

00567
2
28j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**CONTENIDO DE ACIDO MEDICAGENICO
EN 10 VARIEDADES DE ALFALFA (Medicago sativa)**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

P R E S E N T A :

NORMA ALICIA PEREZ FLORES

ASESOR: DRA. SILVIA DENISE PEÑA BETANCOURT



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.

00567

2

28j

18001015

JURADO ASIGNADO SEGUN EL TEMA:

PRESIDENTE: M.C. ANGELA SOTELO LOPEZ
VOCAL: DR. ALFREDO KURT SPROSS
SECRETARIO: M.C. ANGELES VALDIVIA LOPEZ
PRIMER SUPLENTE: M.C. JORGE HARO CASTELLANOS
SEGUNDO SUPLENTE: M.C. LUIS CASTRO ACERO

LUGARES DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

**LABORATORIO DEL POSGRADO DE ALIMENTOS. FACULTAD DE QUIMICA.
UNAM.**

**LABORATORIOS DE BROMATOLOGIA Y BACTERIOLOGIA. U.S.A.D.
UAM-XOCHIMILCO.**

**LABORATORIO DE ACUICULTURA. DEPARTAMENTO DEL HOMBRE Y SU
AMBIENTE. UAM-XOCHIMILCO.**

**LABORATORIO DEL DR. RAUL ENRIQUEZ. INSTITUTO DE QUIMICA.
UNAM.**

A PABLO. Por ser como eres

A PABLO, ARTURO Y ALEJANDRA. Maravillosos hijos

A MIS PADRES. Por su cariño y confianza

A MIS AMIGOS DE LA U.S.A.D.. Por sus consejos y apoyo

A MARIO NOA. Por su ayuda invaluable y su amistad

AGRADEZCO A:

M.C. LUIS CASTRO ACERO. Por las muestras de alfalfa

M.C. FILIBERTO VEGA. Por los peces *Oriochromis mozambicus*

QFB MARTEA JIMENEZ. Por la cepa de *Trichoderma viride*

M.C. CARMEN MARQUEZ Y QFB AGUSTIN RIBO. Por el tiempo que me dedicaron en el manejo del HPLC.

HAGO UN RECONOCIMIENTO ESPECIAL AL DR. RAUL ENRIQUEZ POR SU ASESORIA Y POR PERMITIRME UTILIZAR SU EQUIPO HPLC PARA FINALIZAR ESTE TRABAJO.

MI SINCERO AGRADECIMIENTO A LA DRA. SILVIA PEÑA POR EL PROFESIONALISMO DE SUS ASESORIAS Y POR SU AMISTAD.

INDICE

	Pag.
RESUMEN	
INTRODUCCION.	1
1. REVISION BIBLIOGRAFICA	6
1.1 Alfalfa.	6
1.1.1 Origen e historia.	6
1.1.2 Clasificación taxonómica.	6
1.1.3 Morfología.	6
1.1.4 Especies y variedades botánicas.	7
1.1.5 Distribución.	10
1.1.6 Usos.	13
1.1.7 Composición química.	14
1.2 Saponinas de la alfalfa.	15
1.2.1 Distribución y concentración de las saponinas en la planta.	15
1.2.2 Clasificación de las saponinas de alfalfa.	17
1.2.3 Clasificación de las saponinas de la alfalfa.	21
1.2.4 Azúcares de las saponinas de alfalfa.	24
1.2.5 Actividad biológica de las saponinas de alfalfa.	25
1.2.5.1 Hemólisis.	25
1.2.5.2 Efecto en microorganismos.	26
1.2.5.3 Efecto en la germinación.	28
1.2.5.4 Efecto en animales.	29
1.2.5.5 Efecto en insectos.	31
1.2.5.6 Disminución en los niveles de colesterol tisular y sanguíneo.	33
1.2.5.7 Efecto sobre sistemas enzimáticos.	34
1.2.6 Biosíntesis de las saponinas de alfalfa.	34
1.2.7 Análisis de las saponinas de alfalfa.	37
1.2.7.1 Extracción.	37
1.2.7.2 Detección.	39
1.2.7.3 Purificación.	41
1.2.7.4 Cuantificación.	43
1.2.7.5 Determinación de estructura.	45

1.2.8	Análisis de las saponinas de alfalfa	48
1.2.8.1	Aislamiento y purificación	48
1.2.7.4	Detección y cuantificación	49
1.2.9	Análisis de la fracción glicosídica	52
1.2.9.1	Aislamiento y purificación	52
1.2.9.2	Detección	53
1.2.9.3	Cuantificación	54
1.2.7.4	Determinación de estructura	54
2.	MATERIALES Y METODOS	56
2.1	Muestreo	56
2.2	Extracción de saponinas	57
2.3	Detección de las saponinas	60
2.3.1	Cromatografía en capa fina	60
2.3.2	Hemólisis	61
2.4	Hidrólisis de las saponinas	61
2.5	Aislamiento y detección de saponinas	62
2.6	Aislamiento y detección de azúcares	63
2.7	Extracción y purificación del ácido medicagénico	64
2.8	Cuantificación del ácido medicagénico	65
2.9	Valoración de la actividad biológica de las saponinas	68
2.9.1	Ictiotoxicidad	68
2.9.2	Inhibición del crecimiento del hongo <i>Trichoderma viride</i>	69
2.10	Análisis químico proximal de las alfalfas	71
2.11	Análisis estadístico	72

3. RESULTADOS Y DISCUSION	73
3.1 Saponinas	73
3.1.1 Contenido de saponinas	73
3.1.2 Detección por cromatografía en capa fina.	75
3.1.3 Detección por su actividad hemolítica	78
3.2 Sapogeninas	79
3.2.1 Contenido de sapogeninas	79
3.2.2 Detección por cromatografía en capa fina.	82
3.3 Detección de azúcares por cromatografía en capa fina.	84
3.4 Cuantificación de ácido medicagénico por cromatografía de líquidos de alta resolución.	86
3.5 Actividad biológica	93
3.5.1 Determinación de la actividad ictiotóxica	93
3.5.2 Inhibición del hongo <i>Trichoderma viride</i>	94
3.6 Composición química proximal	97
4. CONCLUSIONES	105
5. BIBLIOGRAFIA	107

INDICE DE FIGURAS

1. Estructura del ácido medicagénico.	2
2. Saponinas aisladas de raíz de alfalfa.	18
3. Saponinas aisladas de follaje de alfalfa.	19
4. Saponinas aisladas de botones y germinados de alfalfa.	20
5. Estructura química de las sapogeninas de alfalfa.	22-23
6. Biosíntesis de sapogeninas.	35
7. Técnica de extracción de saponinas.	59
8. Halo de hemólisis producido por el extracto crudo de saponina de alfalfa.	78
9. Recuperación de ácido medicagénico a diferentes tiempos de hidrólisis. Determinado por HPLC.	81
10. Linealidad de la detección de ácido medicagénico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	86
11. Cromatogramas (HPLC) del estándar de ácido medicagénico y de diez variedades de alfalfa.	88-91

INDICE DE CUADROS

1. Estados productores de alfalfa y superficie sembrada en 1989, 1990 y 1991.	11-12
2. Sapogeninas encontradas en saponinas de alfalfa.	21
3. Efecto de las saponinas de alfalfa en insectos.	32
4. Disolventes utilizados en la extracción de saponinas de alfalfa . . .	38
5. Adsorbentes y sistemas de elución para la detección de saponinas por cromatografía en capa fina (CCF)	40
6. Condiciones de hidrólisis para saponinas de alfalfa.	47
7. Cuantificación de ácido medicagénico por cromatografía de gases (CG)	51
8. Contenido de saponinas en diez variedades de alfalfa.	74
9. Detección de saponinas en diez variedades de alfalfa mediante cromatografía en capa fina.	76
10. Contenido de sapogeninas en diez variedades de alfalfa.	80
11. Detección de sapogeninas en diez variedades de alfalfa mediante cromatografía en capa fina.	83
12. Detección de azúcares en diez variedades de alfalfa mediante cromatografía en capa fina.	85
13. Contenido de ácido medicagénico en diez variedades de alfalfa. .	92
14. Prueba de inhibición del hongo <i>Trichoderma viride</i> en diez variedades de alfalfa.	96
15. Contenido de proteína cruda en diez variedades de alfalfa.	97
16. Contenido de grasa cruda en diez variedades de alfalfa.	98

17. Contenido de cenizas en diez variedades de alfalfa.	99
18. Contenido de fibra cruda en diez variedades de alfalfa.	100
19. Extracto libre de nitrógeno en diez variedades de alfalfa.	101
20. Contenido de proteína cruda, fibra cruda, saponina y ácido medicagénico en diez variedades de alfalfa.	103

RESUMEN

Se determinó el contenido de saponina y de ácido medicagénico (sapogenina con actividad biológica) en diez variedades de alfalfa: Puebla 76, Inia 76, Sintético I, Sintético II, Valenciana, Maxidor, Sundor, Pierce, Cándor y NK-819. Se utilizó la técnica de extracción fraccionada con disolventes para obtener las saponinas. El ácido medicagénico se cuantificó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Los porcentajes de saponina cruda y de ácido medicagénico (en base seca) de las diez variedades fueron: Sundor, 1.76, 0.002; Maxidor, 1.17, 0.003; Valenciana, 0.88, 0.016; Cándor, 0.85, 0.002; Puebla 76, 0.83, 0.010; Inia 76, 0.68, 0.012; NK-819, 0.59, 0.001; Pierce, 0.49, 0.003; Sintético I, 0.46, 0.004 y Sintético II, 0.40, 0.002.

Se encontró que las variedades Sundor, Maxidor y Valenciana fueron las de mayor contenido en saponinas y las variedades Sintético I, Sintético II y la Pierce, las de menor contenido.

Con respecto al ácido medicagénico, las variedades Puebla 76, Inia 76 y Valenciana presentaron los niveles más altos y las variedades Sintético II, Sundor, Cándor y NK-819, los más bajos.

Se evaluó la actividad biológica de las saponinas presentes en las diferentes variedades de alfalfa, mediante dos bioensayos: actividad ictiotóxica e inhibición del hongo *Trichoderma viride*. Las variedades con mayor actividad biológica fueron la Valenciana, Inia 76 y Puebla 76. Se observó una correlación lineal ($r= 0.97$) entre la actividad biológica y la concentración de ácido medicagénico en la planta.

Se estimó la calidad nutritiva de las diez variedades de alfalfa, relacionando sus principales componentes nutritivos (proteína cruda y fibra cruda) con su contenido en saponinas y ácido medicagénico (substancias antinutritivas). Los resultados de este trabajo señalaron a las variedades Sintético II y Pierce como las de mejor calidad nutritiva.

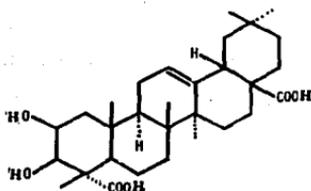
INTRODUCCION

Se considera a la alfalfa como una de las fuentes más ricas de proteína vegetal (Massiot y col., 1988), contiene entre un 18 a un 20% de proteína cruda en base seca. Sin embargo, la presencia de saponinas como metabolitos secundarios mayoritarios, hace que disminuya su calidad nutritiva.

Se ha informado que las saponinas de alfalfa producen algunos efectos antinutricionales en aves, como disminución en la ganancia de peso y en la producción de huevo (Cheeke y col., 1985). Además presentan una diversidad de efectos biológicos, son fungitóxicas, insecticidas, ictiotóxicas y hemolíticas. Algunos autores han señalado su capacidad de disminuir la absorción intestinal del colesterol (Birk y Peri, 1980). También se ha observado que son alelopáticas (Oleszeck y Jurzysta, 1987).

Las saponinas de la alfalfa son glicósidos triterpénicos, que al someterse a hidrólisis liberan moléculas de azúcar y sapogeninas triterpénicas. A través de varios estudios se ha comprobado que el ácido medicagénico (figura 1) es la sapogenina de la alfalfa con mayor actividad biológica (Birk y Peri, 1980).

Figura 1. Estructura del ácido medicagénico



El contenido de saponinas en la alfalfa se ve afectado por factores genéticos, ambientales y de manejo. Sin embargo, se considera que la variedad de la alfalfa es la que influye de manera determinante en la concentración y composición de estos metabolitos, habiendo variedades de alto y de bajo contenido (Birk y Peri., 1980).

En México se siembran tanto variedades de importación como variedades mexicanas criollas y mejoradas, éstas últimas en menor cantidad. De acuerdo a la revisión bibliográfica realizada, los estudios sobre alfalfa se han enfocado principalmente desde dos puntos de vista: agrícola y nutricional. En el primer caso, se ha tratado de definir aquellas variedades más rendidoras y resistentes a plagas y

enfermedades; en el segundo caso, las de mayor contenido protéico. No se encontraron trabajos que caracterizaran a las variedades de alfalfa cultivadas en nuestro país, de acuerdo a su contenido en saponinas o ácido medicagénico, lo cual es determinante para valorar su calidad nutritiva. Por lo que los objetivos de este trabajo fueron:

Caracterizar 10 variedades de alfalfa, incluyendo mexicanas e introducidas, de acuerdo a su contenido de saponinas y de ácido medicagénico.

Evaluar la actividad biológica de las saponinas de las diferentes variedades, puesto que depende en gran medida del ácido medicagénico que contienen.

Establecer entre las variedades, aquéllas de mejor calidad nutritiva, es decir alto contenido de nutrientes y bajos niveles de saponina y ácido medicagénico.

Para alcanzar estos objetivos se realizó una revisión bibliográfica de los métodos de análisis que se han utilizado para el estudio de las saponinas de alfalfa. A partir de ella se desarrolló un esquema analítico que permitió aislar y cuantificar las saponinas y el ácido

medicagénico, así como valorar la actividad biológica de estos compuestos.

Para aislar y cuantificar las saponinas se seleccionó un método de extracción fraccionada por disolventes y se midió el rendimiento del extracto. Para comprobar la presencia de saponinas en el extracto se utilizó la cromatografía en capa fina y una prueba hemolítica.

También se escogió la técnica de cromatografía en capa fina para la detección del ácido medicagénico en las saponinas de cada variedad y la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para su cuantificación. Fue necesario aislar el ácido medicagénico del hidrolizado de saponina, antes de medirlo por HPLC, utilizando cromatografía en capa fina preparativa.

Entre los bioensayos mencionados en la literatura para evaluar la actividad biológica de las saponinas de alfalfa, se seleccionaron la prueba de ictiotoxicidad y la inhibición del hongo *Trichoderma viride*. Los resultados de estas pruebas se relacionaron con los obtenidos por HPLC, considerando que a mayor contenido de ácido medicagénico mayor debía ser la actividad biológica de las saponinas.

La calidad nutritiva de los alimentos destinados a alimentación animal se estima a través de su contenido de macronutrientes, los cuáles son determinados mediante el análisis químico proximal. En este trabajo se utilizó esta metodología para poder caracterizar las variedades de alfalfa de acuerdo a su contenido nutritivo.

Finalmente se determinaron las variedades de alfalfa con mejores características nutritivas, considerando además de sus nutrientes, los niveles de saponinas y ácido medicagénico que contienen.

1. REVISION BIBLIOGRAFICA

1.1 Alfalfa

1.1.1 Origen e historia

Se cree que la alfalfa tuvo su origen en Asia Occidental o Asia Central, las regiones montañosas de la India, el Asia Menor y Transcaucasia (Robles, 1983). Se menciona que fue la primera especie forrajera dominada por el hombre (Cazares, 1988).

1.1.2 Clasificación taxonómica

La alfalfa pertenece a la clase Dicotyledoneae, subdivisión Angiospermae, familia Leguminosae, género Medicago, especie Sativa (Sánchez, 1968).

1.1.3 Morfología

Planta herbácea perenne, con promedio de vida entre 5 y 7 años dependiendo de la variedad, clima, agua y suelo. Alcanza alturas de 60 a 90 cm. Sus hojas son trifoliadas y las flores son libres, pequeñas y localizadas en densos racimos axilares, generalmente son de color morado, pero algunas veces son amarillas según la variedad. Los frutos son vainas curvadas en espiral y contienen de 2 a 6

semillas ovaladas o arrifonadas de color amarillo verdoso o café claro; con una longitud de 1.5 mm.

1.1.4 Especies y variedades botánicas

Se señalan (Small y col. 1990) tres grupos básicos en la especie:

1. Plantas con flores violetas y frutos en espiral
 - a) *Medicago sativa* ssp. *caerulea*. Silvestre diploide, localizada desde el este de Turquía al centro de la desaparecida Unión Soviética.
 - b) *Medicago sativa* ssp. *sativa*. Tetraploide, silvestres y cultivadas.

2. *Medicago sativa* ssp. *falcata*. Plantas con flores amarillas y frutos en forma de luna. Principalmente diploides pero con algunas tetraploides nativas de Eurasia.

3. *Medicago sativa* ssp. *glomerata*. Flores amarillas, frutos glandulares en espiral. Diploides y tetraploides. Encontradas en el sur de Europa,

Caucasia y las montañas del norte de Africa. Grupo con importancia agronómica limitada.

Los híbridos y recombinantes se generan a partir de estos 3 grupos. Siendo los más notables entre las subespecies *sativa* con *falcata*, así como *caerulea* con *falcata*. Se les asigna el taxon *M. sativa* ssp x *varia*.

En el mundo existen numerosos ecotipos espontáneos y/o variedades adaptadas a las más diversas condiciones de clima, suelo y explotación (Muslera y Ratera, 1983). Mundialmente se producen nuevos híbridos mejorados, por lo que la lista de variedades se hace interminable (Flores, 1981).

En México, debido a la baja producción de semilla de alfalfa certificada, normalmente se tiene que recurrir a importaciones. Anualmente se importan 3 225 toneladas para satisfacer el 90% de la demanda nacional, ya que sólo un 10% se cubre con semilla de variedades criollas producidas en distintas regiones del país (Castro, 1990a).

Variedades mexicanas criollas.

Son aquéllas introducidas pero que con el tiempo se han adaptado perfectamente a una región específica. Se obtienen por selección natural (Robles, 1983). Entre ellas se encuentran: Atlixco (Puebla); Atoyac (Jalisco); Navojoa (Sonora); Oaxaqueña (Oaxaca); San Miguelito (Guanajuato); Tanhuato, Zacapu y Tanverde (Michoacán).

Variedades mexicanas mejoradas.

El Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA, actualmente INIFAP), en la década de los setentas, desarrolló ciertas variedades mejoradas (Flores, 1981). Entre ellas la Inia 76, Puebla 76, Bajío 76 y Mixteca 76, las tres primeras fueron recomendadas para los estados de Guanajuato, Michoacán, México, Puebla, Aguascalientes y Distrito Federal; la última para los estados de Puebla y Oaxaca.

En 1982, el Programa de Mejoramiento Genético de Forrajes del CEVAMEX (Centro Experimental Valle de México del INIFAP) generó dos variedades sintéticas de alfalfa, a las que denominaron Sintético I y Sintético II (Castro, 1990a,b), con mayor producción en materia verde y materia

seca que las variedades introducidas: Cóndor, Maxidor, Pierce y NK-819 (Castro, 1992).

Variedades extranjeras.

Muchas variedades se han introducido al país, entre las más difundidas están: Moapa, Valenciana (Aragón), Velluda peruana, NK-819, Africana, San Joaquín II, Caliverde y El Camino (Robles, 1983; Flores, 1981). Sin embargo, nuevas variedades se introducen continuamente al país, las cuales deben estar avaladas por el INIFAP para que puedan ser recomendadas para su siembra (Castro, 1992)

1.1.5 Distribución

La alfalfa tiene una amplia distribución en el mundo debido a su notable adaptabilidad a climas y suelos (Robles 1983). Con una superficie estimada en 32 millones de hectáreas (Small y col., 1990).

En México, la alfalfa se siembra en una superficie aproximada de 296 mil hectáreas (S.A.R.H., 1992). En el cuadro 1 se pueden observar los principales estados productores y la superficie sembrada durante 1989, 1990 y 1991.

Cuadro 1. Estados productores de alfalfa y superficie sembrada durante 1989,1990 y 1991.

Estado	Superficie sembrada (hectáreas)		
	1989	1990	1991
Aguascalientes	8 378	7 952	8 234
Baja California	22 446	21 729	21 216
Coahuila	9 181	8 236	14 418
Chiapas	3		
Chihuahua	45 527	48 182	48 298
Distrito Federal	63		
Durango	25 658	11 870	14 483
Guanajuato	53 247	54 759	53 984
Guerrero			13
Hidalgo	30 827		32 423
Jalisco	7 940	7 216	8 326
Edo. México	13 924	14 349	12 204
Michoacán			3 996
Morelos	124	470	139

continúa

Cuadro 1. Estados productores de alfalfa y superficie sembrada en 1989, 1990 y 1991. (Continúa)

Estado	Superficie sembrada (hectáreas)		
	1989	1990	1991
Nayarit	—	—	19
Nuevo León	2 885	1 902	2 184
Oaxaca	3 982	3 617	3 050
Puebla	11 034	—	12 109
Querétaro	4 123	4 750	10 220
San Luis Potosí	10 909	11 248	11 105
Sinaloa	12 682	3 878	3 895
Sonora	19 078	19 697	19 697
Tamaulipas	—	40	212
Tlaxcala	4 366	4 394	3 000
Veracruz	—	—	366
Zacatecas	4 585	5 199	5 586
Total	290 962	255 684	296 393

Fuente: Dirección General de Estadística, S.A.R.H. (1992)

1.1.6 Usos

En el ganado bovino lechero, la alfalfa se utiliza preferentemente como planta de corte para consumo en estado verde (Flores, 1981). Aunque también se utiliza henificada, ensilada, como harina de alfalfa, en pastillas o pellets y como concentrado protéico (Muslera y Ratera, 1983).

La alfalfa también se emplea en la alimentación humana principalmente en forma de germinados hidropónicos. Estos son las primeras etapas de desarrollo de la plántula, generalmente de 5 a 7 días (Ponce, 1993).

En los últimos años se ha incrementado el uso de alimentos naturistas y entre ellos podemos encontrar cápsulas de harina de alfalfa que se venden como complemento protéico. En México, el problema principal con estos productos naturistas es que son elaborados en condiciones poco higiénicas, por lo que presentan una alta contaminación microbiana. Garzón y col. (1993) aislaron estafilococos y hongos en cápsulas de harina de alfalfa .

1.1.7 Composición química.

A continuación se presenta el análisis químico proximal promedio de la alfalfa (*Medicago sativa* L.). Los valores indicados están expresados como porcentajes (Flores, 1981).

	Verde	Heno
Agua	77.99	8.50
Proteína cruda (N X 6.25)	3.59	16.01
Carbohidratos	8.43	40.55
Fibra cruda	6.88	24.26
Grasa cruda	0.73	2.73
Cenizas	2.47	7.95

En la alfalfa se han encontrado una serie de compuestos químicos de diferentes tipos, entre los que destacan: saponinas triterpénicas, glicoproteína inhibidora de la tripsina (Birk y Peri, 1980), la fito-hormona cumestrol (Muslera y Ratera, 1983), el aminoácido tóxico canavanina, compuestos fenólicos y bases cuaternarias de amonio (Gorski y col., 1991).

1.2 Saponinas de la alfalfa

Se sabe que la alfalfa contiene como metabolitos secundarios, saponinas con propiedades antinutricionales. Debido a la importancia económica que tiene la alfalfa en la nutrición animal, el estudio químico de estas sustancias ha sido ampliamente investigado en las últimas dos décadas.

1.2.1 Distribución y concentración de las saponinas en la planta

Las saponinas se encuentran en la raíz, tallo, hojas, flores y semillas de la alfalfa. Sin embargo, existen diferencias cualitativas y cuantitativas en las saponinas de cada parte de la planta (Birk y Peri, 1980). También se han encontrado saponinas en germinados (Gorski y col., 1991), en botones (Morris y Hussey, 1964) y en callos y cultivos en suspensión de células de alfalfa (Besson y col., 1988).

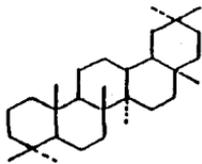
El contenido de saponinas en la alfalfa se ve afectado por factores genéticos, ambientales y de manejo. Se ha observado que la concentración de saponinas sigue un ciclo

estacional, alto en verano y bajo en primavera y otoño (Cheeke y Shull, 1985). Sin embargo, se considera que la variedad de la alfalfa es la que influye de manera determinante en la concentración y composición de estos metabolitos, encontrándose hasta un 16% de variación en el contenido total de saponinas entre diferentes variedades de forraje de alfalfa (Birk y Peri, 1980).

El contenido promedio de saponinas en diferentes partes de la planta es: 30.0 g/Kg en raíz, 1.3 g/Kg en semilla, 2.0 g/Kg en concentrados protéicos de hoja, aunque la variedad de la alfalfa y su época de recolección influyen de manera importante en estas concentraciones (Massiot y col., 1988).

1.2.2 Clasificación de las saponinas de alfalfa

Las saponinas de la alfalfa son glicósidos triterpénicos (pentacíclicos) cuyas agliconas o sapogeninas pertenecen a la serie oleanano .

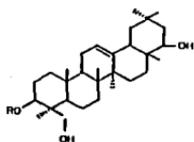


Son mezclas muy complejas de mono, bi y tridesmósidos (una, dos o tres cadenas glicosídicas en el grupo aglicón); pueden contener entre 15 y 20 saponinas diferentes (Oleszek, 1988, 1990).

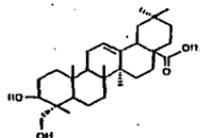
En las figuras 2, 3 y 4 se pueden ver las saponinas que se han aislado de la raíz, follaje (hojas y tallos), botones y germinados de la alfalfa, respectivamente.

Figura 2. Saponinas aisladas de raíz de alfalfa.

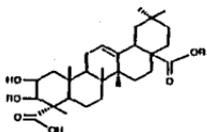
Soyasapogenol B



Hederagenina



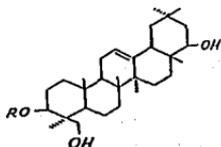
Acido medicagénico



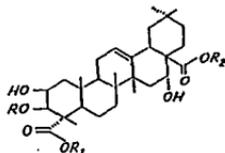
Sapogenina	R	R ₁	Referencias
Ac. Medicagénico	Glucosa	Arabinosa-Ramnosa-Xilosa	Oleszek y col., 1990.
Ac. Medicagénico	Glucosa	Glucosa	Oleszek y col., 1990.
Ac. Medicagénico	Ac. glucurónico	Arabinosa-Ramnosa-Xilosa	Oleszek y col., 1990.
Ac. Medicagénico	Glucosa	Hidrógeno	Levy y col., 1986; Oleszek y col., 1988; Oleszek y col., 1990.
Ac. Medicagénico	Glucosa	Arabinosa-Ramnosa	Timbekova y col., 1990.
Hederagenina	Arabinosa-Glucosa-Arabinosa	Hidrógeno	Oleszek y col., 1990.
Soyasapogenol B	Ac. glucurónico-Galactosa-Ramnosa		Oleszek y col., 1990.

Figura 3. Saponinas aisladas de follaje de alfalfa.

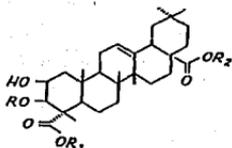
Soyasapogenol B



Acido Zánico



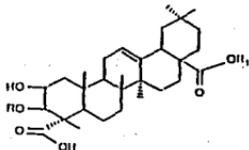
Acido Medicagénico



Saponina	R	R ₁	R ₂	Referencias
Ac. Medicagénico	Ac. Glucurónico	Hidrógeno	Arabinosa-Ramnosa	Oleszek y col., 1992
Ac. Medicagénico	Ac. Glucurónico	Hidrógeno	Arabinosa-Ramnosa- Xilosa	Oleszek y col., 1992; Massiot y col., 1991.
Ac. Medicagénico	Glucosa	Hidrógeno	Arabinosa-Ramnosa- Xilosa	Oleszek y col., 1992; Massiot y col., 1991.
Ac. Medicagénico	Glucosa-Glucosa	Hidrógeno	Arabinosa-Ramnosa- Xilosa	Oleszek y col., 1992; Massiot y col., 1991.
Ac. Medicagénico	Hidrógeno	Hidrógeno	Arabinosa-Ramnosa- Xilosa	Massiot y col., 1991.
Ac. Zánico	Glucosa-Glucosa- Glucosa	Arabinosa	Arabinosa-Ramnosa- Xilosa-Apioasa	Oleszek y col., 1992
Soyasapogenol B	Ac. glucurónico- Galactosa-Ramnosa	-	-	Oleszek y col., 1992
Soyasapogenol B	Ac. glucurónico- Glucosa-Ramnosa	-	-	Massiot y col., 1991.

Figura 4. Saponinas aisladas de botones y germinados de alfalfa.

Acido Medicagénico



Sapogenina	R	R'	Fuente	Referencia
Ac. Medicagénico	Ramnosa-Glucosa -Glucosa	Hidrógeno	botones	Morris y Hussey, 1964.
Ac. Medicagénico	Glucosa	Hidrógeno	germinados	Oleszek, 1988.
Ac. Medicagénico	Glucosa	Glucosa	germinados	Oleszek, 1988.

1.2.3 Clasificación de las saponinas de alfalfa

Las saponinas triterpénicas de la alfalfa pueden ser de dos tipos: neutras y ácidas. Las primeras presentan sólo grupos hidroxilo y las segundas, tanto grupos carboxilo como hidroxilo. En el cuadro 2 se presentan las saponinas que se han identificado en las saponinas de la alfalfa y en la figura 6, la estructura química de ellas.

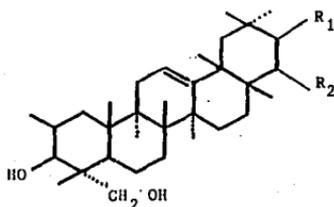
Cuadro 2. Saponinas encontradas en saponinas de alfalfa

	Parte de la planta					
	Raíz	Hojas	Semillas	Callos	Germi nados	Botones
Saponinas neutras						
Soyasapogenol C	X		X			
Soyasapogenol E	X	X	X			
Soyasapogenol B		X	X	X		
Soyasapogenol A	X	X				
Saponinas ácidas						
Hederagenina	X	X				
Bayogenina	X	X				
Ac. Hedicagénico	X	X		X	X	X
Ac. Zánico	X	X				

Fuente: Adaptado de Morris y Hussey, 1964; Massiot y col., 1987; Besson y col., 1989; Gorski y col., 1991; Jurzysta y col., 1992.

Figura 5. Estructura química de las sapogeninas de alfalfa.

Sapogeninas neutras

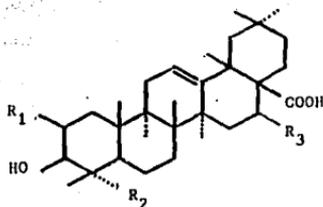


	R ₁	R ₂
Soyasapogenol A	OH	OH
Soyasapogenol B	H	OH
Soyasapogenol C		
Soyasapogenol E	H	=O

continúa

Figura 5. (Continúa)

Sapogeninas ácidas



	R ₁	R ₂	R ₃
Acido medicagénico	OH	COOH	H
Hederagenina	H	CH ₂ OH	H
Bayogenina	OH	CH ₂ OH	H
Acido zánico	OH	COOH	OH

Fuente: Massiot y col., 1988

1.2.4 Azúcares de las saponinas de alfalfa

Los azúcares que se han encontrado en las saponinas de alfalfa son: glucosa, ramnosa, xilosa, galactosa, ácido glucurónico, arabinosa, soforosa y apiosa (Birk y Peri, 1980; Jurzysta y col., 1984; Massiot y col., 1988, 1991; Oleszek y col., 1990a, 1992).

Se ha visto que los residuos glicosídicos se unen a la sapogenina en los grupos hidroxilo o carboxilo en las posiciones 3, 23 y 28. Esta unión puede incluir sólo un monosacárido o un oligosacárido.

A principios de la década de los setentas se estudió la relación sapogenina/carbohidrato de las saponinas de alfalfa, encontrándose que las extraídas del follaje contenían casi el doble de azúcar que las de raíz. Posteriormente, en la década de los ochentas, se informó que en las saponinas conteniendo los soyasapogenoles A, B, C, D y E como aglicón, la relación sapogenina/carbohidrato era de 1 a 5 (Birk y Peri, 1980).

1.2.5 Actividad biológica de la saponinas de alfalfa

1.2.5.1 Hemólisis

Algunas de las saponinas de la alfalfa tienen como propiedad característica lisar los glóbulos rojos. Esta acción se atribuye a la interacción de estas sustancias con el colesterol presente en la membrana de los eritrocitos (Birk y Peri, 1980).

Las saponinas de alfalfa que presentan actividad hemolítica son aquéllas que tienen como grupos aglicón el ácido medicagénico (Birk y Peri, 1980), la hederagenina (Oleszek,1990) y el ácido zánico (Oleszek y col.,1992). En cambio las que tienen soyasapogenoles como aglicones no presentan esta actividad.Además se ha encontrado que los monodesmósidos presentan mayor actividad hemolítica que los bidesmósidos (Oleszek 1990) y que los tridesmósidos (Oleszek y col., 1992).

Se han observado (Jones y Elliott, 1969; Birk y Peri, 1980) diferencias en el grado de hemólisis producida por los extractos de saponina obtenidos de hoja, tallo y raíz. Estos últimos presentaron más fuerza hemolítica, lo que se atribuyó a su mayor relación sapogenina/azúcar.

En un estudio realizado en las hojas de 1213 especímenes de alfalfa, de herbario, Small y col. (1990) observaron que el contenido de saponinas hemolíticas en las plantas de alfalfa era alto para *Medicago spp falcata* (silvestre), medio para *Medicago spp sativa* y *Medicago spp Xvaria* (silvestres y cultivadas, canadienses y europeas) y bajo en *Medicago spp sativa* procedentes de Turquía. Concluyeron que el contenido de saponinas hemolíticas era una característica taxonómica.

Se han encontrado saponinas hemolíticas en germinados de alfalfa comerciales (consumidos como ingredientes de ensaladas) en una concentración del 8% (Small y col., 1990).

1.2.5.2 Efecto en microorganismos

Las saponinas de alfalfa presentan toxicidad selectiva hacia diversas especies de hongos y bacterias. Se ha observado que el desarrollo puede ser inhibido, estimulado o no afectado. Entre los microorganismos que presentaron mayor inhibición están: *Trichoderma viride*, *Pythium spp.* y *Sclerotium rolsfii*; el primero de los cuales se ha venido

utilizando para detectar la actividad biológica de las saponinas de alfalfa (Birk y Peri,1980).

Las saponinas que presentan actividad fungistática o fungicida son las que tienen las sapogeninas ácidas. Se encontró que los grupos carboxilo del ácido medicagénico eran esenciales para la inhibición del crecimiento fúngico, pues cuando se bloquearon, metilándolos, se redujo su actividad depresora (Birk y Peri,1980). Lo mismo se observó con el ácido zánico, pues su monodesmósido producía inhibición y sin embargo el tridesmósido no lo hacía, por tener sus dos grupos carboxilo bloqueados (Oleszek y col. 1992).

El mecanismo a través del cual las saponinas de alfalfa logran inhibir el crecimiento fúngico, no se ha podido explicar totalmente. Varios investigadores han coincidido en que las saponinas interaccionan con los esteroides presentes en la membrana celular, ocasionando cambios drásticos en la permeabilidad de las membranas. Sin embargo, algunos otros han señalado que la acción de las saponinas no se centra en los esteroides, sino sobre otros constituyentes de la membrana como proteínas y

fosfolípidos; lo que explicaba que algunos hongos sin esteroides en sus membranas, fueran también inhibidos por las saponinas (Birk y Peri, 1980).

1.2.5.3 Efecto en la germinación

Se encontró un 25% de inhibición en la germinación de semillas de algodón sembradas en suelo donde se había cultivado alfalfa por tres años consecutivos; esto ocasionado por el efecto surfactante de las saponinas sobre la cubierta de la semilla (Birk y Peri, 1980).

Oleszek y Jurzysta (1987) encontraron un 40% de inhibición en la germinación de semillas de trigo, germinadas en cajas petri con papel filtro saturado con extractos acuosos y etanólicos de raíz de alfalfa. Gorski y col.(1992) encontraron que el ácido medicagénico y los glicósidos que lo contienen inhibían el desarrollo de las semillas de berro (*Lepidium sativum* L.) y de amaranto (*Amaranthus caudatus* L.), observando este mismo efecto en el cultivo de tejidos de jitomate (*Lycopersicon esculentum* Mill cv. Lukullus).

1.2.5.4 Efecto en animales

Se ha señalado que las saponinas de la alfalfa tienen un efecto negativo en el desarrollo de animales monogástricos como ratones, ratas, conejos, conejillos de India y aves, siendo éstas últimas las más sensibles (Birk y Peri, 1980). Se encontró que niveles de saponina de alfalfa entre 0.1 y 0.2% en la dieta, retardaban el crecimiento de pollitos; mientras que para ratones, ratas, conejos y conejillos de India se necesitaron concentraciones entre 2 y 3%.

En cerdos alimentados con raciones conteniendo entre 20% y 75% de alfalfa, no se observaron efectos negativos (Aparicio y col., 1987; Birk y Peri, 1980).

Por muchos años se consideró a las saponinas agentes causales del timpanismo (meteorismo) en los rumiantes, debido a su propiedad de formar espumas estables. Sin embargo se ha encontrado que las fracciones de proteína citoplasmática soluble (18 S o Fracción I) presentes en la alfalfa, parecen ser las principales causantes de este efecto. Además no se encontró diferencia en la incidencia

de timpanismo en ganado alimentado con alfalfas de bajo y alto contenido en saponinas (Cheeke y Shull, 1985).

Lu y Jorgensen (1987) observaron, en carneros fistulados, que las saponinas de alfalfa afectan el sitio y grado de digestibilidad de los nutrientes en estos rumiantes, ya que producen una reducción en la fermentación microbiana ruminal, en la cuenta protozónica y en el flujo de nitrógeno bacteriano hacia el duodeno. Encontraron que el efecto de las saponinas de alfalfa, al administrarlas directamente al rumen de los animales, era más pronunciado en dietas a base de forrajes que en dietas a base de concentrados.

Se han sugerido varios mecanismos para explicar cómo las saponinas pueden afectar el crecimiento en los animales, siendo éstos: inhibición enzimática, efecto anoréxico y disminución en la palatabilidad del alimento. Aunque éste último se considera la principal causa, ya que las saponinas, al ser sustancias amargas disminuyen el consumo voluntario del alimento (Cheeke y Shull, 1985).

1.2.5.5 Efecto en Insectos (Birk y Peri, 1980)

Las saponinas de alfalfa actúan como repelentes o inhibidores de insectos, especialmente en los polívoros como gallina ciega, pulgón y chicharrita. En el caso de insectos oligófagos, especializados en alfalfa, el efecto no es constante, lo que puede deberse a una adaptación progresiva a las saponinas. En el cuadro 3 se indica el efecto de las saponinas de alfalfa en algunos insectos.

Se ha encontrado mayor toxicidad en saponinas de raíz que en las de follaje de alfalfa. Con respecto a éstas últimas, se observó que eran más tóxicas las que presentaban mayor concentración de ácido medicagénico .

No se ha podido establecer si existe correlación entre resistencia a plagas y contenido de saponinas en la alfalfa, ya que en la literatura se han informado resultados contradictorios.

La forma de acción de las saponinas de alfalfa sobre los insectos no se ha demostrado claramente. Se ha propuesto

Cuadro 3.-Efecto de las saponinas de alfalfa en insectos.

Insecto	Efecto	Investigador
<i>Melolontha vulgaris</i> F.	Tóxico	Horber
<i>Empasca fabae</i>	Tóxico	Horber y col.
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	Tóxico	Horber y col.
<i>Blatta orientalis</i>	Repelencia	Horber y col.
<i>Tribolium castaneum</i>	Tóxico	Shany y col.; Gestetner y col.
<i>Megachile rotundata</i> F.	Tóxico	Thorp y Briggs
<i>Megachile pacifica</i>	Tóxico	Bohart
<i>Drosophila funebris</i> L.	Inhibición en la formación de larvas	Hsiao
<i>Hypera postica</i> Gyll.	Inocuo	Hsiao

Fuente: Birk y Peri, 1980

que producen antibiosis, debido a cambios morfológicos en el intestino que ocasionan problemas en la absorción de agua e inhibición en la actividad enzimática. Por otro lado se señala que producen inanición por rechazo en el consumo del alimento.

1.2.5.6 Disminución en los niveles de colesterol tisular y sanguíneo

Se ha observado que las saponinas de alfalfa reducen los niveles de colesterol plasmático en animales como ratas, monos, conejos, caballos y aves. En experimentos realizados en ratones, se encontró que las saponinas disminuían el nivel de colesterol hepático, al mismo tiempo que aumentaba la cantidad de colesterol excretado en las heces (Birk y Peri, 1980).

Para explicar esta actividad, Birk y Peri (1980), señalaron que las saponinas forman complejos insolubles con el colesterol, inhibiendo de esta forma la absorción a nivel intestinal. Sin embargo se ha observado que la disminución de la concentración de colesterol en plasma se puede producir sin necesidad de que se forme un complejo, por lo que también se ha propuesto que las saponinas incrementan la pérdida de ácidos biliares por vía fecal y esta disminución parece estar balanceada con una conversión de colesterol en ácidos biliares en el hígado (Uribe, 1987).

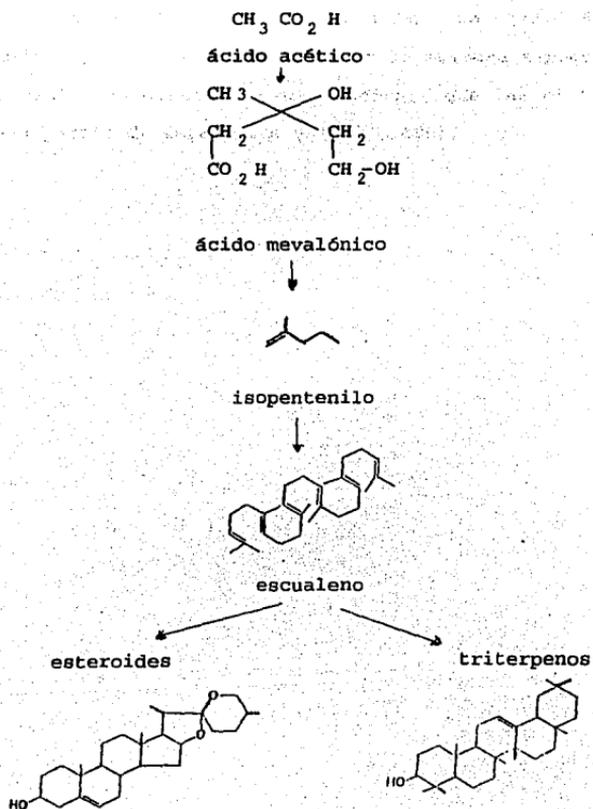
1.2.5.7 Efecto sobre sistemas enzimáticos

Se ha informado que las saponinas de alfalfa inhiben, *in vitro*, la acción de la succinoxidasa obtenida de hígado de rata. Dado que esta enzima interviene en las reacciones energéticas del ciclo del ácido cítrico, se propuso que esta acción podía afectar la eficiencia en la utilización de los nutrientes y por lo tanto el desarrollo del animal (Birk y Peri, 1980).

1.2.6 Biosíntesis de las saponinas de alfalfa

Al incubar semillas de alfalfa con ácido mevalónico radiactivo se obtuvieron saponinas y sapogeninas marcadas. Estos resultados apoyan el esquema biosintético donde el ácido mevalónico sirve como base para las unidades isoprenoides de 5 átomos de carbono, a partir de las cuales se forma el escualeno. Este último es el precursor de los triterpenoides policíclicos. En la figura 6 se esquematiza al proceso.

Figura 6. Biosíntesis de saponinas (Adaptado de Porter y Spurgeon, 1981; Tyler, 1981)



En un experimento realizado en germinados de semillas de alfalfa (*Medicago media*), utilizando acetato ($2-^{14}C$), se observó que durante los 10 primeros días de germinación, la mayor radioactividad se encontraba en el ácido medicagénico, sugiriendo que éste es la primera sapogenina que se sintetiza durante la germinación y que las otras se forman a partir de ésta (Birk y Peri, 1980).

1.2.7 Análisis de las saponinas de alfalfa

A continuación se tratarán las diferentes metodologías que se han utilizado para extraer, detectar, purificar y cuantificar las saponinas de alfalfa.

1.2.7.1 Extracción

A lo largo de casi 50 años de estudios sobre las saponinas de alfalfa, las técnicas mencionadas en la literatura son numerosas y variadas. Sin embargo el sistema de extracción más comunmente utilizado consiste en tratar el material vegetal seco y pulverizado con soluciones acuosas de etanol o metanol en caliente (cuadro 4).

En cuanto al tiempo de extracción utilizado la variación es tan amplia que puede ir desde 10 minutos hasta varias horas (Besson y col., 1989; Levy y col., 1986; Massiot y col., 1988; Oleszek y col., 1988,1990,1992; Rao y Borjes 1987).

Cuadro 4. Disolventes utilizados en la extracción de saponinas de alfalfa.

Soluciones acuosas de:	Referencia
Metanol 30%	Oleszek, 1991
Metanol 80%	Massiott, 1988 y 1991; Oleszek 1988;
Etanol 20%	Rao y Bories, 1987
Etanol 80%	Oleszek, 1990; Levy y col., 1986; Gorski y col., 1991.
Etanol 95%	Morris y Hussey, 1964;

Las soluciones alcohólicas obtenidas se filtran y se concentran al vacío para eliminar el alcohol. Ya teniendo el concentrado acuoso, las saponinas se pueden obtener por diferentes procedimientos.

- a) Extracción fraccionada.- El extracto acuoso se extrae con disolventes orgánicos como cloroformo, éter etílico o benceno para eliminar materias grasa y pigmentos como clorofilas (Levy y col., 1986). Finalmente se utiliza el n-butanol saturado con agua, para extraer las saponinas (Besson, y col., 1989; Rao y Bories, 1987; Visag y Peña, 1991). El

extracto butanólico constituye, en general, lo que se conoce como saponina cruda o bruta.

- b) Por precipitación.- El extracto acuoso se evapora a sequedad y el residuo se resuspende en metanol caliente. Se le adicionan 5 volúmenes de eter etílico para que las saponinas precipiten y se recuperan por filtración (Massiot y col., 1988). El residuo es la saponina cruda.

- c) Por separación cromatográfica.- El extracto acuoso se trata por cromatografía en columna o por extracción en fase sólida . Estos métodos permiten extraer glicósidos individuales.

1.2.7.2 Detección

El método generalmente utilizado para la detección de las saponinas extraídas, es la cromatografía en capa fina. En el cuadro 5 se presentan algunos de los adsorbentes y sistemas de elución más comunes.

Cuadro 5. Adsorbentes y sistemas de elución para la detección de saponinas por cromatografía en capa fina (CCF)

Adsorbente	Sistema de elución	Referencia
Silicagel G	Acido acético - ciclohexano (1:2 v/v)	Morris y Hussey 1964
	Butanol-ácido acético -agua (4:1:1 v/v)	Berrang y col. 1974
Silicagel 60 F254	Acetato de etilo- agua-ácido acético (7:2:2 v/v)	Oleszek y col. 1988, 1990, 1992
Silicagel C-18	Metanol-agua-ácido acético (60:40:0.5 v/v)	Oleszek y col. 1992

Los reveladores que se han utilizado en la cromatografía en capa fina (CCF) de saponinas de alfalfa son los vapores de yodo (Morris y Hussey, 1964) y la mezcla metanol- anhídrido acético- ácido sulfúrico (50:5:5 v/v) con calentamiento a 120 °C (Oleszek y col., 1988, 1990, 1992)

1.2.7.3 Purificación

Para eliminar las impurezas (azúcares y fenoles) que generalmente acompañan al extracto crudo de saponina se ha utilizado la cromatografía en columna, la diálisis, la precipitación y recientemente la extracción en fase sólida.

Cromatografía en columna.- Durante muchos años el adsorbente más utilizado ha sido la sílicagel (Levy y col., 1986; Timbekova y col., 1990); sin embargo, en los últimos años se ha encontrado que la sílicagel C-18 (fase reversa) ofrece mejores resultados (Oleszek y col., 1990, 1992).

Los sistemas de elución que se han utilizado con la sílicagel consisten en mezclas binarias y ternarias de disolventes como acetato de etilo, ácido acético, agua, metanol, cloroformo, benceno y acetona (Levy y col., 1986; Timbekova y col., 1990). Para la sílicagel C-18, las mezclas son a partir de metanol y agua; encontrándose que concentraciones del 35% de metanol eliminan fenoles y azúcares (Oleszek y col., 1990, 1992).

Diálisis.- Massiot y col., (1988,1991) y Besson y col.(1989) utilizaron la diálisis en membrana de celulosa para purificar el residuo de saponina cruda. El tiempo de diálisis fue de 3 a 4 días. Con este procedimiento eliminaron impurezas de bajo peso molecular como azúcares libres.

Precipitación.- La saponina cruda se puede purificar someténdola a una serie de precipitaciones con metanol y éter etílico (Jurzysta y col., 1984; Massiot y col., 1988,1990; Besson y col., 1989).

Fase sólida.- Oleszek (1988) utilizó cartuchos de sílicagel C-18 para eliminar carbohidratos y compuestos fenólicos del extracto crudo de saponina, utilizando como eluyentes agua y metanol acuoso (10-40% v/v).

La purificación de las saponinas va más allá de la sola eliminación de impurezas, ya que para conocer los glicósidos individuales que las integran, es imprescindible separarlas.

Las técnicas de cromatografía en columna, así como la extracción en fase sólida, antes mencionadas, han sido

utilizadas tanto para purificar como para separar las saponinas de la alfalfa.

En los últimos años, la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) preparativa, ha sido muy utilizada para la separación y purificación de las complejas mezclas de las saponinas de alfalfa. Se han utilizado columnas de silicagel 60 y de sílica C-18 y como eluyentes metanol-agua-ácido acético (75:25:0.5 v/v; 60:40:0.5 v/v) y acetato de etilo-ácido acético-agua (9:2:2 v/v) para las primeras y cloroformo-metanol-agua (7:3:1 v/v) para las segundas (Oleszek y col., 1990, 1992).

Massiot y col. (1991) utilizaron cromatografía "flash" en columnas de silicagel y como eluyentes mezclas de cloroformo-metanol-agua y cloroformo-hexano-metanol a diferentes concentraciones.

1.2.7.4 Cuantificación

El primer paso para la cuantificación de saponinas consiste en determinar el rendimiento de los extractos obtenidos tanto crudos como purificados.

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se ha convertido en una herramienta muy útil para la

cuantificación de saponinas (Massiot y col., 1988, 1991; Oleszek 1990, 1992).

Los bioensayos se han utilizado por muchos años para determinar el contenido de saponinas en la alfalfa. Estos ensayos no cuantifican el total de saponinas sino sólo aquellas que tienen actividad biológica, principalmente las que contienen al ácido medicagénico y a la hederagenina como aglicones (Birk y Peri., 1980, Oleszek y col., 1992). Dentro de los bioensayos que se han utilizado se encuentran:

Hemólisis.- Se han señalado dos métodos. Uno se basa en la cuantificación colorimétrica de la hemoglobina liberada a partir de una solución de sangre de origen animal a la que se añade la saponina en diferentes concentraciones (Jones y Elliott, 1969; Oleszek, 1990). La otra se basa en la medición de halos de hemólisis formados por la aplicación de soluciones de saponinas sobre una capa delgada de gelatina con sangre (Small y col., 1990).

Ictiotoxicidad.- Jones y Elliott (1969) estimaron el contenido de saponina cruda en alfalfa mediante un ensayo con peces; relacionando el tiempo de inmovilización del

pez, en el extracto acuoso de las alfalfas, con el contenido de saponina.

Inhibición del hongo *Trichoderma viride*.- Es uno de los bioensayos que más se ha utilizado en la cuantificación de saponinas "biológicamente activas", ya que el hongo saprófito *Trichoderma viride* (común en el suelo) es muy sensible a las saponinas de alfalfa. En esta prueba se relaciona el halo de inhibición del hongo con la cantidad de saponina (Jurzysta y col., 1984; Levy y col., 1986; Oleszek y col., 1990, 1992; Stuteville y Skinner, 1987).

1.2.7.5 Determinación de estructura

El estudio estructural de las saponinas se ha realizado a través de la resonancia magnética nuclear (RMN) del carbono 13 y de protón (H^1 , C^{13}) y la espectrometría de masas (M) de sus productos de hidrólisis, es decir, los azúcares y aglicones triterpénicos que las constituyen (Massiot y col, 1991; Oleszek y col., 1992; Timbekova y col, 1990). Para hidrolizar las saponinas de alfalfa se han utilizado

tanto la hidrólisis ácida como la alcalina:

a) Hidrólisis ácida.- Esta hidrólisis rompe los enlaces glicosídicos liberando la saponina. El tipo de ácido empleado, su concentración y el tiempo de hidrólisis es muy variable, como se puede observar en el cuadro 6.

b) Hidrólisis alcalina.- Ha sido utilizada por Oleszek y col. (1992) y Nowacka y Oleszek (1992) para obtener compuestos incompletos de hidrólisis, llamados prosapogeninas que ayudan al establecimiento de la estructura de las saponinas. Estos autores emplearon hidróxido de potasio al 5% acuoso o metanólico, en reflujo por 4 y 2 horas respectivamente. En la hidrólisis alcalina se separan los azúcares que están unidos a la saponina a través de un enlace éster.

Cuadro 6. Condiciones de hidrólisis para saponinas de alfalfa.

Acido	Concen- tración	Tiempo de hidrólisis	Referencia
Clorhídrico- etanólico	3N	90 horas ¹	Morris y Hussey, 1964
Clorhídrico- (metanol-agua 50:50 v/v)	2N	20 horas ¹	Jurzysta y col., 1984 Oleszek, 1990
		8 horas ¹	
Clorhídrico	4M	4 horas ¹	Oleszek, 1988
Sulfúrico- (dioxano:agua 1:3 v/v)	1N	5 horas ¹	Rao y Bories, 1987
	0.5M	12-15 horas ¹	
Sulfúrico- metanólico	0.5%	3 horas ¹	Timbekova y col., 1990
Perclórico	4%	2 horas ²	Massiot y col., 1988 Besson y col., 1989
	2%	2 horas ²	

1) En reflujo a 100 ° C

2) En recipientes sellados de pared gruesa a 140 ° C.

1.2.8 Análisis de las saponinas de alfalfa

1.2.8.1 Aislamiento y purificación

Una vez hidrolizadas las saponinas es necesario recuperar la saponina de la mezcla hidrolítica, generalmente utilizando alguno de los métodos siguientes:

- a) **Filtración.-** Las saponinas precipitan en la mezcla hidrolítica por lo que se pueden recuperar por filtración (Besson y col., 1989; Massiot y col., 1988; Morris y Hussey, 1964; Timbekova y col., 1990).

- b) **Extracción.-** Las saponinas se pueden extraer de la mezcla hidrolítica, mediante disolventes como éter etílico (Rao y Bories, 1987) o acetato de etilo (Jurzysta y col., 1984; Oleszek y col., 1988).

- c) **Métodos cromatográficos.-** Oleszek y col.(1992) y Nowacka y Oleszek (1992) utilizaron cartuchos SEP-PAK C-18 (Waters Associates) preacondicionados con agua y eluyeron las prosapogeninas con metanol. Massiot y col. (1988) utilizaron la cromatografía en columna con sílica gel y como eluyentes cloroformo y un gradiente de cloroformo - metanol.

1.2.8.2 Detección y cuantificación

La cromatografía en capa fina y la cromatografía de líquidos de alta resolución son las técnicas más empleadas para la detección de las saponinas:

Cromatografía en capa fina.- La silicagel ha sido el adsorbente más utilizado y como sistemas de elución eter de petróleo-cloroformo-ácido acético (7:2:1 v/v) y benceno-metanol (92:8 v/v). Al igual que para saponinas, se empleó metanol-anhídrido acético-ácido sulfúrico (50:5:5 v/v) y calor (120 °C) como revelador (Besson y col., 1989; Jurzysta y col., 1984; Oleszek y col., 1988,1990).

Recientemente, Oleszek y col. (1992) utilizaron cromatoplacas C-18 para la detección de aglicones, desarrollándolas con metanol-agua (90:10 v/v); la visualización se hizo con el revelador antes mencionado.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).- Mediante este técnica, Massiot y col. (1988) determinaron el perfil de geninas de 50 variedades de alfalfa. Utilizaron una columna C-18 (fase reversa) y como eluyente metanol-agua-ácido fórmico (75:25:0.05 v/v). Los tiempos de retención que encontraron para algunas

sapogeninas fueron: ácido zánico, 1.63 min; ácido medicagénico, 3.9 min; bayogenina, 4.2 min y hederagenina, 7.47 min.

Besson y col. (1989) emplearon también HPLC para identificar las geninas de callos y cultivos en suspensión de alfalfa. Las condiciones analíticas fueron semejantes a las mencionadas.

La cuantificación de sapogeninas se ha hecho por gravimetría y mediante la técnica de cromatografía de gases (CGL) acoplada a los equipos para la determinación de estructura química (resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas) .

Rao y Bories (1987) determinaron por cromatografía de gases el contenido de ácido medicagénico en follaje, raíz, tallos, hojas y concentrados proteicos de hojas, obtenidos de diferentes variedades de alfalfa. Utilizaron el derivado trimetil silitado del ácido medicagénico. Los resultados se presentan en el cuadro 7.

Cuadro 7 . Cuantificación de ácido medicagénico por cromatografía de gases (CG)

Variedad	Follaje*	Hojas*	Tallos*	Raíz*	LPC**
Verneuil	-	-	-	-	0.64
Lutèce	-	-	-	9.03	0.56
Campagne	-	-	-	-	0.53
Dupuits	-	-	-	-	0.48
Résis	0.90	1.02	0.30	-	0.48
Ruro	-	-	-	-	0.31
Robot	0.26	0.46	0.17	-	0.24
Lahontan	-	-	-	-	0.15

* Promedios de triplicados (mg por gramo de materia vegetal, base seca)

** Promedios de duplicados (mg por gramo de concentrado protéico de hojas (LPC), base seca)

Fuente: Adaptado de Rao y Bories, 1987

1.2.9 Análisis de la fracción glicosídica

1.2.9.1 Aislamiento y purificación

Una vez hidrolizadas las saponinas es necesario extraer los azúcares de la mezcla hidrolítica, para poder identificarlos y cuantificarlos. Se señalan algunas de las técnicas descritas.

- a) Neutralización del hidrolizado.- Una vez extraída la sapogenina de la mezcla hidrolítica, Morris y Hussey (1964) neutralizaron con hidróxido de sodio saturado hasta obtener un pH entre 5 y 6, después desalaron con resinas Dowex, para dejar los azúcares libres en la solución.

- b) Eliminación del ácido clorhídrico de la fracción acuosa mediante evaporación repetida. (Jurzysta y col., 1984).

- c) Fase sólida.- Oleszek y col. (1992) utilizaron cartuchos C-18 preacondicionados con agua. La mezcla de hidrólisis se pasó a través del cartucho y la fracción eluida conteniendo los azúcares se evaporó a sequedad a 40 °C.

1.2.9.2 Detección

Para la detección de los azúcares de las saponinas de alfalfa se han utilizado las siguientes técnicas cromatográficas:

Cromatografía en papel.- En 1964, Morris y Hussey utilizaron esta técnica para identificar los azúcares de una saponina extraída de botones de alfalfa. El sistema de elución fue acetato de etilo-piridina-agua (12:5:4 v/v) y como revelador nitrato de plata alcalino.

Otros investigadores han empleado el sistema de elución n-butanol-piridina-agua-benceno (5:3:3:1 v/v) y el ftalato de anilina para visualizar los azúcares (Levy y col., 1986; Jurzysta y col., 1984; Oleszek, 1990; Oleszek y col., 1992).

Cromatografía en capa fina.- Se han utilizado cromatoplasmas de celulosa, desarrollándolas con n-butanol- piridina- agua-benceno (5:3:3:1 v/v) y nitrato de plata alcalino como revelador (Oleszek, 1990).

Cromatografía de gases (CG).-Oleszek y col. (1992) convirtieron los azúcares en sus alditol acetatos y los

identificaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Timbekova y col. (1990) utilizaron también la CG para identificación de azúcares, pero en la forma de trimetilsilil éteres de los metilglicósidos.

1.2.9.3 Cuantificación

Levy y col. (1986) cuantificaron la glucosa de una de las saponinas de la raíz de alfalfa (3-0-D glucopiranosido del ácido medicagénico), mediante la técnica del fenol-sulfúrico y con la enzima glucosa oxidasa peroxidasa.

Actualmente la cromatografía de gases es una de las técnicas más útiles para cuantificar los azúcares de las saponinas de alfalfa (Oleszek y col., 1992; Timbekova y col., 1990).

1.2.9.4 Determinación de estructura

La espectrometría de masas (MS) y la resonancia magnética nuclear (RMN) del carbono ¹³ y de protón (H), son las herramientas usadas para la determinación de la estructura de la fracción glicosídica de las saponinas de alfalfa

(Massiot y col., 1991; Oleszek y col., 1990; Timbekova y col., 1990).

Para determinar la configuración alfa o beta de los azúcares, Levy y col. (1986) utilizaron la alfa y la beta glucosidosa, y Timbekova y col. (1990), la resonancia magnética de protón (RMN H⁺).

2.0 MATERIALES Y METODOS

2.1 Muestreo

Las 10 variedades de alfalfa utilizadas en este estudio se obtuvieron del Campo Experimental Valle de México del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP); ubicado en Chapingo, Edo. México, Latitud 19-29; Longitud 098-54; Altitud 2250 msnm (SARH, 1982).

Las variedades estudiadas fueron Inia 76, Puebla 76, Sintético I, Sintético II, Valenciana, Cóndor, Maxidor, Pierce, Sundor y NK-819. Las 4 primeras son variedades mejoradas obtenidas por el INIFAP; la Valenciana es una variedad española muy cultivada en México y las últimas cinco son variedades de importación, originarias de Estados Unidos.

Las muestras con las que se trabajaron fueron la mezcla de 3 cortes (inicio de floración,) en el verano de 1990: 27 de junio, 3 de agosto y 13 de septiembre. Los cultivos tenían un año y medio de haberse sembrado (enero de 1989). Después de cada corte las plantas se deshidrataron a 80 °C en estufa de convección forzada. Las plantas ya secas se molieron en un molino de cuchillas con un tamiz de 1 mm de diámetro de abertura. Ya secos y molidos los 3 cortes se

mezclaron en cantidades iguales. Cada variedad se obtuvo con cuatro repeticiones.

2.2 Extracción de las saponinas

Se utilizó la técnica de extracción fraccionada descrita por Berrang y col.(1974) modificada por Visag y Peña (1991). En la figura 7 se esquematiza el proceso de extracción.

Se pesaron 100 g de alfalfa deshidratada y molida y se colocaron en una matraz erlenmeyer de 2 l, se adicionaron 800 ml de etanol al 80% y se calentó a 60°C con agitación constante durante 90 minutos. Se filtró al vacío con papel whatman de filtración rápida. El residuo se extrajo dos veces más con 500 ml de etanol al 80% durante 90 minutos. El residuo vegetal se desechó y los filtrados etanólicos de las tres extracciones se mezclaron y concentraron en un rotoevaporador a presión reducida, a 45 ± 5 °C, hasta un volumen de 200 ml.

El concentrado acuoso se filtró al vacío a través de papel whatman de filtración rápida.

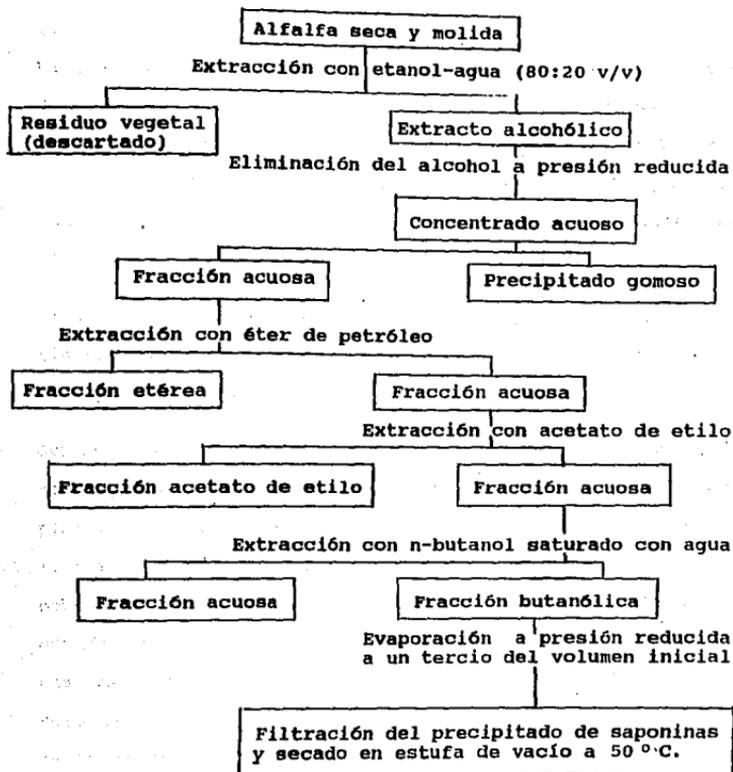
El filtrado se extrajo con tres porciones de 100 ml de éter de petróleo para eliminar las sustancias lipídicas y algunos pigmentos (clorofila principalmente).

La fracción acuosa se extrajo con tres porciones de 100 ml de acetato de etilo para liberarla de pigmentos de tipo flavonoide.

Finalmente la fracción acuosa se extrajo con 400 ml (4x100 ml) de n-butanol saturado con agua (10:6 v/v). El extracto butanólico se concentró en el rotoevaporador a un tercio de su volumen inicial, se enfrió a 20 °C y el precipitado de saponina se recuperó por filtración. Después se secó en estufa de vacío a 50 °C y se registró el peso de la saponina cruda.

Las fracciones etérea, de acetato de etilo y acuosa se sometieron a cromatografía en capa fina para determinar si había presencia de saponinas.

Figura 7. Técnica de extracción de saponinas



Visag y Peña (1991)

2.3 Detección de las saponinas

2.3.1 Cromatografía en capa fina

Para determinar la presencia de saponinas en las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de extracción se utilizó la cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas precubiertas con silicagel 60 F 254 (Merck), analíticas de 20 X 20 cm y se probaron 3 sistemas de elución:

Sistema I: n-butanol-ácido acético-agua 4:1:2 v/v

Sistema II: Cloroformo-metanol-agua 65:38:10 v/v

Sistema III: Acetato de etilo-metanol-agua 60:15:6 v/v

Junto con las muestras se aplicó el estándar de soyasaponina I (proporcionada por el Dr. K. Price). Las placas se rociaron con el revelador p-anisaldehído (1 parte de p-anisaldehído + 40 partes de ácido acético + 1 parte de ácido sulfúrico concentrado) y se calentaron en estufa a 100 °C durante 10 minutos.

Una vez reveladas las cromatoplasmas, se calcularon los valores de R_f (relación entre la distancia de corrimiento de la mancha con respecto a la distancia de corrimiento del frente del disolvente).

2.3.2 Hemólisis

Para confirmar la presencia de saponinas en el extracto butanólico, se realizó una prueba hemolítica basada en el método de Jurzysta (Oleszek, 1990). Se prepararon cajas petri con medio de gelatina-sangre (75 ml de solución de gelatina al 4.5% p/v en solución isotónica, con 20 ml de sangre de borrego). Los extractos crudos de saponina de alfalfa se disolvieron en solución buffer isotónica de NaCl, pH=7 (3.95g de Na_2HPO_4 , 0.76g de KH_2PO_4 y 7.2g de NaCl en 1 litro de agua destilada), a una concentración de 30 mg/ml. En cada caja petri se colocaron 2 cilindros de acero inoxidable, de 1 cm de alto y 0.5 cm de diámetro interno, se llenaron con la solución de saponinas y después de 20 horas se observó si se producían halos de hemólisis.

2.4 Hidrólisis de las saponinas

Para hidrolizar las saponinas se seleccionó el método utilizado por Oleszek (1988). Se pesaron 200 mg de saponina cruda y se hidrolizaron con 40 ml de ácido clorhídrico 4M durante 4 horas a reflujo.

2.5 Aislamiento y detección de las sapogeninas

Transcurrido el tiempo de hidrólisis, la solución se enfrió y las sapogeninas precipitadas se recuperaron por filtración al vacío con papel whatman 541. Las sapogeninas se enjuagaron con suficiente agua destilada para eliminar el ácido residual. El papel filtro con las sapogeninas se secó a 50 °C en estufa de vacío. Se recuperaron con metanol y se colocaron en un frasco vial a peso constante. Una vez evaporado el solvente se registró el peso.

La detección de las sapogeninas se hizo por cromatografía en capa fina, utilizando cromatofolios (Merck) precubiertos con sílicagel 60 F 254, analíticos de 20 X 20 cm y tres sistemas de elución:

Sistema I: Eter petróleo-cloroformo-ácido acético
(7:2:1 v/v)

Sistema II: Hexano-éter etílico (50:50 v/v)

Sistema III: Benceno-metanol (92:8 v/v)

Las placas se revelaron con p-anisaldehído y calentamiento a 100 °C durante 10 minutos.

Se aplicaron como estándares, ácido medicagénico, hederagenina (proporcionados por : Dr. W. Oleszek, Dr. G. Massiot) y el soyasapogenol obtenido de la hidrólisis del estándar de soyasaponina I .

Se determinaron los valores de Rf para las muestras y los estándares.

2.6 Aislamiento y detección de azúcares

Se seleccionó la técnica utilizada por Jurzysta y col. (1984). Una vez recuperadas las sapogeninas, se tomaron 10 ml del hidrolizado y se evaporaron a sequedad a una temperatura de 40 °C. Se le adicionaron 5 ml de agua destilada y se evaporaron nuevamente a sequedad; esta operación se repitió varias veces hasta eliminar todo el ácido clorhídrico. Este punto se detectó midiendo el pH de la solución con papel indicador. El residuo seco se disolvió en isopropanol al 10%.

Para la detección de los azúcares se empleó la cromatografía en capa fina (CCF). Se usaron cromatofolios (Merck) precubiertos con sílicagel 60 F 254 y con celulosa. Los sistemas de elución fueron n-butanol-isopropanol-agua (100:60:20 v/v) y n-butanol-ácido-acético-

agua (4:1:1 v/v) respectivamente. Los reveladores que se emplearon fueron el p-anisaldehído para los cromatofolios con sílicagel y nitrato de plata para los de celulosa.

En esta prueba se corrieron como estándares los siguientes azúcares: glucosa, L-arabinosa, xilosa, ramnosa y ácido glucurónico. Una vez desarrolladas y reveladas las cromatoplas, se calcularon los Rf.

2.7 Extracción y purificación del ácido medicagénico

Para aislar el ácido medicagénico del extracto crudo de sapogeninas se utilizó la cromatografía en capa fina preparativa.

El extracto de sapogenina cruda deshidratado se disolvió en 2 ml de metanol. Se aplicaron (en banda) 800 microlitros de esta solución en cromatoplas de 20 x 20 cm preparadas con sílicagel H (Merck). El sistema de elución utilizado fue éter de petróleo-cloroformo-ácido acético (7:2:1 v/v) y como revelador vapores de yodo. Se aplicó a cada placa el estándar de ácido medicagénico para detectar la banda correspondiente en las muestras.

Una vez localizada la banda se recuperó y el ácido medicagénico se extrajo con metanol (10ml) tres veces. Los extractos metanólicos se filtraron en papel whatman y evaporaron a sequedad en estufa de vacío a 50 ° C.

2.8 Cuantificación del ácido medicagénico

Para cuantificar el ácido medicagénico se utilizó la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) descrita por Massiot y col. (1988), modificando el tamaño de la columna de 15 a 25 cm.

El ácido medicagénico recuperado, se disolvió en 2 ml de metanol y se filtró a través de una membrana Millipore de 13 mm de diámetro y con tamaño de poro de 0.45 μ m.

El estándar de ácido medicagénico se preparó en metanol , a una concentración de 1.0 mg/ml.

La fase móvil, metanol-agua-ácido fórmico (75:25:0.05 v/v), se filtró a través de membrana Millipore de 47 mm de diámetro (tamaño de poro 0.45 μ m) y desgasificó 15 minutos por ultrasonido, antes de utilizarla.

El análisis se realizó en un cromatógrafo Varian serie VISTA 5000, con detector de luz ultravioleta (UV) e integrador Varian 4270 . Se utilizó una columna Merck -

Lichrosorb RP-18 de 250 mm longitud, 4 mm de diámetro interno y 5 μ m de diámetro de partícula.

Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

Flujo del solvente: 1.5 ml/min.

Velocidad de la carta: 0.5 cm/min.

Presión : 182 - 186 BAR

Volumen de muestra: 10 microlitros.

Volumen del estándar: 5 y 10 microlitros.

Longitud de onda del detector: 202 nm.

En cualquier método analítico utilizado se considera necesario establecer la proporcionalidad entre la concentración del analito estudiado y su respuesta (Quattrocchi y col., 1992), por lo que se determinó la linealidad de la curva estándar. Se hicieron cuatro mediciones (por duplicado cada una) a diferentes concentraciones del estándar de ácido medicagénico. Se preparó una solución con una concentración de 1.0 mg/ml y se inyectaron 2.5, 5.0, 10.0 y 15.0 μ g. Estas concentraciones se seleccionaron de acuerdo al rango de análisis de las muestras.

Para comprobar que el tiempo de hidrólisis seleccionado en este trabajo permitía hacer una hidrólisis completa de las saponinas, se hicieron determinaciones a 2, 4 y 6 horas con ácido clorhídrico 4M. Se utilizó la variedad Inia 76, determinándose la cantidad de ácido medicagénico recuperado para cada tiempo. Cada análisis se trabajó por triplicado.

Debido al número de pasos que intervienen en la obtención del ácido medicagénico, se estimó conveniente determinar la variabilidad (error experimental) del método de análisis utilizado. Para lo cual se realizaron 10 réplicas del proceso con la variedad Inia 76 y se calculó el coeficiente de variación.

2.9 Valoración de la actividad biológica de las saponinas

Para evaluar la actividad biológica en las diferentes variedades de alfalfa, atribuible a su contenido en saponinas, se realizaron dos bioensayos: ictiotoxicidad e inhibición del crecimiento del hongo *Trichoderma viride*.

2.9.1 Ictiotoxicidad

Se utilizó la técnica descrita por Jones y Elliot (1969), modificando la especie de los peces y la cantidad de muestra.

Se vaciaron 3 g de la alfalfa molida y seca en 25 ml de agua destilada, dejando en reposo durante 2 horas. Después se filtró a través de papel whatman de filtración rápida. Los peces, de la especie *Oriochromis mozambicus* (mojarra-tilapia) con un tamaño aproximado de 3 - 5 cm, se mantuvieron en adaptación a las condiciones del laboratorio durante 2 días. Se colocó cada pez en un vaso desechable transparente con 92 ml de agua destilada a 20 °C. Se esperaron 5 minutos para ver si el pez permanecía calmado y saludable, luego se agregaron 8 ml del extracto acuoso de alfalfa. Los peces se observaron durante 180 minutos, con registro del tiempo de inmovilización del pez.

Junto con las muestras se corrió una prueba con el estándar de ácido medicagénico. Se hizo por duplicado, utilizando 100 ml de una solución acuosa a una concentración de 50 microgramos/ml. El ácido medicagénico se disolvió primero con 3 gotas de metanol. También se corrió un testigo (4 repeticiones) con agua destilada a la que se le agregaron 3 gotas de metanol para determinar si influyen en el análisis.

2.9.2 Inhibición del crecimiento del hongo *Trichoderma viride*

Se utilizó la técnica descrita por Stuteville y Skinner (1987), modificando la cantidad de muestra.

Se pesaron 750 mg de alfalfa seca y molida y se adicionaron a 30 ml de agua destilada en tubos de ensayo de 100 ml, con agitación suave y constante. Se colocaron los tubos en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Se enfriaron y filtraron a través de papel filtro whatman de filtración rápida. Se midieron 20 ml del filtrado y se colocaron en tubos de ensayo limpios, adicionándoles 0.8 g de medio de cultivo agar papa-dextrosa (Bioxon) y se disolvieron con agitación en baño maría. Se colocaron nuevamente al

autoclave durante 15 minutos a 120 °C. Se enfriaron a 45 °C y se vaciaron en cajas petri estériles desechables.

Se prepararon 4 cajas con estándar de ácido medicagénico. A cuatro tubos de ensayo con 20 ml del medio se les adicionaron 2 mg del estándar, colocándose en el autoclave durante 15 minutos a 121 °C. Se enfriaron y vaciaron en las cajas petri. Se prepararon también 4 cajas petri testigo conteniendo sólo el medio.

El hongo *Trichoderma viride* se sembró en cuatro cajas petri con medio de agar papa dextrosa. Se aplicó en tres puntos introduciendo ligeramente el asa en el medio y luego superficialmente en estría. Se incubaron a 28 °C durante 48 horas.

Con un horador de tapones de 5 mm de diámetro interno se cortaron discos del gel en la periferia del desarrollo del hongo. Utilizando un punzón, se colocó de forma invertida un disco del inóculo en el centro de cada una de las cajas petri preparadas. Se incubaron a 28 °C durante 24 horas y se midió el diámetro de crecimiento del hongo. A estos valores se les restó los 5 mm de diámetro del disco de inóculo.

Los valores se convirtieron en porcentaje del desarrollo fúngico, comparándolos con las placas control y se denominaron "índice de saponina".

2.10 Análisis químico proximal de las alfalfas

Se realizó el análisis químico proximal de cada una de las variedades de alfalfa para determinar su valor nutritivo, siguiendo las técnicas de la Asociación Oficial de Químicos Analíticos de Estados Unidos (AOAC, 1990). Los componentes analizados fueron: proteína cruda, grasa cruda (extracto etéreo), cenizas, fibra cruda y extracto libre de nitrógeno. En este trabajo no se determinó la humedad de las alfalfas frescas puesto que las muestras se recibieron ya deshidratadas (97% de materia seca), por lo que los resultados se informan en base seca.

2.11 Análisis estadístico

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación de medias, utilizando la prueba de comparación múltiple de Fisher (Diferencias Mínimas Significativas) con el programa computacional estadístico "The Number Cruncher Statistical Analysis System, version 3.1" . En todos los casos se consideró un valor de $p \leq 0.05$.

Los coeficientes de correlación lineal se calcularon utilizando el mismo paquete estadístico.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1 Saponinas

3.1.1 Contenido de saponinas

En el cuadro 8 se presenta el contenido de saponina cruda de las 10 variedades de alfalfa estudiadas. La variedad Sundor fue la de mayor contenido con 1.77% en base seca y las de menor contenido los Sintéticos I, Sintético II y Pierce, con un promedio de 0.44%, lo que significa 3.3 veces más saponina cruda en la primera. Comparando estos resultados con los obtenidos por Leath y col. (1972), quienes informaron un 0.23% y 0.46% para las variedades Lahontan y DuPuits; así como los obtenidos por Oleszek y col. (1992), 3.0% para la variedad Kleszczewska. Encontramos que los contenidos de saponina cruda de las diez variedades de alfalfa estudiadas están por encima de los de la variedad Lahontan, considerada internacionalmente como una variedad baja en saponinas, pero son menores a los de la variedad polaca Kleszczewska. Sin embargo debe considerarse que el método de extracción puede afectar cualitativa y cuantitativamente las saponinas recuperadas (Oleszek, 1988).

Cuadro 8. Contenido de saponinas en 10 variedades de alfalfa.

Variedad	Contenido de saponinas (% base seca) *	Desviación estándar
Sundor	1.77 a **	0.48
Maxidor	1.17 b	0.32
Valenciana	0.88 bc	0.21
Cóndor	0.85 c	0.16
Puebla 76	0.83 c	0.12
Inia 76	0.68 c	0.12
NK-819	0.59 cd	0.15
Pierce	0.49 d	0.15
Sintético I	0.46 d	0.15
Sintético II	0.40 d	0.09

* Promedios de cuatro repeticiones

** Las medias con letra diferente, son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

3.1.2 Detección por cromatografía en capa fina

La fase móvil con mejor resolución fue el sistema I (n-butanol-ácido acético-agua, 4:1:2 v/v), aunque el tiempo de desarrollo fue el más largo (4h). Con el sistema de desarrollo II las manchas migraron con el frente del solvente y el sistema III presentó poca resolución.

En el cuadro 9 se puede ver el valor de las referencias frontales (Rf), en el sistema I, de las saponinas de las 10 variedades de alfalfa estudiadas.

Se observó que todas presentaron 3 manchas definidas, aunque algunas con valores de Rf diferentes. El color de las manchas fue gris verdoso, como el del estándar de Soyasaponina I.

Las variedades Puebla 76, Inia 76, Cóndor, Sundor y Maxidor presentaron patrones de movilidad semejantes (Rf: 0.21, 0.36, 0.42). En el caso de la Pierce y el Sintético I, sus cromatogramas fueron similares entre sí (Rf= 0.21, 0.33, 0.42), pero diferentes a las anteriores en una de las manchas.

De las 10 variedades de alfalfa, sólo la Valenciana y la NK-819 no presentaron la mancha correspondiente al estándar de soyasaponina I (Rf= 0.42).

Cuadro 9. Detección de saponinas en diez variedades de alfalfa mediante cromatografía en capa fina (CCF)

Variedad	Valor	de	Rf*
Puebla 76	0.21		0.36 0.42
Inia 76	0.20		0.35 0.41
Sintético II	0.20		0.37 0.42
Condor	0.21		0.38 0.42
Sundor	0.20		0.35 0.40
Maxidor	0.20		0.37 0.42
Pierce	0.21	0.32	0.40
Sintético I	0.20	0.33	0.42
Valenciana	0.29	0.32	0.37
NK - 819	0.20	0.31	0.36
Estándar Soyasaponina I			0.42

Adsorbente: Sílicagel 60 F254

Sistema de elución: n-butanol: agua: ácido acético
(4:2:1 v/v)

*Rf = Referencias frontales

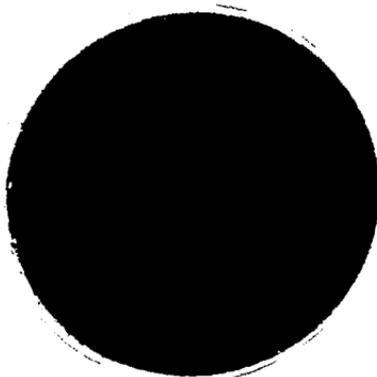
Berrang y col. (1974), utilizando el sistema de elución I, observaron 6 manchas de saponinas en extractos butanólicos de forraje de alfalfa de las variedades Lahontan y DuPuits. Los valores de R_f fueron: 0.25, 0.30, 0.36, 0.40, 0.49 y 0.60. Comparando estos resultados con las alfalfas estudiadas, podemos observar coincidencias en los primeros cuatro valores de R_f .

En las fracciones etérea y de acetato de etilo no se observaron manchas correspondientes a saponinas. Sin embargo en la fracción acuosa se observó una mancha tenue. Oleszek (1988) menciona que algunos hidemósidos no son extraídos completamente por el n-butanol, debido a que son muy solubles en agua.

3.1.3 Detección por su actividad hemolítica

Todas las variedades presentaron actividad hemolítica. Con esta prueba se pudo confirmar que el extracto butanólico considerado como saponina cruda presentó la actividad hemolítica característica de las saponinas de alfalfa que contienen sapogeninas ácidas. En la figura 8 se pueden observar los halos de hemólisis producidos por los extractos crudos de las saponinas de alfalfa.

Figura 8. Halo de hemólisis producido por el extracto crudo de saponina de alfalfa (variedad Puebla 76)



3.2 Sapogeninas

3.2.1 Contenido de sapogeninas

En el cuadro 10 se puede apreciar la cantidad de sapogenina contenida en 100 mg de saponina cruda para cada variedad. Se observa que la relación sapogenina/saponina no es constante entre las variedades, existiendo una variación hasta del 50%. Los valores más altos corresponden a las variedades Inia 76 (1:3), Sintético I (1:3) y Sintético II (1:3) y el más bajo a la Cóndor (1:6). Esto se puede deber a una mayor proporción de azúcares unidos a la sapogenina. Birk y Peri (1980) mencionan que las saponinas que contienen los soyasapogenoles como aglicón, tienen una relación sapogenina/carbohidrato 1 a 5.

Mediante la detección, por HPLC, del ácido medicagénico obtenido a diferentes tiempos de hidrólisis de la saponina cruda de la variedad Puebla 76; se confirmó que el tiempo de hidrólisis de 4 horas era necesario para liberar completamente las sapogeninas, pues con 2 horas la recuperación de ácido medicagénico fue del 50%. En cambio con 6 horas de hidrólisis no aumentó la cantidad recuperada y se observó una ligera disminución, figura 9.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Cuadro 10. Contenido de saponinas en diez variedades de alfalfa

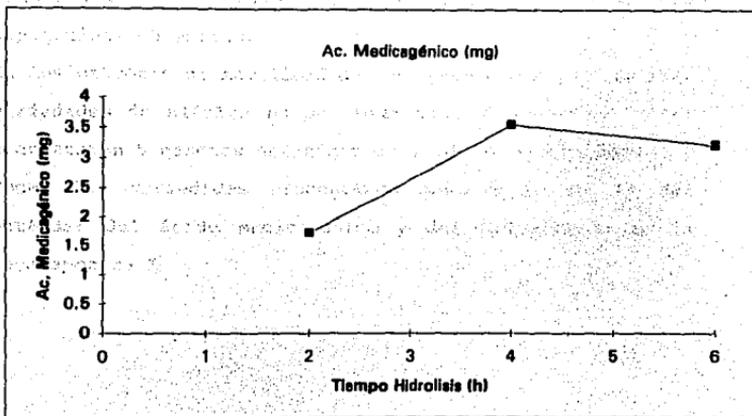
Variedad	Contenido de saponina mg/100 mg saponina *	Desviación estándar
Inia 76	35.50 a **	5.69
Sintético II	31.10 a	5.19
Sintético I	30.25 a	6.71
Valenciana	25.24 ab	7.51
Sundor	24.70 ab	4.25
NK - 819	23.59 ab	3.05
Puebla 76	23.45 ab	4.03
Pierce	22.51 bc	2.61
Maxidor	18.80 bc	5.95
Cóndor	17.97 c	3.07

* Promedio de 4 repeticiones

** Las medias con diferente letra son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

Figura 9. Recuperación de ácido medicagénico a diferentes tiempos de hidrólisis. Determinado por HPLC.

Tiempo de Hidrólisis (h)	Ac. Medicagénico (mg)
2	1.72
4	3.58
6	3.22



3.2.2 Detección por cromatografía en capa fina

De los tres sistemas de elución utilizados para detectar las sapogeninas, el mejor fue el Sistema I (éter de petróleo - cloroformo - ácido acético, 7:2:1 v/v). El tiempo de desarrollo fue de aproximadamente 1 hora. En el cuadro 11 se pueden ver los valores de Rf de las sapogeninas obtenidas.

En los patrones de movilidad de las sapogeninas de las diez variedades de alfalfa no se observaron diferencias. Todas presentaron 5 manchas definidas de color morado grisáceo. Todas las variedades presentaron manchas en el Rf del estándar del ácido medicagénico y del hidrolizado de la soyasaponina I.

Cuadro 11. Detección de sapogeninas en diez variedades de alfalfa mediante cromatografía encapa fina

Variedad	Valor de Rf*				
Valenciana	0.16	0.29	0.39	0.52	0.57
Puebla 76	0.17	0.30	0.40	0.52	0.57
Inia 76	0.17	0.31	0.41	0.51	0.56
Sintético I	0.17	0.30	0.40	0.52	0.57
Sintético II	0.17	0.30	0.41	0.52	0.57
Cóndor	0.17	0.29	0.39	0.52	0.57
Sundor	0.16	0.28	0.38	0.52	0.57
Maxidor	0.17	0.30	0.41	0.52	0.57
Pierce	0.17	0.30	0.41	0.52	0.56
NK - 819	0.17	0.30	0.42	0.52	0.56
Ac. Medicagénico	0.17				
Hederagenina		0.34			
Hidrolizado de Soyaponina I				0.52	0.57

Adsorbente: Cromatofolios Merck Silicagel 60 F254 (20X20)

Sistema de elución: Eter de petróleo - cloroformo - ácido acético (7:2:1 v/v)

* Rf = Referencias frontales

*. Rf = Referencias frontales

3.3 Detección de azúcares por cromatografía en capa fina

A través de la cromatografía en capa fina se detectaron los azúcares: glucosa, ramnosa y xilosa (cuadro 12), aunque sólo éste último se encontró en todas las variedades. Con respecto a los otros dos azúcares, casi todas las variedades los contienen excepto la Inia 76 que sí presenta glucosa pero no ramnosa, y las variedades Valenciana, Puebla 76 y Sintético II donde no se encontraron ninguno de los dos.

Es recomendable verificar posteriormente, la ausencia de glucosa en estas variedades, ya que este azúcar es muy común en las saponinas de alfalfa; aunque Massiot y col. (1991) aislaron de hojas de alfalfa, variedad Resis, un monodesmósido que contenía sólo arabinosa, ramnosa y xilosa.

Cuadro 12. Detección de azúcares en saponina de diez variedades de alfalfa mediante cromatografía en capa fina

Variedades	Valor de Rf *			
Valenciana	0.22		0.51	
Puebla 76	0.22		0.51	
Sintético II	0.23		0.51	
Inia 76		0.34	0.51	
Sintético I	0.21	0.34	0.51	0.63
Cóndor	0.21	0.34	0.51	0.63
Sundor	0.21	0.33	0.51	0.63
Maxidor	0.20	0.33	0.51	0.62
Pierce	0.21	0.34	0.50	0.62
NK-819	0.20	0.33	0.51	0.62
Ac. glucurónico	0.08			
Glucosa		0.32		
L. Arabinosa			0.38	
Xilosa			0.50	
Ramnosa				0.62

Adsorbente: Sílicagel 60 F 254

Sistema de elución I: n-butanol-isopropanol-agua (100:60:20 v/v).

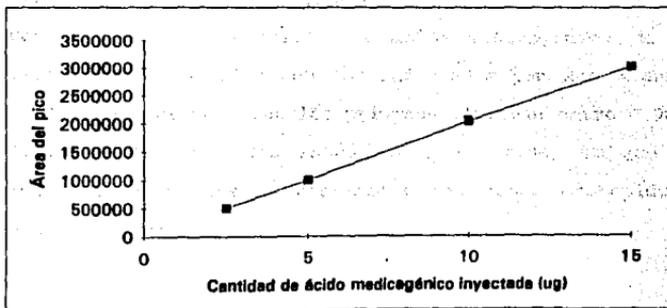
* Rf= Referencias frontales

3.4 Cuantificación de ácido medicagénico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Se encontró que existe linealidad en la detección del ácido medicagénico bajo las condiciones cromatográficas utilizadas (figura 10).

Figura 10. Linealidad de la detección de ácido medicagénico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Cantidad de ácido medicagénico inyectada (ug)	Area del pico
2.5	501 992
5.0	997 797
10.0	2 037 107
15.0	3 024 042



Ecuación de la recta: $y = (202\ 500)x - 5084$

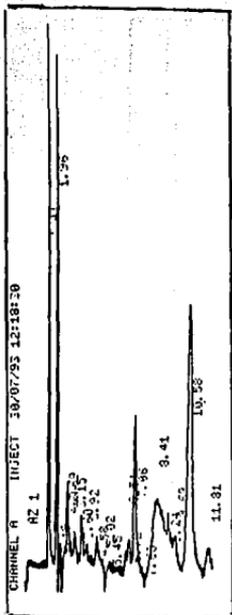
Coefficiente de correlación $r = 0.99$

En la figura 11 se presentan los cromatogramas obtenidos por HPLC, de las 10 variedades de alfalfa analizadas y del estándar de ácido medicagénico. El tiempo de retención promedio para el ácido medicagénico fue de 10.20 minutos.

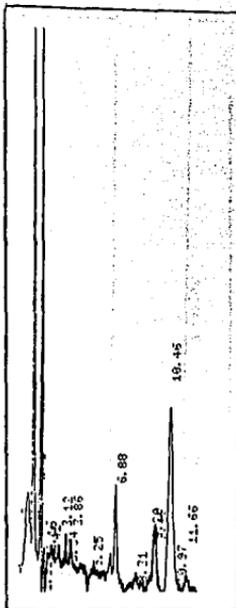
El contenido de ácido medicagénico para cada variedad de alfalfa, calculado con base en la cantidad de saponina cruda presente en 100 gramos de planta seca, se muestra en el cuadro 13. Se observó que la variedad Valenciana es la de mayor contenido en ácido medicagénico, con aproximadamente 12 veces más saponina que la variedad NK-819, que tuvo el menor contenido.

Comparando los contenidos de ácido medicagénico de las variedades estudiadas con los informados por Rao y Bories (1987), encontramos que los primeros fluctúan entre 0.001 - 0.016% y los segundos entre 0.026 - 0.090%, lo que nos indicaría que tenemos variedades con menor contenido en esta saponina.

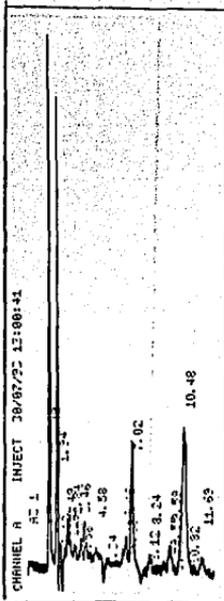
Figura 11. (Continúa)



Pierce



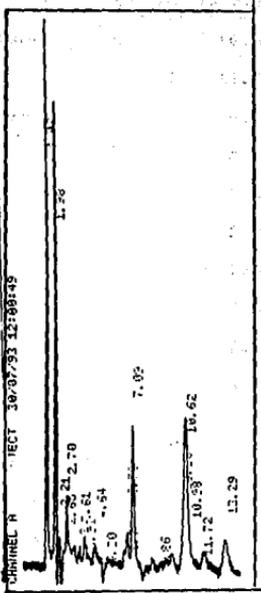
Códor



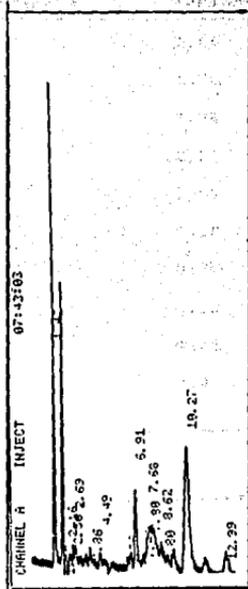
NK-819

continúa

Figura 11. (Continúa)



Maxidor



Sundor

Cuadro 13. Contenido de ácido medicagénico en diez variedades de alfalfa

Variedad	Ac. medicagénico (mg en 100 g de planta deshidratada)*	Desviación estándar
Valenciana	16.54 a **	1.85
Inia 76	11.50 b	1.90
Puebla 76	9.72 c	1.26
Sintético I	4.19 d	0.81
Pierce	3.08 e	0.57
Maxidor	2.72 e	0.50
Cóndor	2.43 e	0.70
Sintético II	2.31 e	0.33
Sundor	2.30 e	0.41
NK-819	1.34 f	0.24

* Promedio de 4 repeticiones

** Las medias con letra diferente son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

Con respecto a la determinación del coeficiente de variación de la técnica analítica desarrollada en este trabajo se obtuvo un valor del 14.3%; por lo que el método sólo permite separar las variedades de alfalfa con diferencias de contenidos de ácido medicagénico superiores al 14%, pues si son menores, podrían deberse a errores del método analítico.

Se pudo observar que desde el proceso de extracción de las saponinas ya se tenía un coeficiente de variación de 13.1%, lo que hace pensar que en esta parte está la principal fuente de error. Por lo que en futuras investigaciones será conveniente tratar de optimizar las condiciones de extracción o buscar un método analítico alternativo, como la extracción en fase sólida propuesta por Oleszek (1988).

3.5 Actividad biológica

3.5.1 Determinación de la actividad ictiotóxica

Sólo las variedades Valenciana, Inia 76 y Puebla 76 tuvieron efecto ictiotóxico. Los tiempos de inmovilización de los peces fueron 33, 108 y 160 min respectivamente, lo que indica una mayor toxicidad para la primera. Los peces testigo, no fueron afectados por las tres gotas de metanol que se adicionaron al control positivo de ácido

medicagénico. El tiempo de inmovilización para el control positivo fue de 30 minutos.

Jones y Elliot (1969) encontraron tiempos de inmovilización entre 10 y 117 minutos en muestras de hojas de alfalfa, rango en el que estarían dos de las alfalfas estudiadas. Comparando los resultados obtenidos con la cantidad de ácido medicagénico determinado en las alfalfas, se observa que a mayor concentración de éste, mayor fue la actividad ictiotóxica. Sin embargo, a concentraciones menores del 0.004%, ya no se produce efecto tóxico; lo que sugiere el grado de sensibilidad de esta prueba.

3.5.2 Inhibición del hongo *Trichoderma viride*.

En el cuadro 14 se presentan los diámetros de los halos de desarrollo del hongo y el índice de saponina calculado con base al testigo. La variedad Valenciana presentó la mayor actividad fungitóxica, seguida por la Inia 76, la Puebla 76 y la Sintético I. Las 6 variedades restantes no presentaron diferencias significativas entre ellas, aunque sí con el testigo, lo que indica una ligera actividad biológica. Se podría decir que esta técnica resultó ser más sensible para determinar la actividad biológica de las alfalfas, comparada con la prueba de ictiotoxicidad.

Stuteville y Skinner (1987) encontraron que la variedad Lahontan (control bajo en saponinas) presentó un índice de saponinas de 98.3 y la variedad Uinta (control alto en saponinas) un valor de 35.1. En ese estudio se trabajó con 250 mg de plántulas de alfalfa (1/10 de su estado de floración). Comparando sus resultados con los obtenidos en el presente trabajo, podemos observar que los índices de saponina de las alfalfas estudiadas caen dentro de los rangos informados por dichos autores. Sin embargo, se debe considerar que en este trabajo se utilizaron 750 mg de alfalfa, lo que indicaría concentraciones menores de saponina.

Se encontró una correlación lineal ($r= 0.97$) entre el contenido de ácido medicagénico y la actividad biológica . Lo que no ocurrió entre esta última y el contenido de saponinas ($r= 0.05$).

Cuadro 14. Prueba de inhibición del hongo *Trichoderma viride* en diez variedades de alfalfa.

Variedad	Halo de desarrollo (mm) *	Índice de saponina [®]	Desviación estándar
Valenciana	25.8	45.66 a **	5.26
Puebla 76	35.6	62.97 b	3.40
Inia 76	36.4	64.33 bc	6.25
Sintético I	41.4	73.08 c	3.53
Maxidor	47.6	84.16 d	4.29
Sintético II	48.2	85.13 d	7.62
Sundor	49.3	87.07 d	4.64
Pierce	50.0	88.40 d	1.59
Condor	50.9	89.94 d	2.02
NK-819	52.1	92.06 d	2.09
Testigo	55.2	100.00 e	
Estándar ac. medicagénico (0.1mg/ml)	9.8	17.77	

* Promedio de cuatro repeticiones

** Las medias con letra diferente, son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

® Un menor índice de saponinas implica mayor concentración de saponinas

3.6 Composición química proximal

La variedad de alfalfa con mayor contenido en proteína cruda fue la Cóndor. Estadísticamente no fue diferente de las variedades Maxidor, Sundor y Sintético II; pero sí presentó diferencias significativas con respecto a las otras 6 variedades (cuadro 15).

Cuadro 15. Contenido de proteína cruda en diez variedades de alfalfa

Variedad	Proteína cruda (% base seca)*	Desviación estándar
Cóndor	19.34 a **	0.58
Maxidor	19.14 a	0.98
Sundor	18.92 ab	0.94
Sintético II	18.33 abc	0.98
Pierce	18.24 bc	0.30
Puebla 76	18.08 bc	0.55
NK-819	18.01 bc	0.47
Valenciana	17.80 c	1.09
Sintético I	17.66 c	0.23
Inia 76	17.62 c	0.47

* Promedio de cuatro repeticiones

** Las medias con letra diferente son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

La variedad Maxidor fue la de mayor contenido en grasa cruda, aunque fue estadísticamente equivalente al de las variedades Sundor y Valenciana. Con respecto a las otras 7 variedades sí tuvo diferencias significativas (cuadro 16).

Cuadro 16. Contenido de grasa cruda en diez variedades de alfalfa

Variedad	Grasa cruda * (% base seca)	Desviación estándar
Maxidor	2.45 a **	0.18
Sundor	2.42 ab	0.12
Valenciana	2.40 ab	0.22
Cóndor	2.08 bc	0.18
Pierce	2.08 bc	0.51
Sintético I	2.06 bc	0.17
NK-819	2.06 bc	0.09
Sintético II	2.02 c	0.09
Inia 76	1.98 c	0.20
Puebla 76	1.86 c	0.30

* Promedio de cuatro repeticiones

** Las medias con letra diferente son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

De las 10 variedades de alfalfa estudiadas, la Sintético II fue la de mayor contenido en minerales. No tuvo diferencia significativa con la NK-819 y Pierce, pero sí con respecto a las otras 7 variedades (cuadro 17).

Cuadro 17. Contenido de cenizas en diez variedades de alfalfa

Variedad	Cenizas * (% base seca)	Desviación estándar
Sintético II	10.44 a **	0.38
NK-819	10.38 a	0.15
Pierce	10.10 ab	0.44
Cóndor	9.92 bc	0.21
Sintético I	9.89 bc	0.12
Inia 76	9.84 bcd	0.36
Valenciana	9.73 bcd	0.14
Sundor	9.73 bcd	0.34
Puebla 76	9.55 cd	0.26
Maxidor	9.46 d	0.17

* Promedio de cuatro repeticiones

** Las medias con diferente letra son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

La variedad de alfalfa con el porcentaje más alto de fibra cruda fue la Inia 76, sin embargo, sólo fue estadísticamente diferente de las variedades Maxidor, Cóndor y Valenciana (cuadro 18).

Cuadro 18. Contenido de fibra cruda en diez variedades de alfalfa

Variedad	Fibra cruda* (% base seca)	Desviación estándar
Inia 76	31.89 a **	0.79
Pierce	31.85 a	0.70
Sintético I	31.34 ab	0.77
NK-819	31.17 ab	0.68
Sintético II	30.40 abc	1.17
Puebla 76	29.63 abc	0.90
Sundor	29.47 abc	1.81
Maxidor	28.72 c	1.65
Cóndor	28.59 c	2.96
Valenciana	28.52 c	1.46

* Promedio de cuatro repeticiones

** Las medias con letra diferente son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

El mayor contenido en extracto libre de nitrógeno correspondió a la variedad Valenciana; sólo fue estadísticamente diferente de las variedades Sintético II, Inia 76, NK-819 y Pierce (cuadro 19).

Cuadro 19. Extracto libre de nitrógeno (ELN) en diez variedades de alfalfa

Variiedad	ELN * (% base seca)	Desviación estándar
Valenciana	41.54 a **	1.78
Puebla 76	40.89 ab	1.02
Maxidor	40.24 ab	2.01
Cóndor	40.00 abc	2.63
Sundor	39.46 abc	2.11
Sintético I	39.05 abc	0.48
Sintético II	38.79 bc	1.81
Inia 76	38.66 bc	1.00
NK-819	38.39 c	0.37
Pierce	37.91 c	1.18

* Promedio de cuatro repeticiones

** Las medias con diferente letra son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

Si se toma en cuenta que la calidad nutritiva de la alfalfa estaría dada por un alto nivel protéico y un bajo contenido en fibra (mayor digestibilidad), así como en saponinas (especialmente las que contienen al ácido medicagénico como aglicón), al hacer el análisis de estos parámetros en las 10 variedades de alfalfa estudiadas (cuadro 20) se observa lo siguiente:

De las variedades mexicanas mejoradas, las cuatro presentan contenidos de proteína y fibra equivalentes ($p \leq 0.05$). Sin embargo, los dos sintéticos tienen menor concentración de saponinas que la Inia 76 y la Puebla 76.

No hubo diferencia significativa en el contenido de saponinas de los dos sintéticos, pero como el Sintético II presentó el menor contenido en ácido medicagénico, éste le daría la mejor calidad nutritiva.

De las 6 variedades extranjeras, la Córdor, Maxidor y Sundor tendrían la mejor calidad nutritiva de acuerdo a su contenido en proteína y fibra, sin embargo, son las de niveles más altos de saponina, por lo que su calidad se vería disminuida.

Cuadro 20. Contenido de proteína, fibra, saponina y ácido medicagénico en diez variedades de alfalfa (Base seca).

Variedad	Proteína (%)	Fibra (%)	Saponina (%)	Acido Medicagénico (mg/100g)
Cóndor	19.34a*	28.59c	0.84c	2.43e
Maxidor	19.14a	28.72c	1.17b	2.72e
Sundor	18.92ab	29.47bc	1.76a	2.30e
Sintético II	18.33abc	30.40abc	0.40d	2.31e
Pierce	18.24bc	31.85a	0.49d	3.08e
Puebla 76	18.08bc	29.63abc	0.83c	9.72c
NK-819	18.01bc	31.17ab	0.59cd	1.34f
Valenciana	17.80c	28.52c	0.88bc	16.54a
Sintético I	17.66c	31.34ab	0.46d	4.19d
Inia 76	17.62c	31.89a	0.68c	11.50b

* Las medias con diferente letra son significativamente diferentes para una $p \leq 0.05$

Las variedades Pierce, NK-819 y Valenciana son iguales en su contenido protéico, aunque ésta última sería mejor por su menor contenido en fibra. Sin embargo la Valenciana presentó mayor contenido en saponinas que la Pierce y mucho más ácido medicagénico que las otras dos. Entre la Pierce y

la NK-819, la primera tiene menor concentración de ácido medicagénico.

Con base a lo anterior, de las 10 variedades de alfalfa estudiadas, la Sintético II y la Pierce serían equivalentes en su calidad nutritiva , es decir niveles intermedios de proteína y fibra, así como niveles bajos en saponina y ácido medicagénico. Podría decirse que de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se considerarían las variedades más recomendables en nutrición animal. Sin embargo, para poderlo corroborar, sería necesario realizar pruebas en animales que se ha demostrado presentan sensibilidad a las saponinas, por ejemplo conejos o conejillos de India (Birk y Peri, 1980).

4. CONCLUSIONES

Se confirmó que el contenido de saponinas de la alfalfa se ve afectado por la variedad. Se observó que la variedad Sundor (1.76%), con el mayor contenido en saponina cruda, presenta cuatro veces más saponina que la variedad Sintético II (0.40%), con los niveles más bajos.

De las 10 variedades de alfalfa estudiadas, las que tuvieron las concentraciones más bajas en saponinas fueron la Pierce (0.49%), el Sintético I (0.46%) y el Sintético II (0.40%); la primera es una variedad introducida y las otras dos son mexicanas.

Con relación al contenido de ácido medicagénico, la variedad Valenciana (0.016 %) superó significativamente ($p \leq 0.05$) a las otras nueve variedades estudiadas. Su concentración de ácido medicagénico fue 16 veces mayor que la variedad NK-819 (0.001%), con el menor contenido.

La variedad mexicana con menor contenido en ácido medicagénico fue el Sintético II (0.002%) y de las

introducidas, NK-819 (0.001%), Cóndor (0.002%) y Sundor (0.002%).

Las variedades de alfalfa que mostraron ictiotoxicidad fueron la Valenciana, Inia 76 y Puebla 76, con los niveles más altos en ácido medicagénico; estas tres variedades también presentaron la mayor inhibición del hongo *Trichoderma viride*. Se encontró una correlación lineal ($r=0.97$) entre actividad fungitóxicas y concentración de ácido medicagénico en la alfalfa; no existiendo ésta, con respecto al contenido de saponinas ($r= 0.05$).

Las variedades de alfalfa con mejor calidad nutritiva, es decir niveles protéicos altos y bajos en fibra, saponina y ácido medicagénico, fueron la Sintético II y la Pierce.

Será conveniente corroborar en futuras investigaciones, mediante pruebas *in vivo*, los posibles efectos antinutritivos de las variedades de alfalfa con mayor contenido en saponinas (Sundor, Maxidor y Valenciana) y en ácido medicagénico (Valenciana, Inia 76 y Puebla 76); principalmente éstas últimas ya que fueron las que mostraron ictiotoxicidad.

5. BIBLIOGRAFIA

Aparicio, F.; Jodral, A.; Vera, A.; Peña, F.; Domemeh, V. y Tovar J. (1987). "Interés de la alfalfa fresca en la alimentación durante la gestación de cerdas primíparas. Influencia del nivel energético". Archivos de Zootecnia. Vol 36.No. 134 (ene-abr).Facultad de Veterinaria. Córdoba, España.

A.O.A.C. (1990). Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. 15th Ed. Arlington, USA

Berrang, B.; Davis Jr.,K.H.; Wall, M.E.; Hanson, C.H. y Pedersen,M.E. (1974). "Saponins of two alfalfa cultivars". Phytochemistry. Vol. 13. pp 2253-2260.

Besson, V.; Lavaud, C.; Massiot, G.; Le Men-Olivier, L.; Bianchi, S.; Flament, P. y Dattee, Y. (1989). "Medicagenic acid and saponins in callus and suspension cultures of alfalfa". Phytochemistry. Vol. 28, No. 5. pp 1379-1380.

Birk, Y. y Peri, I. (1980). " Saponins". Cap. 6. En: Toxic constituents of plant foodstuffs". Ed. Liener, I.E.. 2a Ed. Academic Press Inc. Londres. pp 161-182.

Castro, A.L. (1990a). "Comportamiento de dos sintéticos de alfalfa en valles altos del Estado de México". Memoria del VIII Congreso de la Asociación Nacional de Egresados de la Facultad de Agrobiología (A.N.E.F.A.). Uruapan, Michoacán. pp. 118-122.

Castro, A.L. (1990b). "Obtención de dos variedades sintéticas de alfalfa". Memoria del VIII Congreso de la A.N.E.F.A. Uruapan, Michoacán. pp. 123-127.

Castro, A.L. (1992). Informe de investigación del programa de alfalfa 1991. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Estado de México. S.A.R.H. México. pp 8-12

Cazares, G.L.R.(1988). "Evaluación del estado nutricional de los alfalfares del Valle de México". Tesis de maestría. Colegio de Postgraduados, Montecillos, México.

Cheeke, P.R. y Shull, L.R. (1985). Natural toxicants in feed and poisonous plants. The AVI Publishing Company Inc. Westport Connecticut.

Flores, M.J. (1983). Bromatología animal. 3a Ed. Limusa. pp. 436-453.

Garzón, S.M.L.; Romero, M.A.; James, M.G.; Cruz, G.E. y González, C.C.(1993). "Determinación de contaminantes microbianos en medicamentos naturistas". Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Asos. Farm. Mexicana.

Gorski, P.M.; Miersch, J. y Plozynski, M. (1991). "Production and biological activity of saponins and canavanine in alfalfa seedling". J. Chem. Ecology. Vol. 17, No. 6. pp. 1135-1143.

Jones, M. y Elliott, F.C..(1969). "Two rapid assays for saponin in individual alfalfa plants". Crop Sci. Vol.9 (Nov-Dic). pp.688-691.

Jurzysta, M.; Burda, S.; Oleszek, W.; Ploszynski, M.; Small, E. y Nozzolillo C.. (1992). "Chemical composition of seed saponins as guide to the classification of Medicago species". Can. J. Bot. Vol. 70. pp. 1384-1387.

Jurzysta, M.; Oleszek, W. y Szyzanek, B. (1984). "Medicagenic acid glycosides as a standard for determination of toxic saponin content in alfalfa". Proc. Session Encarpie Brno.pp. 339-347.

Levy, M.; Zehavi, U.; Naim, M. y Polachec, K.I. (1986). "An improved procedure for the isolation of medicagenic acid 3-O- beta-D- glucopyranoside from alfalfa roots and its antifungal activity on plant pathogens". J. Agric. Food Chem. Vol. 34. pp. 960-963.

Lu, D.C. y Jorgensen, N.A. (1987). "Alfalfa saponins affect site and extent of nutrient digestion in ruminants". J. Nutrition. Vol. 117, No.5. pp 919-927.

Massiot, G.; Lavaud, C.; Besson, V.; Le-Men Olivier, L. y Van Binst, G. (1991). "Saponins from aerial parts of alfalfa (*Medicago sativa*)". J. Agric. Food Chem. Vol. 39. pp. 78-82.

Massiot, G.; Lavaud, C.; Guillaume, D. y Le-Men Olivier, L. (1988). "Reinvestigation of the saponin and prosapogenin from alfalfa (*Medicago sativa*)". J. Agric. Food Chem. Vol. 36. pp. 902-909.

Morris, R.J. y Hussey, E.W. (1964). "A natural glycoside of medicagenic acid. An alfalfa blossom saponin". J. Org. Chem. Vol.30. pp. 166-168.

Muslera, P.E. y Ratera, G.C. (1983). La alfalfa en praderas y forrajes Ed. Mundiprensa. Madrid. pp. 625-681.

Nowacka, J. y Oleszek, W. (1992). "High performance liquid chromatography of zanthic acid glycoside in alfalfa (*Medicago sativa*)". Phytochemical analysis. Vol. 3. pp. 227-230.

Oleszek, W. (1988). "Solid phase extraction - fractionation of alfalfa saponins". J. Sci. Food Agric. Vol. 44. pp. 43-49.

Oleszek, W. (1990). "Structural specificity of alfalfa (*Medicago sativa*) saponin haemolysis and its impact on two

haemolysis based quantification methods". J. Sci. Food Agric. Vol. 43. pp. 477-485.

Oleszek, W. y Jurzysta, M. (1987). "The allelopathic potential of alfalfa root medicagenic acid glycosides and their fate in soil environments". Plant and Soil. Vol.98.pp.67-80.

Oleszek, W.; Jurzysta, M.; Ploszynski, M.; Colquhoun, I.J.; Price, K.R. y Fenwick G.R. (1992). "Zanhic acid tridesmoside and other dominant saponins from alfalfa (*Medicago sativa* L) aerial parts". J. Agric. Food Chem. Vol.40, No.2. pp.191-196.

Oleszek, W.; Jurzysta, M.; Price, K.R. y Fenwick, G.R.(1990a). "High performance liquid chromatography of alfalfa root saponins". J. Chromatogr. Vol. 519. pp. 109-116.

Oleszek, W.; Price, K.R.; Colquhoun, I.J.; Jurzysta, M.; Ploszynski, M. y Fenwick, G.R. (1990b). "Isolation and identification of alfalfa (*Medicago sativa* L.) root saponins. Their activity in relation to a fungal bioassay". J. Agric. Food Chem. Vol. 38. pp. 1810-1817.

Pedersen, M.W. (1975). "Relative quantity and biological activity of saponins in germinated seeds, roots and foliage of alfalfa." Crop Science. Vol. 15 (Jul-Ags). pp. 541-543.

Ponce, J. (1993). Evaluación de germinados hidropónicos. Informe Final de Servicio Social. Carrera de Agronomía. UAM- Xochimilco.

Porter, J.W. y Spurgeon, S.L. (1981). Biosynthesis of isoprenoid compounds.Vol.I. Wiley Interscience Publication. pp. 35, 37, 51, 469, 470.

Quattrocchi, O.A.; Abelaira, de A.S.; Laba, R.F. (1992). Introducción a la HPLC. Aplicación y Práctica. Artes Gráficas Farro S.A. Argentina. p. 312.

Ramírez, L.M. (1974). El cultivo de alfalfa en México. Dir. Gral. de extensión agrícola. SAG. Chapingo, México. 2a Ed. (Nov).

Rao, D. y Bories, G. (1987). "Gas chromatography determination of medicagenic acid in alfalfa". J. Chromatogr. Vol. 410. pp. 169-175.

Robles, S.R. (1983). "Cultivo de la alfalfa. Capítulo XVIII. En: Producción de Granos y Forrajes. 4a Ed. Ed. Limusa. pp. 441-467.

S.A.R.H. (1992). "Avance de siembra y cosecha de los cultivos principales. Producto : Alfalfa verde. Período 1989- 1991". Dirección General de Estadística. S.A.R.H. México.

Sánchez, S.O. (1968). Flora del Valle de México. Ed. Herrero Hermanos. México.

Sifuentes, J.A. (1987). "Plagas de la alfalfa y sus enemigos naturales en México". Folleto técnico No. 86. (Mayo). Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. I.N.I.F.A.P. México, D.F.

Small, E.; Jurzysta, M. y Nozolillo, C. (1990). "The evolution of hemolytic saponin content in wild and cultivated alfalfa (*Medicago sativa*, Fabaceae)". Economic Botany. Vol. 44, No. 2 . pp. 226-235.

Stuteville, D.L. y Skinner, D.Z. (1987). "Effect of selecting for downy mildew resistance in alfalfa on saponin content". Crop Science. Vol. 27 (Sep-Oct). pp. 906-908.