



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

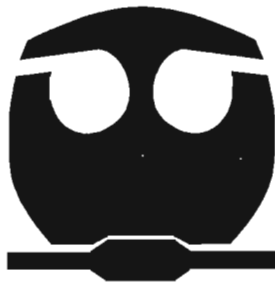
FACULTAD DE QUÍMICA

"CONTROL QUIMICO DE PLANTAS MEDICINALES
SMILAX SP"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A:
RAFAEL RAMIREZ LUNA



MÉXICO. D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

m. 347880



Universidad Nacional
Autónoma de México

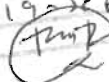


UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en tiempo digital e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Rafael Ramírez Luna
FECHA: 19 de septiembre
FIRMA: 

Jurado asignado:

Presidente	Dra. Ofelia Espejo González
Vocal	Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Secretario	Dr. Francisco Hernández Luis
1er. Suplente	Q. F. B. Honoria Fuentes Sixtos
2do. Suplente	Q. F. B. Pedro Salvador Valadez Eslava

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 121. Departamento de Farmacia. Facultad de Química. UNAM

Nombre Completo y Firma del asesor del tema:

Dra. Ofelia Espejo González



Nombre Completo y Firma del sustentante:

Rafael Ramírez Luna



DEDICATORIAS:

A Dios. Por ser el que está conmigo en todos los momentos de mi vida.

A mis padres. Ellos me dieron el gran honor de ser su hijo y con esto espero que se sientan orgullosos de mi.

A mi papá Cristóbal. Él me puso el ejemplo de que la perseverancia y el buen corazón logran lo que quieren.

A mi mamá Rosita. Su fortaleza ha sido la virtud en la que descansa la unión de esta familia.

A mis hermanas. La vida me dio dos bellas niñas con las cuales compartir ese lazo especial que sólo los hermanos pueden sentir.

A Karina. Lo que la hace diferente del resto de la gente, es que me hace enojar con mucha facilidad.

A Adriana. Al igual que Karina, tiene la virtud de sacarme de quicio sin mucho esfuerzo.

A México, al ser mi país, me dio un gran orgullo, pero la gran responsabilidad de ser un buen Mexicano.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi Alma Mater. Gracias por darme una casa a la cual pertenecer.

A la Facultad de Química, en ella he vivido la que hasta ahora ha sido la mejor etapa de mi vida.

A mis abuelitos. Gracias por darme esos padres que no tienen igual en este mundo.

A mi abuelito Luis. Esté donde esté, gracias por papá.

A mi abuelita Digna. Ella fue quién le heredó a mi papá la inteligencia, perseverancia y buen corazón que tiene.

A mi abuelito Hipólito. Un ejemplo claro de cómo se puede llegar a ser grande en un entorno humilde.

A mi abuelita Carmelita. De ella salieron las virtudes de saber ser el respaldo de una familia.

A mis tíos y primos. Ramiro y Cata; Maribel, Olivia, Araceli, Mirna y Sara; Ramiro, Jaqueline, Carmelita y Polo; Vicenta, Heladio y Juan; Teresa y Bárbara; Domingo y Tina; Vero y Daniel; Gudelia, Zeferino; Sergio y Oliva; Armando, Sergio, Lulú y Oscar; Joel y Rosa; Beto, César y Laura; Miguel y Amalia; Erika, Miguel, Carmelita, Rocío y Fanny; Pedro y Adela; Marisol, Arlette, Adelita y Alejandro; Jorge y Josefina; Pancho y Esperanza; Judith, David y Polo; Enrique y Lupe; Mónica y Ricardo; Mary, Orlando y Samy; Marta y Rogelio; Cari y Paola; Enrique, Vero y Lalo; Teresa, Julia, Carlos y Efraín; Hernán y Socorro; Yael, Omar y Nadia.

A mis padrinos Pedro y Marta; Miguel y Elodia.

A mis amigos con quienes he respirado el mismo aire. Se necesitan muchos dedos en la mano para contarlos.

A Gilda. Mi mejor amiga. Ella es responsable en gran parte de que esté terminando con esta etapa de mi vida y siga adelante. Gracias a ella supe de la importancia de saber comprender a la gente. Mi alma gemela.

A Jonathan. Mi mejor amigo. Nadie mejor que él para haber compartido la estancia en la UNAM. Con él supe que las apariencias engañan y que sabiendo buscar se encuentran a grandes personas como lo es él.

A Lalo. Si la vida me hubiese dado un hermano, debió haber sido él.

A Verónica. Por ser mi cómplice en muchas travesuras en la Facultad.

A Jorge. No hubo mejor compañero en las fiestas que él.

A Jessica. Con ella aprendí a saber como hacerle para que alguien tenga la confianza de abrirse conmigo.

A Sheila. A pesar de las dificultades que ha tenido, ha sabido salir adelante.

A Josué. Superó tiempos adversos y se abre paso para demostrar que sí se puede.

Al Neto. Su alma bohemia puede llenar de inspiración a cualquiera.

A Dianita Colín. Con ella tuve largas pláticas constructivas y muy divertidas.

A Marco. Una gran ayuda en el último paso de mi estancia en la UNAM. Cuando lo veo a él, es como si me viera a mi mismo. El destino dictó que de una u otra forma debíamos conocernos y doy gracias porque así fue.

A Karina. La empatía hace que seamos muy unidos. Con ella comparto el gusto por la música, la disfrutamos con la misma intensidad y esa coincidencia hace que nuestra amistad sea muy padre.

A Carlitos. Él me recuerda que en a cada momento y sin importar las circunstancias, hay que ser desprendido y apasionado en lo que se hace; sobretodo si es lo que a uno más le gusta hacer.

A Christian. A pesar de tener ideas muy diferentes, llegamos a las mismas conclusiones.

A mis amigos de la Facultad de Química: Pancho, Sergio, Julio, Ivonne, Erika, Sandra, Gamaliel, Wrooman, Manuelito, Fer, Ricardo (QA1), Panchito, Pedrito, Yolanda, Miriam, Rubén, Juan Carlos, Nelson, Angel, Vivis, Jazmín, Ernesto, Lariza, Dianita Sánchez, Luz, Julio Guerrero, Maggie, Paty, Paco, Itzel, Jeimy, Oliver, Ernesto, Paola, Lore, Anel, Elizabeth y Liliana.

A mis amigos del Departamento de Farmacia: Dr. Sergio, Dr. Juan Gabriel, José (Mister), Lalito, Paty, Toño, Dr. Castillo, Maestra Alicia, Dra. Aguilar, Dra. Elenita, Dr. Medina (Luisito) y Fabián.

A mis amigos del laboratorio 121: Susana, Sr. Antonio, Claudia, Lorena, Lina, Mirna, Laura, Natalia (muchas gracias), Adriana Agular, Rubén, Mari Ro, Lupis, Jackie, Erika, Oscar, Dulce, Sandra, Alicia, Adriana Álvarez, Marcela, Jorge, Dave, Paquito, Toño.

A la Dra. Espejo. Con nadie más hubiese podido encontrar una mejor asesora de mi tesis.

Al Prof. Lira. Me dio el ejemplo de ser un buen líder de un grupo de trabajo.

A los profesores que con sus enseñanzas me dieron las herramientas necesarias para llegar a ser un buen profesionalista.

A todos aquellos de quien no tengo el mejor de los recuerdos, pero que a pesar de todo, han dejado alguna enseñanza en mi vida.

A toda la música por hacernos viajar por todos los sentimientos conocidos.

A mis deportes favoritos: El Beisbol, el Fútbol Americano (Pumas CU) y el soccer (Cruz Azul).

Y a todos aquellos que todos los días se despiertan y hacen hasta lo imposible por ser felices; entre quienes espero que estén quienes lean esto y quienes no lo lean.

“Hay quienes se aferran al pasado aun cuando ponen en peligro su futuro; tal vez sea porque su pasado hace que su presente se vea mal, o tal vez sea porque el futuro es tan misterioso... como el periódico de mañana”

“Y a mí me gusta el pimpirimpimpim de la Universidad pararampampam...”

AGRADECIMIENTOS:

A la Dra. Espejo, por aceptarme en su laboratorio, por sus enseñanzas y sus consejos.

Al M. en C. Alfonso Lira, por su ayuda incomparable.

Al M. en C. Loza por su ayuda y apoyo ofrecido a esta Tesis.

Al Dr. Hernández y la Dra. Naranjo, por su participación y aportación a este trabajo.

Al personal de la USAI por los espectros realizados.

A los Laboratorios Mixim y al Ing. Ebrard por el apoyo otorgado a este proyecto.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN:	1
2. ANTECEDENTES:	2
2.1 VIGILANCIA Y CONTROL DE DROGAS CRUDAS.	2
2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO SMILAX	9
2.3 CONTENIDO QUÍMICO (SAPONINAS Y SAPOGENINAS)	11
2.4 USOS	16
2.5 MANEJO COMERCIAL	17
2.6 CONTROL ANALÍTICO	18
3. PARTE EXPERIMENTAL	20
3.1 MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.2 MÉTODO GENERAL	20
3.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO	23
3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	24
3.5 AISLAMIENTO DE MARCADORES	24
4. RESULTADOS	26
4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON METANOL	26
4.2 HIDRÓLISIS	26
4.3 CURVA ESTÁNDAR	27
4.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	29
4.5 AISLAMIENTO DE MARCADORES	32
5. CONCLUSIONES	36
6. BIBLIOGRAFÍA	37
7. ESPECTROS	38

1. INTRODUCCIÓN:

Las plantas medicinales son ampliamente utilizadas no sólo en México sino en todo el mundo, para una gran cantidad de aplicaciones.

Es bien sabido que en los últimos años ha habido un aumento notable en el interés hacia las plantas medicinales debido a la revaloración de estos productos; lo que ha ocasionado un aumento en el número de estudios científicos con todas las plantas que son utilizadas en la medicina popular. Aunque dichos estudios se han llevado a cabo por muchos años, es evidente que aún falta mucho camino por recorrer pues los estudios completos y concluyentes en relación con el número total de plantas de interés son muy escasos y el proceso es muy lento, quizás más lento que el del desarrollo de nuevos medicamentos tomando en cuenta los factores económicos que determinan a uno y otro.

Los estudios antes mencionados deben realizarse por muchas razones y una de ellas es el escaso control que hay sobre las drogas vegetales usadas por los consumidores finales, es decir, la población, considerando el riesgo sanitario que eso significa.

El papel de las Farmacopeas es muy importante, en ellas se encuentran los estudios concluyentes acerca de las plantas medicinales. En el caso de México, existe ya una Farmacopea Herbolaria lo que es notable, considerando que en el mundo existen pocas referentes sobre plantas medicinales; sin embargo, el número de monografías es aún escaso, debido a que las plantas mexicanas en mayor parte no están científicamente estudiadas; los estudios no son sistemáticos y en muchos casos los datos existentes no son confiables.

Este trabajo es una aportación a la información útil en el control de la droga vegetal conocida como Raíz de Cocolmea (*Smilax* sp.) que es ampliamente utilizada en nuestro país y sobre la que no existen estudios analíticos publicados.

Para cumplir con lo dicho en el párrafo anterior se requiere formalizar un método de análisis basado en un componente que pueda ser considerado como marcador químico.

En la literatura se encuentra que uno de los componentes de este género de plantas son las sapogeninas esteroides; una de las cuales, la esmilagenina, está presente en la droga vegetal; en este trabajo se considerará como marcador químico y referencia en el desarrollo de un método de valoración para la planta antes mencionada.

2. ANTECEDENTES:

2.1 VIGILANCIA Y CONTROL DE DROGAS CRUDAS.

La vigilancia de la calidad de las plantas medicinales y de las drogas crudas que se comercializan es una necesidad evidente considerando el nivel de riesgo que representan.

Este concepto es importante y se desprende de las recomendaciones que de un tiempo a la fecha ha hecho la OMS.

La OMS concede a las plantas medicinales una gran importancia, porque se reconoce que han formado la base de la atención de salud en todo el mundo desde los primeros días de la humanidad, siguen utilizándose ampliamente y tienen una considerable importancia en el comercio internacional. La OMS considera asimismo que el reconocimiento de su valor clínico, farmacéutico y económico sigue en aumento, si bien esto varía ampliamente entre un país y otro.

Se reconoce también el hecho de que las plantas medicinales son importantes para la investigación farmacológica y el desarrollo de medicamentos, no solo cuando los constituyentes de plantas se usan directamente como agentes terapéuticos sino también como materiales de base para la síntesis de medicamentos o como modelos para compuestos farmacológicamente activos.

Existe asimismo una preocupación por su permanencia por lo que la misma OMS señala como necesaria la reglamentación de la explotación, junto con la cooperación y la coordinación internacionales, que considera esenciales para su conservación a fin de asegurar su disponibilidad para el futuro.

Hay diferentes maneras en las cuales los países definen las plantas o hierbas medicinales o los productos derivados de las mismas, y han adoptado diversos enfoques en la autorización, el expendio, la fabricación y la comercialización para asegurar su inocuidad, calidad y eficacia.

Pero desgraciadamente no es la misma situación en todos los países; porque en los de desarrollo a menudo poseen una gran cantidad de medicamentos herbarios de uso tradicional y muchos conocimientos populares sobre ellos, pero no tienen casi ningún criterio legislativo para establecer dichos medicamentos herbarios de uso tradicional como parte de la legislación sobre medicamentos.

La OMS ha propuesto que en los casos en que los medicamentos herbarios y los productos relacionados no estén registrados ni controlados por los órganos normativos, se necesita un sistema especial de concesión de licencias que permita a las autoridades de salud identificar los ingredientes, exigir prueba de calidad antes de la comercialización, asegurar el uso correcto e inocuo y también a obligar a los poseedores de licencia a informar presuntas reacciones adversas dentro de un sistema de vigilancia posterior a la comercialización.

El Programa de Medicina Tradicional de la OMS mediante la la Asamblea Mundial de la Salud (WHA) ha adoptado varias resoluciones haciendo resaltar el hecho de que, en muchos países en desarrollo, un gran segmento de la población todavía depende de la medicina tradicional y que la fuerza laboral representada por los profesionales tradicionales es un recurso importante para la atención primaria de salud. En 1978, la Declaración de Alma-Ata recomendó, entre otras cosas, la inclusión de las medicinas tradicionales de utilidad comprobada en las políticas farmacéuticas y las medidas normativas nacionales.

La política de la Organización Mundial de la Salud en lo referente a la medicina tradicional se presentó en el informe de la Directora General sobre la Medicina Tradicional y la Atención de Salud Moderna a la Cuadragésima Cuarta Asamblea Mundial de la Salud en 1991, en el que decía que la OMS colaboró con sus Estados Miembros en el examen de las políticas nacionales, la legislación y las decisiones sobre la naturaleza y el grado de uso de la medicina tradicional en sus sistemas de salud. Sobre la base de las resoluciones pertinentes de la AMS, los objetivos principales del Programa de Medicina Tradicional son: facilitar la integración de la medicina tradicional en los sistemas nacionales de atención de salud, promover el uso racional de la medicina tradicional mediante la formulación de pautas técnicas y normas internacionales en el campo de los medicamentos herbarios y la acupuntura, y actuar como centro de difusión de información sobre diversas formas de la medicina tradicional.

En la resolución WHA42.43 (1989), la Asamblea de la Salud instó a los Estados Miembros a que efectuaran una evaluación completa de sus sistemas de medicina tradicionales; a hacer sistemáticamente un inventario y un estudio (preclínico y clínico) de las plantas medicinales que utilizan los que practican la medicina tradicional y la población; implantar medidas con el fin de reglamentar y controlar los productos elaborados a partir de plantas medicinales y establecer y mantener estándares adecuados; y a identificar las plantas medicinales o los medicamentos de ellas derivados que tengan una relación eficacia/efecto-secundario satisfactoria y que por lo cual deben incluirse en los formularios o farmacopeas nacionales.

En años recientes, muchos países desarrollados han mostrado interés creciente en los sistemas alternativos o complementarios de la medicina, con el

consiguiente aumento del comercio internacional de medicamentos herbarios y otros tipos de medicamentos tradicionales. En consecuencia, tanto en países desarrollados como en aquellos en desarrollo existe un estímulo para evaluar y racionalizar las prácticas y para controlar la explotación comercial de medicamentos herbarios mediante la venta sin prescripción y otros etiquetados como "naturales".

Los medicamentos herbarios han estado incluidos en la Conferencia Internacional sobre Autoridades Reguladoras de Medicamentos (ICDRA) desde la Cuarta Conferencia en 1986. Durante la Cuarta y la Quinta Conferencia de ICDRA en 1986 y 1989 se realizaron talleres sobre la reglamentación de los medicamentos herbarios que se mueven en el comercio internacional, en los cuales las deliberaciones se limitaron a la explotación comercial de las medicinas tradicionales por medio de productos rotulados de venta sin prescripción (OTC). Se llegó a la conclusión de que la Organización Mundial de la Salud debería considerar la posibilidad de preparar normas modelo que contengan elementos básicos de legislación y registro.

En una reunión de consulta de la OMS, que tuvo lugar en Munich, Alemania, en junio de 1991, se redactaron Normas para la Evaluación de los Medicamentos Herbarios que fueron adoptadas para uso general por la Sexta ICDRA en Ottawa, en octubre de 1991. Estas normas (OMS/TRM/91.4) definen los criterios básicos para la evaluación de la calidad, la inocuidad y la eficacia de los medicamentos herbarios para ayudar a las autoridades normativas nacionales, organizaciones científicas y fabricantes a que emprendan una evaluación de la documentación, de las presentaciones y los expedientes con respecto a tales productos. Una regla general de tal evaluación es que se tendrá en cuenta la experiencia tradicional en el uso de estos productos así como los antecedentes médicos, históricos y etnológicos, mediante descripciones detalladas en la bibliografía médica o farmacéutica o en reseñas documentadas de sus aplicaciones.

Estas normas deben contener criterios básicos para la evaluación de la calidad, la seguridad y la eficacia así como requisitos importantes para el etiquetado y el prospecto para información del consumidor. Los requisitos de evaluación farmacéutica abarcan temas como identificación, formulación, análisis y estabilidad. La evaluación de la inocuidad debe cubrir al menos la experiencia documentada de estudios toxicológicos y de inocuidad, donde se indica. La evaluación de la eficacia y el uso designado comprenden evaluación del uso tradicional mediante evaluación de la bibliografía y pruebas para apoyar las afirmaciones de indicación. Se incluyen capítulos especiales sobre productos combinados y los requisitos en cuanto a información para el consumidor sobre el producto. Las Normas de la OMS tienen el propósito de facilitar el trabajo de las autoridades reguladoras, los órganos científicos y la industria en el desarrollo, la evaluación y el registro de los medicamentos herbarios, poniendo de manifiesto los resultados científicos que podrían ser la base para la clasificación futura de

medicamentos herbarios; también darían cabida a la transferencia transcultural de conocimientos sobre medicamentos herbarios tradicionales entre diferentes partes del mundo.

En 1994, la Oficina Regional de la OMS para el Mediterráneo oriental publicó Normas para la Formulación de la Política Nacional sobre Medicamentos Herbarios. Como la mayoría de la población mundial acude en busca de tratamiento a consultorios médicos tradicionales, en especial de medicamentos herbarios, y como éstos son de valor particular en problemas del aparato digestivo, dolencias de las vías respiratorias superiores, enfermedades de las vías urinarias y de la piel, es evidente la necesidad de formular políticas nacionales sobre las medicinas tradicionales y promover la cooperación entre los Estados Miembros en este sentido. El objetivo de tales políticas nacionales sería formular reformas reglamentarias y jurídicas para asegurar una buena práctica y ampliar la cobertura de la atención primaria de salud, mientras se aseguran la autenticidad, la seguridad y la eficacia de estos medicamentos. Los objetivos principales comprenden el reconocimiento de la medicina tradicional como parte integrante de los sistemas nacionales de atención de salud, la cooperación entre la medicina moderna y la tradicional, la promoción del uso racional de los productos, la introducción de los sistemas de garantía de la calidad, la garantía de suministros regulares, la promoción de la investigación y la elaboración de medidas normativas. Se ha recomendado a los países que se establezca un Comité Nacional de Expertos, que sería la autoridad apropiada para identificar las medidas y los planes necesarios para formular una política nacional en esta esfera y luego preparar, dirigir y vigilar las diversas fases de su ejecución. Entre las funciones y las actividades del Comité Nacional de Expertos deben figurar las siguientes: formular una lista nacional de los medicamentos herbarios esenciales, preparar normas para los requisitos de registro, asesorar sobre un sistema nacional de concesión de licencias, asesorar en cuanto a los medios para informar sobre reacciones adversas y proponer métodos apropiados de comunicación y cooperación con el Ministerio de Salud. Los criterios para la selección de las hierbas medicinales esenciales deben ser principalmente la seguridad, la eficacia, las necesidades en asuntos de salud y la disponibilidad de suministros. Sobre la base de la lista aprobada de plantas medicinales de cada país, la política debe indicar claramente cómo se aseguraría el suministro de dichas plantas. El procedimiento de suministro debe comprender recolección, cultivo, producción y elaboración locales, importaciones y preservación de la flora nacional. En un sistema nacional de garantía de la calidad, es preciso fijar normas y reglamentos a fin de asegurar la calidad de todas las plantas medicinales y sus preparados que están disponibles en el mercado. Las normas contienen un capítulo especial dedicado a los criterios para la investigación sobre los medicamentos herbarios tradicionales y criterios para su uso racional.

Con el fin de elaborar criterios y principios generales que guíen la labor de investigación sobre la evaluación de los medicamento herbarios, la Oficina Regional de la OMS para el Pacífico Occidental organizó, en 1992, una reunión

de expertos para formular normas para la investigación sobre estos medicamentos. Se han incorporado a estas normas principios científicos básicos y los requisitos especiales relacionados con su uso en la práctica tradicional, cuyos objetivos principales son asegurar la inocuidad y eficacia de dichos medicamentos, promover su uso racional y proporcionar criterios de investigación para su evaluación. Las normas proporcionan una base para que los Estados Miembros formulen sus propias normas de investigación y para el intercambio de experiencias de investigación y otra información de manera que pueden acumularse un conjunto de datos confiables para la validación de los medicamentos herbarios. La adopción de dicha política tenía el propósito de ayudar a superar las barreras para el uso de medicamentos herbarios.

Los enfoques de investigación deben diferenciar entre los medicamentos herbarios con una larga experiencia documentada y aquellas cuyo uso "tradicional" todavía no se ha establecido. De conformidad con las Normas de la OMS para la Evaluación de los Medicamentos Herbarios (OMS/TRM/91.4), al realizar la investigación debe considerarse, como regla general, la experiencia tradicional en la preparación respectiva, que incluye el uso de gran cantidad de datos y referencias así como los antecedentes médicos, históricos y etnológicos.

Los medicamentos herbarios tienen dos características especiales que los distinguen de los medicamentos químicos: el uso de hierbas sin elaborar y el uso prolongado. Una única hierba puede contener muchos constituyentes naturales; una combinación de hierbas, aún más. La experiencia señala que el uso de plantas medicinales enteras y sus extractos tienen beneficios reales a largo plazo, ya que los componentes de las mismas actúan conjuntamente unos con otros. Sin embargo, hay muy poca investigación sobre las plantas enteras porque el proceso de aprobación de medicamentos no da cabida a mezclas indiferenciadas de productos químicos naturales, la función colectiva de los cuales es incierta. Aislar cada principio activo de cada hierba sería inmensamente lento a un costo insostenible y es casi imposible en el caso de las preparaciones.

El resumen y las recomendaciones de la Sexta ICDRA impulsaron a la OMS a que siguiera elaborando monografías farmacopéicas de los medicamentos herbarios sobre la base de las Normas para la Evaluación de los Medicamentos Herbarios. En respuesta a la solicitud de los Estados Miembros, el Programa de Medicina Tradicional de la OMS decidió preparar un documento técnico, titulado "Monografías de la OMS sobre Plantas Medicinales Seleccionadas", para la atención primaria de salud. La información contenida en las monografías comprende dos partes: la Parte I consta de resúmenes de las características botánicas, los principales componentes químicos activos y el control de calidad de cada planta; la Parte II consta de resúmenes de las aplicaciones clínicas, la farmacología, la posología, las contraindicaciones y precauciones posibles, y las reacciones adversas potenciales.

Una consulta de la OMS sobre las "Monografías de la OMS sobre Plantas Medicinales Seleccionadas" tuvo lugar en Munich, Alemania, en 1996. Tras discusión y análisis, se adoptaron 28 monografías. La finalidad de este documento es proporcionar información científica sobre la inocuidad, la eficacia y el control de calidad de las plantas medicinales de uso generalizado; facilitar el uso adecuado de los medicamentos herbarios; proporcionar modelos para que los Estados Miembros elaboren sus propias monografías sobre estas y otros medicamentos herbarios adicionales, y facilitar el intercambio de información. Las 28 monografías se presentaron en la Octava reunión de la ICDRA, que tuvo lugar en Bahrein en noviembre de 1996. Están preparándose otras 32 monografías. [1]

En México la situación de las plantas medicinales no es muy diferente de la situación que existe en países que no son altamente industrializados.

Existe una dualidad en el uso, por una parte la medicina tradicional sigue siendo importante en el manejo terapéutico, aunque las plantas en uso no sean las originarias del país o la región, sino que incluyen (a veces en forma prominente) a plantas introducidas y a algunas que ni siquiera se cultivan en México y que tienen origen geográfico muy lejano.

Estas plantas son generalmente comercializadas en mercados, por yerberos y curanderos, y en ocasiones recomendadas por médicos relacionados con la medicina alternativa. En ocasiones, estas plantas son medianamente industrializadas por empresas pequeñas que no tienen rigor en su proceso ni en su control analítico. En ningún caso estos productos se sujetan a un registro oficial ni a la supervisión gubernamental y son parte de una comercialización informal.

Por otra parte, existe una oferta y una demanda de productos industrializados a base de plantas medicinales, que en muchos casos no está basada en los usos tradicionales de las plantas usadas, sino en nuevos usos y aplicaciones (productos para adelgazar, adyuvantes sexuales, etc), que no tienen el sustento de estudios clínicos serios y confiables, ni de estudios químicos permitan controlar su calidad

Cabe decir que en muchos casos, el precio de estos productos, es más elevado que el de los medicamentos ortodoxos.

Respecto a los medicamentos herbarios tanto en los países industrializados como en los que están en vías de desarrollo, existe una reglamentación que no siempre es clara.

En el caso particular de México, se tiene que tanto la Ley General de Salud como el Reglamento de Insumos para la Salud hacen mención de los medicamentos herbarios. La Ley General de Salud en su Título decimosegundo:

“Control Sanitario de Productos y Servicios de su Importación y Exportación” capítulo cuarto: “Medicamentos” artículo 221 define medicamento como:

Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas. Cuando un producto contenga nutrimentos, será considerado como medicamento, siempre que se trate de un preparado que contenga de manera individual o asociada: vitaminas, minerales, electrólitos, aminoácidos o ácidos grasos, en concentraciones superiores a las de los alimentos naturales y además se presente en alguna forma farmacéutica definida y la indicación de uso contemple efectos terapéuticos, preventivos o rehabilitatorios.

En su artículo 221 determina que: La Secretaría de Salud sólo concederá la autorización correspondiente a los medicamentos, cuando se demuestre que las sustancias que contengan reúnan las características de seguridad y eficacia exigidas, y tomarán en cuenta, en su caso, lo dispuesto por el Artículo 428 de esta Ley. (Revocaciones)

Y en el artículo 223 hace mención de los controles a los cuales estarán sujetos los productos que contengan plantas medicinales:

El proceso de los productos que contengan plantas medicinales queda sujeto al control sanitario a que se refiere este capítulo y a las normas oficiales mexicanas que al efecto emita la Secretaría de Salud.

En el artículo 224 de la misma Ley, se encuentra la clasificación de los medicamentos entre los cuales están los herbolarios.

Artículo 224.- Los medicamentos se clasifican:

A. Por su forma de preparación en:

I. Magistrales: Cuando sean preparados conforme a la fórmula prescrita por un médico,

II. Oficinales: Cuando la preparación se realice de acuerdo a las reglas de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, y

III. Especialidades farmacéuticas: Cuando sean preparados con fórmulas autorizadas por la Secretaría de Salud, en establecimientos de la industria químico-farmacéutica.

B. Por su naturaleza:

I. Alopáticos: Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio, que se presente en forma farmacéutica y se identifique como tal por su actividad farmacológica, características físicas, químicas y biológicas, y se encuentre registrado en la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos para medicamentos alopáticos,

II. Homeopáticos: Toda sustancia o mezcla de sustancias de origen natural o sintético que tenga efecto terapéutico, preventivo o rehabilitatorio y que sea elaborado de acuerdo con los procedimientos de fabricación descritos en la Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos Mexicanos, en las de otros países u otras fuentes de información científica nacional e internacional, y

III. Herbolarios: Los productos elaborados con material vegetal o algún derivado de éste, cuyo ingrediente principal es la parte aérea o subterránea de una planta o extractos y tinturas, así como jugos, resinas, aceites grasos y esenciales, presentados en forma farmacéutica, cuya eficacia terapéutica y seguridad ha sido confirmada científicamente en la literatura nacional o internacional.

El reglamento de insumos para la salud menciona en el Título II: "Insumos" capítulo VI: "Medicamentos herbolarios". Discute lo relacionado con los medicamentos herbolarios.

Medicamentos herbolarios

ARTÍCULO 66. Los medicamentos herbolarios, además de contener material vegetal, podrán adicionar en su formulación excipientes y aditivos.

ARTÍCULO 67. No se consideran medicamentos herbolarios aquéllos que estén asociados a principios activos aislados y químicamente definidos, ni aquéllos propuestos como inyectables.

ARTÍCULO 68. En la formulación de un medicamento herbolario no podrán incluirse sustancias estupefacientes o las psicotrópicas de origen sintético, ni las mezclas con medicamentos alopáticos, procaína, efedrina, yohimbina, chaparral, germanio, hormonas animales o humanas u otras sustancias que contengan actividad hormonal o antihormonal o cualquier otra que represente riesgo para la salud.

ARTÍCULO 71. La venta y suministro de los medicamentos herbolarios que no sean ni contengan estupefacientes ni psicotrópicos, podrá realizarse en Establecimientos que no sean farmacias.

2.2 CARACTERÍSTICAS GENERALES DEL GÉNERO SMILAX

En México se tiene estimado que existen cerca 30,000 especies de plantas de las cuales en 1997 el Instituto Nacional Indigenista documentó 3,000 con usos medicinales, esto es el 10% del total de la riqueza florística del país. [2]

Estudios realizados por Betancourt y Gutiérrez (1999) reportan que de manera cotidiana se comercializan cerca de 250 especies de plantas medicinales frescas y deshidratadas provenientes principalmente de las zonas centro y sur del país [2]

La droga llamada cocolmea (*Smilax sp*) está constituida por plantas que pertenece al género *Smilax* y cuyas características se describen a continuación:

Las plantas que pertenecen al género *Smilax*, con alrededor de 350 especies, son arbustos trepadores, vivaces con tallos espinosos. Las hojas son alternas, coriáceas, pecioladas, aovadas u oblongas, con 5 a 7 nervios y reticuladas entre ellos, con bases acorazonadas, alabardadas o redondeadas y estípulas modificadas en forma de zarcillos. Generalmente están armadas con espinas en los nervios principales por la parte inferior. Las flores se presentan en umbelas axilares. El fruto es una baya globosa y pequeña. [3]

Producen numerosas raíces de unos 3 cm de longitud y 6 mm de diámetro, unidas a un corto rizoma. Para la recolección se cortan las raíces, pero dejando en el terreno la parte suficiente para que la planta prosiga su desarrollo. A veces el rizoma se recolecta junto con las raíces.[3]

Las plantas que pertenecen al género *Smilax* (Liliaceae), están muy distribuidas en las zonas tropicales y templadas en todo el mundo, y especialmente en las zonas tropicales del este de Asia y Norteamérica [4]; muchas de estas especies han sido estudiadas químicamente y se ha encontrado que contienen saponinas esteroidales [5].

A continuación se enlistan algunas características de las plantas pertenecientes a este género que se encuentran en diferentes partes del continente.

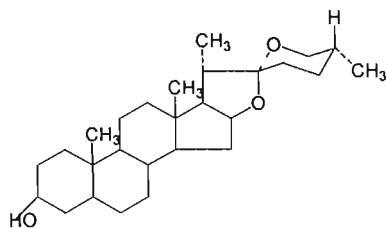
Cuadro 1. Características de las plantas del género *Smilax*.

Características	Variedad			
	Mexicana	Hondureña	Ecuatoriana	Centroamericana
Haces	De hasta 65cm de longitud Rizomas y tallos, hasta un 10%	50-75cm de longitud Sólo raíces	Unos 50cm de longitud Raíces y tallos hasta un 10%	Unos 45 cm de longitud Sólo raíces
Diámetro de las raíces	3.5-6mm	2-5.5mm	2-6mm	1-4.5 mm
Color	Pardo con tonalidad grisácea, rojiza o amarillenta	Pardorrojizo a pardo oscuro	Pardorrojizo a púrpúreo	Pardorrojizo a amarillento

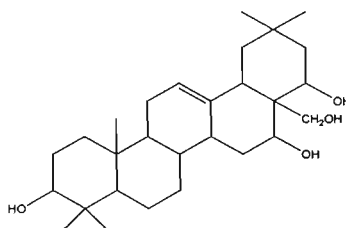
[3]

2.3 CONTENIDO QUÍMICO (SAPONINAS Y SAPOGENINAS)

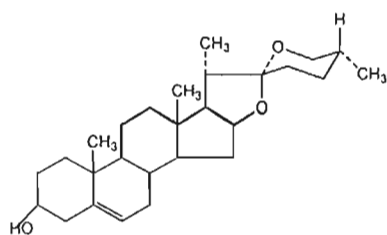
Se le da el nombre de saponinas a (del latín sapón – jabón) a un grupo de glicósidos que se disuelven en agua y disminuyen la tensión superficial de ésta; por lo tanto, al sacudir sus soluciones, se forma una espuma abundante y relativamente estable. Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina, la cual puede tener un esqueleto esteroidal (tipo colano) como en la esmilagenina, o de triterpeno tipo β -amirina como en la chichipegénina; tipo α -amirina, como en el ácido asiático; tipo lupeol como en la estallogenina; o de tipo tetracíclico (Figura 1). [6]



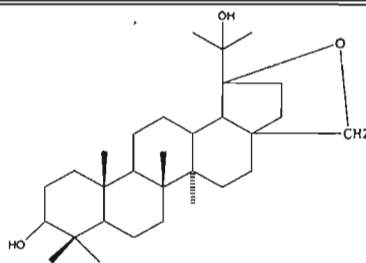
1.1 Esmilagenina



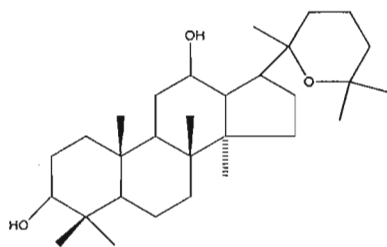
1.2 Chichipegénina



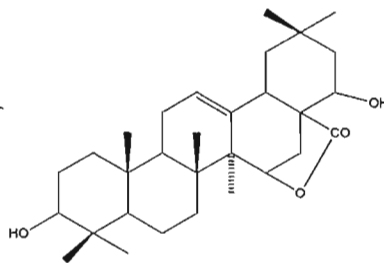
1.3 Ác. Asiático.



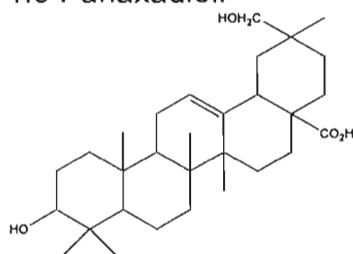
1.4 Estallogenina.



1.5 Panaxadiol.



1.6 Dumortierigenina.



1.7 Ác. Queretaróico.

Figura 1. Ejemplos de saponinas.

Con excepción de la criptogenina, el sistema espiroacetal [anillos E y F] es una característica general de las saponinas esteroidales y, es variable el número de insaturaciones, hidroxilos, grupos cetónicos y otros grupos oxigenados (Figura 2). Las agliconas triterpenoides están también representadas por la dumortierigenina y el ácido queretaróico. El enlace glicosídico siempre se forma con el oxígeno del carbono 3. Se conocen más de 200 saponinas esteroidales localizadas en las monocotiledóneas (lileáceas, amarilidáceas y dioscoráceas, principalmente) y otras tantas saponinas triterpenoides, aisladas principalmente dicotiledóneas. [6]

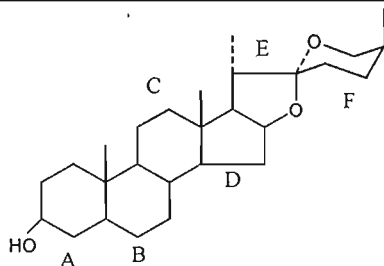
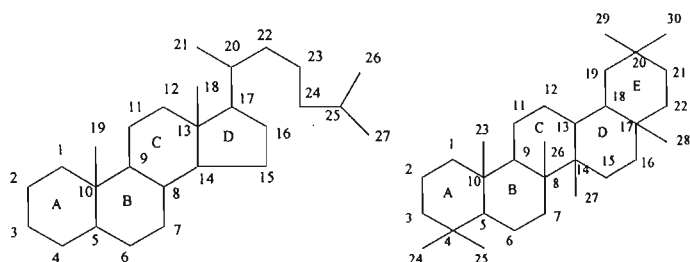


Figura 2. Esqueleto de sapogenina.

Las sapogeninas como tales no se encuentran en forma libre, en los rizomas sino que están en forma de glucósidos, es decir, la sapogenina unida a un azúcar, lo que se conoce como saponina o bien, glucósido esteroide.

Las saponinas tienen elevado peso molecular y su aislamiento en estado puro ofrece ciertas dificultades. Como heterósidos que son, se hidrolizan por ácidos, dando una genina (sapogenina) y diversos azúcares. Según la estructura de la sapogenina, se conocen dos grupos de ellas; los de tipo esteroide (generalmente triterpenoides tetracíclicos) y los triterpenoides pentacíclicos. Ambos presentan un enlace heterosídico en el C-3 (Figura 3) y tiene un origen biogénético común vía ácido mevalónico y unidades isoprenoides (Figuras 4 y 5).[7]



3.1 Esqueleto esteroide. 3.2 Esqueleto triterpenoide.

Figura 3. Esqueletos de sapogeninas

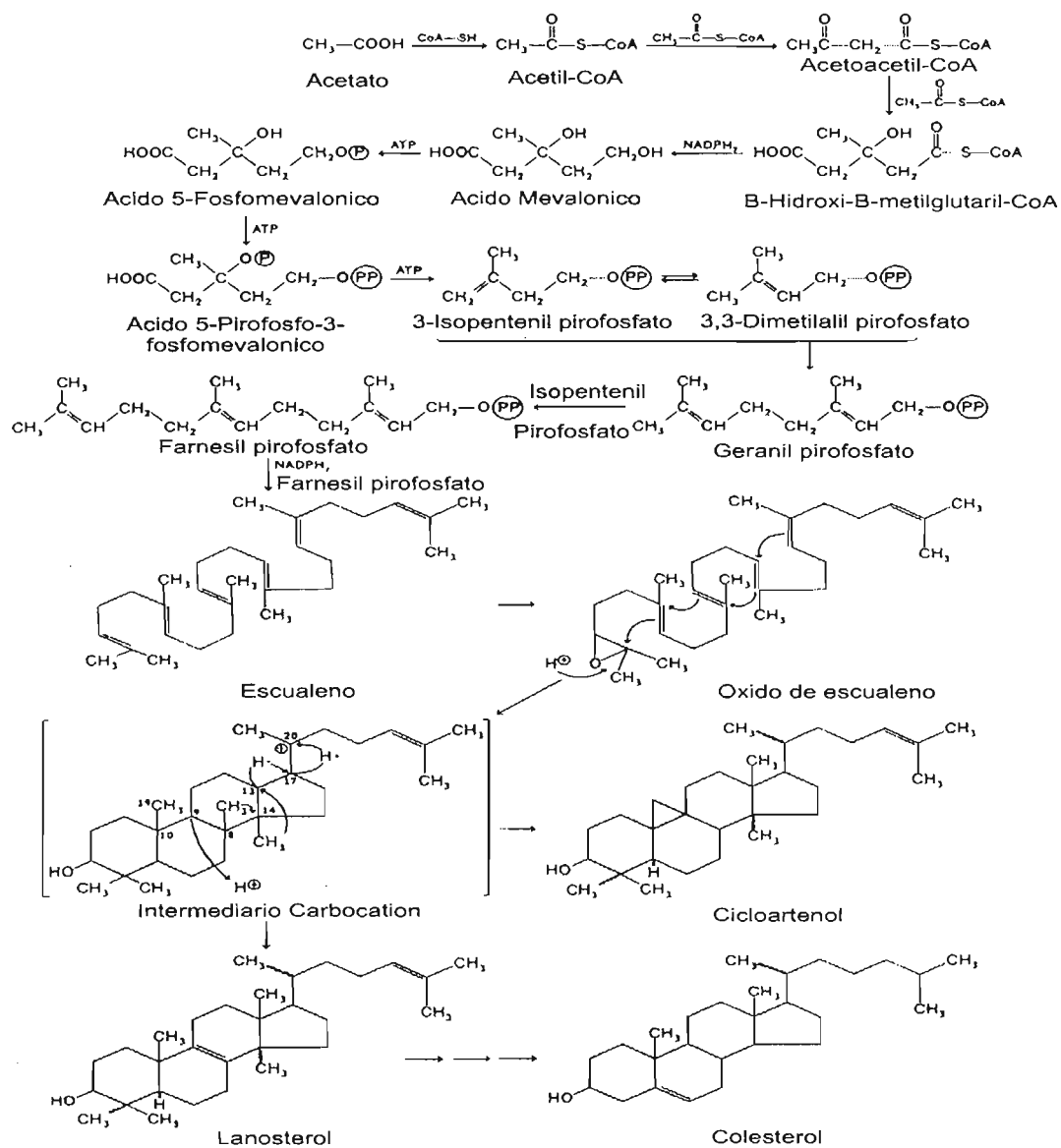


Figura 4. Biosíntesis del colesterol.

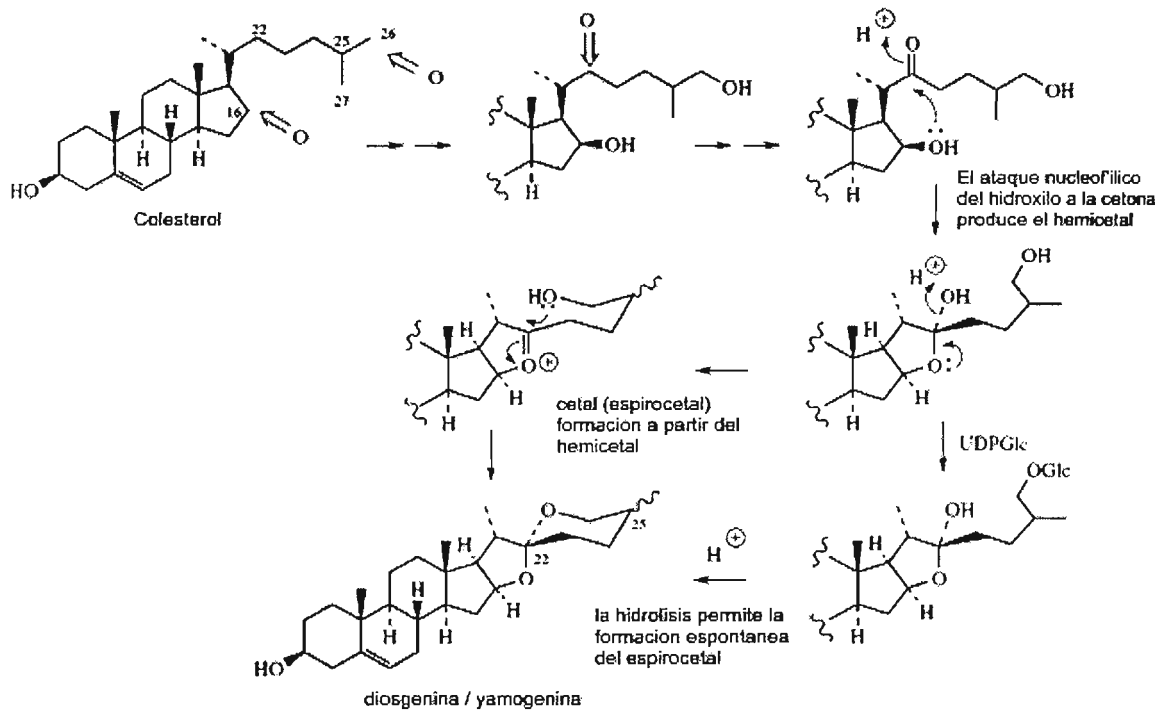


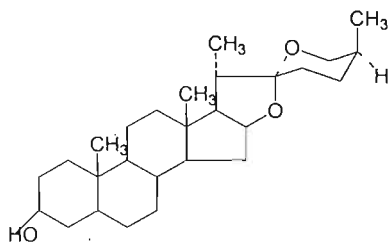
Figura 5. Biosíntesis de la diosgenina a partir del colesterol.

Las sapogeninas se encuentran entre el 1-3% de base seca en los rizomas de diversas especies del género Smilax. [7]

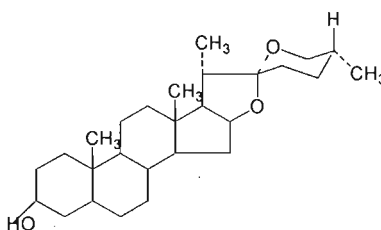
Entre los compuestos que contienen están las saponinas que al hidrolizarse producen sapogeninas y azúcares; los compuestos de mayor interés son:

1. Sarsasapogenina.
2. Diosgenina.
3. Esmilagenina.

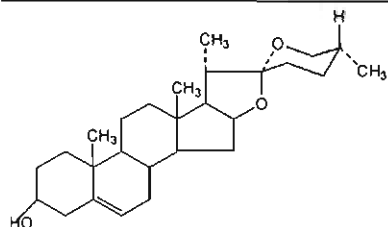
Los cuales son sapogeninas; sus estructuras son:



6.1 Sarsasapogenina.



6.2 Esmilagenina



6.3 Diosgenina

Figura 6. Ejemplos de sapogeninas

La diferencia entre la esmilagenina y la sarsapogenina, reside en que el carbono de la posición 25 en la esmilagenina es R y, en la sarsapogenina es S.

Cuadro 2. Ejemplos de azúcares de saponinas y sus fuentes.

Saponinas	Azúcares	Fuente
Sarsaponina	2 glucosas, 1 ramnosa	Raíces de Smilax spp.
Digitonina	2 glucosas, 2 galactosas, 1 xilosa	Semillas de Digitalis purpurea y D. Lanata
Gitonina	1 glucosa, 2 galactosas, 1 xilosa	Semilla y hojas de D. Purpurea y semillas de D. Lanata
Dioscina	1 glucosa, 2 ramnosas	Dioscorea spp. [9]

[7]

2.4 USOS

La sarsaparilla, sinónimo de cocolmecha ha sido usada para remediar diversos males entre los cuales están:

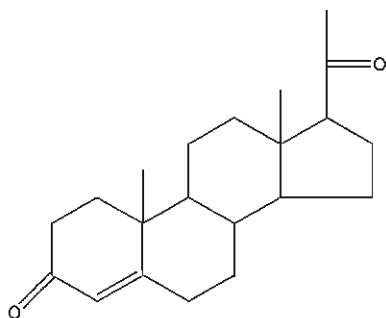
Hidropesía, obesidad, eczema, psoriasis, artritis reumatoide

También se dice que es relajante del musculo estriado uretral, “purifica” la sangre, es sudorífica, diurética, sirve para erupciones de la piel y elimina ácido úrico. [10]

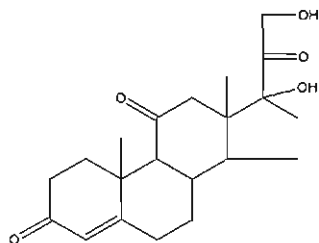
Las saponinas esteroides son de gran interés e importancia por su relación con compuestos como las hormonas sexuales, cortisona, esteroides diuréticos, vitamina D y heterósidos cardiacos (Figura 7). Algunas son utilizadas como material de partida para la síntesis de estos compuestos.[4]

Las sapogeninas esteroidales son materias primas, muy usadas en la síntesis parcial de fármacos esteroidales y su importancia económica es una de

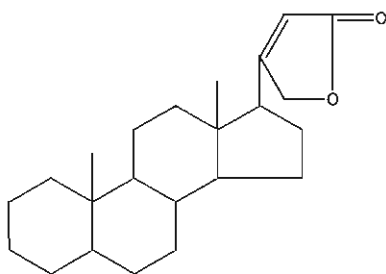
las razones por las cuales se han llevado a cabo múltiples investigaciones, especialmente para métodos analíticos.



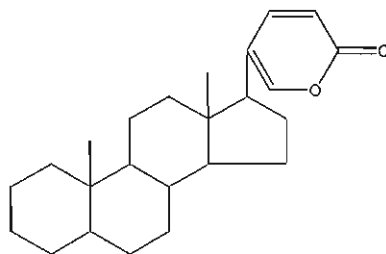
7.1 Progesterona.



7.2 Cortisona.



7.3 Cardenólido.



7.5 Bufadienólido.

Figura 7. Compuestos relacionados con las sapogeninas.

2.5 MANEJO COMERCIAL

Además de su comercialización como droga cruda en los mercados del país existen algunos productos comerciales, producidos por fabricantes locales, que usualmente no están formalmente registradas ante la SSA y por tanto sus productos no tienen una autorización o registro formal, ni su producción se acoge a buenas prácticas de fabricación.

Entre estos productos están:

a) SINDIET [11]

b) Thermogen Tea [11]

2.6 CONTROL ANALÍTICO

Existen en la literatura ejemplos formales para la cuantificación de sapogeninas, generalmente ligados a su uso como materias primas en la fabricación de esteroides.

La detección y determinación de sapogeninas puede llevarse a cabo convenientemente por espectrofotometría IR; también se han diseñado ensayos gravimétricos y colorimétricos.[7]

Cuantificación de saponinas y sapogeninas:

Las primeras determinaciones de las saponinas que se hicieron en plantas se basaron predominantemente en la gravimetría o en métodos que aprovechaban sus características químicas o biológicas. La capacidad de producir espuma que es una de sus características mejor conocidas ha sido utilizada para buscar el contenido de saponinas en las plantas. [12]

Algunas saponinas presentan actividad hemolítica propiedad que ha sido usada para el desarrollo de pruebas semicuantitativas. [12]

La cuantificación de saponinas también se puede intentar por medio de otros medios biológicos como el de la inhibición del crecimiento de hongos *Trichoderma viride* o *Tribolium castaneum*, o la inhibición de la germinación de semillas de lechuga. [12]

Los métodos biológicos a pesar de su simplicidad son en el mejor de los casos aproximados y no distinguen entre saponinas diferentes. Aun así, estos métodos se pueden usar de manera satisfactoria en trabajos en los que el objetivo sea la comparación de la concentración de saponinas totales. Para semicuantificar saponinas, la prueba debe de estandarizarse con mezclas de saponinas aisladas de las especies estudiadas. De cualquier modo los métodos biológicos fallan cuando las preparaciones de las saponinas se usan para pruebas de actividad biológica. Debido a que la actividad biológica de las saponinas ha sido cercanamente relacionada con la estructura individual de las saponinas y debido a que su concentración puede cambiar a causa de diferentes factores, incluyendo la edad de la planta, fase del crecimiento estrés ambiental, etc. [12]

Los métodos no biológicos de determinación total de sapogeninas incluyen: espectrofotometría, densitometría-CCF, cromatografía de gases, HPLC técnicas conjuntas tales como CL-EM CL-RMN y electroforesis capilar. Mientras que las primeras tres técnicas han sido utilizadas para la cuantificación de las sapogeninas y/o saponinas en plantas, las recientes técnicas conjuntas permiten el monitoreo rápido inicial de los extractos crudos proporcionando información preliminar no cuantitativa del contenido y naturaleza de los constituyentes en la

planta. Dichas técnicas proporcionan un buen método de identificación de nuevos compuestos con actividad biológica potencial y hace que se evite el aislamiento innecesario de compuestos comunes de menor interés. [12]

En cuanto a los métodos espectrofotométricos, la mayoría de los reactivos que se han utilizado, por ejemplo, cloruro de antimonio III en una solución acidulada o ácido sulfúrico y formaldehído, eran aplicables sólo a las sapogeninas que tienen la estructura Δ en el anillo-B y un grupo hidroxilo en la posición 3. Esta característica ocurre también en los fitosteroles y muchas sapogeninas tales como tigogenina, gitogenina, hecogenina, esmilagenina, yonogenina y tokorogenina, por lo tanto no pueden ser determinadas. Por otro lado, otros métodos determinan sólo sapogeninas saturadas (reactivos basados en ácido ortofosfórico y anisaldehído) así que para la determinación de las sapogeninas totales es necesario un método adicional. Aun la técnica en la que se usan la vainillina y el ácido sulfúrico no es específica para sapogeninas porque los esteroides, los ácidos biliares y los esteroides triterpenoides los cuales tienen un grupo hidroxilo en la posición 3, dan cromóforos. Es conocido que las sapogeninas tratadas con ácido sulfúrico concentrado producen cromóforos característicos, todos los cuales de cualquier forma no absorben a la misma longitud de onda. En suma el problema de interferencia es particularmente importante en esta instancia. Esta deficiencia permite divisar un método que sea más específico para sapogeninas y permita determinar todas las sapogeninas a pesar de sus particularidades en cuanto a la estructura. Tales propiedades son muy importantes, especialmente cuando es deseable determinar el contenido de sapogeninas cuando su estructura exacta no es conocida, o cuando se estudie su fisiología durante ciertas etapas vegetales. Se ha mostrado que bajo esas condiciones las diferencias cualitativas y cuantitativas son importantes. Las reacciones que envuelven los anillos E y F de las moléculas proporciona una base para desarrollar un método rápido, exacto y simple. [13]

El método se basa en la formación de un derivado colorido, que se forma cuando reaccionan el grupo espiroetano de las sapogeninas con el anisaldehído y; el compuesto formado se mide a 430 nm. [13]

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.1 MATERIAL

- Material vegetal: Raíz de cocolmecha, 3 kg. Procedencia: Laboratorios Mixim; alternativamente se emplearon muestras obtenidas en el Mercado de Sonora procedentes de: Chiapas, Hidalgo y Guerrero.
- Material de vidrio común para la extracción y el trabajo analítico.
- Molino Willey de malla de 1 mm
- Espectrofotómetro Shimadzu.
- Celdas de cuarzo.

3.1.2 REACTIVOS

Disolventes: Etanol al 70%, Etanol, Metanol, Butanol, Hexano (destilado y grado reactivo).

Revelador: Vainillina-ácido sulfúrico (se prepara mezclando 1:1 una solución de ácido sulfúrico al 5% más con solución de vainillina al 1% en etanol).

Reactivo A: Se hace una mezcla 99.5-0.5 de acetato de etilo-anisaldehído

Reactivo B: Se hace una mezcla 1:1 de acetato de etilo-ác. sulfurico

Estándar de Esmilagenina. Adquirido en Aldrich.

Otros estándares: Sarsasapogenina, Diosgenina procedente del laboratorio 121, y del laboratorio 204 del Instituto de Química.

El estándar que utilizado fue la esmilagenina. La sarsasapogenina y la diosgenina no fueron utilizados como estándar. La esmilagenina se obtuvo en Aldrich la sarsasapogenina fue proporcionada por el Dr. Romo de Vivar del Instituto de Química de la UNAM y; la diosgenina que se encontraba en existencia en el laboratorio. Tanto el estándar como las otras sapogeninas que fueron utilizados para comparación fueron caracterizados por espectroscopia y punto de fusión.

3.2 MÉTODO GENERAL

3.2.1 PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

La muestra seca se molió en un molino de cuchillas con malla de 1 mm

Para cada experimento se pesaron 10 g del material vegetal en una balanza analítica.

3.2.2 EXTRACCIÓN

Las muestras se transfirieron a un matraz de fondo redondo de boca esmerilada 24/40 y 250 mL de capacidad; se agregaron 50 mL de metanol y se calentó a reflujo por 30 minutos empleando una manta de calentamiento.

Una vez terminado el reflujo se filtró el extracto, se concentró en un rotaevaporador y se registró el peso del extracto seco.

3.2.3 HIDRÓLISIS

Al extracto metanólico se le agregó una mezcla de ácido clorhídrico concentrado y etanol a razón de 0.3 mL y 5 mL respectivamente por cada 100 mg de extracto. Luego se montó un sistema de reflujo con una manta de calentamiento. El sistema se mantuvo a reflujo por 1.5 horas.

3.2.4 NEUTRALIZACIÓN Y EXTRACCIÓN

Al término de la hidrólisis la disolución se neutralizó con una solución de hidróxido de sodio al 5%. Después se extrajo con tres porciones de hexano en un embudo de separación. La fase orgánica, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en un rotaevaporador. Se registró el peso del producto obtenido. Se realizó una cromatografía en capa fina utilizando cloroformo-metanol (90:10) como sistema de elución y Esmilagenina como referencia. Se utilizó como revelador la mezcla de vainillina-ácido sulfúrico.

3.2.5 CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA

El producto obtenido se disolvió en acetato de etilo grado reactivo y se aforó a 25 mL.

De la solución anterior se tomó una alícuota de 1 mL y se aforó a 10 mL. Se mide un volumen de 2 mL y se transfirió a un tubo de ensayo, se agregaron 1 mL del reactivo A y 1 mL del reactivo B. Se dejó reposar por 20 minutos y se leyó en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 430 nm. Utilizando un blanco e intercalando en una curva patrón.

3.2.6 CURVA PATRÓN

Se pesaron 25 mg del estándar de Esmilagenina (PM: 416 g mol⁻¹), se transfirieron a un matraz aforado de 25 mL se disolvieron en acetato de etilo

grado reactivo y se llevaron al aforo; después se tomó 1 mL de esta disolución y se transfirió a un matraz aforado de 10 mL, se disolvió en acetato de etilo grado reactivo y se llevó al aforo. De la solución anterior se transfirió 1 mL a un matraz aforado de 10 mL y se disolvió en acetato de etilo y se llevó al aforo. Esta disolución tuvo una concentración de $24.00 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 1.

De la disolución 1, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

Los 8 mL restantes de la disolución 1 se llevaron al aforo con acetato de etilo grado reactivo en el mismo matraz aforado de 10 mL. Esta disolución tuvo una concentración de $19.20 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 2.

De la disolución 2, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

Los 8 mL restantes de la disolución 2 se llevaron al aforo con acetato de etilo grado reactivo en el mismo matraz aforado de 10 mL. Esta disolución tuvo una concentración de $15.36 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 3.

De la disolución 3, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

Los 8 mL restantes de la disolución 3 se llevan al aforo con acetato de etilo grado reactivo en el mismo matraz aforado de 10 mL. Esta disolución tuvo una concentración de $12.28 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 4.

De la disolución 4, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

Los 8 mL restantes de la disolución 4 se llevaron al aforo con acetato de etilo grado reactivo en el mismo matraz aforado de 10 mL. Esta disolución tuvo una concentración de $9.83 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 5.

De la disolución 5, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

Los 8 mL restantes de la disolución 5 se llevaron al aforo con acetato de etilo grado reactivo en el mismo matraz aforado de 10 mL. Esta disolución tuvo una concentración de $7.86 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 6.

De la disolución 6, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

Los 8 mL restantes de la disolución 6 se llevaron al aforo con acetato de etilo grado reactivo en el mismo matraz aforado de 10 mL. Esta disolución tuvo una concentración de $6.29 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 7.

De la disolución 7, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

Los 8 mL restantes de la disolución 7 se llevaron al aforo con acetato de etilo grado reactivo en el mismo matraz aforado de 10 mL. Esta disolución tuvo una concentración de $5.03 \text{ nmol mL}^{-1}$. Esta fue la disolución 8.

De la disolución 8, se tomaron 2 mL y se transfirieron a un tubo de ensaye.

A las disoluciones que se transfirieron a los tubos de ensaye, se les añadieron 1 mL del reactivo A y 1 mL del reactivo B; se dejaron reposar por 20 minutos y se leyeron a 430 nm, en un espectrofotómetro. Se compararon con un blanco de acetato de etilo.

3.3 OPTIMIZACIÓN DEL MÉTODO

A fin de definir el mejor método de extracción, se probaron diferentes condiciones:

3.3.1 EXTRACCIÓN

Los tiempos de extracción que se probaron fueron las siguientes:

- 10 minutos
- 30 minutos
- 1.5 horas

3.3.2 HIDRÓLISIS

Se realizaron pruebas con diferentes ácidos (ácido clorhídrico y ácido sulfúrico) y con diferentes concentraciones:

0.3 mL de ácido clorhídrico + 5 mL de etanol.

0.15 mL de ácido clorhídrico + 2.35 mL de etanol + 2.5 mL de agua + 2.5 mL de dioxano

0.3 mL de ácido sulfúrico + 5 mL de etanol.

Para la hidrólisis los tiempos de reflujo que se probaron fueron las siguientes:

- 30 minutos
- 1 hora
- 1.5 horas

3.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Para validar el método desarrollado, el procedimiento fue el siguiente:

3.4.1 ESPECIFICIDAD

La longitud de onda a la cual se obtiene la señal más grande es 430 nm

3.4.2 EXACTITUD

Se evaluaron tres concentraciones diferentes y se realizaron tres repeticiones de cada concentración.

3.4.3 PRECISIÓN

Al igual que en la exactitud, se probaron tres concentraciones diferentes. Se realizaron tres repeticiones de cada concentración.

3.4.4 LINEALIDAD

Se probaron cinco concentraciones diferentes y se determinaron precisión y exactitud.

3.5 AISLAMIENTO DE MARCADORES

Con objeto de obtener una cantidad mayor del producto considerado como marcador químico, presuntamente Esmilagenina; para caracterizarlo espectroscópicamente, se llevó a cabo una extracción utilizando el material vegetal, de la siguiente forma:

En un matraz de fondo redondo, se pesaron 600 g del material vegetal molido y se le adicionaron 4000 mL de metanol. La mezcla se calentó a reflujo por 30 minutos.

Al término de este tiempo, se filtró y la fase metanólica se concentró en el rotavapor al vacío. El peso registrado fue de 84.67 g de extracto metanólico

El extracto que se obtiene se hidrolizó con la mezcla de etanol y ácido clorhídrico (proporción: 5 mL de etanol + 0.3 mL de ácido clorhídrico por cada 100 mg de extracto metanólico) a reflujo y con agitación.

El hidrolizado se neutralizó y se extrajo con hexano en un embudo de separación.

3.5.2 PURIFICACIÓN

El producto obtenido de la extracción está constituido por una parte seca y una de apariencia oleosa que se separa mayoritariamente por filtración

El sólido se recristalizó de acetona, se filtró y se registró su peso. Se realizó una placa de CCF con CHCl_3 -MeOH (9.5:0.5) como sistema de elución.

Se le determinó punto de fusión y se realizaron espectros de infrarrojo, resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.

3.5.3 ESTÁNDARES Y SUSTANCIAS DE COMPARACIÓN

El estándar de sarsasapogenina, esmilagenina y la diosgenina utilizados para comparar, se caracterizaron por espectroscopía de IR RMN y EM y punto de fusión.

4. RESULTADOS

4.1 OPTIMIZACIÓN DE LA EXTRACCIÓN CON METANOL

Tabla 1. Extracción en metanol.

	10 minutos	30 minutos	1.5 h
Repetición	Cantidad obtenida (g)	Cantidad obtenida (g)	Cantidad obtenida (g)
1	1.2322	1.2766	1.5360
2	1.3668	1.2844	1.3136
3	1.1288	1.2525	1.1104

En esta tabla se observa que el mejor tiempo es el de 30 minutos, porque sus resultados no son estadísticamente diferentes.

4.2 HIDRÓLISIS

Tabla 2. Hidrólisis con HCl concentrado.

	30 minutos	1 hora	1.5 h
Repetición	Cantidad obtenida (g)	Cantidad obtenida (g)	Cantidad obtenida (g)
1	0.0034	0.0022	0.0410
2	0.0041	0.0030	0.0230
3	0.0025	0.0028	0.0542

En este caso vemos que con el tiempo de hidrólisis a reflujo por 1.5 horas, se obtiene una mayor cantidad de producto que no es significativamente diferente.

Tabla 3. Otras hidrólisis

1. 0.3 mL de ácido clorhídrico + 5 mL de etanol.
2. 0.15 mL de ácido clorhídrico + 2.35 mL de etanol + 2.5 mL de agua + 2.5 mL de dioxano
3. 0.3 mL de ácido sulfúrico + 5 mL de etanol.

	1	2	3
Repetición	Cantidad obtenida (g)	Cantidad obtenida (g)	Cantidad obtenida (g)
1	0.03	0.03	0.04

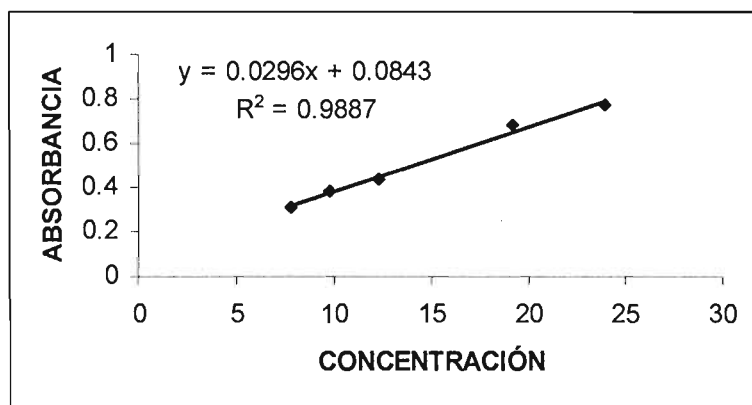
4.3 CURVA ESTÁNDAR

Los resultados de la curva estándar fueron los siguientes.

Tabla 3. Curva estándar.

Concentración nmol mL ⁻¹	Absorbancia
24.00	0.774
19.20	0.685
12.28	0.437
9.83	0.386
7.86	0.306

La curva y la ecuación quedaron de la siguiente manera:



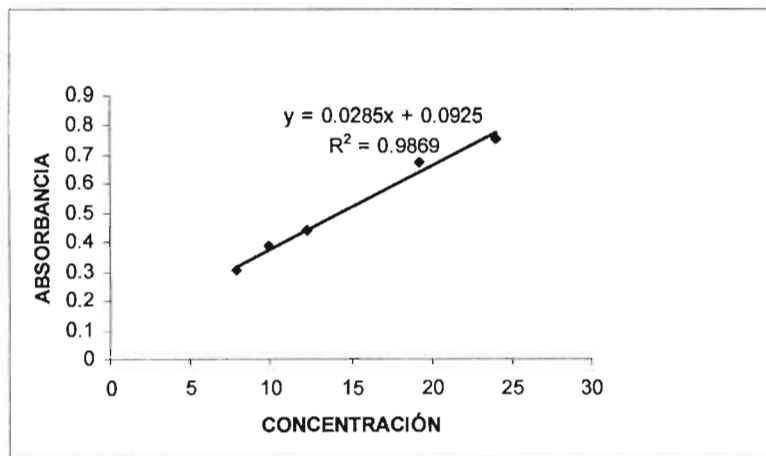
Gráfica 1. Curva estándar

En la construcción de la curva estándar se observa que es lineal porque la r^2 es mayor que 0.98 además de que los valores de las absorbancias están dentro de los parámetros que se indican para que las lecturas sean confiables.

Curva 2:

Tabla 4

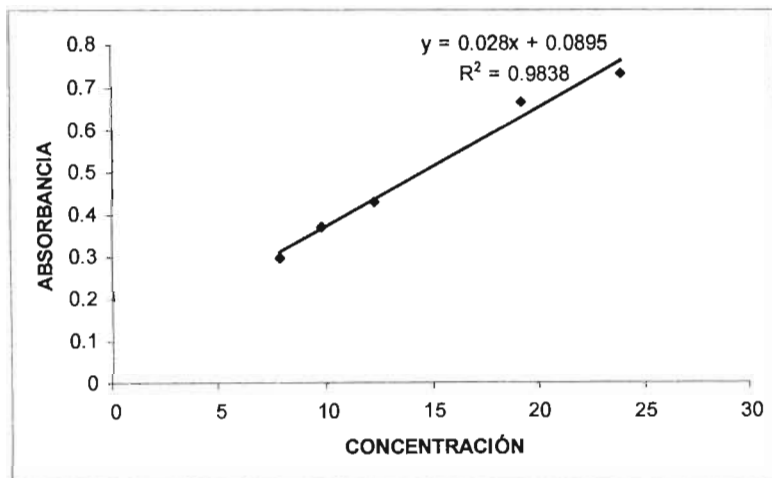
Concentración	Absorbancia
24	0.754
19.2	0.673
12.28	0.439
9.83	0.383
7.86	0.301



Curva 3:

Tabla 5

Concentración	Absorbancia
24	0.735
19.2	0.665
12.28	0.43
9.83	0.37
7.86	0.296



Si comparamos las ecuaciones y sus r^2 se puede ver que no hay muchas variaciones:

$$y = 0.0296x + 0.0843$$

$$r^2 = 0.9887$$

$$y=0.0285x + 0.0925$$

$$r^2=0.9869$$

$$y=0.028x + 0.0895$$

$$r^2=0.9838$$

4.4 VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

4.4.1 EXACTITUD

Para evaluar los siguientes parámetros, se usó la ecuación obtenida de la curva estándar de esmilagenina.

Tabla 6. Concentración de 5g

Cantidad de cocolmecha (g)	Absorbancia	Cantidad de sapogeninas (mg)
5	0.3251	8.4731
5	0.3439	9.1346
5	0.3368	8.8848

Tabla 7. Concentración de 10 g

Cantidad de cocolmecha (g)	Absorbancia	Cantidad de sapogeninas (mg)
10	0.3871	18.61
10	0.3976	19.34
10	0.3897	18.79

Tabla 8. Concentración de 15 g

Cantidad de cocolmecha (g)	Absorbancia	Cantidad de sapogeninas (mg)
15	0.4234	21.13
15	0.4436	22.53
15	0.4430	22.49

En estos resultados se observa que el método es exacto, pues los resultados obtenidos en las tres concentraciones medidas, no son estadísticamente diferentes.

4.4.2 PRECISIÓN

Tabla 9. Concentración de 5 g

Cantidad de cocolmecha (g)	Absorbancia	Cantidad de sapogeninas (mg)
5	0.3219	14.08
5	0.3564	16.48
5	0.3620	16.87

Tabla 10. Concentración de 10 g

Cantidad de cocolmecha (g)	Absorbancia	Cantidad de sapogeninas (mg)
10	0.3871	18.61
10	0.3976	19.34
10	0.3897	18.79

Tabla 11. Concentración 15 g

Cantidad de cocolmecha (g)	Absorbancia	Cantidad de sapogeninas (mg)
15	0.4234	21.13
15	0.4436	22.53
15	0.4430	22.49

En la precisión como en la exactitud, tenemos la misma situación; los resultados obtenidos no son estadísticamente diferentes y en base a este argumento tenemos que el método también es preciso.

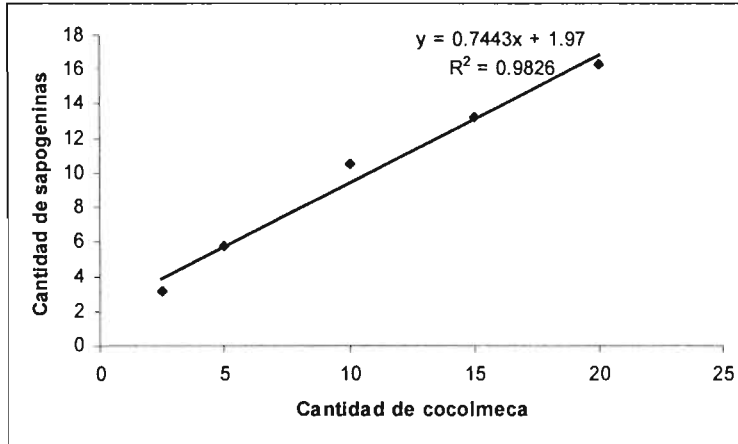
4.4.3 LINEALIDAD

Tabla 12. Linealidad

Cantidad de cocolmecha (g)	Cantidad de producto (mg)
2.5	3.1211
5	5.7601

10	10.5105
15	13.2199
20	16.3164

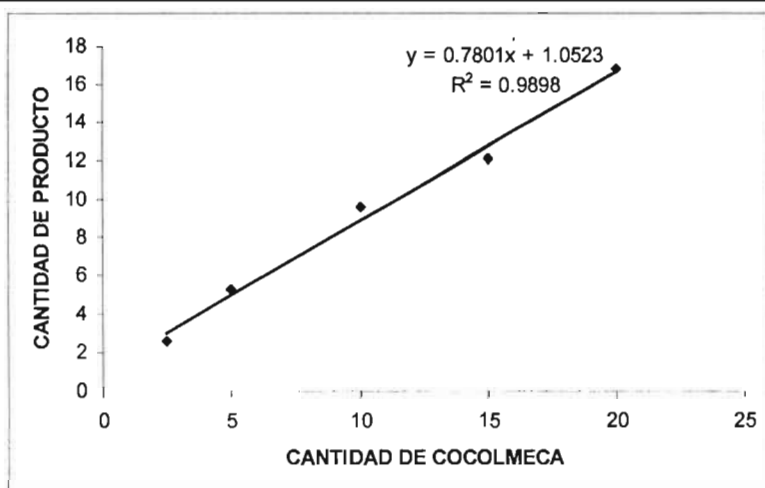
La gráfica es la siguiente:



Lin 2

Tabla 13

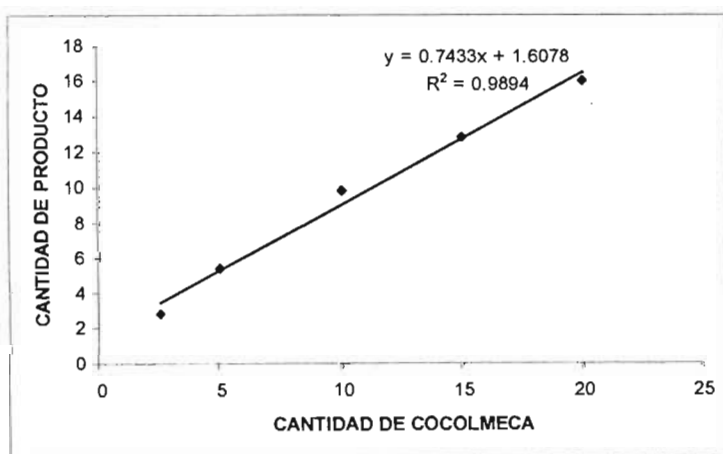
Cantidad de cocolmecha (g)	Cantidad de producto (mg)
2.5	2.5581
5	5.2323
10	9.5604
15	12.0587
20	16.809



Lin 3

Tabla 14

Cantidad de cocolmecha (g)	Cantidad de producto (mg)
2.5	2.8748
5	5.4435
10	9.8419
15	12.868
20	16.0349



4.5 AISLAMIENTO DE MARCADORES

De la extracción en mayor escala se obtuvieron 40 mg de producto denominado A.

4.5.1 CARACTERIZACIÓN

4.5.1.1 PUNTO DE FUSIÓN

Producto A: 125°-126°C

Esmilagenina: 185°C

Diosgenina: 204°C

β-sitosterol: 127°C

4.5.1.2 CROMATOGRAFÍA

Tabla 15. CCF

	Rf	Coloración
Producto A	0.6	Violeta
Esmilagenina	0.6	Amarillo
Sarsasapogenina	0.6	Amarillo
β-sitosterol	0.6	Violeta

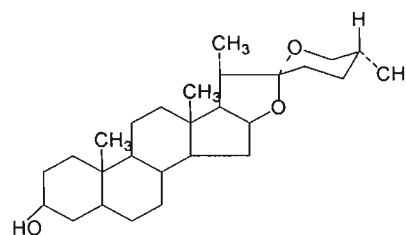
4.5.1.3 ESPECTROSCOPIA

Tabla 16. Espectroscopia de IR

IR (cm ⁻¹)	Esmilagenina	Sarsasapogenina	Producto A
Hidroxilo	3300 cm ⁻¹	3300 cm ⁻¹	3300 cm ⁻¹
C 27 unido a C 25 (axial o ecuatorial)	898 (más intensa) y 917 (menos intensa)	895 (menos intensa) y 916 (más intensa)	Indefinidas

Tabla 17. RMN ¹H de Esmilagenina

	δ (ppm)
H-3	4.11
H-16	4.40
H-18	0.76
H-19	0.98
H-21	0.97
H-26	3.38, 3.48



H-27 0.79

Tabla 18. RMN ¹H de Sarsasapogenina

	δ (ppm)
H-3	4.11
H-16	4.40
H-18	0.76
H-19	0.97
H-21	0.99
H-26	3.28, 3.95
H-27	1.08

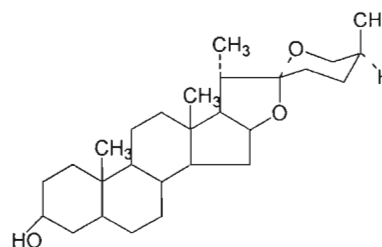


Tabla 19. RMN ¹H de Diosgenina

	δ (ppm)
H-3	4.11
H-6	5.30
H-16	4.38
H-18	0.76
H-19	1.04
H-21	0.92
H-26	3.36, 3.38
H-27	0.70

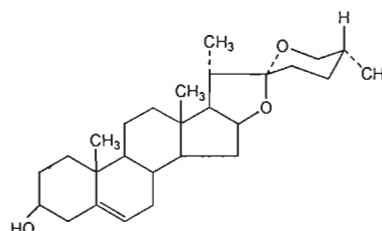


Tabla 20. RMN ¹H del Producto A

	δ (ppm)
H-3	3.50
H-6	5.37
H-16	-----
H-18	1.00
H-19	0.68
H-21	0.84
H-26	-----
H-27	-----

Espectrometría de masas

Esmilagenina: PM= 416 g/mol

Sarsasapogenina: PM= 416 g/mol

β-sitosterol: PM= 414 g/mol

Producto A: PM= 414 g/mol .

4.5.1.4 DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Analizando los resultados anteriores se observó que el producto A no es una sapogenina, presumiblemente sarsasapogenina, de acuerdo al género de la planta que constituye la droga cruda, sino que se trata de un esteroide, en principio β -sitosterol.

Tabla 21. Datos del β -sitosterol

Pf	127 °C
Rf	0.6
CCF	Coloración violeta
PM	414

5. CONCLUSIONES

1. Considerando que la esmilagenina es un componente de las plantas del género Smilax, se decidió usarla como posible marcador.
2. Se diseñó y se preparó un método para la cuantificación de sapogeninas, utilizando esmilagenina, para construir una curva que permita expresar los resultados como sapogenina contenida en la droga.
3. El método fue validado y puede ser aplicado a productos con sapogeninas como componentes.
4. Se asume que la droga cruda denominada cocolmecha tendrá sapogeninas como sarsasapogenina y esmilagenina en cantidades variables. Sin embargo, un análisis de muestras de cocolmecha obtenidas de un laboratorio comercial y del Mercado de Sonora, mostró resultados tales que se concluye que se aisló un compuesto esteroide de tipo esteroide, inicialmente caracterizado como β -sitosterol, por su punto de fusión, peso molecular, espectroscopía de IR, RMN ^1H y masas.
5. Se requiere más estudios sobre la identidad de la droga y contenido de sapogeninas.

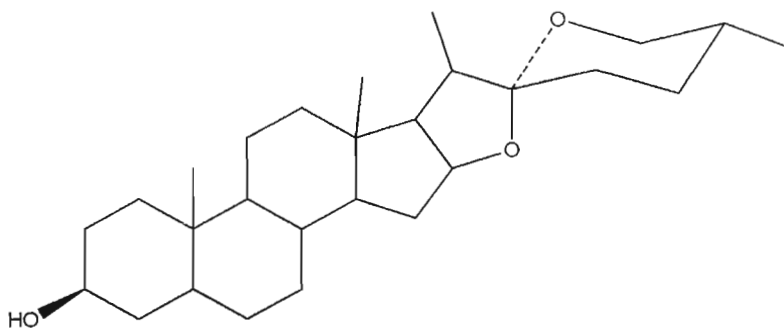
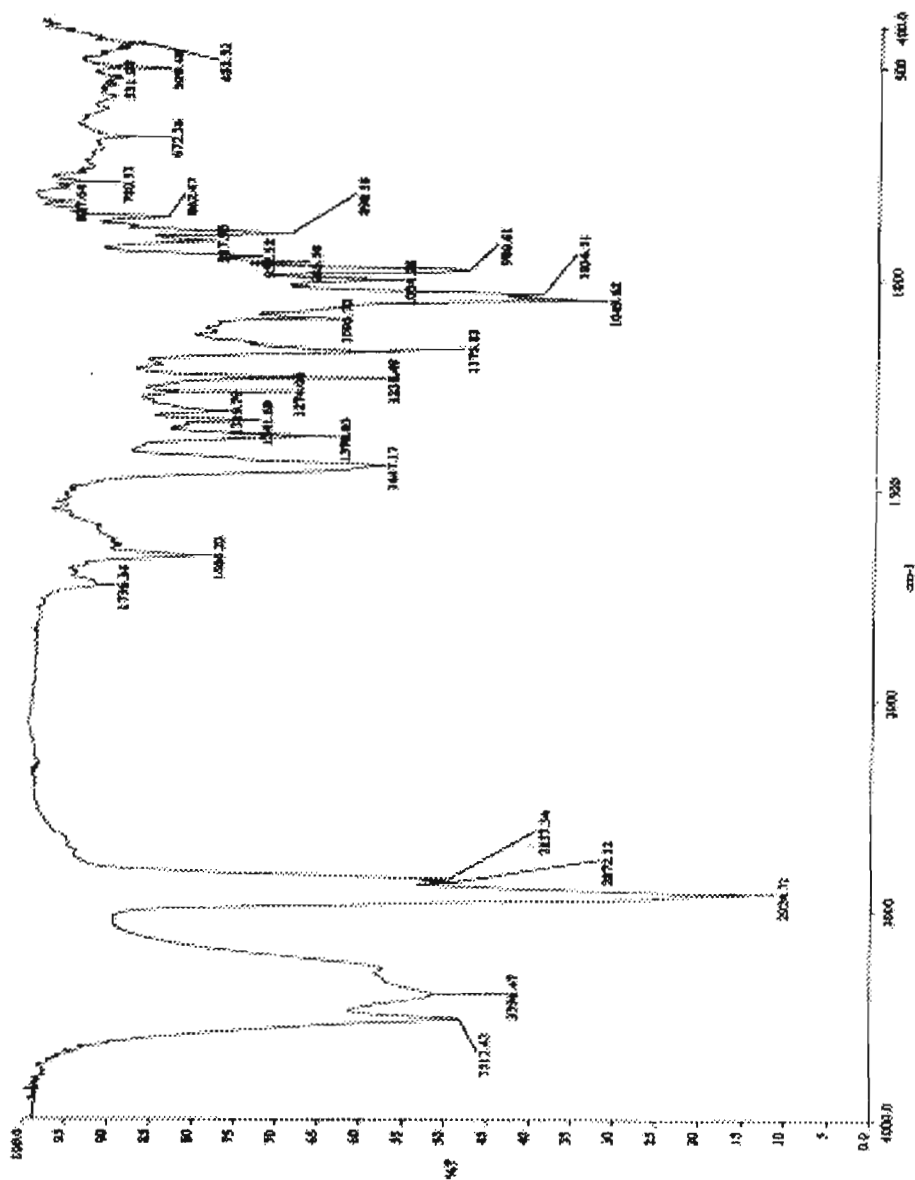
6. BIBLIOGRAFÍA

1. OMS (2000) "Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial"
2. <http://www.biotech.bioetica.org/tb2.htm>
- [3] Heber W. Youngken (1951) "Tratado de Farmacognosia". Edit. Atlante 1ª Ed. México.
- [4] Y Sashida (1992) *Phytochemistry* 31(7), 2439
- [5] R., Bernardo et al. (1996) *Phytochemistry* 43(2), 465
- [6] Domínguez Xorge A. (1979) "Métodos de Investigación Fitoquímica" Edit. Limusa. 1ª Reimpresión. México.
- [7] George Edward Trease (1988) "Tratado de Farmacognosia". Edit. Interamericana 12ª ed. México. Es la 13ª ed.
- [8] The Merck Index (1996) 12th edition. USA
- [9] Espejo-González, O et al. (1982) *Phytochemistry* 21, 413
- [10] <http://www.plantasmedicinales.com.mx/remedios.html>
- [11] <http://www.ayoram.com>
- [12] W. A. Oleszek (2002) *Journal of Chromatography A*, 967, 147
- [13] *Analyst*, June, 1977, Vol., 102 pp 458-465

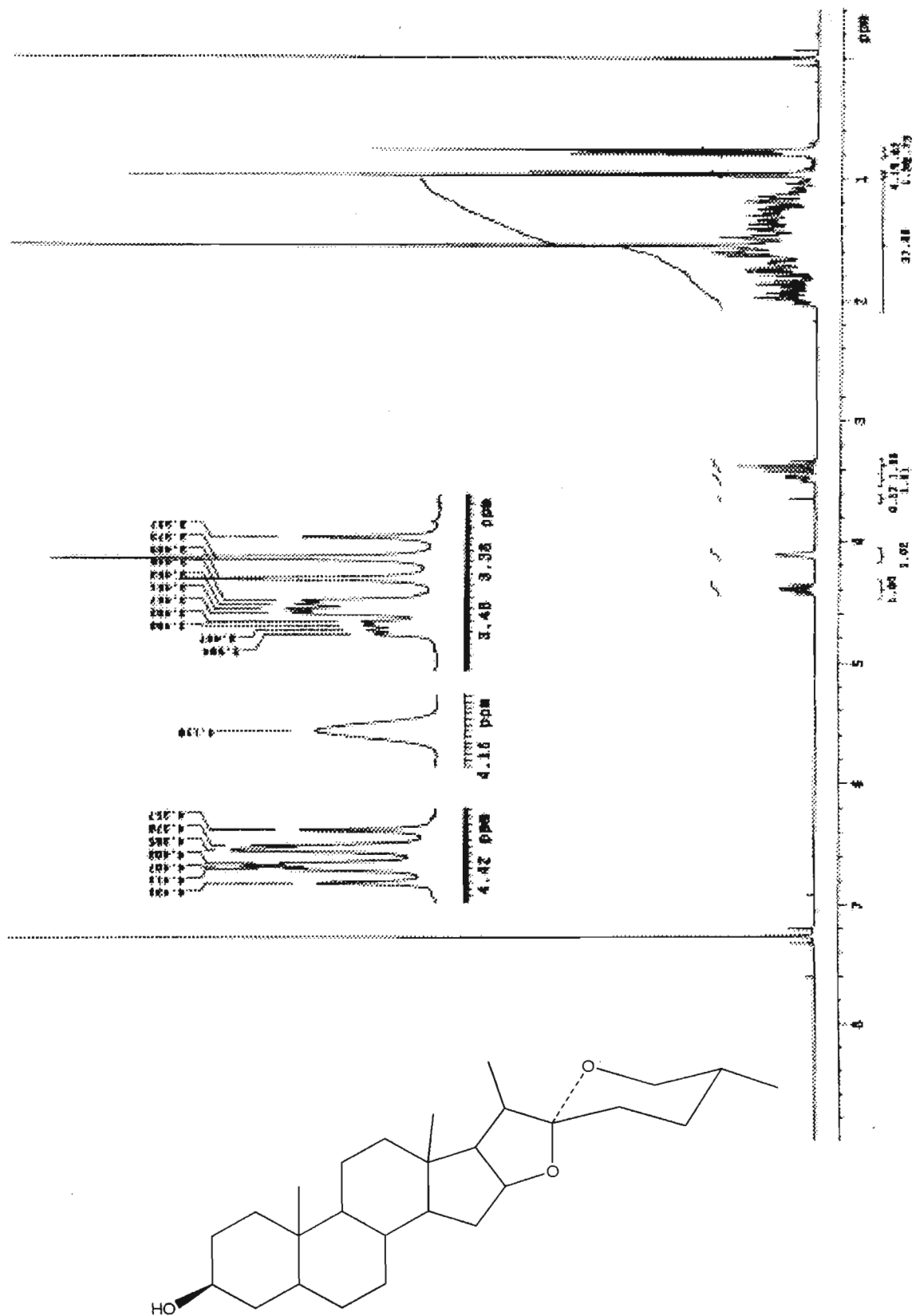
A N E X O

ESPECTROSCOPIA

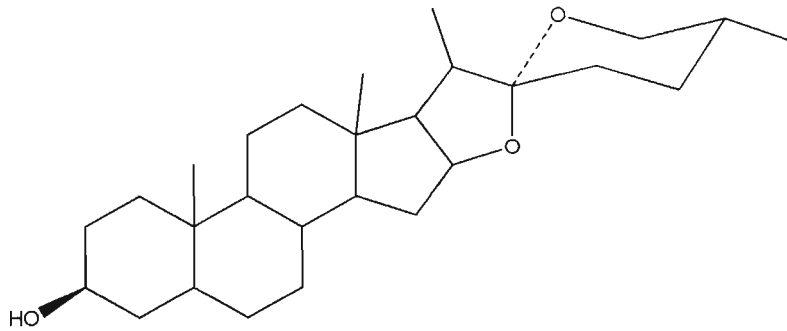
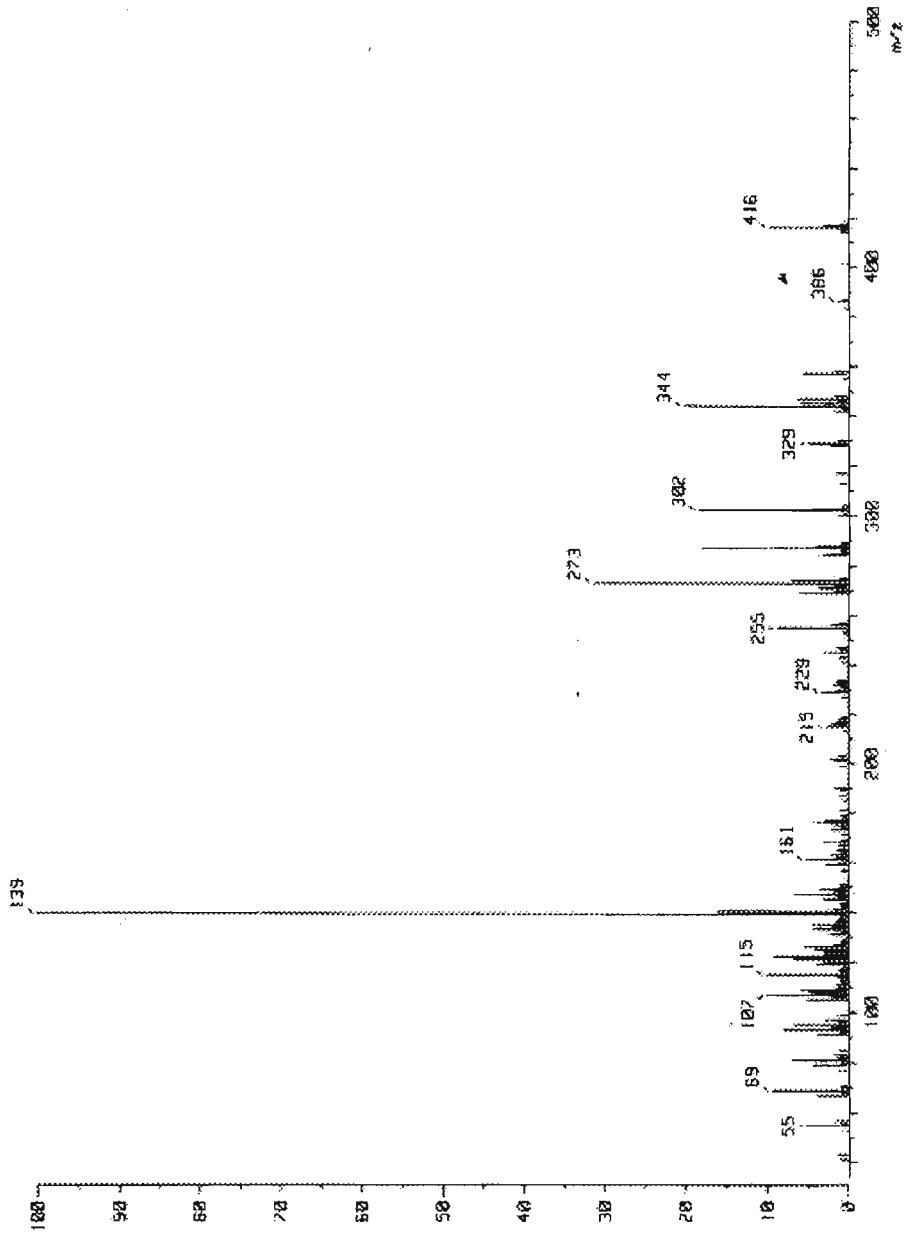
1. Espectro IR de esmilagenina
2. Espectro RMN ^1H de esmilagenina
3. Espectrometría de masas de esmilagenina
4. Espectro IR de sarsapogenina
5. Espectro RMN ^1H de sarsapogenina
6. Espectrometría de masas de sarsapogenina
7. Espectro IR de β -sitosterol
8. Espectro RMN ^1H de β -sitosterol
9. Espectrometría de masas de β -sitosterol
10. Espectro IR de producto A
11. Espectro RMN ^1H de producto A
12. Espectrometría de masas de producto A



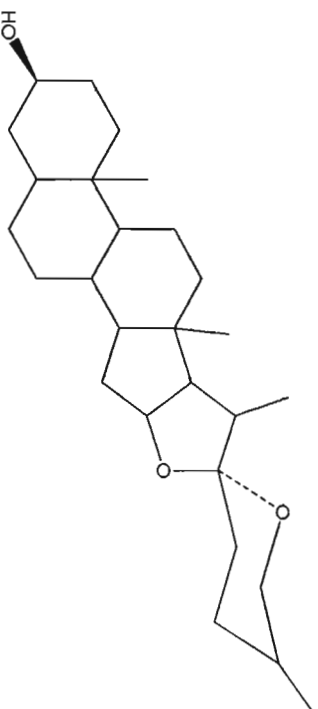
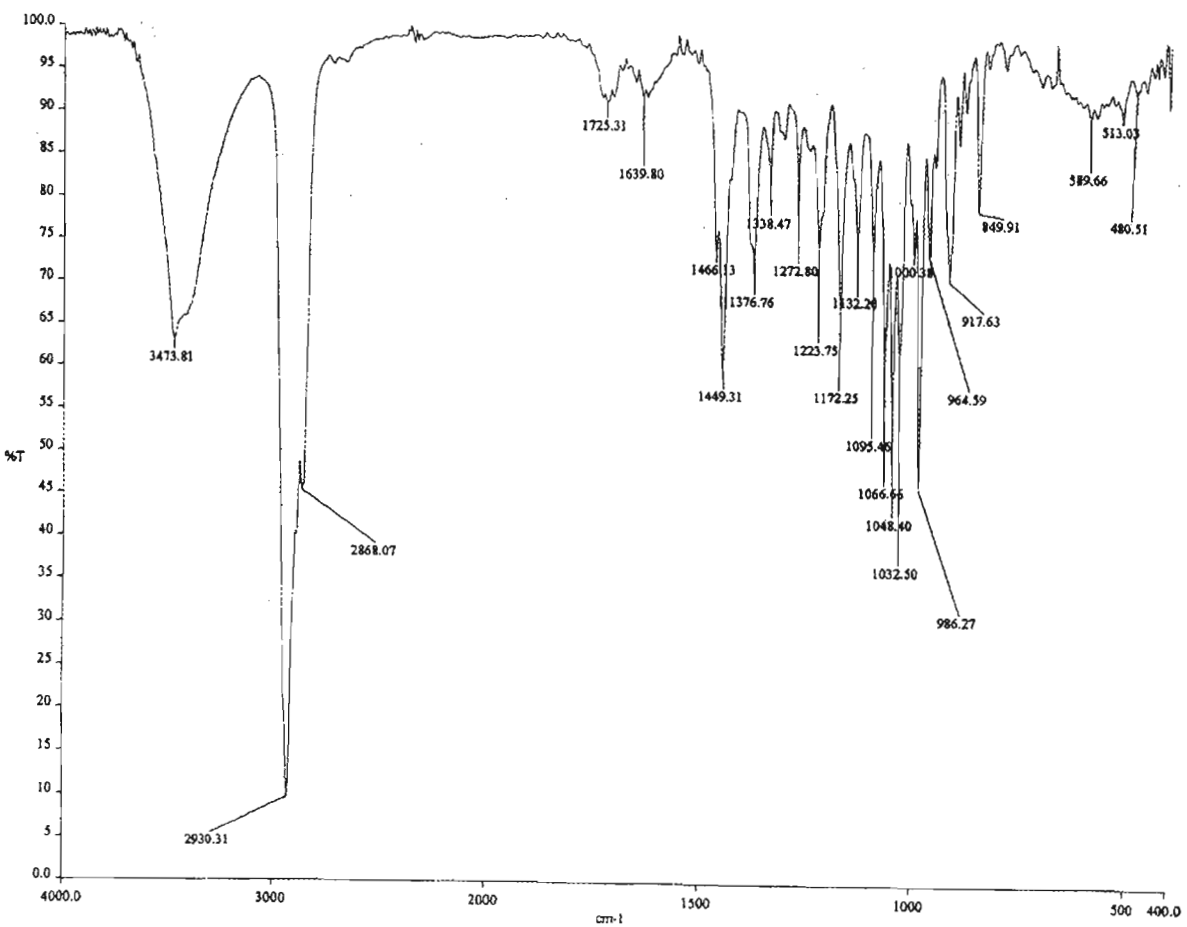
Espectro No. 1 Espectro IR de esmilagenina



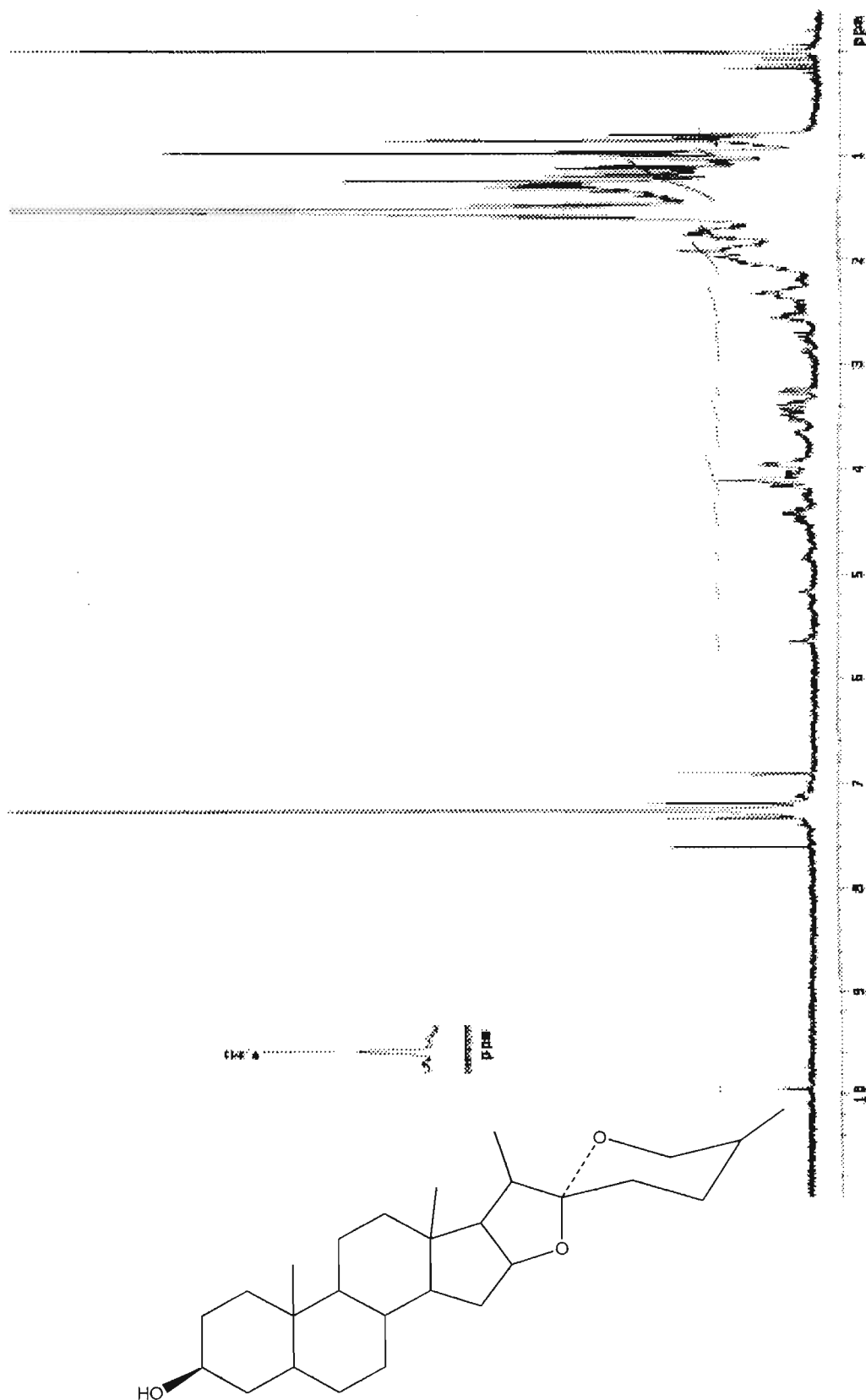
Espectro No. 2. Espectro RMN ¹H de esmilagenina (CDCl₃)



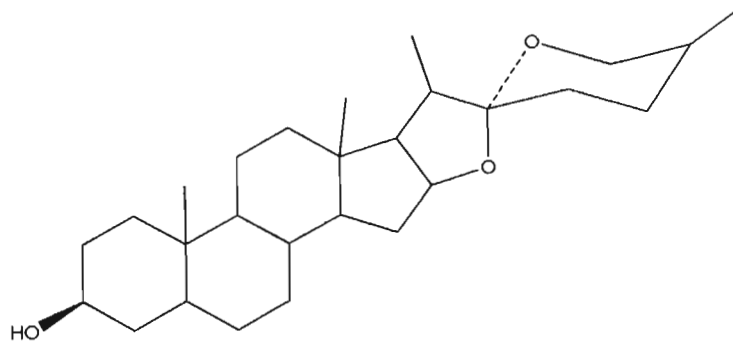
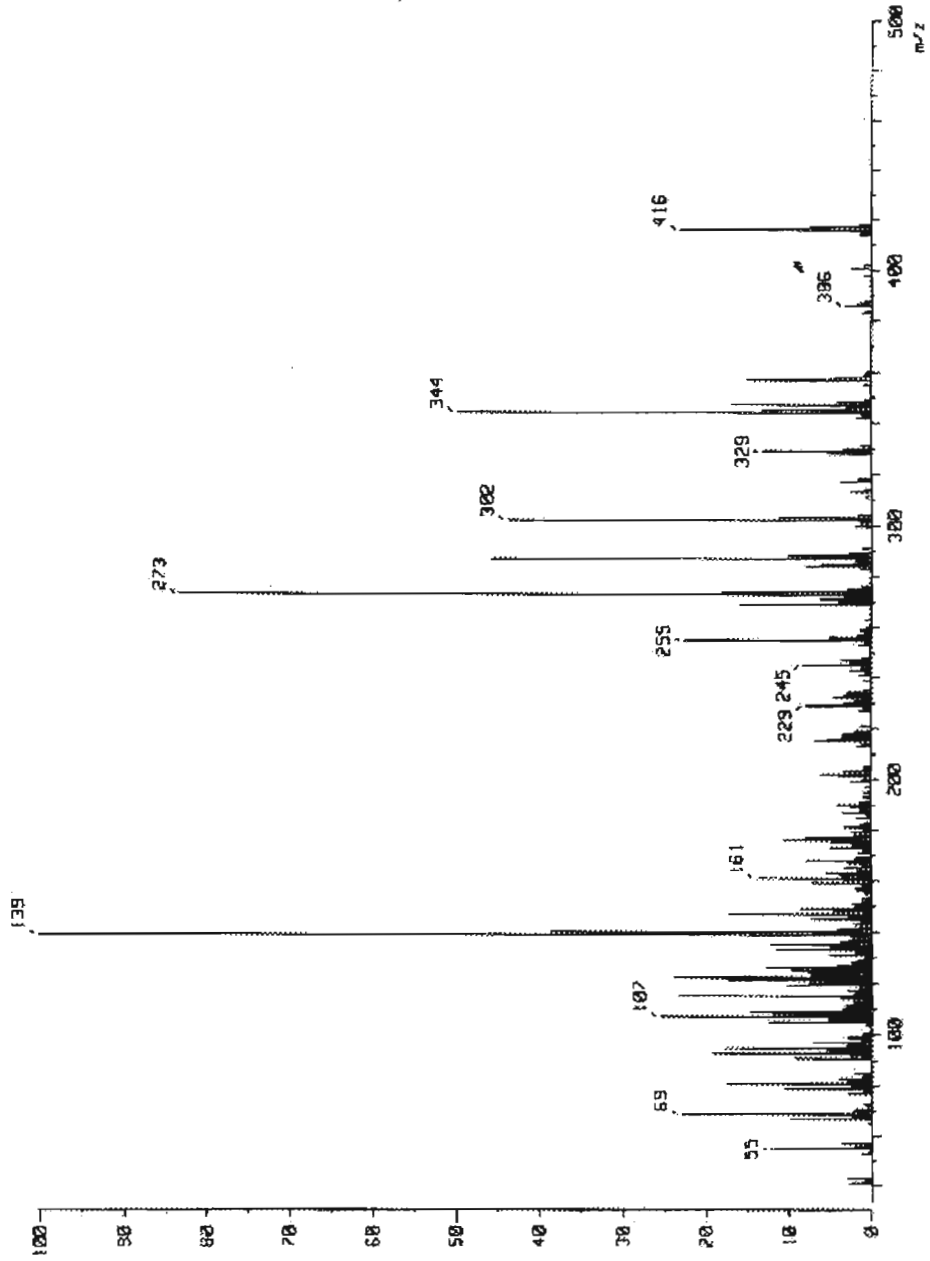
Espectro No. 3 Espectrometría de masas de esmilagenina (IE)



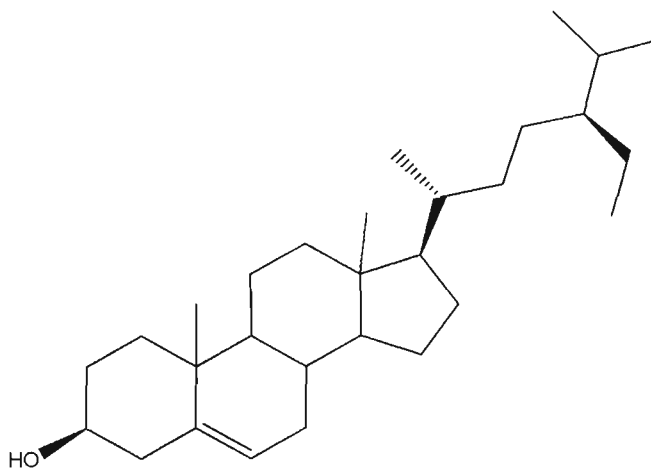
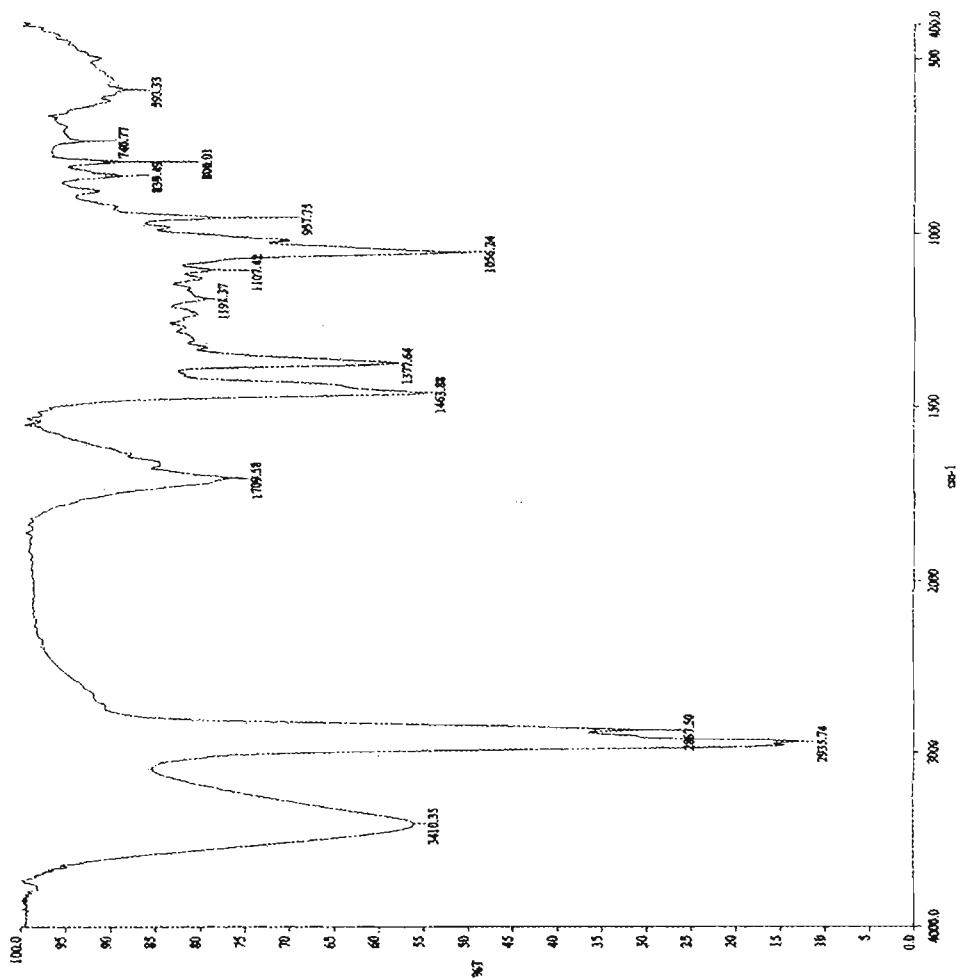
Espectro No. 4 Espectro IR de sarsapogenina



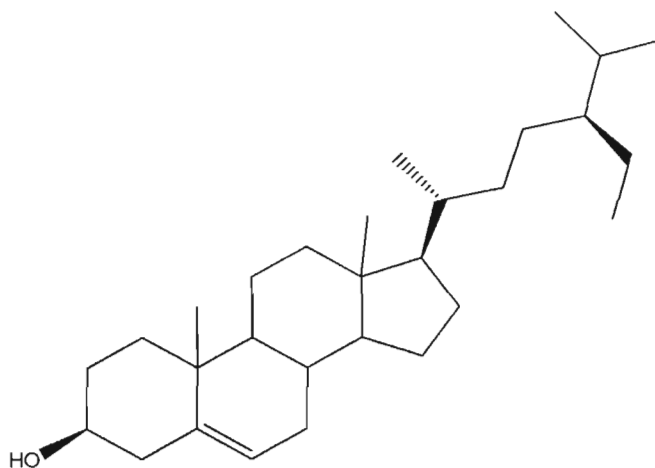
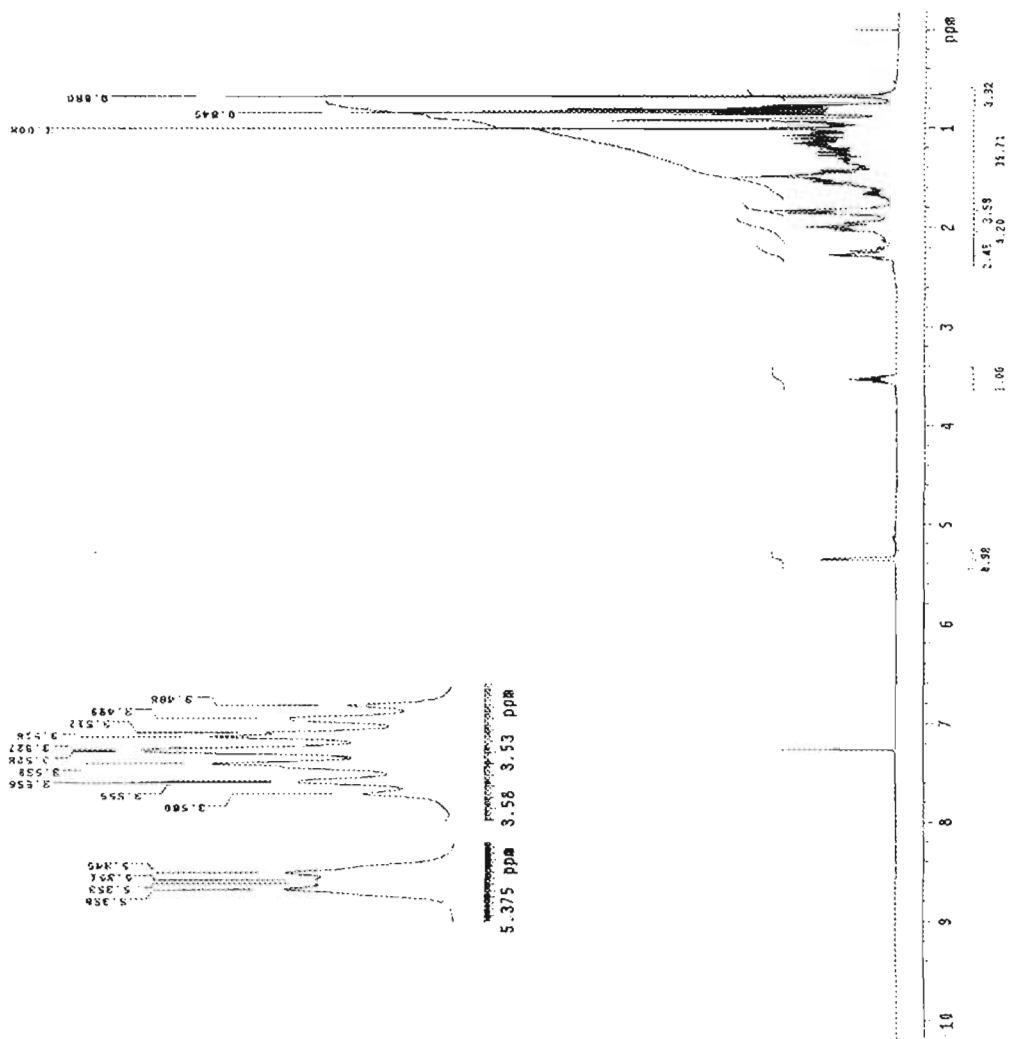
Espectro No. 5. Espectro RMN ¹H de sarsapogenina (CDCl₃)



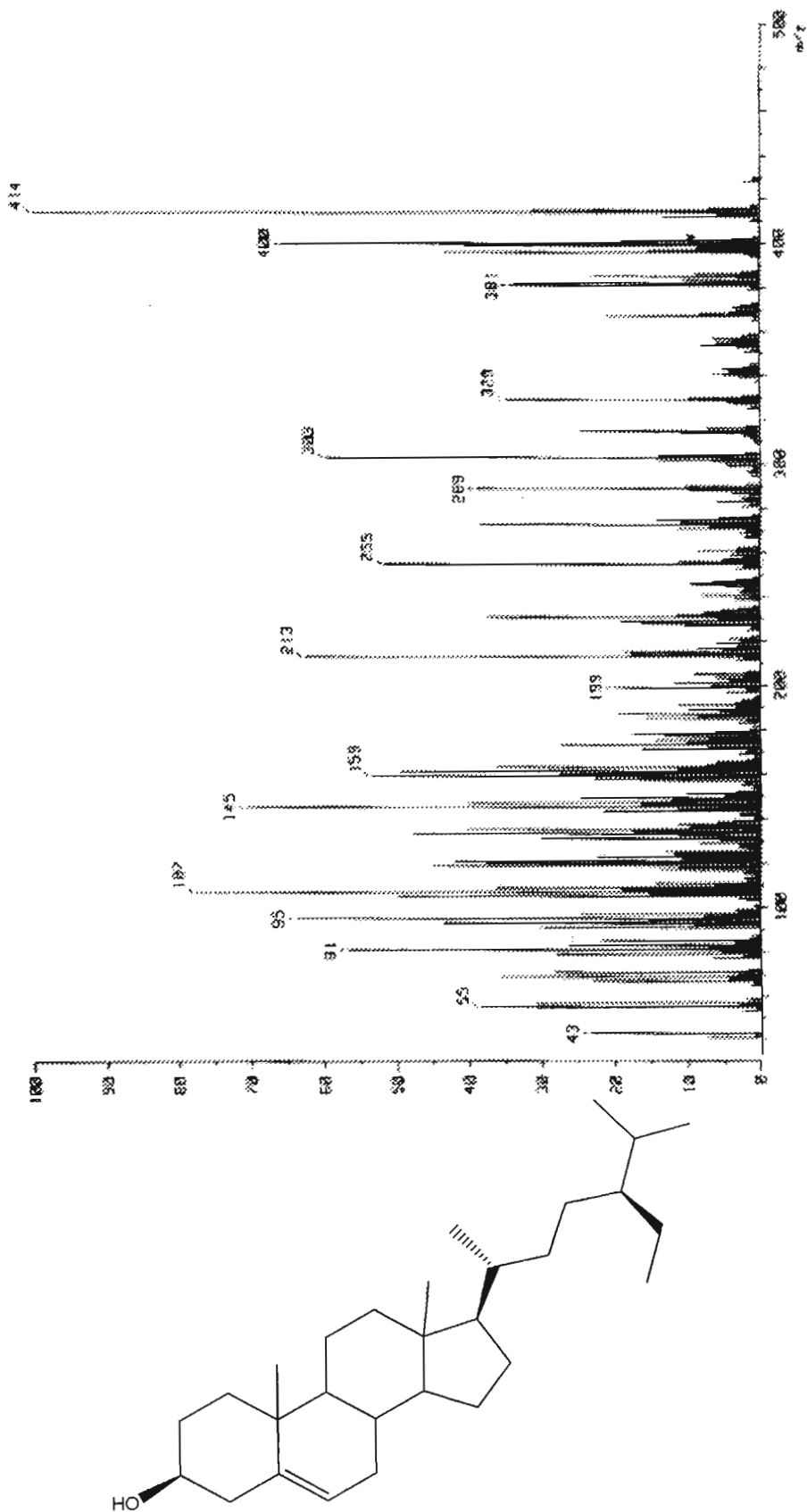
Espectro No. 6 Espectrometría de masas de sarsapogenina (IE)



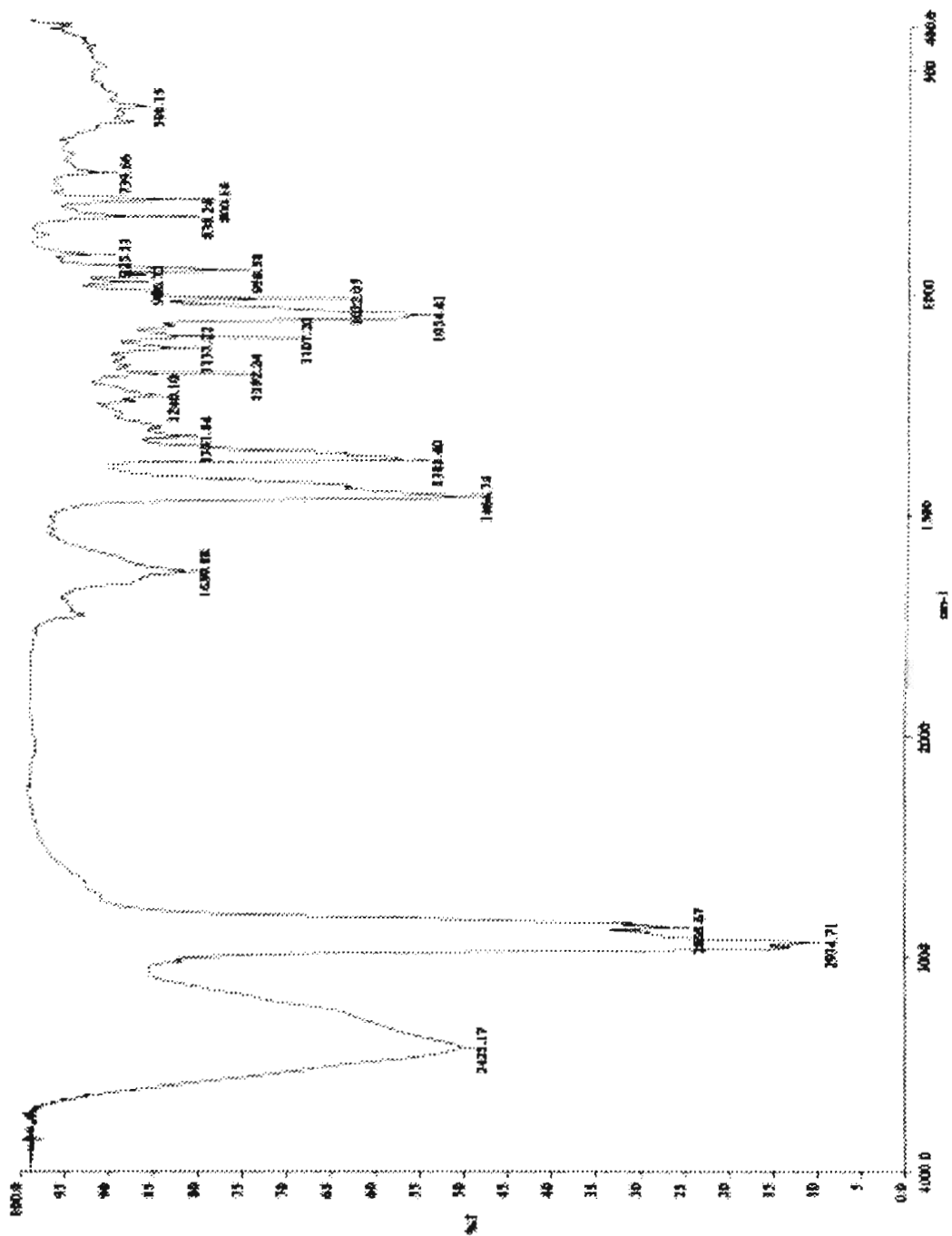
Espectro No. 7 Espectro IR de β-sitosterol



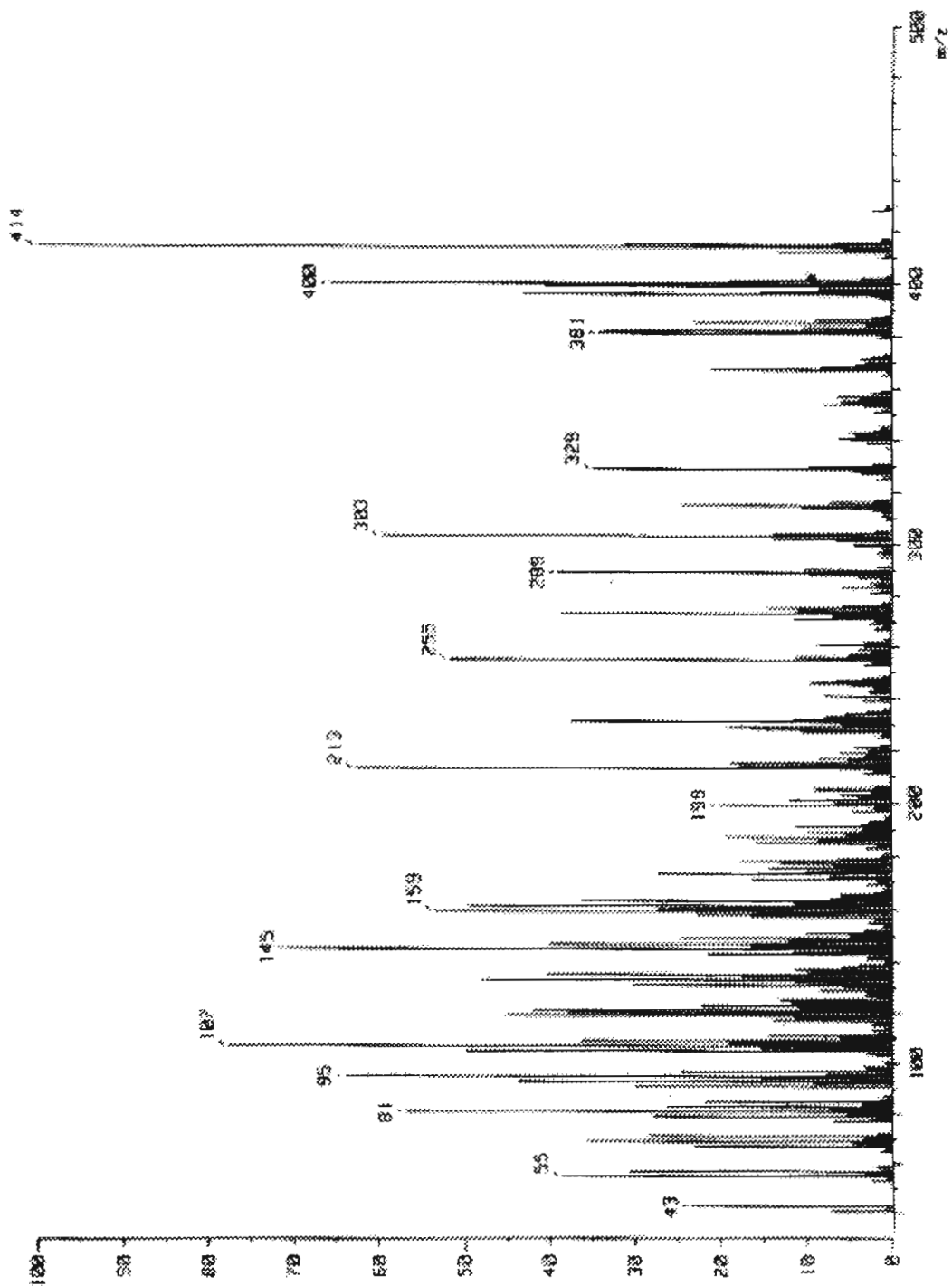
Espectro No. 8. Espectro RMN ¹H de β-sitosterol (CDCl₃)



Espectro No. 9 Espectrometría de masas de β -sitosterol (IE)



Espectro No. 10 Espectro IR del producto A



Espectro No. 12 Espectrometría de masas del producto A (IE)