

HEMISÍNTESIS DE ACETATO DE 16-DEHIDROPEGNENOLONA (16DPA) A
PARTIR DE *Dioscorea rotundata*

MARYURIS VEGA OROZCO
JHONNY BERMEJO MARTÍNEZ

UNIVERSIDAD DE SAN BUENAVENTURA SECCIONAL CARTAGENA
FACULTAD DE INGENIERÍA PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARTAGENA
DE AGOSTO DE 2018

HEMISÍNTESIS DE ACETATO DE 16 DEHIDROPEGNENOLONA (16 DPA) A
PARTIR DE *Dioscorea rotundata*

MARYURIS VEGA OROZCO
JHONNY BERMEJO MARTÍNEZ

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de ingenieros
químicos

ADALBERTO MATUTE THOWINSON
TUTOR

JHOAN PIERMETTEY DITTA
COTUTOR

UNIVERSIDAD DE SAN BUENAVENTURA SECCIONAL CARTAGENA
FACULTAD DE INGENIERÍA PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA
CARTAGENA
DE AGOSTO DE 2018

DEDICATORIA

A Dios por ser mi mayor protector, mi guía, por acompañarme en cada paso que doy y brindarme la oportunidad de educarme y tener una familia.

A mi madre Rosa Esperanza Orozco Cuadro quien es mi mayor ejemplo de dedicación, esfuerzo y superación, mi motor y mi fortaleza por apoyarme y acompañarme siempre.

A mi padre Pedro Claver Vega Sáenz por brindarme educación y velar que cada día creciera como persona, por inculcarme valores y corregir mis errores, por motivarme en todo momento a salir adelante.

A mis hermanos Pedro Javier Vega, Diana Vega y Celina por cuidar de mí, ser mis cómplices y consentirme tanto porque a pesar de las diferencias siempre estarán para mí cuando los necesite.

A mis abuelas Carmen Cuadro y Excelina Sáenz quienes cuidaron de mí y me acompañaron en mis primeros pasos, a las mujeres que admiro con todo mi ser y que, aunque no estén a mi lado siempre vivirán en mi corazón. A mi abuelo Ángel Vega por ser tan amoroso y divertido.

A mis amigos de infancia y a los que conocí en el camino de mi carrera por su apoyo incondicional en todos los momentos que los he necesitado y por ser parte del camino.

Por último, a mi compañero de tesis, mi amigo y confidente Jhonny Bermejo Martínez, con quien pase miles de situaciones, por aguantar mi carácter y por ser parte del proceso.

MARYURIS MACNEIS VEGA OROZCO

DEDICATORIA

A Dios por ser mi soporte y ayudarme en cada momento a lo largo de mi carrera, por darme las oportunidades para enriquecer mi conocimiento y criterio como ingeniero.

A mi madre Aida Martínez, por el sacrificio de pagar mis estudios, por alentarme siempre y apostar por mi educación, por darme los principios morales que se tienen en cuenta en la convivencia.

A mis hermanos Alexandra Bermejo, Noraima Bermejo, Ivan Urquijo y Mabel Urquijo ya que por medio de ellos recibí algunos consejos de la vida, y en algunas circunstancias me han dado apoyo, y mis familiares cercanos, entre ellos mi primo Brayán Valdélamar y mi sobrino Luis Manco.

A mis compañeros de la universidad, Isela Torres, Leidy Rodríguez, Brenda Leones, Andrés Escorcía, Rubén Gómez, Gustavo Sanmartín, ente otros. Y principalmente a Maryuris Vega, quien ha sido mi mejor amiga por todos estos años y mi compañera de tesis, porque a través de aquellas dificultades, tropiezos, y ansiedades, he tenido con quien compartir tanto los momentos buenos como malos.

A mis amigos cercanos, Vladimir Merlano, Luis Guerra, Luis Hernández, Xavier Serrano y Orlando Guerra, ya que han optado por la ingeniería y han compartido conmigo sus diversas ideologías y teorías.

JHONNY BERMEJO MARTÍNEZ

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos infinitamente a Dios por brindarnos tantas oportunidades en la vida, por ser nuestro complemento.

A nuestros padres y familiares porque gracias a su compañía, dedicación y apoyo nuestros sueños se hacen cada día más reales

A los docentes Jhoan Piermattey Ditta y Adalberto Matute, por su colaboración, esfuerzo y guía para la realización de este proyecto, por tener siempre la disposición de enseñar y ayudar.

A los docentes que hicieron parte de nuestra formación ética y académica Sonya Ramírez, Alba Giraldo, Yeimmy Peralta, Vicente Vargas, Carlos Cortes entre otros. Por su confianza y enseñanzas, que nos han servido para enriquecer nuestro conomiento

Agradecemos a la universidad de Cartagena y a sus docentes Ricardo Gaitan y Jorge Anaya por apoyarnos, corregirnos y brindarnos las herramientas para culminar esta etapa.

Y finalmente agradecemos a nuestros amigos Isella Torres, Pedro Blanco Sierra, Brenda Leones, Andrés Escorcía, Leidy Rodríguez y Ericson de Ávila por contribuir desde el inicio a ser mejores personas, colaborarnos y sobre todo por ser parte de nuestras familias.

GRACIAS

CONTENIDO

| | Pág. |
|--|------|
| RESUMEN | 15 |
| 1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN | 17 |
| 1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 17 |
| 1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA..... | 18 |
| 1.3. JUSTIFICACIÓN | 18 |
| 1.4. OBJETIVOS | 20 |
| 1.4.1. Objetivo general | 20 |
| 1.4.2. Objetivos específicos | 20 |
| 2. MARCO DE REFERENCIA | 21 |
| 2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS..... | 21 |
| 2.2. MARCO TEÓRICO | 24 |
| 2.2.1. Síntesis orgánica | 24 |
| 2.2.2. Esteroides | 25 |
| 2.2.3. Ñame | 25 |
| 2.2.4. Saponinas | 27 |
| 2.2.5. EXTRACCIÓN..... | 28 |
| 2.2.6. Extracción por método Soxhlet..... | 29 |
| 2.3. MARCO LEGAL..... | 29 |
| 2.4. MARCO CONCEPTUAL | 31 |
| 2.5. HIPÓTESIS | 31 |
| 2.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES..... | 32 |
| 2.6.1. Variables dependientes | 32 |
| 2.6.2. Variables independientes | 32 |
| 2.6.3. Operacionalización de las variables | 32 |
| 3. DISEÑO METODOLÓGICO | 34 |
| 3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN..... | 34 |
| 3.2. DISEÑO ADOPTADO..... | 34 |
| 3.3. ENFOQUE ADOPTADO | 34 |

| | |
|--|----|
| 3.4. METODOLOGÍA..... | 35 |
| 3.4.1. Generalidades | 35 |
| 3.4.2. Diagrama de flujo de proceso | 36 |
| 3.4.3. Extracción de diosgenina | 37 |
| 3.4.4. Síntesis DE 16 DPA | 41 |
| 3.5. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN..... | 42 |
| 3.5.1. Fuentes primarias | 42 |
| 3.5.2. Fuentes secundarias | 42 |
| 3.6. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN | 42 |
| 3.7. PLAN TRABAJO | 42 |
| 4. RESULTADOS Y DISCUSIONES | 43 |
| 4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL | 43 |
| 5. CONCLUSIONES..... | 51 |
| 6. RECOMENDACIONES | 52 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 53 |
| ANEXOS | 58 |

LISTA DE FIGURAS

| | Pág. |
|--|------|
| Figura 1. Diagrama de flujo de proceso..... | 33 |
| Figura 2. Reacción de transformación de la Diosgenina a 16DPA | 38 |
| Figura 3. Espectro infrarrojo IR de Diosgenina | 44 |
| Figura 4. Espectro infrarrojo IR de 16DPA. | 46 |
| Figura 5. Espectro de masas 16 DPA. | 47 |

LISTA DE CUADROS

| | |
|---|------|
| | Pág. |
| Tabla 1. Ensayos realizados a las muestras de <i>Dioscorea Rotundata</i> | 40 |
| Tabla 2. Porcentajes obtenidos de las diferentes metodologías empleadas..... | 41 |
| Tabla 3. Contenido de Diosgenina en cada prueba..... | 43 |

LISTA DE ANEXOS

| | Pág. |
|---|------|
| Anexo A. Cronograma de actividades | 56 |
| Anexo B. TLC ensayo 1 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 57 |
| Anexo C. TLC ensayo 2 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 57 |
| Anexo D. TLC ensayo 3 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 58 |
| Anexo E. TLC ensayo 4 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 58 |
| Anexo F. TLC ensayo 5 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 59 |
| Anexo G. TLC ensayo 6 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 59 |
| Anexo H. TLC ensayo 7 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 60 |
| Anexo I. TLC ensayo 8 comparadas con patrón de Diosgenina..... | 60 |

LISTA DE ABREVIATURAS

16DPA: Acetato de 16 dehidropregnenolona

PDA: Acetato de Pseudodiosgenina

FT-IR: espectroscopia de transmisión de infrarrojo con transformada de Fourier

MS: espectroscopia de masas

Rf: factor de retardo

TLC: Cromatografía de capa fina

RESUMEN

El acetato de 16-dehidropregnenolona (16DPA) es un precursor de fármacos empleados para el tratamiento de diversas enfermedades, este puede ser obtenido por extracción de sustancias presentes en especies vegetales como las dioscoreáceas y solanáceas. Estas sustancias son conocidas como saponinas, las cuales son transformadas mediante tratamientos químicos para obtener 16DPA. En el presente proyecto de investigación se determinó la cantidad Diosgenina presente en la *Dioscórea rotundata* (ñame espino) mediante extracción empleando método soxhlet acompañado de etapas como maceración, hidrólisis, filtrado, extracción liquido-liquido, cristalización y cromatografía en columna, el proceso de extracción se realizó llevando a cabo diversos ensayos en los cuales se variaron condiciones como tiempo de secado y maceración, método de secado de la muestra e hidrólisis con el propósito de comparar cual era más eficaz para la obtención de Diosgenina. En esta etapa se realizaron 8 ensayos, de los cuales 7 arrojaron resultados positivos para Diosgenina en porcentajes menor al 1%, posteriormente se realizó la conversión de Diosgenina a 16DPA replicando metodologías propuestas por diversos autores [1] [2] [3] obteniendo resultados positivos solo para una de las metodologías empleadas [4], durante la conversión se genera un producto intermediario conocido como PDA. El porcentaje de conversión de Diosgenina a 16DPA fue de un 67,42%. Los progresos de las reacciones fueron monitoreados mediante cromatografía en capa fina TLC y Los productos obtenidos en cada etapa fueron sometidos a pruebas de caracterización como determinación de punto de fusión, IR y MS.

PALABRAS CLAVES: *Dioscorea rotundata*, método soxhlet, Diosgenina, síntesis, 16DPA, saponinas

INTRODUCCIÓN

El 16 DPA es un compuesto de gran interés por ser precursor de fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad androgénica y presenta un elevado costo en el mercado actual, esto se debe a que su método de obtención aun esta en desarrollo. Su importancia radica en las diversas aplicaciones que posee como agente antiinflamatorio, su tratamiento para el control del cáncer, afecciones cutáneas, pulmonares, reacciones alérgicas, las terapias hormonales, náuseas, insuficiencia suprarrenal entre otros. Establecer una ruta sintética ha sido su principal desafío, puesto que se requiere evitar el uso de sustancias toxicas para el medio ambiente, ya que anteriormente se utilizaba al cromo como agente oxidante. La 16 DPA puede ser obtenida a partir de un tipo de sapogenina esteroideal conocida como Diosgenina. Las sapogeninas esteroideas son sustancias obtenidas por hidrólisis de saponinas, las cuales son extraídas de plantas de las familias de Liliaceae (Agavaceae), Dioscoreaceae, Solanáceae, Amaryllidaceae, entre otras. Diferentes estudios evidencian la presencia de la Diosgenina en especies vegetales como las dioscoreáceas (Ñame) y solanáceas (Papa). Por lo que, para esta investigación se eligió el género Dioscorea con la finalidad de darle un valor agregado, teniendo en cuenta la mayor parte de la especie no presenta las propiedades organolépticas requeridas para consumo humano, dando como consecuencia un bajo interés de estos, se seleccionó la Dioscorea Rotundata (Ñame espino), ya que su costo y disponibilidad en el mercado es bastante asequible.

En el desarrollo del proyecto se presentan diferentes capítulos los cuales se desarrollan de la siguiente manera. Capítulo 1 planteamiento del problema de investigación en el cual se describe la necesidad en el uso de las sustancias derivadas de la 16DPA y las sustancias de las cuales se puede lograr su obtención, así como los principales inconvenientes que esta genera. Además, de los objetivos que se pretenden alcanzar con la realización del proyecto. Continuando en el capítulo 2 se puede encontrar las bases teóricas en las que se centra el proyecto, los reglamentos que rigen y regulan el uso de los derivados de esteroides y las variables a emplear. Por otra parte, en el capítulo 3 se encuentra toda la información referente al tipo de investigación, metodología y diseño general del proyecto, como se recopiló la información utilizada de referencia. Finalmente, en el capítulo 4 se desarrollan los resultados obtenidos y la ruta a través de la cual se llegó a ellos, además se encuentran las conclusiones y las investigaciones de referencia citadas respectivamente.

HEMISINTESIS DE 16DPA (ACETATO DE 16 DEHIDROPEGNENOLONA) A PARTIR DE *Dioscorea rotundata*

1. PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

1.1. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El Acetato de 16-dehidropegnenolona (16DPA) es un compuesto de gran interés industrial y comercial, empleado en la elaboración de derivados esteroideos, su precio en el mercado se estima en 80 USD por 5g [5], su importancia farmacológica radica en sus diversas aplicaciones [3] como: las terapias hormonales [1], agentes antiinflamatorios, afecciones cutáneas, pulmonares, reacciones alérgicas, náuseas, insuficiencia suprarrenal y diversos tipos de cáncer [6]. La estructura compleja de 16DPA dificulta el diseño de una ruta exclusivamente de síntesis química para su obtención, por esta razón es necesario partir de compuestos químicos con la estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno presentes en la naturaleza.

Las saponinas esteroideas son sustancias obtenidas por hidrólisis de saponinas, las cuales son extraídas de plantas de las familias de Liliaceae (Agavaceae), Dioscoreaceae, Solanáceae, Amaryllidaceae, entre otras, y son los precursores por elección en la síntesis de 16DPA [7]. En efecto, las saponinas de mayor uso son solasodina extraída de plantas de la familia Solanáceae y su análogo oxigenado diosgenina extraída de plantas de la familia Dioscoreaceae [1]. El precio de este tipo de sustancias en el mercado es sumamente costoso, en 2016 se reportó que los precios de una saponina refinada estaban entre 3,77 y 753,311 Dólares Americanos por kilogramo [8]. Por lo que se hace necesario buscar métodos más económicos y eficientes para su obtención, siendo la extracción una opción viable y su principal desafío. Las saponinas pueden ser extraídas de plantas como bayas y tubérculos, estos últimos juegan un papel importante dentro del plan de alimentación por ser buena fuente de energía y proteína. El ñame es un tubérculo considerado sustituto de la papa y la yuca, y su consumo al igual que su producción se da principalmente en países africanos, islas de las Antillas, países de Oceanía y suramericanos como Colombia, Brasil, Venezuela, República Dominicana y Puerto Rico [9].

Colombia se encuentra entre los 12 países con mayor producción de ñame con 395.374 toneladas en 2010 y ocupa el primer lugar en cuanto a rendimiento con 28,3 toneladas por hectárea sembrada [9]. Su cultivo viene dado desde la colonia, con diferentes especies denominadas comúnmente ñame criollo (*Dioscorea Alata*) ñame espino (*Dioscorea Rotundata*) ñame papa- (*Dioscorea bulbífera*) ñame azúcar

(*Dioscorea Esculenta*), y ñampin (*Dioscórca Trífida*). Siendo la *D. Alata* y *D. Rotundata* las especies de mayor importancia para el consumo humano, tanto por el área sembrada como por la demanda del tubérculo, seguidas por *D. trífida* [10] [11]. El costo y disponibilidad de estos en el mercado es bastante asequible, además de ser un producto de alta demanda en la canasta familiar por sus características organolépticas. El ñame se ha caracterizado por ser un producto cultivado y consumido en la región Caribe, es decir, su consumo es más local que general, lo cual ha estancado su explotación a nivel industrial. Sumado a esto, problemas sanitarios del cultivo y la falta de desarrollo tecnológico, constituyen factores limitantes para un óptimo nivel de producción [12] [9], como quedó demostrado en el año 2017, mediante un evento realizado en la ciudad de Cartagena conocido como “Ñameton”, donde se llevó a cabo una venta masiva de este producto organizada por la gobernación debido a la superproducción, en el cual se realizó ventas al por mayor de diferentes especies de ñame y también de productos alimenticios preparados a base del mismo, sin tener en cuenta su potencial uso a nivel industrial en disciplinas como la fitoterapia y la homeopatía, para el tratamiento de enfermedades, su acción como plaguicida (piscicidas, pediculicidas, insecticidas), su potencial cosmético para la elaboración de champús, jabones o en la cacería para envenenar flechas [13], entre otros usos conocidos.

En el presente proyecto se pretende la síntesis y caracterización de un intermediario para la producción de medicamentos esteroidales (16DPA) empleando como material de partida Diosgenina la cual puede ser extraída de *Dioscorea Rotundata*.

1.2. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA

¿Cuáles son las condiciones óptimas de extracción de Diosgenina y síntesis de acetato de 16-dehidropegnenolona (16DPA) a partir de *Dioscorea Rotundata*?

1.3. JUSTIFICACIÓN

La síntesis de 16DPA es un tema de interés en muchas investigaciones en las cuales se han reportado rutas sintéticas basadas en el uso de diferentes solventes y donde se sugieren eliminar reactivos contaminantes, uno de los principales problemas que genera la obtención de este compuesto, su importancia radica por ser precursoras de fármacos utilizados para el tratamiento de enfermedades relacionadas con la actividad androgénica y su costo en el mercado es bastante elevado, su obtención puede lograrse a partir de las sapogeninas, sustancias que se encuentran presente en diferentes especies de plantas como bayas y tubérculos.

Con la finalidad de proporcionarles un valor agregado, teniendo en cuenta que muchos de estos cultivos son considerados de aplicación reducida por el hecho de no poseer un interés comercial como producto alimenticio, ya sea por sus características organolépticas o por su toxicidad. La presente investigación tiene como finalidad la extracción de Diosgenina a partir de *Dioscorea Rotundata* y la posterior síntesis de 16DPA.

Debido a que comúnmente se realizan investigaciones en las cuales se utilizan diferentes métodos para la extracción de saponinas a partir de diferentes especies *Dioscórrea*, y conociendo que Colombia es uno de los países donde más se produce ñame, pero la gran parte de cultivo es utilizado con fines alimenticios [14], se hizo necesario realizar un análisis comparativo entre los métodos más empleados, utilizando *Dioscórrea Rotundata* (ñame espino) con el propósito de identificar cual era el procedimiento más adecuado de extracción, el porcentaje de extracto obtenido, así como el contenido de *Diosgenina*.

En el presente proyecto se realizó la extracción de saponinas a partir de *Dioscórrea Rotundata* empleando variaciones en las condiciones de extracción como el tiempo de maceración, pH, condiciones de secado, hidrólisis entre otras, mediante método soxhlet por ser el método tradicional y posteriormente se realizó la síntesis en dos etapas de 16DPA a partir de Diosgenina. de una manera limpia o con el menor impacto ambiental posible, mediante el uso de solventes de baja toxicidad, por medio de procesos que generaran pocos contaminantes, además de la utilización de una metodología que permitiera la recuperación de los solventes utilizados y así reducir costos lo que es de gran utilidad en un futuro para poder implementarlo a escala industrial dado que se tiene conocimiento que dichos compuestos presentan gran demanda y a la dificultad que genera su obtención lo que ocasiona su alto costo en comparación con el precio del ñame en el mercado además de ser una fuente de obtención natural.

Con base en lo anterior, el presente trabajo tuvo por finalidad proporcionar un valor agregado al ñame con fines industriales extrayendo saponinas de una manera más económica, cuidando el medio ambiente mediante la utilización de solventes de baja toxicidad y obteniendo resultados óptimos en cuanto a la eficiencia del proceso de extracción y obtención de Diosgenina empleada para sintetizar 16DPA.

El proyecto de investigación es factible debido a que los experimentos y las pruebas que se realizaron son a nivel de laboratorio, para lo cual se tenía a disposición un laboratorio dotado de equipos, reactivos, materiales y con horarios disponibles aprobado para el proyecto de investigación, además de la asesoría y supervisión de un tutor preparado en el área.

La temática de investigación ha sido estudiada con anterioridad por lo que se tuvo a disposición gran material de apoyo como artículos para la revisión del mismo, sé

contó con los equipos para la realización de pruebas de caracterización, con el personal capacitado para realizarlas y posteriormente estas pudieron ser analizadas por los investigadores del proyecto.

El artículo 6 de la Ley 30 de 1992 del estatuto Orgánico de la Universidad de San Buenaventura en Colombia en sus objetivos define que: “Acometer las funciones de investigación, examinando los logros culturales del pasado; estimulando la búsqueda de nuevos conocimientos y métodos; y promoviendo el espíritu de crítica, con la certeza de que la ciencia está en permanente desarrollo”. Teniendo en cuenta que la investigación contribuye a un aporte científico, la universidad promueve su investigación [15].

1.4. OBJETIVOS

1.4.1. Objetivo general

Establecer un procedimiento para la obtención de 16DPA a partir de *Dioscorea Rotundata* a través de una hemisíntesis

1.4.2. Objetivos específicos

- Establecer el procedimiento más adecuado de extracción de Diosgenina por el método soxhlet a partir de *Dioscorea Rotundata*
- Caracterización espectroscópica de la Diosgenina obtenida
- Sintetizar 16DPA a partir de la Diosgenina obtenida
- Caracterizar la 16DPA obtenida a partir de la hemisíntesis

2. MARCO DE REFERENCIA

2.1. ANTECEDENTES INVESTIGATIVOS

Con el propósito de conocer qué investigaciones previas que se han desarrollado entorno a la extracción de Diosgenina a partir de plantas y a la síntesis orgánica de compuestos esteroidales a partir de un intermediario conocido como 16DPA y la transformación de grupos orgánicos como el grupo carbonilo de las cetonas, se ha recopilado una serie de documentos referentes a las dos temáticas, los cuales han sido organizados cronológicamente para obtener una mejor visión de la evolución en el tiempo y los aspectos más destacados de cada una de ellas.

Dentro de la extracción encontramos los siguientes antecedentes investigativos:

En el año 1981 Ntahomvurike y colaboradores desarrollaron una investigación que tuvo por objetivo detectar la presencia de Diosgenina en varias especies de *Dioscórrea* (ñames) y *Solanáceas* (Papas). Provenientes de África y en la cual se detectó Diosgenina en las especies *D. praehensilis*, en las bayas verdes, maduras y tallos de *incanum* L. y en las raíces de *S. Adoense* [16]

En el año 2001, en la universidad de Antioquia, Alejandro Martínez M. realizó un trabajo de investigación de extracción y aislamiento de saponinas de manera general y donde se detallan los diferentes ensayos de identificación de las saponinas [17]. Continuando con los avances en las investigaciones sobre la obtención de saponinas a partir de diferentes géneros de *Dioscórreas* en 2003 se publicó la investigación por parte de Yoshie Hata y colaboradores en la cual se evaluó el contenido de saponinas de diversas especies de *Dioscórreas* provenientes de la colección de la universidad de Córdoba, seleccionadas con sutileza, en dichas especies se detectaron de 4 a 7 saponinas diferentes entre los géneros de *Dioscórrea* utilizados, además se encontró que el 34% de las muestras seleccionadas contuvieron saponina [12].

Las investigaciones detalladas anteriormente sirvieron de guía en cuantos a los contenidos de saponinas de las diferentes especies de *Dioscorea*, se logró identificar que la *Dioscorea rotundata* es uno de las especies que presenta mayor contenido de saponinas y que hace parte de las especies cultivadas en Colombia.

Continuando con las investigaciones sobre extracción, cuantificación y aislamiento de saponinas encontramos las investigaciones que se describen a continuación, de las cuales se puede resaltar que las saponinas pueden ser obtenidas de otras especies y a través de otras rutas de obtención.

En el año 2004, Marc Sautour y su equipo de investigación descubrieron una saponina realizando una extracción con metanol de *Dioscórrea cayenensis* [18]. Por otro lado, el investigador S.G. Sparg y colaboradores con el tema de "Biological activities and distribution of plant saponins", examinaron los estudios de aislamiento de saponinas para determinar cuáles son las familias de plantas más comúnmente estudiadas y en qué familias se han identificado saponinas [19].

Con el fin de determinar la mejor forma de extracción de saponinas empleando dos solventes diferentes para luego determinar cuál es más eficaz al momento de extraer las saponinas, Rosa Hernández S y su equipo de investigación en el año 2005 publicaron el artículo de investigación "Extracción y Cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey" [7].

En 2009 con el propósito de comparar los métodos de extracción de saponinas de los residuos del beneficio del fique, la facultad de ingenierías fisicoquímicas de la universidad industrial de Santander encaminadas por Johnny Leonardo Pérez Ochoa, Lili Andrea Quitián Méndez realizaron una investigación en donde se comparan dos métodos de extracción los cuales son el método Soxhlet y el método de extracción asistido por ultrasonido (EUA), donde se determinó que el método más eficaz para extraer saponinas del bagazo del fique fue el EUA, a su vez fueron comparados diferentes solventes lo que generó como conclusión que al emplear una mezcla de metanol-agua se obtenían mejores resultados, los compuestos de extracción fueron sometidos a diversas pruebas para detectar las saponinas entre las pruebas realizadas se destacan el ensayo de espuma, hemólisis entre otras [21]. En el mismo año se adelantó la investigación conocida como "Steroidal Sapogenins and Glycosides from the Rhizomes of *Dioscórrea bulbifera*" por el equipo de trabajo de Hai Liu y colaboradores, en donde se reportaron cuatro saponinas esteroideas y nuevos glicosidos obtenidos de la *Dioscórrea bulbifera* [22].

En el año 2010 G. Tomás Ch., J. Huamán M y colaboradores tuvieron el propósito de descubrir las saponinas en la investigación que lleva por título "Extracción y clasificación de la saponina del *Sapindus Saponaria* L.", "boliche" [23]. El boliche es comúnmente utilizado para crear detergentes biodegradables por su contenido de saponinas por lo que resultó atractivo para lograr su objetivo, en el desarrollo de la investigación se plantearon dos metodologías de extracción. La primera consistió en realizar una extracción sin desengrase y la segunda utilizando cloroformo como solvente para desengrasar la muestra del boliche, con el fin de determinar cuál de los dos métodos proporcionaba una mayor cantidad de saponinas del boliche y cuya conclusión fue que la extracción realizada con desengrase era más eficiente en cuanto a la obtención de saponinas.

En 2012, Holger J. Maldonado García, y colaboradores publicaron una investigación sobre "ESTUDIO DE SAPOGENINAS ESTEROIDALES DE

ESPECIES PERUANAS DEL GÉNERO *DIOSCÓREA*” con el propósito de detectar las saponinas, más específicamente Diosgenina presente en los géneros de Dioscórea procedentes de Perú, por su amplio uso en la producción de esteroides con fines farmacológicos, la metodología utilizada fue proceso de hidrólisis, neutralización, lavado con agua destilada, secado, extracción por método soxhlet, reducción de volumen, lavado con solvente, recristalización y purificación por cromatografía en columna [24]. Cabe resaltar que esta investigación posee similitud con nuestra propuesta, debido a la metodología empleada diferenciándose en el orden de la misma y el uso de diferentes solventes, así como las condiciones de trabajo, además de aplicar solo el método de extracción tradicional mientras en nuestra investigación se pretende comparar el método tradicional con el método asistido por ultrasonido y por microondas

En 2013 se estudió la extracción, cuantificación y purificación de saponinas de semillas de *chenopodium quinoa willd* provenientes del noroeste argentino por parte de Vicente Gianna en Córdoba en donde se busca determinar las condiciones óptimas de extracción de las saponinas y donde se comparan dos métodos de extracción el primero el método de extracción asistida por microondas y el método de extracción a alta presión, además de realizar un análisis comparativo entre los métodos anteriormente mencionados y los métodos soxhlet y de agitación lineal y reportando como el mejor método el de extracción a altas presiones [25].

Por otro lado las investigaciones basadas como referencia para la síntesis de 16DPA son las siguientes antecedentes investigativos:

En el año 2003, Amrit Goswami y colaboradores desarrollan un trabajo de investigación que lleva por título “A One-Pot Efficient Process for 16-Dehydropregnenolone Acetate”, cuyo propósito era obtener de manera eficiente y ecológica 16 DPA a partir de Diosgenina (saponinas esteroidales) y solasodina por medio de una reacción en un solo recipiente (One-Pot), la cual se desarrolló con un rendimiento global del 75% [3]. Lo planteado anteriormente fue relevante debido a que se evitaba la mayor cantidad de pérdidas entre las diferentes etapas de síntesis. Sin embargo, al tratar de replicar la metodología planteado no se obtuvieron resultados alentadores.

Ese mismo año, Lee y colaboradores investigaron el papel regulador del gen PgSS1 (Panax ginseng squalene sintasa) sobre la biosíntesis de fitoesteroles y Saponinas triterpénicas, y evidenciaron que esta pudo inducir un alza en la regulación de saponinas y fitoesteroles [20]. Se sugirió que esta enzima se involucra en la ramificación de las vías biosintéticas que conducen a la síntesis de dichos compuestos. Además, los resultados demostraron que PgSS1 es una enzima reguladora clave no sólo para el fitosterol sino también para la biosíntesis de

triterpenos y la sobreexpresión de PgSS1 confirió la hiperproducción de saponinas triterpénicas a *P. ginseng*.

En el proceso de síntesis de 16DPA se genera un intermediario conocido como PDA el cual es oxidado comúnmente empleando compuestos inorgánicos como cromo el cual genera residuos altamente contaminantes, razón por la cual, en el año 2005, Zhang, y colaboradores sustituyeron al cromo por oxígeno generado fotoquímicamente, disminuyendo el impacto negativo sobre el medio ambiente. En la investigación se produjo 16DPA exitosamente con un rendimiento de reacción de 75% [2]. Esta investigación sirvió como guía debido a que se realizó caracterización del intermediario obtenido, se determinó su punto de fusión por lo que durante el proceso de síntesis se tuvo indicios que la ruta extracción era alentadora.

Más adelante en el año 2011, Pritish Chowdhury y colaboradores lograron la síntesis en tres pasos de una droga esteroidal utilizando un intermediario conocido como 16 DPA partiendo de la Diosgenina obteniendo un rendimiento del 60% a través de la generación de ion acetileno , al mismo tiempo Jiaoyang Ding, Liping Cao, y su grupo de investigación en la universidad normal de china lograron sintetizar amidas secundarias o terciarias directamente a partir de aril, heteroaril metil cetonas utilizando un sistema yodo-amina - NaOH que proporcionó los productos esperados con buenos rendimientos en un medio acuoso. Con las ventajas del uso de reactivos de bajo costo, condiciones de reacción suave y facilidad de manipulación.

2.2. MARCO TEÓRICO

2.2.1. Síntesis orgánica

La síntesis orgánica es la construcción planificada de moléculas orgánicas mediante reacciones químicas [26]. Sintetizar un compuesto orgánico significa prepararlo a partir de sustancias más simples, generalmente, comerciales, mediante una secuencia de reacciones cuyos objetivos principales son obtener el producto con el menor número de pasos y con los máximos rendimientos posibles, obtener cantidades del producto en condiciones económicamente ventajosas (industrias farmacéutica, química, agroquímica, veterinaria, etc.), es decir, productos de alto valor agregado “fine chemicals” [27].

Para realizar una síntesis orgánica se deben analizar los caminos sintéticos probables, es decir, existe un proceso mental exploratorio de prueba y error para predecir cuál será la mejor estrategia [27]. Las síntesis se pueden clasificar según la naturaleza del producto de partida en síntesis totales o parciales. Síntesis totales, son aquellas en las que se parte de reactivos más o menos sencillos y que en última

instancia podrían obtenerse a partir de sus elementos constituyentes y las síntesis parciales, son aquellas que utilizan como productos de partida, o productos intermedios, productos naturales que a su vez pueden obtenerse por procedimientos sintéticos o por degradación de otros productos [28].

2.2.2. Esteroides

Los esteroides son compuestos con una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno. Constituyen uno de los grupos más estudiados por su diversa actividad fisiológica, ya que incluyen una gran variedad de compuestos naturales como los esteroides, los ácidos biliares, la vitamina D, las hormonas sexuales y adrenocorticales, los glucósidos cardiotónicos, las saponinas y algunos alcaloides [29].

Dentro de las hormonas sexuales se encuentran los andrógenos u hormonas sexuales masculinas, los cuales son derivados de la oxidación del colesterol, constituidos por 19 átomos de carbono con sustituyentes oxigenados en C3 y C17, los principales andrógenos naturales son la androsterona, la dehidroepiandrosterona y la testosterona, que es la más activa de las tres y quien es la encargada del fenotipo masculino. Otro grupo representativo de las hormonas sexuales son los estrógenos también conocidos como hormonas sexuales femeninas que a diferencia de los estrógenos tienen 18 átomos de carbono.

También hace parte de los esteroides un conjunto de compuestos que posee gran interés, como las saponinas, las cuales se encuentran constituidas por 27 átomos de carbono con una cadena lateral de tipo espiroacetal y que ocurren naturalmente en forma de glucósidos (saponinas) en plantas. Estas pueden ser hidrolizadas por ácidos o enzimáticamente para originar las saponinas libres y el azúcar. Dentro de las saponinas más importantes se encuentran Solasodina, la Hecogenina, la Sarsapogenina y la Diosgenina que es una de las materias primas más usadas para la síntesis orgánica y/o microbiológica de hormonas esteroidales [29].

2.2.3. Ñame

El ñame también conocido como *Dioscorea spp.*, es uno de los seis géneros pertenecientes a la familia *Dioscoraceae* y agrupa aproximadamente 600 especies, de las cuales solamente doce son comestibles [14], ya que presentan un factor antinutricional que es la saponina.

Es un tubérculo originario de Asia, África y América, las especies y variedades más comerciales se introdujeron en América probablemente desde África durante la Conquista [30]. Se encuentra distribuido en las regiones tropicales de alta pluviosidad y el área mundial cultivada comprende: África Occidental, sur de Asia, Oceanía y los países del Caribe [31].

2.2.3.1. Ñame en Colombia

En Colombia se siembra mayoritariamente en la costa caribe con el 98% de producción anual nacional, otros lugares como Antioquia o Caquetá también siembran el ñame, pero su participación en el mercado es mínima. La producción de este para la exportación se concentra en los departamentos de Sucre, Bolívar y Córdoba, en donde existe un núcleo productivo integrado por pequeños productores que explotan el cultivo en terrenos de menos de dos hectáreas.

En 2009 se reportó un total de 25 mil hectáreas sembradas que se concentran en 26 municipios de los Montes de María entre, ellos Chalan, Coloso, Tolú Viejo, Ovejas, Carmen de Bolívar, Sampues, Morroa, San Antero, Coveñas, Lórica, Moñitos, San Pelayo, Cereté, Sincelejo, San Jacinto, San Juan Nepomuceno, San Antonio y Palmito [32].

Entre el año 2000 y el 2010 fue de un poco más 20 mil toneladas por año, convirtiéndose en un cultivo con altos niveles de rendimiento por hectárea. Su consumo es mayoritariamente rural y está asociado prácticas culturales propias de la región costeña. Su cultivo no está del todo industrializado, lo que indica que es cultivado mayoritariamente en fincas de pequeños productores [33].

Los costos de producción por hectárea se calcularon cerca de los 5 millones de pesos y los rendimientos están en un rango de 12 a 15 toneladas con las variedades espino y diamante.

Uno de los principales problemas en cuanto al cultivo, es debido a que el ñame es susceptible a enfermedades que generan fuertes daños en la cantidad producida, rendimiento y calidad del producto final. En Colombia, la producción de ñame se ha visto afectada por una infección llamada antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, generando entre finales de los años ochenta y principios de los noventa la afectación de mayor grado observada en el país,

originando una reducción del área sembrada de 25.000 hectáreas (has) en 1989 a solamente 1.000 has en 1990. El mayor impacto se dio en la región Caribe por ser ésta la de mayor área y producción de ñame [9].

La antracnosis es una enfermedad que se ha convertido en el principal problema para la producción de ñame, no solo en Colombia sino también en África. Los síntomas de un cultivo contaminado con antracnosis se pueden observar en las hojas, a través de la aparición de puntos rojos que con el tiempo producen necrosis, en el tallo ya que este tiende a tomar un color negro o, en el pecíolo que también sufre necrosis [34].

La solución inicial en respuesta a la antracnosis fue el aumento del cultivo de ñame espinoso, el cual es más tolerante a la enfermedad y que logró durante algún tiempo reemplazar al ñame criollo. Sin embargo, dadas las necesidades del mercado tanto local como externo, se hizo necesario buscar otras alternativas. En este proceso, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (Corpoica) inició en 1986 la búsqueda de genotipos (clones de ñame criollo) tolerantes a la enfermedad. Los resultados de la investigación fueron evaluados en fincas de los departamentos de Bolívar, Sucre y Córdoba y se obtuvieron cuatro clones de ñame que actualmente se cultivan en la región [9].

Aun en la actualidad el cultivo de ñame presenta afectaciones por antracnosis, pero no al mismo nivel de décadas pasadas. El esfuerzo conjunto de productores y entidades como Corpoica, ICA, el Programa de Biotecnología Agropecuaria (PBA) y las universidades de Sucre y Córdoba, han contribuido al mejoramiento del cultivo [9].

2.2.4. Saponinas

Los glucósidos saponínicos, también llamados saponinas, son derivados terpénicos que agitados en el agua producen espuma semejante al jabón, reduciendo así la tensión superficial del agua, son unos excelentes emulsivos, y se encuentran frecuentemente en las plantas medicinales. Están formadas por aglicones no polares unidos a una o más moléculas de monosacáridos. Dicha combinación de estructuras polares y no polares explica la capacidad tensoactiva del compuesto [35].

Una de las características de las saponinas es la de producir hemólisis de los glóbulos rojos (eritrocitos), por lo cual son muy dañinas si se inyecta directamente en la sangre de animales poiquilotermos en especial los peces, a causa de esto

algunas plantas no son útiles en medicina; sin embargo, para los animales de sangre caliente apenas tiene toxicidad

Las saponinas se consideran una familia de metabolitos secundarios y se lograron identificar 4 subgrupos: el primero son las saponinas triterpénicas, las segundas son las saponinas esteroidales, las terceras saponinas esteroidales alcalinas y el último son las saponinas de organismos marinos. Los cuales presentan un precursor común: el óxido de escualeno (XI).

2.2.4.1. Sapogeninas esteroidales

Son glicósidos esteroides con un núcleo espiroetano, la porción esteroide se origina por la ruta de la acetilCoenzima vía ácido mevalónico y escualeno [17].

El enlace glucosídico se establece a través del hidroxilo en posición 3 del anillo A de la aglicona.

Las sapogeninas esteroidales siempre se encuentran en la naturaleza formando parte de una saponina, a pesar de la presencia de saponasas, en muchas de las plantas que sintetizan estos compuestos. Entre las sapogeninas esteroidales, cabe destacar aquéllas que tienen como aglicona a la Hecogenina y la Diosgenina, compuestos vegetales que sirven de base para la industria de hormonas esteroidales [36].

2.2.4.2. Sapogeninas

Son obtenidas al hidrolizar una saponina en medio ácido o enzimáticamente, ambos procesos liberan una o varias unidades de carbohidratos ligados y la denominada Sapogenina esteroide. Las saponinas y sapogeninas presentan propiedades físicas, químicas y biológicas diferentes [17].

2.2.5. EXTRACCIÓN

Según su definición es la técnica más empleada para separar un producto orgánico de una mezcla de reacción o para aislarlo de sus fuentes naturales [37]. Se basa en la disolución de una mezcla (líquida o sólida) en un solvente capaz de arrastrar uno

o varios componentes claves al momento que las sustancias tienen contacto. Puede ser Líquido-Líquido o Sólido-Líquido [38].

2.2.5.1. Extracción Sólido-Líquido

Hace referencia a la extracción de uno o varios componentes solubles en un sólido mediante el contacto de este con un solvente líquido selectivo [39], normalmente orgánico, en el cual los demás componentes son insolubles. Es por consiguiente muy importante la elección del disolvente que se realiza teniendo en cuenta la solubilidad en el mismo de la sustancia a extraer, la insolubilidad de las demás sustancias, la facilidad con que pueda separarse la sustancia del disolvente, la peligrosidad y el precio [40], este proceso puede utilizarse para la producción de una disolución concentrada de material sólido valioso, o para eliminar de un sólido insoluble [41].

2.2.6. Extracción por método Soxhlet

Es la técnica más antigua para la extracción de compuestos orgánicos en matrices sólidas. La extracción exhaustiva de componentes orgánicos en un sistema soxhlet se lleva a cabo usando un disolvente orgánico, el cual refluye a través de la muestra contenida en un cartucho poroso [42]. En la extracción soxhlet la muestra se pone repetidamente en contacto con las porciones frescas de disolvente, lo que contribuye a desplazar el equilibrio de transferencia y no se requiere filtración después de la etapa de lixiviación.

2.3. MARCO LEGAL

Con base en que la molécula de 16DPA es un derivado de esteroides, precursor para la síntesis de hormonas sexuales, medicamentos esteroideos y diversos fármacos empleados para el tratamiento de enfermedades como el cáncer y otras afecciones [3]. Se debe tener en cuenta las leyes y reglamentos que regulan el uso de este tipo de sustancias en los diferentes países y las afectaciones que estas puedan causar a la salud por su uso inadecuado o excesivo.

Los “esteroides anabólicos” son análogos de la testosterona, una hormona sexual masculina. Entre otros efectos, provocan el crecimiento del músculo esquelético (efecto anabólico) y el desarrollo de características sexuales masculinas (efecto androgénico) [43].

El uso de estas sustancias puede ocasionar retención de líquido en el organismo lo que proporciona un aumento de peso por ello muchas personas consideran que estos pueden proporcionar mayor fortaleza a los músculos y ha generado un incremento significativo el uso sustancias que incluyen compuestos esteroidales con el propósito de obtener resultados a nivel corporal en tiempos significativamente cortos, en algunos suplementos vitamínicos y pastillas adelgazantes este componente se encuentra declarado en sus ingredientes.

El abuso de este tipo de sustancias puede ocasionar efectos no deseables en la salud ya sea físicos y en algunas ocasiones pueden ser mortales porque originan ataques al corazón o cáncer de hígado [43].

Por lo que en muchos países se ha despertado la preocupación por el fácil acceso a estos medicamentos sin ningún control, esto ha generado como consecuencia la aplicación de leyes que regulen la compra y venta, así como el suministro de los mismos. En Colombia, en el mes de abril del reciente año el INVIMA ha dispuesto una alerta sobre aproximadamente 286 productos milagrosos que son expedidos por medios de comunicación como la internet y la televisión los cuales contienen este tipo de compuestos sin declararlos en sus componentes.

Por su parte, en argentina desde agosto de 2002, la Ley 25.627 (sancionada por el Senado y Cámara de Diputados de la Nación Argentina) los incluye entre los medicamentos de "venta bajo receta archivada" [43].

En Brasil fueron incluidos dentro de la Lista I de la Ley General sobre Fiscalización de la Metanfetamina promulgada en 1996, que incluye la notificación de ciertas transacciones relacionadas con esos compuestos. En vista del creciente uso indebido de los esteroides anabólicos, especialmente en los establecimientos de fisicoculturismo, la Secretaría de Vigilancia Sanitaria del Ministerio de Salud ha decidido dispensar este tipo de compuestos, junto con sus sales, isómeros y precursores, con receta especial, copia de la cual deberá guardar el prescriptor.

En algunos países como los estados unidos la compra y venta de estos compuestos era manejada sin ningún control previo por lo que el 18 de diciembre de 2014, el presidente Obama firmó la Ley de Control de esteroides anabólicos de 2014 Designer - Dasca en La cual se toman medidas contra el mercado de los suplementos "prohormonales" de nutrición deportiva [44].

En algunas otras naciones occidentales como el Reino Unido y Canadá han impuesto leyes más laxas, donde posesión y uso por razones personales son legales, pero el tráfico no. Durante gran parte del resto del mundo, o bien no existen leyes o leyes muy endeblen en lo que respecta a estas sustancias. [45]

2.4. MARCO CONCEPTUAL

CONTAMINANTES. Son todas aquellas sustancias o componentes que afectan al medio ambiente debido a su toxicidad o sus propia naturaleza, son los residuos de las actividades realizadas por el ser humano a contaminación es un cambio perjudicial en las características físicas, químicas o biológicas del aire, la tierra o el agua, que puede afectar nocivamente la vida humana o la de especies beneficiosas, los procesos industriales, las condiciones de vida del ser humano y puede malgastar y deteriorar los recursos naturales renovables [46].

ESTEROIDES. Los esteroides son compuestos con una estructura básica de ciclopentanoperhidrofenantreno. Constituyen uno de los grupos más estudiados por su diversa actividad fisiológica [29].

HEMÓLISIS. Ruptura de los eritrocitos con liberación de hemoglobina al plasma. Se produce al final de la vida media de los hematíes, aproximadamente a los 120 días [47].

MOLÉCULAS. Son la unión de dos o más átomos, de un mismo elemento o de elementos diferentes, mediante enlaces químicos se originan una molécula de un compuesto químico [48].

SAPONINA TRITERPENICA. Son saponinas que presentan una estructura policíclica, normalmente tetra o pentacíclica. Proviene de un precursor llamado oxido de escualeno (XI). Y a diferencia de las saponinas esteroideas mantienen intactos sus tres radicales metilos, y algunos triterpenos no presentan el sistema policíclico característico del esterano [35].

REACTIVOS. Son las sustancias que reaccionan para dar origen a las reacciones químicas también son conocidas como reactantes.

QUINONAS. Metabolitos secundarios con un núcleo dicarbonilo quinoide orto o para [49].

2.5. HIPÓTESIS

Ha. A partir de la extracción de las saponinas presentes en el ñame espino se podrá obtener una fuente de producción de 16DPA

Ho. A partir de la extracción de las saponinas presentes en el ñame espino no se podrá obtener una fuente de producción de 16DPA.

2.6. OPERACIONALIZACIÓN DE LAS VARIABLES

2.6.1. Variables dependientes

- Presión
- Volumen
- PH
- Concentración
- Peso

2.6.2. Variables independientes

- Temperatura
- Tiempo

2.6.3. Operacionalización de las variables

| | VARIABLES | DEFINICIÓN | INDICADOR |
|---------------------------|---------------|--|---------------------|
| VARIABLES DEPENDIENTES | Presión | Fuerza por unidad de superficie que ejerce un líquido o un gas en dicha superficie | Bar |
| | Volumen | Espacio que ocupa un objeto | Litro |
| | pH | La intensidad de un ácido, dependiendo de su capacidad de disociación, así como de su concentración. | Ácido-básico-neutro |
| | Concentración | cantidad de soluto que hay disuelta en una cantidad dada de disolvente | Gramos/ litro |
| | Peso | Fuerza gravitacional que | Kilogramo |

| | | | |
|--------------------------|-------------|--|--------------------|
| | | la Tierra ejerce sobre un objeto | |
| VARIABLES INDEPENDIENTES | Temperatura | Grado de energía térmica medido en una escala definida | Grados centígrados |
| | Tiempo | Duración de un evento específico | Horas |

3. DISEÑO METODOLÓGICO

3.1. TIPO DE INVESTIGACIÓN

La siguiente investigación es de tipo explicativa debido a que trata de encontrar solución a los problemas reportados en investigaciones anteriores, según la definición una investigación explicativa pretende explicar el fenómeno en cuestión, para lo cual busca establecer, de manera confiable, la naturaleza de la relación entre uno o más efectos o variables dependientes y una o más causas o variables independientes. Las investigaciones explicativas proporcionan un 'sentido de entendimiento' del fenómeno en estudio, es decir, procuran entenderlo a partir de sus causas Algunos llaman 'experimental' a la investigación explicativa.

Hernández Sampieri et al (1991) sostienen que, si bien la mayoría de las investigaciones explicativas son experimentales, ciertos estudios no experimentales pueden aportar evidencia para explicar por qué ocurre un fenómeno, proporcionando así "un cierto sentido de causalidad" [50].

3.2. DISEÑO ADOPTADO

El diseño es de tipo experimental debido a que mediante pruebas experimentales se logrará verificar la obtención de los resultados.

Autores afirman que el diseño experimental intenta establecer básicamente relaciones causa-efecto. Más específicamente, cuando se desea estudiar como una variable independiente (causa) modifica una variable dependiente (efecto) [51].

3.3. ENFOQUE ADOPTADO

El enfoque cuantitativo presenta relación con las investigaciones de tipo explicativa y a su vez con el diseño experimental, debido a esta relación y los objetivos plasmados el enfoque adoptado en el siguiente proyecto es de tipo cuantitativo por que utiliza información cuantitativa o cuantificable (medible) [52].

Este tipo de enfoque se caracteriza porque usa la recolección de datos para probar hipótesis con base en medición numérica y el análisis estadístico para establecer patrones de comportamiento [53].

3.4. METODOLOGÍA

3.4.1. Generalidades

Todas las reacciones fueron monitoreadas por Cromatografía en Capa Delgada Analítica (CCDA). Para realizar la purificación se utilizó silica gel 60-200 Mesh, solventes y reactivos fueron obtenidos como grado analítico de la firma comercial MERCK. Los puntos de fusión fueron tomados en un fusiómetro marca Fischer y no fueron corregidos. Los equipos utilizados para concentrar los solventes fueron rotaevaporadores yamato RE540 Rotary evaporator with yamato BM-400 water bath y Heidolph Coated G5 Cold Trap. Para revelar con diferentes longitudes de onda se utilizó una lámpara UV modelo UVLS-24 EL SERIES UV LAMP. El secado de la muestra se realizó en un horno de vacío acoplado a una bomba modelo KNF Laboport N820FTP.

Las diferentes muestras de *Dioscorea* fueron compradas en un supermercado donde se tenían clasificadas de acuerdo al nombre común, una vez adquiridas se procedió al tratamiento el cual consistió en retirar la cascara y cortar en trozos pequeños cada una de las muestras de *Dioscórrea*, una vez cortados fueron sometidos a desengrase con un solvente apolar, en nuestro caso el éter de petróleo (se utiliza la cantidad equivalente de ml por g de muestra) terminado el proceso se filtró para separar el extracto de la parte sólida. El extracto se rota-evaporo para recuperar el solvente y la parte solida fue sometida a secado en una estufa a baja presión, una vez se obtuvo la muestra totalmente seca se procedió a triturar con el fin de obtener una harina para aumentar la superficie de contacto en el proceso de extracción por método soxhlet, el extracto alcohólico se llevó hasta sequedad posteriormente se realizó hidrólisis con ácido clorhídrico y finalmente se purificó. Cabe resaltar que en las diferentes pruebas se realizaron variaciones en las condiciones metodológicas. Se identificó las muestras en las que se obtuvo diosgenina la cual fue aislada mediante cromatografía en columna monitoreada por TLC.

3.4.2. Diagrama de flujo de proceso

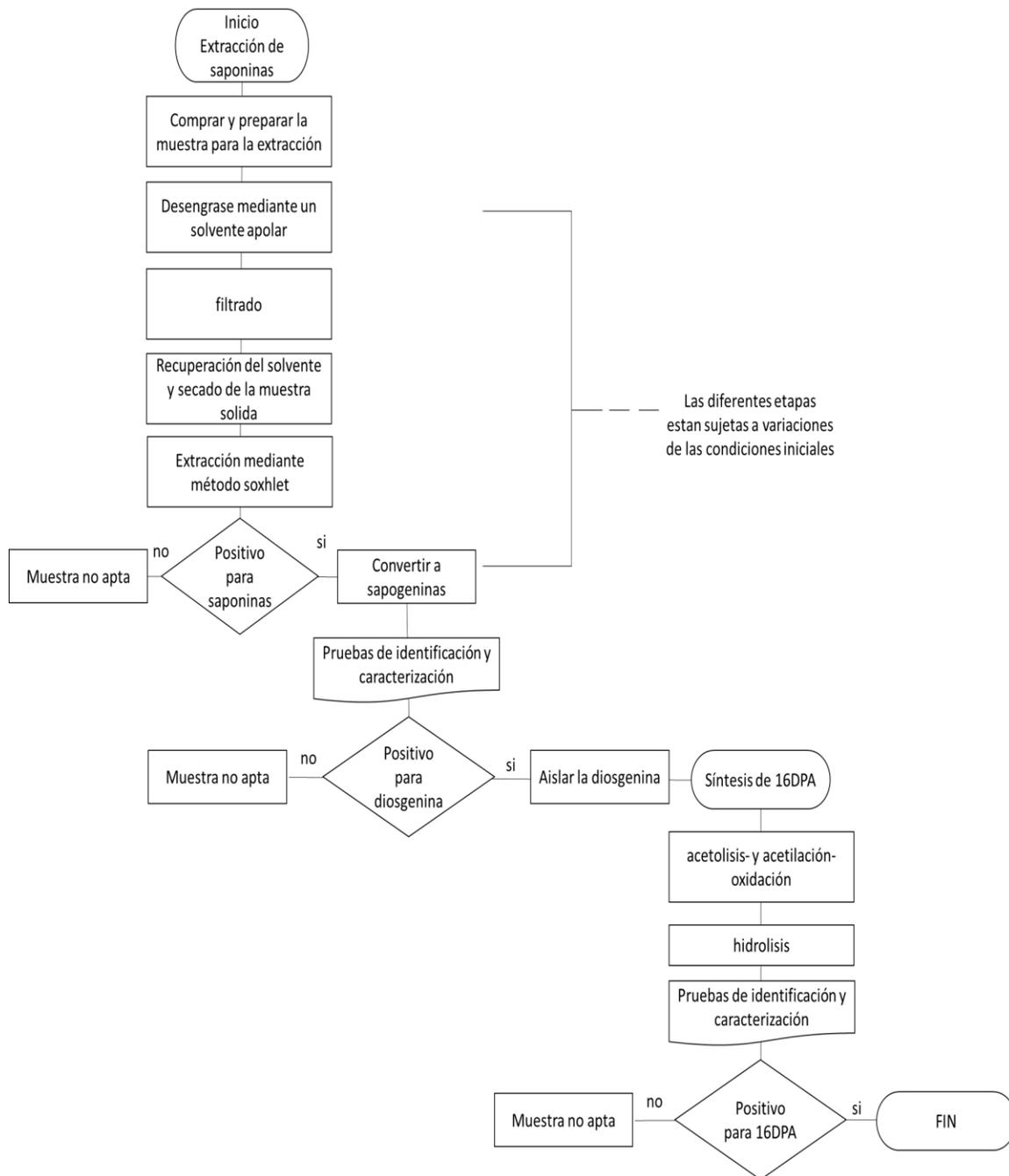


Figura1. En la figura se puede observar el diagrama de flujo que describe el proceso general de extracción de Diosgenina y la posterior síntesis de la misma a 16DPA

3.4.3. Extracción de Diosgenina

De acuerdo con la metodología propuesta por G. Tomás Ch. [23] se estableció una metodología general de extracción por método Soxhlet, la cual fue sometida a variaciones con base en los resultados que se fueron obteniendo y a otros autores consultados [24] [25], con el propósito de observar la influencia de las diferentes variables tratadas en el rendimiento de la extracción. Lo cual género como resultado el empleo de los diferentes ensayos que se describen a continuación.

Determinación del porcentaje de sapogeninas total extraídas: El porcentaje de eficiencia de extracción se realiza de acuerdo a la siguiente ecuación

$$\%P_{EE} = \frac{S_{TE}}{M_{SE}} * 100$$

Donde:

P_{EE} =porcentaje de eficiencia de extracción

S_{TE} =Sapogenina total extraída (mg)

M_{SE} = muestra empleada

Determinación mg de sapogeninas por cada 100g de muestra seca

$$\frac{\text{mg}_{STE}}{\text{por cada 100g de } M_{SE}} = \frac{S_{TE} * 100}{M_{SE}}$$

Donde:

mg_{STE} =mg de saponina total extraído por cada 100 g de muestra seca

S_{TE} =Sapogenina total extraída (mg)

M_{SE} = muestra empleada

Procedimiento general para la extracción de Diosgenina mediante método Soxhlet

Etapa 1 Método soxhlet

Para realizar la extracción por medio este método se requirió de un equipo soxhlet que se ajustaba a la cantidad de muestra a tratar. Para iniciar el procedimiento la harina de ñame se colocó en el cartucho poroso (algodón o papel filtro) y este fue colocado dentro del sifón soxhlet, el solvente que en nuestro caso es etanol se adicionó en un balón aforado que se colocó sobre una plancha de calentamiento, y se adecuó en el montaje del aparato soxhlet [54]. El proceso de extracción se realizó hasta agotamiento, una vez terminada la extracción, el extracto etanólico se concentró en un rotaevaporador, se dejó reposar el solvente, y finalmente se filtró para recuperarlo y separarlo del extracto crudo de saponinas [23].

Etapa 2 Hidrólisis

A los extractos secos se le adicionó suficiente agua destilada hasta disolución total de las muestras, posteriormente se llevó a reflujo durante 3 horas, a una temperatura de 90 ° C, con HCL 2.5 N empleando un volumen de solución ácida igual a la cantidad de agua destilada que se emplea para diluir la muestra seca, luego se dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente [23] [21].

Etapa 3 Extracción Líquido-Líquido

En un balón de decantación se agregó la solución hidrolizada previamente neutralizada, luego se adicionó acetato de etilo como fase orgánica, este proceso se realiza al menos 3 veces, luego de ello la fase orgánica es llevada al rotaevaporador para recuperar el solvente empleado.

Etapa 4 Purificación

Para purificar el extracto de saponinas obtenido se empleó el método de cromatografía en columna, utilizando como fase móvil Diclorometano, una mezcla Diclorometano-Acetato de Etilo (4:1) y acetato de etilo, con el propósito de aumentar la polaridad. Las fracciones obtenidas de la purificación fueron monitoreadas por TLC y reveladas con vainillina en ácido sulfúrico [55].

Ensayos de variación del procedimiento general para la extracción de Diosgenina mediante método Soxhlet

Ensayo 1

Consistió en preparar la muestra retirando la cascara, las impurezas y disminuyendo su tamaño, una vez se terminada esta etapa se procedió a macerar con un solvente apolar (éter de petróleo) con el propósito de retirar las grasas este proceso se realizó durante 3 días con agitación constante, transcurrido el tiempo de maceración el extracto fue separado de la parte solida mediante filtrado convencional esta última fue sometida a secado en un horno a vacío durante 24 horas a una temperatura de 50° C, mientras que el extracto es llevado a sequedad para separar el solvente de la grasa en un rotaevaporador. Posteriormente el sólido seco se pulverizó empleando un mortero con pistilo y se sometió a extracción soxhlet hasta agotamiento (14 a 16 horas) con etanol, culminada la etapa de extracción el extracto alcohólico fue concentrado a sequedad y recristalizado con metanol.

Ensayo 2

Se realizó variación en la preparación de la muestra modificando su tamaño por medio de licuado, se aumentó el tiempo de maceración de 3 a 5 días, con el propósito de obtener la muestra más seca se aumentó el tiempo de secado de 24 a 44 horas, después de concentrar el extracto alcohólico este fue sometido a secado en un horno de vacío durante 24h a 50° C, el extracto bruto de saponinas fue hidrolizado con HCl 2,5 N durante 2 horas a reflujo a 90° C. Posterior a la hidrólisis se llevó la solución hasta un pH de 4 y se realizó una extracción líquido-líquido utilizando una mezcla diclorometano-acetona (7:5), el extracto orgánico se concentró y purifico mediante recristalización en metanol y cromatografía en columna monitoreada por TLC empleando diclorometano como fase móvil y como reveladores lámpara UV con longitudes de onda 254 y 356 Mn, Iodo metálico y vainillina en H₂SO₄.

Ensayo 3

Se realizó la preparación de la muestra igual que en el ensayo 1, la muestra fue sometida a secado durante 5 días en una estufa a 50° C, una vez secada la muestra se pulverizo en un mortero con pistilo y se sometió a maceración con éter de petróleo disminuyendo el tiempo de 5 a 4 días el resto del proceso se mantuvo igual. La etapa de extracción líquido-líquido fue eliminada al igual que en la etapa de purificación donde se eliminó la recristalización en metanol y se empleó solo la cromatografía en columna monitoreada por TLC.

Ensayo 4

La preparación de la muestra se mantuvo igual al anterior con variación en la pulverización de la muestra la cual se realizó en un molino de tornillo, se aumentó la maceración de 4 a 5 días, el resto del proceso continuo igual, posterior a la etapa de hidrólisis se agregó nuevamente el proceso de extracción líquido-líquido utilizando acetato de etilo. Se mantuvieron las condiciones de purificación y revelado.

Ensayo 5

Se mantuvo las condiciones de preparación anterior hasta el proceso de secado, se eliminó la etapa de maceración con éter de petróleo y la muestra seca fue sometida a extracción sin variación en las condiciones anteriores hasta la etapa de hidrólisis donde se aumentó de 2 a 3 horas y se neutralizó hasta un pH de 7 el resto del proceso continuo igual hasta la etapa de purificación y revelado

Ensayo 6

Se continuo con las condiciones anteriores variando el tiempo de extracción soxhlet a 20h, se mantuvo las condiciones anteriores hasta la etapa de purificación donde se empleó diclorometano inicialmente, después una mezcla diclorometano-acetato de etilo (4:1) y finalmente acetato de etilo

Ensayo 7

En este se empleó gran variación en comparación con las anteriores debido a que se realizó Hidrólisis previa empleando HCl 2,5 relación (1:6) a reflujo durante 3h, posterior a la etapa de hidrólisis la muestra hidrolizada se neutralizo, se filtró, se lavó la muestra con volúmenes de 50 ml de agua destilada 6 veces. Posteriormente la muestra fue sometida a secado en un horno a vacío a temperatura de 50° C durante 5 días, una vez secada fue sometida a extracción por método soxhlet con diclorometano, el extracto obtenido se concentró a sequedad y fue purificado por cromatografía en columna empleando diclorometano inicialmente y una mezcla diclorometano-acetato de etilo (4:1).

Ensayo 8

Se modificó la etapa de secado de la muestra debido a que se realizó mediante liofilización y el resto del proceso se mantuvo igual al 5

3.4.4. Síntesis DE 16DPA

Determinación del rendimiento total de la reacción

$$\%R_{TR} = \frac{R_R}{R_T} * 100$$

Donde

R_{TR}= Rendimiento total de la reacción

R_R= Rendimiento real

R_T=Rendimiento teórico

El procedimiento general para la síntesis de acetato de 16 dehidropregnenolona (16 DPA) en dos pasos a partir de diosgenina se divide en 3 etapas. Primeramente, acetólisis seguida de acetilación-oxidación y finalmente hidrólisis. Siguiendo la metodología planteada por Baruah y colaboradores [4].

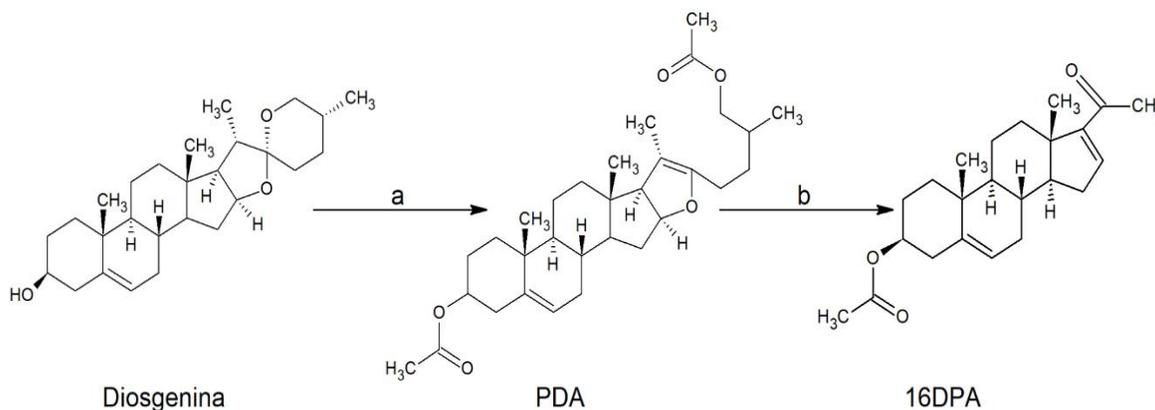


Figura 2. Reacción de transformación de la diosgenina a 16 DPA. a) anhídrido acético, AlCl₃, 140° C; b) NaIO₄/CH₂Cl₂, yoduro de tetraetil amonio, KMnO₄, luego CH₃COOH, reflujo

Empleando diosgenina como material de partida, se llevó a cabo la etapa de acetólisis por medio de reacción con anhídrido acético y cloruro de aluminio (AlCl₃) a reflujo obteniéndose como producto de reacción PDA. Como segundo paso se realizó la oxidación-acetilación de la PDA utilizando peryodato de sodio y permanganato de sodio en diclorometano (CH₂Cl₂) a temperatura ambiente, seguido de ácido acético a reflujo.

3.5. TÉCNICAS DE RECOLECCIÓN DE INFORMACIÓN

3.5.1. Fuentes primarias

La recolección de la información hace uso de fuentes primarias, principalmente asesorías con docentes y expertos de otras instituciones. También se consultaron permanentemente artículos científicos de revistas indexadas.

3.5.2. Fuentes secundarias

Para recolectar la información se planteó el uso de las fuentes secundarias, como bases de datos de Scopus, ScienDirect, Scielo, documentos en páginas web y revistas indexadas

3.6. PROCESAMIENTO DE LA INFORMACIÓN

Para el procesamiento de la información, fue necesario contar con datos cuantitativos que expresan la cantidad de producto que se obtuvo para la especie de dioscórea empleada y con los resultados se realizó un análisis comparativo. Los resultados que se obtuvieron permitieron prever la eficiencia del proceso en cuanto a la ruta metabólica seleccionada y que procedimiento presenta un mayor rendimiento. Para el procesamiento de la información se hizo uso de tablas, diagramas y gráficas, con el fin de evaluar la viabilidad y sostenibilidad del diseño al implementarlo a escala laboratorio, utilizando diferentes solventes

En el proyecto, se elucidó cada uno de los productos obtenidos, a través de sus propiedades fisicoquímicas como punto de fusión, rotación óptica, etc.

3.7. PLAN TRABAJO

Se dedicó 20 horas semanales en promedio para realizar prácticas de laboratorio y revisión de información sobre el tema de investigación en las instalaciones de laboratorio de productos naturales de la facultad de química farmacéutica de la universidad de Cartagena

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. DISEÑO EXPERIMENTAL

Con el propósito de encontrar las mejores condiciones de extracción, se realizaron diferentes procedimientos de extracción analizando diferentes variables o factores, para lograr este objetivo, se adoptaron los diseños experimentales planteados por diferentes autores en la literatura consultada [23] [24] [25].

Tabla 1. Ensayos realizados a las muestras de *Dioscorea rotundata*

| ensayo | tratamiento inicial | tiempo (días) | solvente de extracción | hidrólisis | tiempo (horas) | pH | método de purificación | solvente de purificación |
|--------|--|---------------|------------------------|----------------------------|----------------|-----|--|---|
| 1 | maceración con éter de petróleo | 3 | Etanol | ----- | ----- | --- | Recristalización | metanol |
| 2 | maceración con éter de petróleo | 5 | Etanol | HCl 2,5 N a reflujo (90°C) | 2 | 4 | Recristalización, cromatografía en columna y TLC | Metanol/diclorometano |
| 3 | Secado y maceración con éter de petróleo | 4 | Etanol | HCl 2,5 N a reflujo (90°C) | 2 | 4 | cromatografía en columna y TLC | diclorometano |
| 4 | Secado y maceración con éter de petróleo | 5 | Etanol | HCl 2,5 N a reflujo (90°C) | 2 | 4 | cromatografía en columna y TLC | diclorometano |
| 5 | Secado | 5 | Etanol | HCl 2,5 N a reflujo (90°C) | 3 | 7 | cromatografía en columna y TLC | diclorometano |
| 6 | Secado | 5 | Etanol | HCl 2,5 N a reflujo (90°C) | 3 | 7 | cromatografía en columna y TLC | diclorometano /diclorometano acetato de etilo 4:1/ acetato de etilo |
| 7 | Secado e hidrólisis | 5 | diclorometano | HCl 2,5 N a reflujo (90°C) | 3 | 7 | cromatografía en columna y TLC | diclorometano /diclorometano acetato de etilo 4:1 |
| 8 | Liofilización | 3 | Etanol | HCl 2,5 N a reflujo (90°C) | 3 | 7 | cromatografía en columna y TLC | diclorometano |

En la tabla 1, se puede observar las variaciones de tiempo, secado, condiciones de extracción y/o hidrólisis a las que fueron sometidas las diferentes muestras. En los ensayos 1 a 4 se realizó maceración con éter de petróleo con el propósito de eliminar las grasas presentes en la muestra cómo se reporta en la literatura [23]. Sin embargo, esta etapa fue eliminada en el resto de ensayos con el propósito de observar si era relevante y si afectaba el rendimiento de la extracción debido a que las saponinas presentan carácter anfipático el cual permitiría una posible pérdida de estas en la etapa de extracción de las grasas. En el ensayo 1 y 2 se realizó la maceración de la muestra en etapa previa al secado, el cual fue variado en los ensayos 3 y 4 donde se realizó previamente el secado de la muestra para retirar el agua que representa entre 60 y 70% del peso de la muestra tratada en los ensayos 5-8 el proceso de maceración con éter de petróleo fue eliminado. Además, el tiempo de hidrólisis aumento a 3h en comparación con el tiempo empleado en los ensayos 2 a 4 el cual fue de 2h con el propósito de obtener mayor conversión de saponinas a sapogeninas al igual que las condiciones de pH las cuales variaron de 4 a 7 con el fin de neutralizar la muestra. En el ensayo 7 se varió el orden del proceso de extracción, se inició con la etapa de hidrólisis lo cual generó el empleo de una gran cantidad de solución de HCl en comparación con el empleado en el resto de ensayos debido al tamaño de muestra seca por lo que solo se aplicó a esa muestra. el proceso de secado fue realizado en los ensayos 1 a 7 a través de una estufa a vacío mientras en el ensayo 8 se realizó a través de liofilización para disminuir los tiempos de secado en los cuales se empleaba un periodo de 5 días (aproximadamente). Por otra parte el método de purificación por recristalización en metanol empleado en los ensayos 1 y 2 fue eliminado a partir del tercer ensayo debido a que generaba perdidas de extracto de sapogeninas porque los cristales formados tienen un tamaño de partícula muy pequeño el cual fácilmente asciende los poros del papel filtro, además, en los ensayos 6 y 7 se aumentó la polaridad del solvente de purificación tratando de aumentar el rendimiento de extracción.

Tabla 2. Porcentajes obtenidos de las diferentes metodologías empleadas

| Ensayo | Peso de ñame húmedo(g) | Porcentaje de humedad (%) | Peso de ñame seco(g) | Muestra empleada (g) | Sapogenina total extraída | | mg de sapogeninas /100g de muestra seca |
|--------|------------------------|---------------------------|----------------------|----------------------|---------------------------|-------|---|
| | | | | | mg | % | |
| 1 | 3800 | 61,316 | 1470 | 1470 | 96 | 0,007 | 6,531 |
| 2 | 737,8 | 67,831 | 237,34 | 237,34 | 211 | 0,089 | 88,902 |
| 3 | 1180 | 70,508 | 348 | 348 | 314 | 0,090 | 90,230 |
| 4 | 1552 | 66,495 | 520 | 497 | 341 | 0,069 | 65,577 |
| 5 | | | | 300 | 369 | 0,123 | 123 |
| 6 | 1568 | 61,276 | 607,2 | 127 | 686 | 0,540 | 540,157 |
| 7 | | | | 100 | 468 | 0,468 | 468 |
| 8 | 2170 | 70,272 | 645,1 | 58,475 | 66 | 0,113 | 10,231 |

En la tabla 2 se puede observar el porcentaje de humedad y la cantidad de saponinas total extraída obtenidos por cada ensayo realizado. también se observa los porcentajes de saponinas total extraídas y la cantidad de saponinas extraída por cada 100g de muestra seca. Se puede observar que El procedimiento llevado a cabo en el ensayo 6 proporcionó mayor rendimiento en cuanto a obtención de saponinas, aunque el procedimiento empleado fue exactamente igual a la 5 con una pequeña variación en el tiempo de extracción. Por otro lado, en el ensayo 1 se obtuvo el menor rendimiento, esto como resultado del proceso de purificación por medio de recristalización en metanol, en el cual se presentaba poca formación de cristales. Se puede observar que la metodología planteada por Maldonado y colaboradores [24], en la cual se plantea realizar hidrólisis previa a la etapa de extracción, se obtuvo un porcentaje menor de saponinas totales, en comparación con las metodologías donde se realizó la hidrólisis posterior a la etapa extracción, este hecho posiblemente se presenta debido a que la solución de hidrólisis previa a una extracción presenta material vegetal, el cual contiene celulosa, almidón, proteínas, entre otras macromoléculas, que pudieran estar consumiendo ácido clorhídrico. En los ensayos 1-4 se realizó desengrase variando el tiempo de maceración con el propósito de extraer mayor contenido de grasas, se comprobó que el tiempo de maceración influyo en la cantidad de grasas extraídas aunque no en cantidades significativas lo cual indica que en los periodos más cortos de maceración no son suficientes para lograr una extracción total de grasas, esta etapa fue eliminada en los ensayos posteriores (5, 6,7, y 8), esta decisión fue tomada al observar los bajos rendimientos obtenidos en los ensayos iniciales, posiblemente al hecho que las saponinas presentan un carácter anfipático que permitiría una posible pérdida de estas en la etapa de extracción de las grasas. En general, la cantidad de saponinas obtenidas se encuentran en un rango entre 0,005 y 0,540 %, resultado muy cercano a los reportados en diversas investigaciones [24], [12]. Sin embargo, este resultado no es alentador si se requiere realizar extracción con fines comerciales debido a que el porcentaje mínimo de interés es del 3% (en base seca) [12]

Tabla 3. Contenido de Diosgenina en cada prueba

| Ensayo | Fracciones con Diosgenina (mg) | Peso seco(g) | Diosgenina purificada (mg) | Porcentaje de Diosgenina |
|--------|--------------------------------|--------------|----------------------------|--------------------------|
| 2 | 30 | 237,34 | ----- | ----- |
| 3 | 98 | 348 | 3 | 0,001 |
| 4 | 45 | 497 | 8 | 0,002 |
| 5 | 43 | 300 | 2 | 0,001 |
| 6 | 380 | 127 | 10 | 0,008 |
| 7 | 31 | 100 | ----- | ----- |
| 8 | 48 | 58,475 | ----- | ----- |

En la tabla 3 se puede observar las cantidades en mg de las muestras que se supone contienen Diosgenina después de la purificación, de acuerdo a su comparación con un patrón de referencia a través de un TLC observando el cambio de coloración cuando se utiliza el revelador de vainillina en H₂SO₄ y al factor de retardo (Rf). Con base en los análisis realizados se puede observar que en el ensayo 1 no se obtuvo Diosgenina, debido a que no se realizó hidrólisis, proceso mediante el cual las saponinas son convertidas en sapogeninas, por la ruptura del enlace glucosídico.

Las muestras en las cuales se observó la presencia de Diosgenina fueron eluidas en cromatografía en columna utilizando silica gel como fase estacionaria y diclorometano como fase móvil, con el objetivo de separar el compuesto de interés, posteriormente se realizaron pruebas de identificación como punto de fusión, espectrofotometría de infrarrojo (FT-IR) espectrometría de masa (MS) y comparación de factor de retardo contrastado por patrón de Diosgenina comercial.

Se observa los mg de Diosgenina que fueron purificados de las fracciones de cada ensayo donde se tenía indicios estaba presente. Además del porcentaje de Diosgenina presente en cada muestra seca de Dioscorea.

En los recuadros donde no se observan valores de purificación y porcentaje de Diosgenina corresponden a muestras en las cuales después de aislar mediante cromatografía en columna se observó que no había contenido de diosgenina suficiente para realizar cuantificación

Análisis espectroscópico

Espectro IR

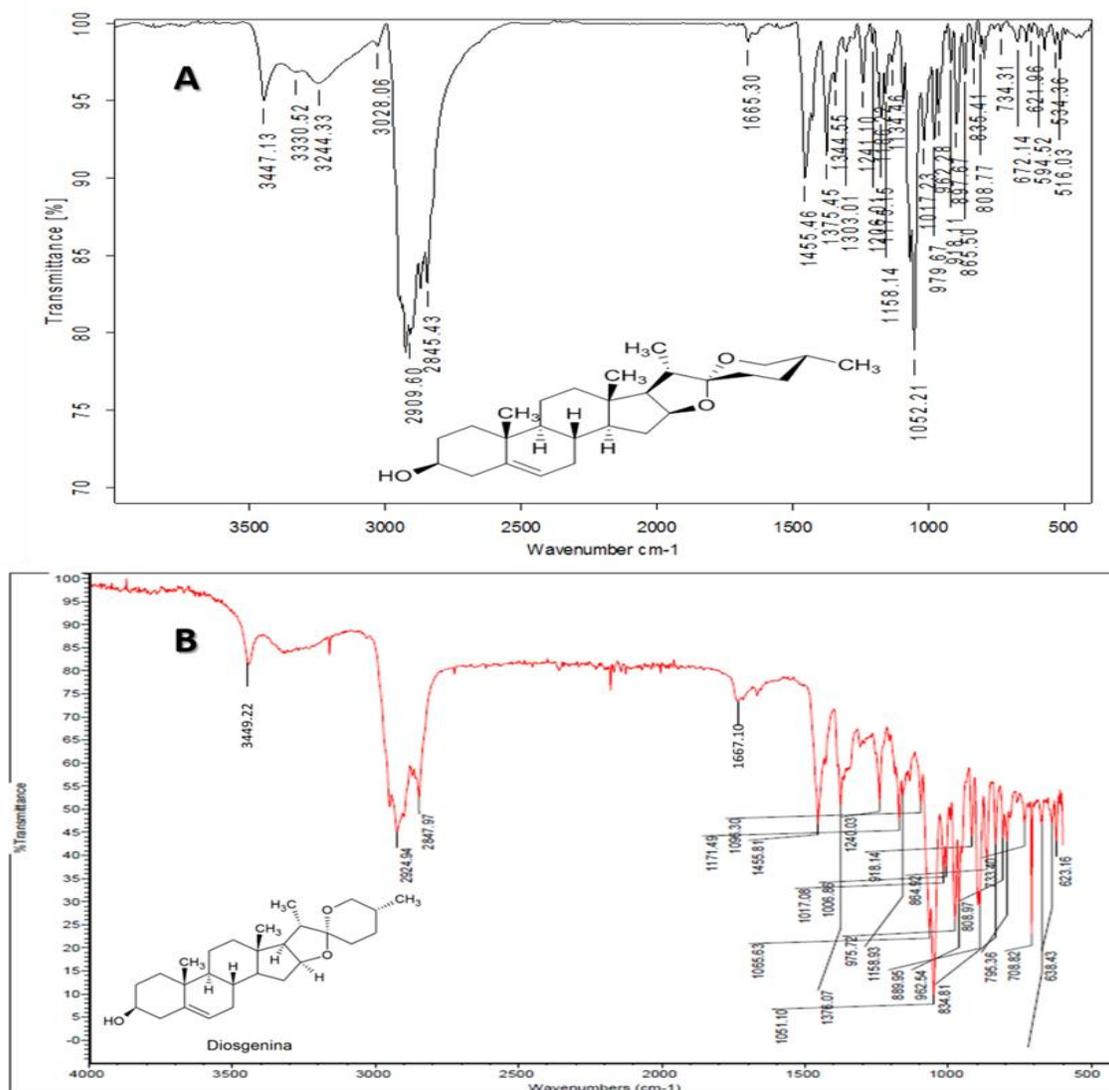


Figura 3. Espectro infrarrojo de Diosgenina. A espectro obtenido de la literatura [56], B espectro del compuesto aislado.

De acuerdo a lo observado en la fig.1 se puede inferir por la similitud en las bandas características entre los espectros que se trata de Diosgenina. Por otra parte, el análisis del espectro IR del compuesto aislado presenta una banda en 3449 cm^{-1}

características del estiramiento O-H en alcoholes, también se observa una banda en 2924 cm^{-1} seguida de 2847 cm^{-1} del estiramiento C-H de los grupos metilo y metilenos respectivamente, corroborándose con la banda de menor energía a 1456 cm^{-1} . El estiramiento C=C de alqueno trisustituido se observa en la banda a 1667 cm^{-1} , finalmente se observan bandas a 1171, 1158, 1096, 1065 que corresponden a estiramiento C-O de éteres cíclicos.

Síntesis de 16DPA

La síntesis de 16DA a partir de Diosgenina ha sido reportada por diversos autores los cuales proponen rutas sintéticas amigables al medio ambiente en un solo recipiente, otras empleando reactivos contaminantes como el xileno [3] [1]. Sin embargo y aunque fueron replicadas la ruta que proporciono resultados positivos fue la planteada por Baruah, Diganta [4] con algunas variaciones.

Procedimiento

Se añadieron 61 mg de cloruro de aluminio a 20 ml de anhídrido acético recién destilados a 95° C la mezcla fue agitada durante 15 minutos, posteriormente se le adicionaron 414 mg Diosgenina, la mezcla fue llevada a reflujo durante 3 horas. Transcurrido el tiempo de reacción la mezcla se deja enfriar a temperatura ambiente, se añade agua destilada y se agita durante 5h, se filtra y se obtiene un polvo amorfo color café el cual es recristalizado en 10 ml de metanol, al producto de obtenido de la reacción se le realizaron pruebas de caracterización como punto de fusión e identificado como PDA

El producto anterior (PDA) es mezclado con 10mg de peryodato de sodio y disuelto en una mezcla de 20ml de diclorometano (CH_2Cl_2) y 15 ml de agua destilada, a la cual es añadida gota a gota una solución de 10ml de permanganato de potasio en 5 ml de agua durante 10 min seguida de 5mg de yoduro de tetraetil amonio a pH de 4, se agitó vigorosamente durante un período de 3h a temperatura ambiente. El progreso de la reacción fue monitoreado por TLC. Después de completarse, la mezcla de reacción se diluyó por adición de 50 ml de CH_2Cl_2 y se pasó a través de carbón activado, el solvente orgánico fue separado y se llevado a sequedad. Al producto bruto de reacción se añadieron 20 ml de CH_3COOH y se calentó a reflujo durante 4 horas, finalizado el proceso, la mezcla de reacción se vertió en agua con hielo y se extrajo con CH_2Cl_2 . La capa orgánica es separada y lavada con NaHCO_3 posteriormente es secado sobre Na_2SO_4 anhidro, la mezcla es llevada a sequedad y el producto sólido es recristalizado en metanol. Se obtuvieron cristales color blanco con un peso de 240g, los cuales fueron caracterizados por IR, MS en las cuales se analizaron las bandas y picos obtenidos, se compararon con los reportados en la literatura por lo que se determinó que se encontraban en los rangos

de los grupos funcionales característicos de esta molécula. Además, se determinó el punto de fusión el cual fue de 176° C mientras que el reportado en la literatura se encuentra en un rango de 170-178° C, adicionalmente se realizó comparación del factor de retardo contra un patrón de 16DPA comercial, por lo que se estableció que el producto obtenido se trataba de 16DPA. obteniendo un rendimiento global de reacción de 67,42%.

Análisis espectroscópico

Espectro IR

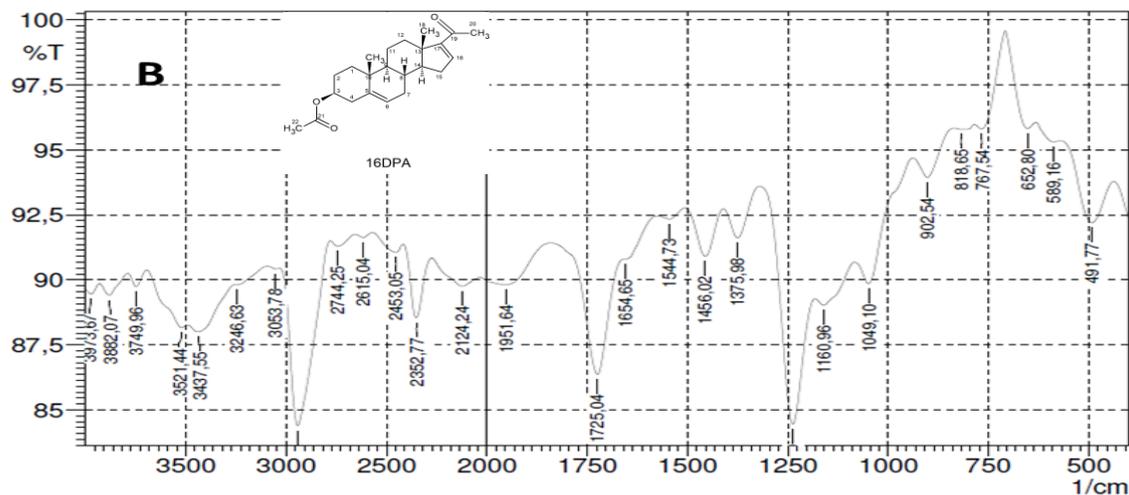
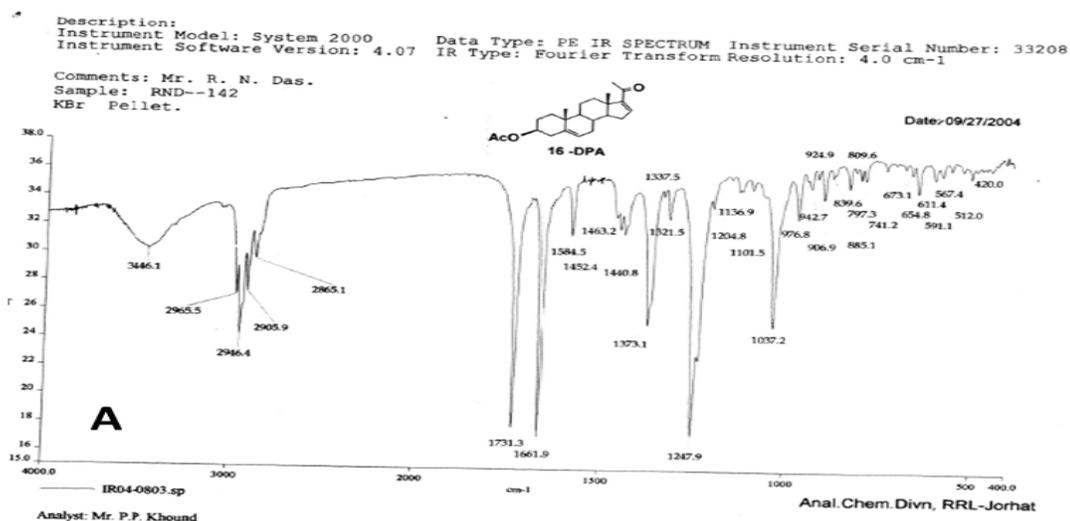


Figura 4. A) Espectro infrarrojo acetato de 16 dehidropegnenolona (16DPA) [4]; B) Espectro del compuesto aislado

De acuerdo a lo observado en la fig.3 se puede inferir por la similitud en las bandas características entre los espectros que se trata de 16DPA. Con base en lo anterior al realizar el análisis al espectro del compuesto de síntesis se puede observar que presenta una banda en 1725,04 características del estiramiento del grupo carbonilo seguida de una banda en 1456,02 también se observa una banda en 1456,03 la cual indica (C=C) de un grupo aromático, seguida de tres bandas en 1375,98-1160,96 y 1049,10 respectivamente representativas de los esterres acetato (figura 2). Además, la banda presentada en 1725,04 correspondiente al estiramiento del grupo carbonilo se ve ensanchada, posiblemente debido a un solapamiento de las dos bandas correspondientes a cada uno de carbonilos presentes en la estructura, este fenómeno se puede atribuir a la resolución del equipo.

Espectro MS

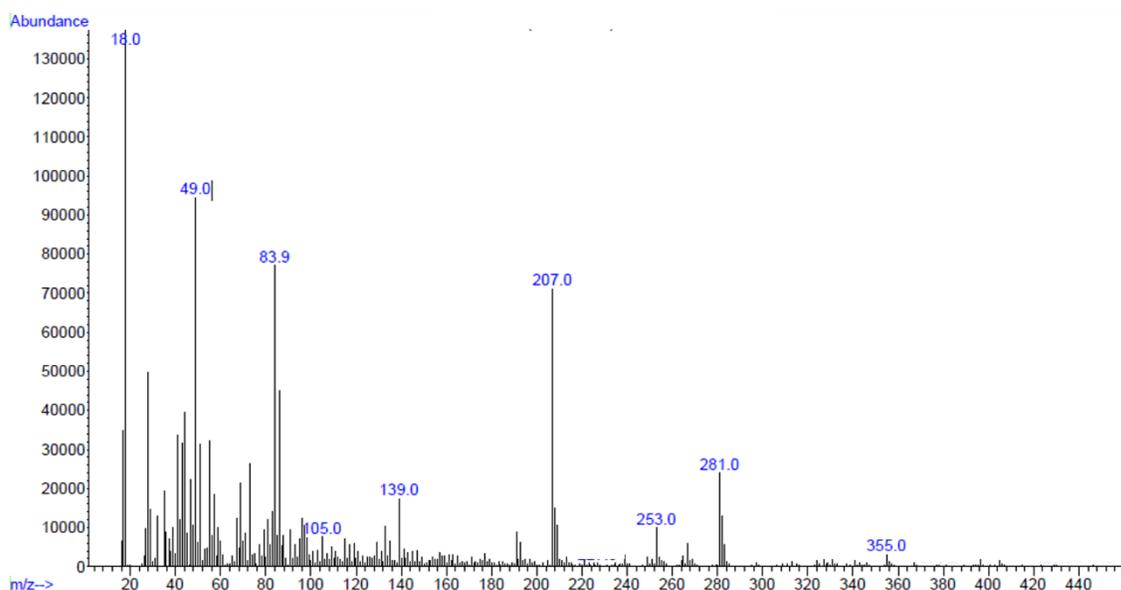


Figura 5. Espectro de masas -1 de la 16DPA obtenida de la síntesis.

En el espectro de masas se observa el ion molecular [M]⁻ a m/z 355, que corresponde al peso molecular menos uno de 16 DPA, del mismo modo el patrón de fraccionamiento coincide a los reportados en la literatura para compuestos derivados esteroides [57].

5. CONCLUSIONES

- De acuerdo con los resultados obtenidos podemos llegar a la conclusión que el mejor procedimiento para la extracción de Diosgenina fue el seis debido a que proporciono la mayor cantidad de Diosgenina aislada, se logró la mayor conversión de las saponinas presentes en el ñame espino, así como la mayor cantidad de sapogenina total extraída.
- Se pudo comprobar que el producto de extracción se trataba de Diosgenina a través de las pruebas físicas y espectroscópicas realizadas al producto de extracción obtenido
- Se realizó la síntesis de 16DPA a partir de la Diosgenina obtenida por el único método que arrojo resultados positivos planteado por Baruah, Diganta [4] con algunas variaciones.
- Se pudo comprobar que el producto de extracción se trataba de 16DPA a través de las pruebas físicas y espectroscópicas realizadas al producto de síntesis obtenido a partir de Diosgenina
- Se puede observar que los ensayos en donde se realizó desengrase presentan porcentajes de extracción menores en comparación con los realizados sin desengrase debido al carácter anfipático de las sapogeninas por lo cual parte de ellas pudo ser extraídas junto con las grasas.
- Se determinó que las condiciones óptimas para la etapa de hidrólisis eran HCl 2,5 N a reflujo durante 3 horas.
- Se estableció que al monitorear las TLC la Diosgenina no es visible en las longitudes de ondas empleadas y que el revelador de iodo metálico presenta detección mínima en comparación con revelador de vainillina en H₂SO₄ que es el revelador universal para sapogeninas.

6. RECOMENDACIONES

- Para la extracción de Diosgenina a partir de *Dioscorea* se recomienda ensayar con otras especies las cuales presenten como características organolépticas sabor amargo, debido a que las saponinas generan esta característica lo cual sería un indicativo de mayor contenido en la especie.
- Realizar pruebas en las diferentes etapas del crecimiento y desarrollo del cultivo.
- Se recomienda comparar diferentes métodos de extracción no convencionales (ultrasonido, microondas, fluidos supercrítico) empleando diferentes solventes

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] P. Chowdhury, J. M. Borah, M. Bordoloi, P. . K. Goswami, A. Goswami, N. C. Barua y P. G. Rao, «A Simple Efficient Process for the Synthesis of 16-Dehydropregnenolone,» *Chemical Engineering & Process Technology*, vol. 2, 2011.
- [2] Y. Zhang, Y.-Y. LIU, X.-X. Cheng, X.-S. Wang y B.-W. Zhang, «An Environmentally Friendly Process for the Preparation of 16-Dehydropregnenolone Acetate,» *Chinese Journal of Chemistry*, vol. 23, pp. 753-756, 2005.
- [3] A. Goswami , R. Kotoky, A. C. Ghosh y R. C. Rastogi , «A One-Pot Efficient Process for 16-Dehydropregnenolone Acetate,» 2003. [En línea]. Available: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/op0200625>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [4] D. Baruah, R. Nath Das y D. Konwar, «Facile green synthesis of 16-dehydropregnenolone acetate (16-DPA) from diosgenin,» 23 11 2015. [En línea]. Available: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/00397911.2015.1121280>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [5] T. c. (india), «TCI chemicals (india),» [En línea]. Available: <https://www.tcichemicals.com/eshop/en/in/commodity/D4687/?jsessionid=DA221845DE8FFAA3FDF47E64332B3C33>. [Último acceso: 02 08 2018].
- [6] Chemocare, «Chemocare,» [En línea]. Available: <http://chemocare.com/es/chemotherapy/drug-info/cortisone.aspx>. [Último acceso: 7 JULIO 2018].
- [7] R. Hernández S., E. C. Lugo C., L. Díaz J. y S. Villanueva, «EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN INDIRECTA DE LAS SAPONINAS DE AGAVE LECHUGUILLATORREY,» vol. 3, 2005.
- [8] R. Pajuelo, «Posibilidades de la saponina de quinua en la industria cosmética,» *EUROECOTRADE*, p. 17, 2016.
- [9] Y. C. R. Aranza, «banco de la republica,» junio 2012. [En línea]. Available: http://www.banrep.gov.co/docum/Lectura_finanzas/pdf/dtser_168.pdf. [Último acceso: 18 07 2018].
- [10] A. Álvarez, *Prácticas Agronómicas para el Cultivo del Ñame: Producción de Semillas por Biotecnología*, Bogotá: Unibiblos, 2000, pp. 33-39.

- [11] L. S. Lev y A. L. Shridler, A trend analysis of yam production, área, yield and trade (1961-1996). In: L'igname plante séculaire et culture d 'avenir, France, 1997.
- [12] Y. Hata, M. T. Reguero, L. Arteaga de García, G. Buitrago y A. Álvarez, «Evaluación del contenido de saponinas en variedades nativas de ñame (Dioscorea spp.), provenientes de la colección de la Universidad de Córdoba,» *Col. Cienc. Quím. Farm.*, vol. 32, nº 2, pp. 149-157, 2003.
- [13] V. A. Ramos D., R. ., S. L. Bustamante, M. A. Rojas Cardozo, L. Raz, G. Buitrago Hurtado y J. Rincón Velandia, «Identificación, establecimiento in vitro y análisis fitoquímico preliminar de especies silvestres de ñame (Dioscorea spp.) empleadas con fines medicinales,» *Revista Colombiana de Biotecnología*, vol. 17, nº 1, pp. 9-17, 2015.
- [14] Y. c. Reina Aranza, «El cultivo de ñame en el Caribe colombiano,» *Banco de la República*, nº 168, pp. 4-34, 2012.
- [15] «Proyecto Educativo Bonaventuriano - PEB,» de *Proyecto Educativo Bonaventuriano*, Bogota, 2010, p. 51.
- [16] D. Ntahomvukiye, L. Van Puyvelde y P. C. Nkinamubanzi, «Diosgenine Dans Diverses Especies de Dioscorea et de Solanum Au Rwanda (Afrique Centrale),» pp. 596-597, 1981.
- [17] A. Martínez Martínez, *Saponinas Esteroides*, Medellin: Universidad de Antioquia, 2001.
- [18] M. Sautour, A.-C. Mitaine-Offer, T. Miyamoto, A. Dongmo y M.-A. Lacaille-Dubois, «A New Steroidal Saponin from Dioscorea cayenensis,» *Chem. Pharm. Bull.*, vol. 52, nº 11, pp. 1353-1355, 2004.
- [19] S. Sparg, M. Light y J. van Staden, «Biological activities and distribution of plant saponins,» *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 94, pp. 219-243, 2004.
- [20] M. Lee, J. Jeong, J. Seo, C. Shin, Y. Kim, J. In, D. Yang, J. Yi y Y. Choi, «Enhanced triterpene and phytosterol biosynthesis in Panax ginseng overexpressing squalene synthase gene,» *Plant & cell physiology*, vol. 45, nº 8, pp. 976-984, 2004.
- [21] J. L. Pérez Ochoa y L. A. Quitián Méndez, «Evaluación de métodos de extracción de saponinas de los residuos del beneficio del Fique,» *Universidad industrial de Santander*, 2009.

- [22] H. Liu, G.-X. Chou, T. Wu, Y.-L. Guo, S.-C. Wang, C.-H. Wang y Z.-T. Wang, «Steroidal Sapogenins and Glycosides from the Rhizomes of *Dioscorea bulbifera*,» *Journal of Natural Products*, vol. 72, nº 11, pp. 1964-1968, 2009.
- [23] G. T. Ch., J. M. y R. Aguirre M., «Extracción y clasificación de la saponina del *Sapindus Saponaria* L., “BOLICHE”,» *Per. Quím. Ing. Quím.*, vol. 13, nº 2, pp. 36-39, 2010.
- [24] H. J. Maldonado García, E. G. Guzmán Lezama, S. Márquez Cabezas, A. Tupayachi y J. Albán, «Estudio de saponeninas esteroidales de especies peruanas del género *dioscorea*,» *Soc. Quím. Perú*, vol. 78, nº 3, 2012.
- [25] V. Gianna, Extracción, cuantificación y purificación de saponinas de semillas de *Chenopodium quinoa* Willd provenientes del noroeste Argentino, Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba, 2013.
- [26] «Curso de síntesis orgánica,» [En línea]. Available: http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/SINTESISORGANICAFUNDAMENTOS_30322.pdf. [Último acceso: 25 09 2016].
- [27] «Síntesis Orgánica,» [En línea]. Available: <http://www.qo.fcen.uba.ar/quimor/wp-content/uploads/TeoricaSintesis1.pdf>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [28] «Concepto de Síntesis orgánica,» [En línea]. Available: http://portal.uah.es/portal/page/portal/GP_EPD/PG-MA-ASIG/PG-ASIG-66207/TAB42351/SINTESIS_ORGANICA.pdf. [Último acceso: 25 09 2016].
- [29] A. Cea Bonilla, «Biotecnología de Esteroides,» [En línea]. Available: <http://www.elementos.buap.mx/num05/pdf/15.pdf>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [30] W. Rodríguez, «Botánica, Domesticación y Fisiología del Cultivo de Ñame (*Dioscorea alata*),» *Agronomía Mesoamericana*, vol. 11, nº 2, pp. 133-152, 2000.
- [31] P. V. Amirato, «Yams,» *Handbook of Plant Cell Culture*, vol. 3, pp. 327-352, 1984.
- [32] «Exportadores de ñame de la mano del ICA,» *Instituto Colombiano Agropecuario*, 11 08 2009.
- [33] «El ñame: un cultivo de alto rendimiento,» *El campesino*, 05 08 2015.

- [34] L. Cerón y e. al, «Crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* f. *alatae* durante su cultivo en medios líquidos,» *Acta Biológica Colombiana*, vol. 11, nº 1, pp. 99-109, 2006.
- [35] S. Mangas Alonso, *Producción de saponinas triterpénicas en cultivos in vitro de centella asiatica*, España, 2009.
- [36] E. Foy Valencia, D. Mac Donald, M. Cuyos y R. Dueñas, «EXTRACCIÓN, IDENTIFICACIÓN Y EVALUACIÓN DE SAPONINAS EN *Agaricus bisporus*,» *Biotempo*, vol. 5, pp. 31-36, 2005.
- [37] P. M. BUENDÍA y e. al., *Prácticas de química orgánica*, España: EDITUM, 1989.
- [38] G. V. Barbosa Cánovas y A. Ibartz, *Operaciones Unitarias en la Ingeniería de Alimentos*, Mundi-Prensa, 2011.
- [39] A. P. OLIVARES, *Introducción a la ingeniería química: balances de masa y energía. Tomo I*, Universidad Iberoamericana, 2000.
- [40] E. S. Oria, E. P. Pardo y F. T. Alonso, *Prácticas de laboratorio de química orgánica*, EDITUM, 1991.
- [41] J. M. Coulson y J. F. Richardson, *Ingeniería química*, Reverté, 1983.
- [42] M. d. P. Canosa Rodríguez, *Desarrollo de metodología analítica para determinación de Triclosán y Parabenes. APLICACIÓN al estudio de su distribución y transformación en muestras ambientales*, Universidad de Santiago de Compostela.
- [43] M. Caffaratti y M. C. Briñón, «Esteroides anabólicos. Solamente en farmacias y bajo receta archivada,» 09 2003. [En línea]. Available: <http://cime.fcq.unc.edu.ar/esteroides.htm>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [44] B. Ona, «Nueva ley de esteroides en USA (Dasca),» 27 12 2014. [En línea]. Available: <http://chile-hierros.foroactivo.com/t3285-nueva-ley-de-esteroides-en-usa-dasca>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [45] A. Desky, «Esteroides Para La Venta En Colombia,» [En línea]. Available: <http://andreadesky.com/esteroides-para-la-venta-en-colombia.html>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [46] E. Atilio de la Orden, «Contaminación,» [En línea]. Available: <http://www.editorial.unca.edu.ar/Publicacione%20on%20line/Ecologia/imagenes/pdf/007-contaminacion.pdf>. [Último acceso: 25 09 2016].

- [47] Clinica Universitaria de Navarra, «Diccionario Médico,» [En línea]. Available: <https://www.cun.es/diccionario-medico/terminos/hemolisis>.
- [48] «Conceptos básicos de Química,» [En línea]. Available: <https://avdiaz.files.wordpress.com/2008/08/conceptos-bc3a1sicos-de-que3admica1.pdf>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [49] A. Martínez M. , «Compuestos fenolicos,» [En línea]. Available: <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/quinonasp.pdf>. [Último acceso: 25 09 2016].
- [50] P. Cazzau, Introducción a la investigación en ciencias sociales, Buenos Aires, 2006.
- [51] G. Ramon S., «Diseños experimentales,» [En línea]. Available: http://viref.udea.edu.co/contenido/menu_alterno/apuntes/ac37-diseno_experiment.pdf. [Último acceso: 25 09 2016].
- [52] D. Cauas, «Definición de las variables, enfoque y tipo,» [En línea]. Available: http://datateca.unad.edu.co/contenidos/210115/Documento_reconocimiento_Unidad_No_2.pdf. [Último acceso: 25 09 2016].
- [53] «Investigacion Cuantica,» [En línea]. Available: http://ipes.anep.edu.uy/documentos/investigacion/materiales/inv_cuanti.pdf. [Último acceso: 25 09 2016].
- [54] T. A. e. Química, *Determinación del contenido graso de leche en polvo: Extracción Soxhlet*, Ciencias Ambientales, curso 2004/05.
- [55] H. W. S. Blatt, Plant drug analysis, Munich: Springer, 1996.
- [56] S. Ghosh, Piyush More, Abhishek Derle, Ajay B. Patil, Pramod Markad, Adersh Asok, Navanath Kumbhar, Mahemud L. Shaikh, Boppana Ramanamurthy, Vaishali S. Shinde, Dilip D. Dhavale y Balu A. Chopade, «Diosgenin from Dioscorea bulbifera: Novel Hit for Treatment of Type II Diabetes Mellitus with InhibitoryActivity against α -Amylase and α -Glucosidase,» *Plosone*, vol. 9, nº 9, p. e106039, 2014.
- [57] I. peterson, «Mass Spectra of Some Highly Substituted Pregnanes and Pregnenes,» *ANALYTICAL CHEMISTRY*, vol. 34, nº 13, pp. 1781-1793, 1962.

Anexos

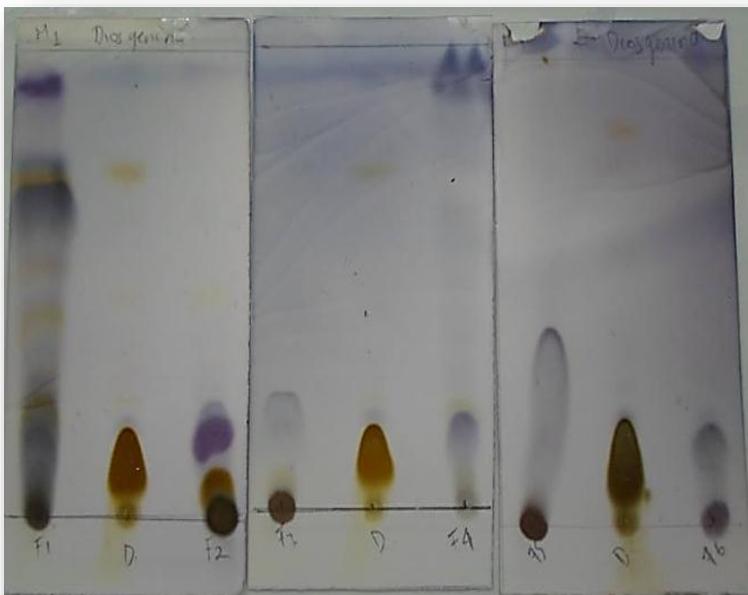
Anexo A. Cronograma de actividades

| Actividades | 2018 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|------|---|---|---|-------|---|---|---|-------|---|---|---|--------|---|---|---|---|---|---|---|
| | Marzo | | | | Abril | | | | Mayo | | | | Junio | | | | Julio | | | | agosto | | | | | | | |
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | 1 | 2 | 3 | 4 | | | | |
| Planteamiento del problema | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Objetivos | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| justificación | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Presentación de propuesta | | | | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Revisión de bibliografía | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Elaboración de marco referencial | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Diseño metodológico | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Presentación de anteproyecto | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Desarrollo de ensayos | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | |
| Pruebas de identificación | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | |
| Pruebas de caracterización | | | | | | | | | ■ | ■ | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Redacción de resultados | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Revisión y corrección de resultados | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ | ■ |
| Transcripción y entrega del trabajo final | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | ■ | ■ | ■ |

Anexo B. (TLC ensayo 1 comparadas con patrón de Diosgenina)



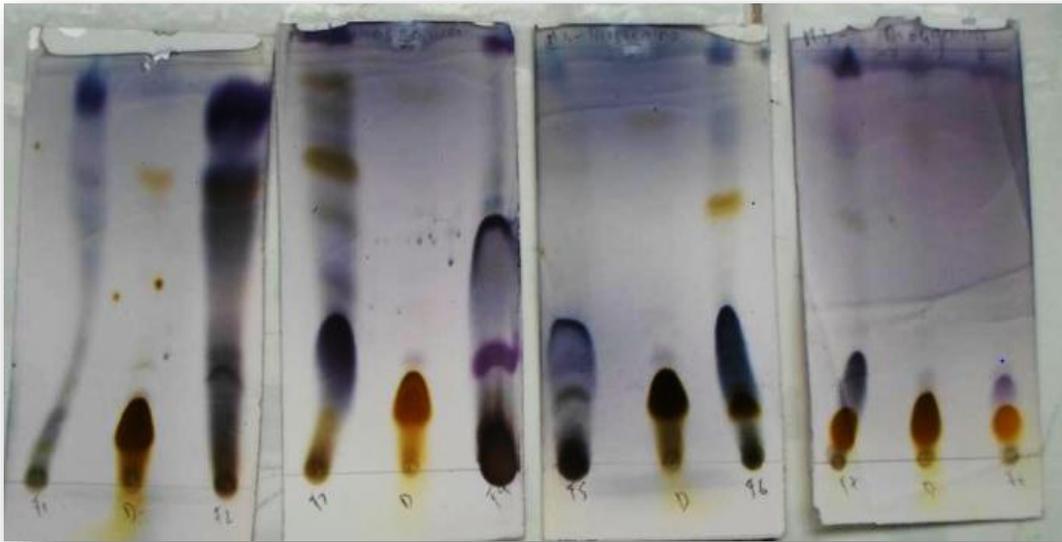
Anexo C. (TLC ensayo 2 comparadas con patrón de Diosgenina)



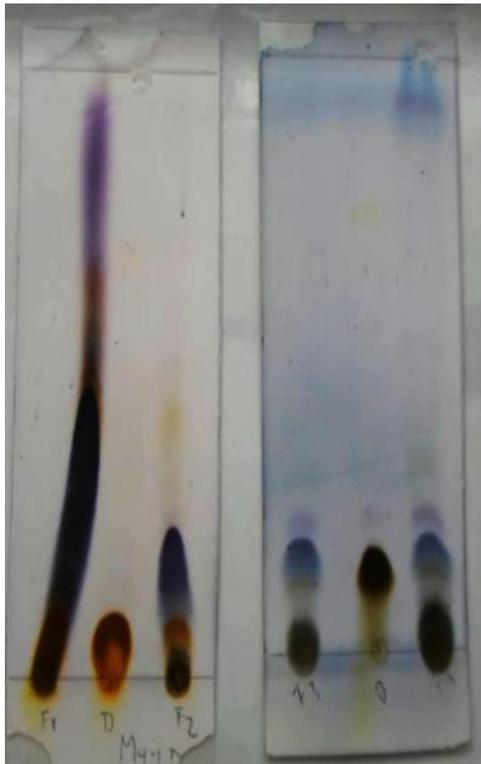
Anexo D. (TLC ensayo 3 comparadas con patrón de Diosgenina)



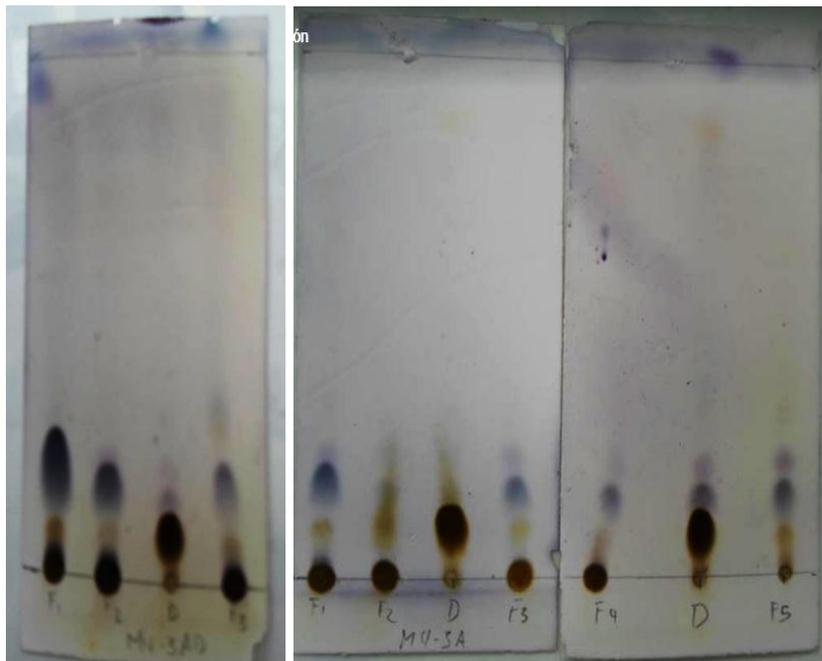
Anexo E. (TLC ensayo 4 comparadas con patrón de Diosgenina)



Anexo F. (TLC ensayo 5 comparadas con patrón de Diosgenina)



Anexo G. (TLC ensayo 6 comparadas con patrón de Diosgenina)



Anexo H. (TLC ensayo 7 comparadas con patrón de Diosgenina)



Anexo I. (TLC ensayo 8 comparadas con patrón de Diosgenina)

