



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

Cuantificación de sapogeninas esteroidales en henequén
(*Agave fourcroydes* Lem.)

Tesis que presenta

Alba de Jesús Pech Matú

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: **Biología**)

Mérida, Yucatán, México

2024



*CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS*



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de Alba de Jesús Pech Matú titulado **Cuantificación de sapogeninas esteroidales en henequén (*Agave fourcroydes* Lem.)**, fue realizado en la Unidad de Biotecnología, en la línea de investigación de Agrobiotecnología, en el laboratorio de marcadores moleculares del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro

Esta tesis tiene orientación al desarrollo socioeconómico de la región por la incidencia en la cadena productiva de henequén.

Atentamente

Dr. José Luis Hernández Stefanoni
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 06 de agosto de 2024

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de investigación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma: _____



Nombre: Alba de Jesús Pech Matú



AGRADECIMIENTOS

Al CONAHCYT por la beca otorgada

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por abrirme sus puertas y formarme como investigadora.

Al doctor Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, director de tesis, por aceptarme en su grupo de investigación, su confianza, enseñanzas, consejos y apoyo brindado.

A las doctoras Rocio de Lourdes Borges Argáez y Teresa Ayora Talavera, por sus aportaciones a la investigación y formación académica.

A la M.C. Fabiola Escalante Erosa por sus enseñanzas, consejos, paciencia y apoyo brindado.

A la doctora María José García por su amistad y sus aportaciones al desarrollo de esta tesis.

A los M.C Miguel Herrera y Miguel Keb por el apoyo técnico.

A mis compañeros de laboratorio, Sayuri, Annette, Tere, Edgar, Josué.



DEDICATORIA

A dios por darme vida, salud y guiar mi camino hasta encontrar mi objetivo.
A mi madre, por su apoyo incondicional y mi ejemplo.
A mi hermanita, gracias por ser mi confidente.
A mi padre, tu recuerdo siempre conmigo.

Coraje, fe y voluntad



CONAHCYT
CONSEJO NACIONAL DE HUMANIDADES
CIENCIAS Y TECNOLOGÍAS



ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	2
ANTECEDENTES.....	2
1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS	2
1.2 SAPONINAS.....	2
1.2.1 Estructura química y clasificación.....	3
1.2.2 Extracción.....	4
1.2.3 Cuantificación	5
1.2.4 Aplicaciones.....	6
1.2.5 Importancia económica	7
1.2.6 Biosíntesis.....	8
1.2.7 Presencia en plantas.....	11
1.3 EL GÉNERO AGAVE	11
1.3.1 Presencia de saponinas esteroidales en <i>Agave</i>	12
1.3.2. Distribucion en plantas de <i>Agave</i>	12
1.4 HENEQUÉN	13
1.4.1 Descripción botánica.....	14

1.4.2 Presencia de saponinas esteroidales en henequén	14
JUSTIFICACIÓN.....	16
HIPÓTESIS	17
OBJETIVO.....	17
GENERAL.....	17
ESPECÍFICO	17
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	18
DISEÑO EXPERIMENTAL	19
CAPITULO II	20
MATERIALES Y MÉTODOS	20
2.1 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.....	20
2.2 EXTRACCION DE SAPOGENINAS	20
2.3 ANALISIS CG-MS	21
2.4 CUANTIFICACIÓN	21
2.5 ANÁLISIS ESTADISTICO	22
CAPITULO III.....	23
RESULTADOS	23
3.1 CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA.....	23

3.2 CUANTIFICACION	24
3.3 PERFIL QUÍMICO.....	26
CAPITULO IV	43
DISCUSION GENERAL.....	43
CAPITULO V	48
CONCLUSIONES	48
CAPITULO VI	49
PERSPECTIVAS	49
BIBLIOGRAFIA	52
Anexos	61

Listado de figuras

Figura 1.1. Estructura general de una saponina.....	3
Figura 1.2. Estructura representativa de agliconas de saponinas esteroidales.....	4
Figura 1.3. Síntesis de sapogeninas esteroidales en plantas.	9
Figura 3.1. Caracterización morfométrica.....	23
Figura 3.2. Esqueleto básico de un derivado de pregnano	28
Figura 3.3. Estructuras químicas correspondientes a los metabolitos detectados en H1.....	29
Figura 3.4. Estructuras químicas correspondientes a los metabolitos detectados en H2.....	31
Figura 3.5. Composición química de grupos H1 y H2 de <i>Agave fourcroydes</i>	33
Figura 3.6. Estructura molecular de tigogenina y neotigogenina.....	34
Figura 3.7. Comparación entre estándar de tigogenina y extracto de sapogeninas de <i>A. fourcroydes</i>	35
Figura 3.8. Estructura de 16-allopregnen-3 β -ol-20-one y Diosgenina.....	36
Figura 3.9. Estructura de spirostan-3-ona, (5 α -,25R)	37
Figura 3.10. Estructura de progesterona.....	37
Figura 3.11. Estructura de pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl-, (2 α)-.....	38
Figura 3.12. Biosíntesis de alopregnanolona	38
Figura 3.13. Estructura de 3 α -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one y estructura de 3 β -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one	39
Figura 3.14. Posible degradación de la progesterona en plantas de <i>A. fourcroydes</i> derivadas de <i>in vitro</i>	40
Figura 3.15. Puntos clave en la estructura química de la progesterona	41

Listado de tablas

Tabla 1.1. Presencia de metabolitos secundarios en extracto acuoso de <i>A. fourcroydes</i>	14
Tabla 3.1. Caracterización morfométrica de plantas agrupadas de <i>A. fourcroydes</i>	22
Tabla 3.2. Porcentaje de metabolitos detectados.....	24
Tabla 3.3. Parámetros de rendimiento obtenido en plantas agrupadas.....	26
Tabla 3.4. Metabolitos detectados en <i>Agave fourcroydes</i>	27
Tabla 4.1. Parámetros estadísticos aplicados a características morfológicas en plantas agrupadas.....	40

ABREVIATURAS

mm	Milímetros
p/v	Peso/volumen
µl	Microlitros
ml/min	Mililitros por minuto
°C	Grados centígrados
hrs	horas
rpm	Revoluciones por minuto
µm	Micrómetros

Nomenclatura química

MeOH-H ₂ O	Metanol-agua
HCl 1N	Ácido clorhídrico 1 normal
Na ₂ HCO ₃	Bicarbonato de sodio
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
RMN	Resonancia magnética nuclear
C	carbono

RESUMEN

Las plantas, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa denominados metabolitos secundarios, la mayoría de estos metabolitos tienen efectos farmacológicos, por lo tanto, muchos de ellos se están utilizando por su capacidad biológica. Las sapogeninas esteroidales constituyen desde hace muchos años, una materia prima importante para la producción de medicamentos esteroides y antiinflamatorios además de presentar diversidad en su actividad biológica.

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), es una especie perteneciente al género *Agave*, es cultivada por su fibra y se sabe que es fuente natural de sapogeninas esteroidales por lo cual, su uso como fuente de estos metabolitos se vuelve una posible alternativa.

En este estudio se realizó el análisis de composición de sapogeninas esteroidales en plantas de henequén derivadas de cultivo *in vitro* con características contrastantes y en condiciones de invernadero, mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Se obtuvo un contenido de total de sapogeninas de 81.5% y 76.5% para cada grupo.

Se observó un perfil químico diferencial entre grupos en el que además de sapogeninas, se detectaron compuestos conocidos como derivados de pregnano, sin embargo, tigogenina se encuentra como el componente principal por lo que se realizó una cuantificación mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama, se reporta un contenido máximo de 144.4 mg de tigogenina, estos resultados señalan que el uso de *Agave fourcroydes* tiene potencial para su uso como fuente de sapogeninas esteroidales. Este estudio sienta las bases en busca del aprovechamiento integral del henequén.

ABSTRAC

Plants have a secondary metabolism that allows them to produce and accumulate compounds of diverse chemical nature called secondary metabolites. Most of these metabolites have pharmacological effects, therefore, many of them are being used for their biological capacity. Steroidal sapogenins have been an important raw material for the production of steroid and anti-inflammatory drugs for many years, in addition to presenting diversity in their biological activity.

Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), is a species belonging to the genus *Agave*, it is cultivated for its fiber and is known to be a natural source of steroidal sapogenins, therefore, its use as a source of these metabolites becomes a possible alternative.

In this study, the composition analysis of steroidal sapogenins was carried out in henequen plants derived from *in vitro* culture with contrasting characteristics and in greenhouse conditions, using the gas chromatography technique coupled to mass spectrometry. A total sapogenin content of 81.5% and 76.5% was obtained for each group.

A differential chemical profile was observed between groups in which, in addition to sapogenins, compounds known as pregnane derivatives were detected; however, tigogenin was found as the main component, so quantification was carried out using gas chromatography coupled to a flame ionization detector, a maximum content of 144.4 mg of tigogenin is reported. These results indicate that the use of *Agave fourcroydes* has potential for use as a source of steroidal sapogenins, this study lays the foundations in search of the comprehensive use of henequén.

INTRODUCCIÓN.

México es el centro de origen y diversidad natural del género *Agave*, estas plantas representan un importante recurso económico para el país debido a sus diversas aplicaciones en la producción de bebidas alcohólicas, alimentos y fibras naturales; también han llamado la atención por ser fuente natural de saponinas esteroidales, las cuales son un tipo de metabolito secundario de donde se pueden derivar compuestos anticonceptivos, antiinflamatorios y hormonas sexuales; así mismo, los agaves han sido investigados por su potencial como nutraceuticos, prebióticos, edulcorantes naturales y biocombustibles.

Se ha demostrado en diversos estudios que el extracto de henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), especie perteneciente al género *Agave*, contiene saponinas, taninos, fenoles, flavonoides, entre otros, siendo las saponinas el componente de mayor cantidad.

Esta especie es conocida como el “oro verde” de Yucatán por el impacto económico que logró a principios del siglo pasado y durante varias décadas, gracias a su potencial como cultivo generador de fibras. Actualmente, ante la demanda de materiales menos contaminantes, su cultivo va ganado importancia de nuevo, registrándose una superficie de cultivo de 16 mil hectáreas (SIAP, 2019).

En el presente trabajo, se evaluó la concentración de saponinas esteroidales de manera indirecta mediante la cuantificación de sus sapogeninas en plantas en etapa de invernadero derivadas de cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes* Lem., mediante cromatografía de gases, con el objetivo de identificar posibles diferencias en la concentración como base para desarrollar una estrategia de selección basada en este criterio. Por lo que se realizó la colecta y caracterización de material vegetal, la elaboración de un extracto crudo obtenido por la aplicación de un sistema de disolventes orgánicos de alta polaridad, finalizando con la obtención y cuantificación de sapogeninas esteroidales.

Con los resultados obtenidos se espera sentar las bases para identificar posibles aplicaciones que puedan dar valor agregado al cultivo de henequén y lograr un aprovechamiento integral de esta planta.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1 METABOLITOS SECUNDARIOS

El conjunto de reacciones químicas que tienen lugar en un organismo constituye el metabolismo. Estas reacciones dan origen a moléculas comunes en todas las células que son necesarias para su funcionamiento (aminoácidos, nucleótidos, azúcares, lípidos) y a los cuales se les denominan metabolitos primarios.

Las plantas, además del metabolismo primario presente en todos los seres vivos, poseen un metabolismo secundario que les permite producir y acumular compuestos de naturaleza química diversa; los compuestos derivados de este metabolismo se denominan metabolitos secundarios y se encargan de proteger a la planta al ser su sistema de defensa contra plagas, enfermedades y estrés medioambiental (Sharma y Kaushik, 2021).

La mayoría de estos metabolitos tienen efectos farmacológicos, por lo tanto, muchos de ellos se están utilizando por su amplia actividad biológica como anticancerígenos, antioxidantes, antibacterianos, antivirales, antisépticas, tónicas, etc. (Nartop, 2018).

Existen una gran diversidad de metabolitos secundarios, como, por ejemplo:

- Terpenos: como la artemisina (utilizado para tratar la malaria) y el taxol (se utiliza en el tratamiento del cáncer de mama y de pulmón)
- Compuestos fenólicos: entre los que se encuentra el resveratrol (presenta actividad antioxidante), kaempferol (actividad antidepresiva)
- Glicósidos: los esteviosidos pertenecen a este grupo (poseen propiedades edulcorantes) junto con las saponinas (amplia actividad biológica) además de otros.
- Alcaloides: como la morfina, cafeína, nicotina, etc.

1.2 SAPONINAS

Las saponinas son compuestos secundarios que se encuentran en muchas plantas, forman una espuma estable en soluciones acuosas como el jabón, de ahí el nombre de "saponina". La espuma se forma debido a que los saponósidos disminuyen la tensión superficial del agua, por lo cual Vincken (2007) señala que son una clase de tensoactivos naturales y que se encuentran en más de 500 especies de plantas. Existe una gran variedad de estos compuestos con

diferente estructura y composición, considerados como parte del sistema de defensa de las plantas contra patógenos y herbívoros por el sabor amargo que atribuyen.

Por hidrólisis de las saponinas se obtienen carbohidratos y una aglicona, llamada genéricamente sapogenina, esta última es la responsable de las características de la molécula, las cuales son usadas para brindarles una clasificación como tipo triterpénicas o esteroidales.

1.2.1 Estructura química y clasificación

Estos metabolitos poseen una estructura compacta, están compuestas por una aglicona de naturaleza no polar y una o más cadenas de monosacáridos de naturaleza polar (Figura 1.1).

Muchas formas de saponinas surgen de una combinación de agliconas y carbohidratos en diferentes posiciones de unión. Las características en la estructura molecular de la aglicona separan las saponinas en esteroidales y triterpénicas.

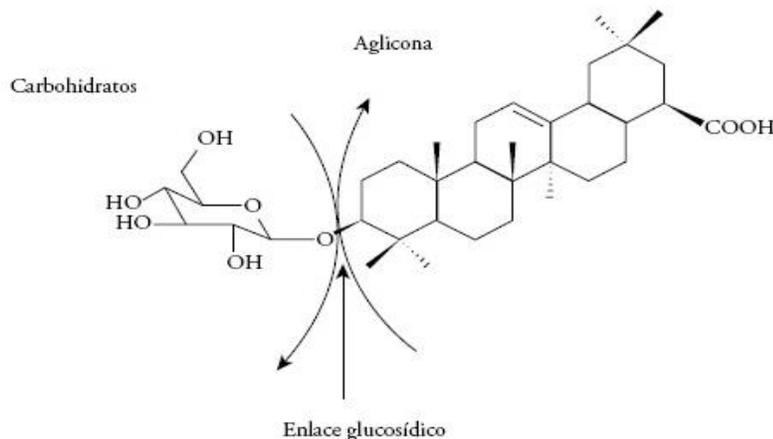


Figura 1.1. Estructura general de una saponina (tomado de Ahumada *et al.*, 2016).

La diferencia entre las saponinas triterpénicas y las esteroidales es que las primeras pueden tener 30 átomos de carbono, de igual manera, se subdividen en los grupos: oleano, ursano, y dammarano (Pérez *et al.*, 2014) mientras que las moléculas de saponinas esteroidales tienen 27 átomos de carbono debido a la ausencia de tres grupos metilo.

Yang y colaboradores (2021), mencionan que las saponinas esteroidales comprenden cuatro grupos representativos de esqueletos esteroideos, los cuales son el espirostanos, furostanos, colestano y los de tipo cardenolidos que contienen lactona (figura 1.2).

Cuando es de tipo espirostanos indica que el C 27, generalmente, está compuesto por una estructura de seis anillos. En el caso del esqueleto de furostano la estructura de la aglicona permanece pentacíclica debido a que el grupo hidroxilo en la posición C 26 forma un enlace glucosídico (Sparg *et al.*, 2004).

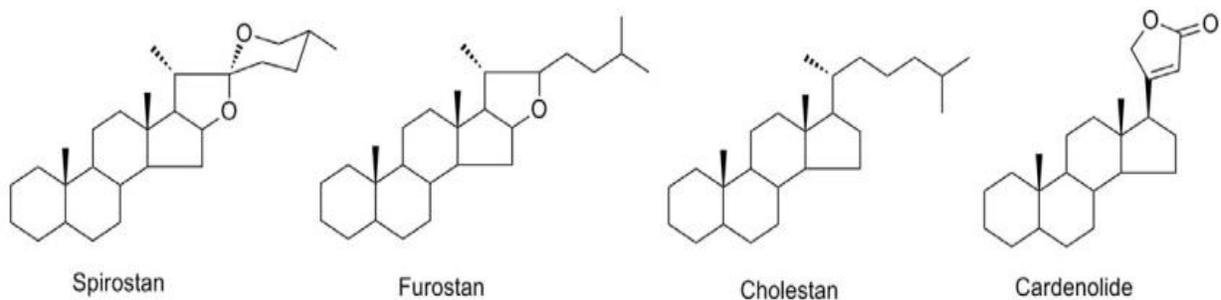


Figura 1.2. Estructura representativa de agliconas de saponinas esteroidales
(tomado de Yang *et al.*, 2021).

1.2.2 Extracción

Heng *et al.*, (2013) señalan que para la extracción de saponinas los procesos convencionales son Soxhlet, extracción por reflujo y maceración.

Hernández *et al.*, (2005), mencionan, dada la naturaleza polar de estos compuestos, los diversos métodos coinciden en la extracción en caliente o en frío y sobresalen el uso de metanol, etanol, butanol y mezclas de diferentes proporciones de estos alcoholes y agua.

En *Agave fourcroydes*, Valdivia *et al.*, (2018) reportan extracciones exitosas con el uso de metanol y etanol; por su parte Terry *et al.*, (2019) determinaron la presencia de saponinas mediante extracto acuoso; Iser *et al.*, (2020), realizaron extracciones de polaridad creciente con éter de petróleo, etanol al 70 % y agua destilada mientras que Moran y colaboradores (2020), obtuvieron resultados con mezclas de clorformo-metanol, etanol al 70% y 80%.

Orestes (2009) menciona un método el cual involucra varias etapas e implica un proceso de hidrólisis que es necesario realizar cuando se quiere hacer una cuantificación indirecta mediante la cuantificación de sus agliconas (sapogeninas) puesto que de manera natural las agliconas no se encuentran en los tejidos de la planta, el método implica inicialmente la

extracción de las saponinas, para luego realizar la hidrólisis del extracto que logra la liberación de las sapogeninas. A continuación, la descripción:

1. Proceso de desengrase del material vegetal: tiene como objetivo eliminar los compuestos lipídicos que posee la planta, que pueden afectar operaciones posteriores.
2. Obtención del “crudo” de saponinas: Se realiza la extracción del material vegetal empleando solventes polares o mezclas hidroalcohólicas de cada uno de ellos.
3. Hidrólisis de las saponinas: Generalmente se realiza por vía química utilizando un ácido mineral como catalizador y su finalidad es liberar las sapogeninas.
4. Extracción de las sapogeninas liberadas en el proceso de hidrólisis: En este proceso se utilizan solventes de mediana polaridad.

El método descrito por Orestes fue aplicado para este trabajo de investigación puesto que se realizó la cuantificación de saponinas de manera indirecta utilizando un análisis por cromatografía de gases.

1.2.3 Cuantificación

La cuantificación de saponinas se ha realizado por diferentes técnicas espectrofotométricas, pero una de las limitantes es contar con los estándares, la mayoría de los métodos desarrollados en las últimas fechas se basan en el uso de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), a partir de saponinas purificadas (Hernández *et al.*, 2005).

Para el caso de mezclas complejas de saponinas, el uso de técnicas como HPLC con detector evaporativo de dispersión de luz (ELSD), junto a las técnicas de espectrometría de masas-electro spray, ha permitido facilitar el proceso de aislamiento y caracterización de estas sustancias (Martínez, 2020).

En el caso de *Agave fourcroydes*, Ohtsuki *et al.*, (2004) realizaron investigaciones aplicando HPLC-FAB (bombardeo rápido de haz atómico) de alta resolución-RMN-IR (Resonancia Magnética Nuclear-Infrarrojo).

A pesar de que hay muchos métodos de detección disponibles para cuantificación de saponinas, la determinación individual es muy difícil ya que son cromóforos pobres y su identificación por espectros de RMN implica métodos de purificación y aislamiento tediosos y lentos (Olvera *et al.*, 2015). Por otra parte, los métodos cromatográficos acoplados a la espectrometría de masas se han convertido en técnicas analíticas eficaces para el rápido

cribado e identificación de compuestos en extractos complejos (Kang *et al.*, 2013), por ejemplo, el uso de la cromatografía de gases (GC) se basa en la determinación indirecta de saponinas a través de la cuantificación de las agliconas (sapogeninas) (Hostettman y Marston, 2005).

La eficacia de esta técnica de cuantificación se ve reflejada en trabajos como los de Olvera *et al.*, (2015) donde aplicaron CG-EM (espectrometría de masas) en *Agave atrovirens*, por su parte García *et al.*, (2022) utilizaron GC-FID (Detector de Ionización de Flama) en *Agave cupreata*, *A. angustifolia*, *A. americana*, *A. karwinskii* y *A. potatorum*.

En este trabajo, la determinación de saponinas fue indirecta por lo que se cuantificó el contenido de sapogeninas, este proceso se llevó a cabo con el uso de CG-EM y posteriormente cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización (CG-FID).

1.2.4 Aplicaciones

Las saponinas son empleadas industrialmente como aditivos para alimentos y cosméticos. Potencialmente, pueden ser utilizadas para otras aplicaciones (Yang *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2010) como, por ejemplo, conservantes, modificadores del sabor, detergentes (debido a sus propiedades químicas y su capacidad como agentes espumantes) y agentes para eliminar el colesterol de productos lácteos. González y colaboradores (2013), reportan su uso potencial para remover arsénico, también se ha comprobado su funcionamiento como molusquicida.

El sector farmacéutico es el dominante en el mercado de saponinas ya que se emplean comúnmente como adyuvantes para mejorar la absorción de medicamentos al mejorar la solubilidad o interferir con las vías de absorción (Marketdataforecast, 2022).

Las saponinas esteroidales, constituyen desde hace muchos años, una materia prima importante para la producción de medicamentos esteroides y antiinflamatorios, como la hidrocortisona y dexametasona, los cuales se están estudiando para uso en pacientes con COVID-19 (Sen *et al.*, 2022). También se reporta por Kongkathip y colaboradores (2006) su uso como material de partida para la síntesis de betametasona y otros agentes antiinflamatorios ampliamente utilizados en terapias dermatológicas.

Las saponinas esteroides tigogenina y hecogenina, extraídas de los residuos de la producción de fibras de *A. sisalana* y *A. americana*, son materias primas importantes en la síntesis de hormonas esteroides. Se utilizan como materias primas en la producción de corticosteroides (cortisona, cortisol, prednisolona, prednisona, dexametasona, betametasona, triamcinolona, etc.) (Escamilla-Treviño, 2012).

No obstante, se han reportado estudios que demuestran actividades biológicas interesantes como por ejemplo citotóxica, anticancerígena, antiinflamatoria, antifúngica, hemostática, (Martínez, 2020), presentan actividad antiviral reportada por Sharma *et al.*, (2021) quienes mencionan que las saponinas esteroidales del ginseng inhiben el virus de la influenza H1N1 en condiciones *in vitro* e *in vivo*; Marahatha y colaboradores (2021), reportan el uso potencial de la diosgenina, otro tipo de saponina esteroide, en el tratamiento de la artritis reumatoide por su parte, Singh y Kaur (2018), reportan el potencial de las saponinas esteroidales para el control de plagas agrícolas.

1.2.5 Importancia económica

Velázquez y Vélez (2020) señalan que en el período comprendido entre el 2013 y 2017, el mercado de saponinas incrementó aproximadamente un 50%, convirtiéndose en un sector económico importante que ha promovido un marcado interés en la optimización de diversos procesos de extracción desde diferentes fuentes naturales; además, se proyecta un crecimiento a una tasa de 0.2% en los próximos cinco años, pasando de 950 millones de dólares en 2017 a 970 millones de dólares en 2023.

Sin embargo, debido a la pandemia de COVID-19, se estimó que el tamaño del mercado global de saponinas alcanzó un valor de 956.8 millones de dólares en 2022 y se pronostica que tendrá un tamaño reajustado de 1149.2 millones de dólares para 2028 con una CAGR (tasa de crecimiento anual compuesto) del 3.1% durante el período de revisión (Globenewswire, 2022).

Estados Unidos se destacó como el mayor importador a nivel mundial con un 20% del mercado total en el 2017, mientras que países como China, Malasia, Francia, Irlanda, Alemania y Rusia conformaban el 5% del mercado global. En cuanto a las exportaciones, entre los años 2013 y 2017 se observó un incremento aproximado del 23%, pasando de 1.101 a 1.359 millones de dólares (Velázquez Y Vélez, 2020)., China se destaca como el mayor exportador de compuestos glucósidos (entre los cuales se encuentran las saponinas) a nivel mundial con un 55% del mercado en el 2022, seguido de Francia y Malasia con un 9% y 4%, respectivamente (International Trade Center [ITC], 2023). En América Latina, Chile es el país más destacado en exportaciones de saponinas provenientes de *Quillaja saponaria*

Basado en su aplicación, el mercado global de saponinas se divide en: productos farmacéuticos, aplicación agrícola y alimentos y bebidas, el sector de los principales

productores clave en el mercado global está dominado por Asia (Marketdataforecast, 2022), algunos de estos son:

- Weihe Pharma
- KCP Pharmaceuticals
- Laozhiqing Group
- Yunnan Baiyao Group
- Zhongheng Group

En México, el aprovechamiento de las saponinas esteroidales generó una gran derrama económica gracias a investigaciones del Dr. Russel Marker, quien desarrolló un método para producir progesterona a partir de la diosgenina, una saponina esteroideal, que obtuvo de la raíz de la planta *Dioscorea macrostachya*. Tal descubrimiento colocó a México a la vanguardia de la industria hormonal y durante los años de 1950-1970 en nuestro país se producían con mucho éxito hormonas esteroidales femeninas y masculinas, las cuales eran exportadas a todo el mundo (Miramontes, 2001).

Por otra parte, Villanueva (2012), menciona que en la búsqueda del “aprovechamiento integral” del henequén en Yucatán, se logró la producción de esteroides, la cual se inició en 1976 pero en 1982 fue suspendida por falta de canales de comercialización y de solución técnica para la obtención del producto final.

1.2.6 Biosíntesis

El proceso de biosíntesis se divide en tres etapas: la producción de esteroides, la síntesis de saponinas, y la conexión de diferentes monosacáridos para sintetizar una saponina esteroideal.

La vía del mevalonato (MVA) y la vía del metileritritol 4-fosfato (MEP) inician la síntesis. Estas dos vías son muy comunes en la naturaleza y son un proceso común para la biosíntesis de terpenos, esteroides y otros metabolitos secundarios. Las dos vías pueden generar difosfato de isopentenilo (IPP) y difosfato de dimetilalilo (DMAPP) a partir de acetil-CoA (MVA) y piruvato (MEP) como puntos de partida (Chen *et al.*, 2021).

Las plantas están equipadas para emplear ambas vías, a menudo al mismo tiempo y ambas vías parecen estar compartimentadas, de modo que las enzimas de la vía del MVA se localizan en el citosol, mientras que las enzimas de la vía MEP se encuentran en los cloroplastos (Dewick, 2002). Aunque ambas vías están involucradas en la biosíntesis de colesterol y sitosterol, los precursores de las saponinas esteroides, se cree que la vía MVA es la vía más dominante (Sawai y Saito, 2011).

Para la síntesis, se produce escualeno (intermediario de 30 carbonos) que posteriormente se transforma en 2,3-oxidoescualeno por acción del escualeno epoxidasa, este es ciclado por la óxido escualeno ciclasa (OSC) y conduce a la producción de esteroides tetracíclicos a través de la actividad de la cicloartenol sintasa (CS) (Faizal y Geelen, 2013). La conversión de cicloartenol a sitosterol y luego a saponinas esteroides es la ruta biosintética más aceptada para las saponinas esteroides (figura 1.3).

Este proceso requiere una serie de metiltransferasas, desmetilasas, reductasas, deshidrogenasas e isomerasas para producir sitosterol, seguido de hidroxilasa y glicosiltransferasa para finalmente producir saponinas esteroidales (Zhu *et al.*, 2018; Singh *et al.*, 2017; Upadhyay *et al.*, 2014).

AcetilCoA -> -> Acido mevalónico -> -> Escualeno -> -> Cicloartenol

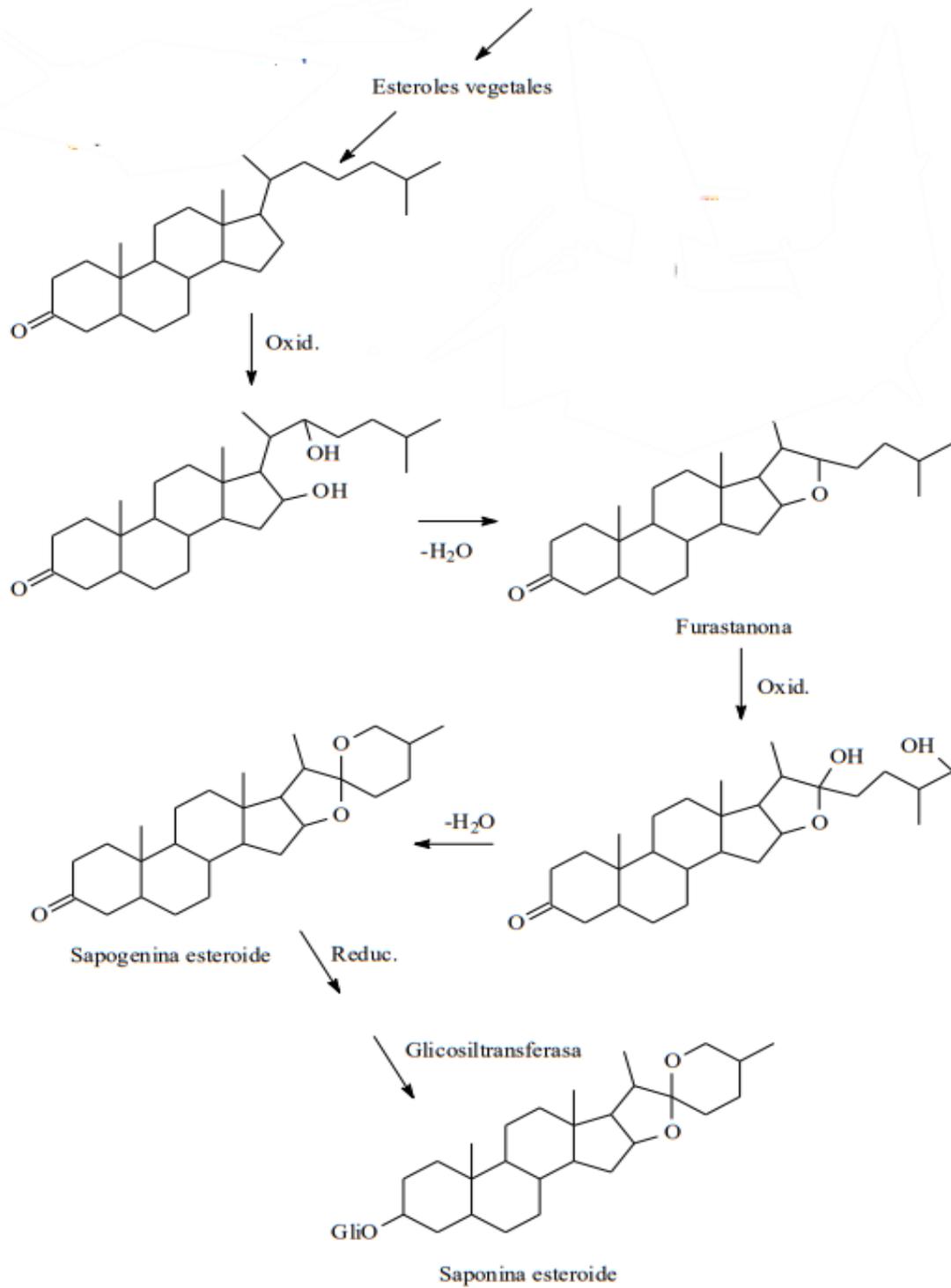


Figura 1.3.- Síntesis de saponinas esteroidales en plantas (tomado de Martínez, 2020).

1.2.7 Presencia en plantas

Los estudios fitoquímicos han demostrado la presencia de saponinas esteroidales en muchas familias monocotiledóneas (Evans, 2009).

Sparg *et al.*, (2004) reportaron que se encuentran casi exclusivamente en la clase Liliopsida (monocotiledóneas). Esto se confirma por la presencia de saponina esteroidal en las familias Agavaceae, Asparagaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, Poaceae, Smilacaceae, Dracaenaceae y Taccaceae, todas pertenecientes a la misma clase (Liliopsida).

Dewick (2002), menciona que sobresalen las familias Dioscoreaceae (por ejemplo, *Dioscorea*), Agavaceae (por ejemplo, *Agave*, *Yucca*) y Liliaceae (por ejemplo, *Smilax*, *Trillium*).

La excepción, sin embargo, se encuentra en Scrophulariaceae y Solanaceae, dos familias de plantas de la clase de Magnoliopsida (dicotiledóneas) en las que todas las especies estudiadas contenían saponina esteroide.

Otras dicotiledóneas en donde se han detectado son *Aspilia montevidensis* (Asteraceae), *Balanites aegyptiaca* (Balanitaceae), *Trigonella foenum-graecum* (Leguminosae) y *Tribulus terrestris* (Zygophyllaceae), también sobresale el género *Panax* (Araliaceae) el cual ha sido estudiado por las propiedades biológicas de sus saponinas (Sparg *et al.*, 2004).

1.3 EL GÉNERO AGAVE

El género *Agave* pertenece a la familia Agavaceae y se distribuye por las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Este género tiene más de 400 especies que crecen en climas áridos y semiáridos (Sidana *et al.*, 2016). La familia incluye 8 géneros con 295 especies, de los cuales 125 se encuentran en México (Rodríguez-Garay, 2004).

Los agaves presentan un metabolismo tipo CAM, adaptaciones fisiológicas y morfológicas, tales como: hojas suculentas, un sistema de raíces superficial, cutículas gruesas en la epidermis de la hoja y acumulación de ceras en la superficie (AGARED 2017).

Esqueda, *et al.*, (2011) señalan que México es el centro de origen y diversidad natural del género; de acuerdo con Mora *et al.*, (2011), existen variantes con importancia regional, nacional e internacional, de las cuales hay un conocimiento tradicional considerable y una variación morfológica alta.

Actualmente, los agaves representan un importante recurso económico en el país debido a sus diversas aplicaciones, se utilizan para producir bebidas alcohólicas (tequila, mezcal, sotol, pulque), alimento (azúcares, jarabes y guisos mexicanos) y fibras naturales (cordaje, paja y

cestería). También han llamado la atención por investigaciones sobre la extracción y producción de nuevos compuestos bioactivos, tal como señala Dueñas (2016), varias especies de *Agave* son fuentes de saponinas esteroidales de donde se pueden derivar compuestos anticonceptivos, antiinflamatorios y hormonas sexuales, también han sido investigadas por su potencial como nutracéuticos, prebióticos, edulcorantes naturales y biocombustibles.

1.3.1 Presencia de saponinas esteroidales en *Agave*

Las saponinas se encuentran ampliamente distribuidos en el reino vegetal estando en segundo lugar entre la gran diversidad de metabolitos (Cheock *et al.*, 2014).

El primer reporte de las saponinas de *Agave* fue en el año 1932, reconocido como una fuente nueva y potencial de saponinas esteroidales, hasta el momento se han identificado más de 50 especies con constituyentes de saponina. Las saponinas de *Agave* son quizás los compuestos más estudiados del género (Sidana *et al.*, 2016), debido a los beneficios demostrados para la salud, como actividad anticancerígena, antiinflamatoria y antifúngica (Santos-Zea *et al.*, 2012; Francis *et al.*, 2002).

Esto queda demostrado con los reportes de la presencia de saponinas esteroidales en varias especies como *Agave difformis*, *A. lechuguilla*, *A. toumeyana*, *A. vilmoriniana*, *A. schott*, *A. durangensis*, *A. salmiana*, *A. tequilana*, *A. angustifolia*, *A. cupreata*, *A. sisalana*, *A. fourcroydes*, *Agave attenuata*, *A. karwinskii* Zucc., *A. potatorum* Zucc, etc. (García *et al.*, 2022; Terry *et al.*, 2019; Novel, 1998).

1.3.2. Distribución en plantas de *Agave*

Es importante mencionar, que la concentración de saponinas se ve afectada por la especie de planta, el origen genético, así como también de los factores ambientales y agronómicos, como lo puede ser el crecimiento de la planta, los procedimientos de colecta y almacenamiento (Guclu-Ustundang y Mazza, 2007).

Se ha encontrado que la producción de saponina varía en órganos y tejidos individuales, varias secciones de plantas tienen concentraciones y tipos específicos de saponina (Zhou *et al.*, 2018). Muchas especies de plantas almacenan saponinas en las raíces, donde estas moléculas pueden actuar como fitoprotectores antimicrobianos.

En las raíces se pueden encontrar en células epidérmicas, capa externa del floema y células del parénquima alrededor del periciclo. Siendo encontradas en el periciclo y floema primario si

se trata de una raíz primaria mientras que se localizan en el cambium vascular y floema secundario en raíces secundarias.

En las hojas se encuentran en la epidermis, floema, parénquima y el en el receptáculo de la epidermis de la hoja siendo este su sitio de almacenamiento (Faizal y Geelen, 2013). La edad y los componentes de las plantas determinan el tipo de moléculas de saponina (Wei *et al.*, 2018). En agaves, estos compuestos se aíslan de hojas, flores, jugo de hojas, rizomas y cultivos de callos de plantas (Sidana *et al.*, 2016), sin embargo, la concentración más alta de saponinas se localiza en la hoja (Cheok *et al.*, 2014; Novel 1998;).

Esta afirmación se sustenta con aportaciones de Wina *et al.*, (2005) quienes señalan que generalmente, las saponinas se encuentran en los tejidos que son más vulnerables al ataque de hongos y bacterias o a la depredación de insectos pues una de sus funciones es la de actuar como barrera o escudo químico en el sistema de defensa de la planta, por su parte Sidana *et al.*, (2016) reportan que la gran mayoría de trabajos de extracción de saponinas se han hecho utilizando las hojas como material de extracción.

También se fundamenta con trabajos como los de Terry y Castellanos (2015) quienes reportan la presencia de hecogenina en abundantes concentraciones en las hojas maduras de henequén, de igual manera Puente-Garza *et al.*, (2017) reportan en hojas de plantas maduras de agave, la presencia de sapogeninas como hecogenina, diosgenina, clorogenina, kammogenina, gentrogenina, entre otras.

1.4 HENEQUÉN

El henequén (*Agave fourcroydes* Lem.), es una especie perteneciente al género *Agave*, es cultivada y conocida mundialmente por su fibra, Colunga (1998) señala que fue domesticado por los mayas desde tiempos prehispánicos a partir de la especie silvestre *A. angustifolia* Haw. Es una planta monocotiledónea, con metabolismo tipo CAM, sus hojas o pencas se caracterizan por ser de gran altura, verdes, gruesas, fibrosas y suculentas.

El ciclo de vida del henequén fluctúa entre los 15 y los 25 años, pero su aprovechamiento comienza sólo después de 5 años de cultivo (Betancourt, 2003).

1.4.1 Descripción botánica

Posee un sistema radicular fibroso ancho, formando penachos sin raíz principal que se encuentra entre los 30-40 cm de profundidad. Las raíces surgen adventiciamente desde la base de las cicatrices de las hojas en el fondo del tallo y se clasifican en portadoras (función de anclaje al suelo) y alimentadoras (encargadas de tomar el agua y los nutrientes contenidos en el suelo).

Esta especie se propaga en forma vegetativa a través de rizomas, el brote terminal del rizoma da lugar aproximadamente después de un año a un retoño el que forma raíces adventicias, pudiendo así independizarse de la planta madre.

El tronco o tallo del henequén alcanza una altura de 1.30 m, su diámetro es de 20 cm en el momento en que la planta está lista para su explotación (4-5 años de edad), período a partir del cual el diámetro no aumenta más, ocurriendo solamente el crecimiento en su parte inferior.

Las hojas del henequén poseen bordes dentados y el ápice terminado en una aguda espina, crecen agrupadas en una estructura en forma de roseta.

La reproducción sexual ocurre solamente una vez en la vida de la planta, y da lugar a semillas que se producen en la parte superior de la inflorescencia. Las pocas semillas que logran madurar muestran una baja capacidad de germinación (Piven *et al.*, 2001), además un escapo floral puede producir hasta 1500 bulbillos, estos surgen de pequeños brotes protegidos por brácteas. Cada uno es una plántula que posee de 6-8 hojas reducidas con un sistema radicular rudimentario.

1.4.2 Presencia de saponinas esteroideas en henequén

Terry *et al.*, (2019), realizaron una diversidad de ensayos de detección para diversos metabolitos, reportan haber encontrado en el extracto acuoso de henequén la presencia de saponinas, triterpenos, esteroides y variedad de metabolitos (tabla 1.1), La identificación fue de tipo cualitativa, haciendo uso de reactivos de coloración y precipitación.

Sin embargo, el conocimiento sobre la presencia de estos metabolitos se remonta mucho tiempo atrás, ejemplo de esto son los estudios realizados por Ohtsuki *et al.*, (2004) quienes

reportaron la presencia de las saponinas esteroidales furcreastatina, cantalasaponina-1 y tigogenina en hojas de *A. fourcroydes*.

Gabr *et al.*, (2022) señala que entre las saponinas esteroidales de *A. fourcroydes* que Ohtsuki aisló también se encontraron hexaglucósidos de clorogenina y hecogenina.

Ensayo	Metabolito	Resultados
Dragendorff	Alcaloides	-
Nihidrina	Aminoácidos libres	+
Baljet	Coumarinas	+
Espuma	Saponinas	+++
Shinoda	Flavonoides	++
Fehling	Azucares reductores	+
Cloruro férrico	Taninos y fenoles	++
Enfriamiento	Mucilago	+
Borntrager	Quinonas	-
Liebermann	Triterpenos y/esteroides	+++

Tabla 1.1.- Presencia de metabolitos secundarios en extracto acuoso de *A. fourcroydes* (tomado de Terry *et al.*, 2019). (-) indica ausencia, (+) presencia en bajas concentraciones, (++) concentración moderada y (+++) alta concentración.

JUSTIFICACIÓN

A. fourcroydes tiene capacidad para generar fibras que pueden reemplazar los materiales plásticos; lo cual ha generado una diversidad de estudios enfocados en lograr un mayor rendimiento y aprovechamiento de la planta.

Con el objetivo incrementar el aprovechamiento integral de esta especie vegetal, se ha realizado una amplia búsqueda para encontrar aplicaciones diferentes a su uso principal, entre los resultados encontrados destaca la presencia de saponinas esteroidales como fuente de usos alternativos.

En la época de mayor auge para el henequén, el aprovechamiento de estos metabolitos se desarrolló en un grado mínimo debido a la falta de producción técnica para su obtención por lo cual, es necesario realizar investigación para encontrar soluciones a estas y otras problemáticas enfocadas en lograr un máximo rendimiento de los compuestos bioactivos del henequén.

En este contexto la selección temprana de individuos que expresen una alta cantidad de saponinas esteroidales puede ser una estrategia válida para que los cultivos de *A. fourcroydes* sean considerados fuente potencial de estos metabolitos.

Uno de los parámetros en los que puede basarse la selección de plantas es el tamaño, considerando que una planta de mayor tamaño debería tener un mayor rendimiento, sin embargo, no se ha encontrado información que permita afirmar lo anterior en *Agave fourcroydes*.

El presente estudio trata de analizar si existe una relación directa entre el tamaño de planta y el contenido de metabolitos de *A. fourcroydes* mediante la cuantificación de sus saponinas considerando que las plantas se encuentran en condiciones ambientales idénticas.

HIPÓTESIS

El contenido de sapogeninas esteroidales en *A. fourcroydes* en plantas derivadas de *in vitro* bajo condiciones de invernadero es proporcional al tamaño de la planta.

OBJETIVO

GENERAL

Evaluar el contenido de sapogeninas esteroidales en individuos de *A. fourcroydes* contrastantes en condiciones de invernadero.

ESPECÍFICO

- Seleccionar individuos de *A. fourcroydes* para conformar grupos con características contrastantes, bajo las mismas condiciones de invernadero.
- Comparar el contenido de sapogeninas esteroidales en dichos grupos contrastantes de *A. fourcroydes*.
- Analizar la composición del contenido de sapogeninas esteroidales en los grupos conformados de plantas de *A. fourcroydes*

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

Para llevar a cabo esta tesis se trabajó en tres grandes niveles, el primero fue la selección de plantas, en segundo lugar, la cuantificación de sapogeninas esteroidales y finalmente el análisis de las pruebas cromatográficas.

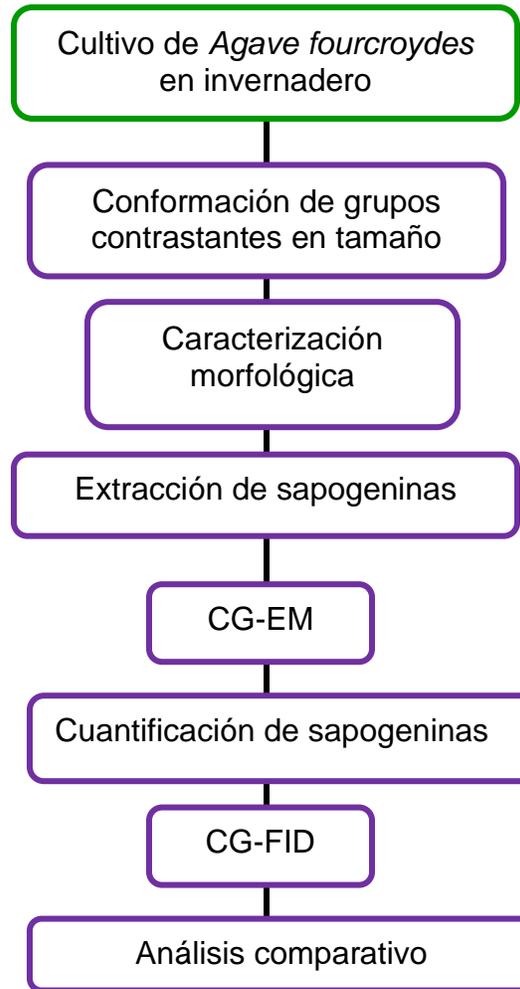
Inicialmente se seleccionaron individuos de *Agave fourcroydes* en condiciones de invernadero, de la misma edad, provenientes de una misma línea clonal y se caracterizaron para conformar grupos contrastantes con base en sus diferencias fenotípicas.

La identificación y cuantificación relativa de sapogeninas esteroidales se realizó mediante cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas y posteriormente se utilizó cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización para una cuantificación absoluta.

La obtención del extracto que se analizó se llevó a cabo siguiendo el método de Orestes (2009), dicho método implica 4 pasos esenciales, los cuales son: 1) tratamiento de la muestra, 2) desengrasado y obtención de extracto crudo en donde se utilizó hexano como disolvente y posteriormente se usó un sistema de disolventes MeOH-H₂O para la obtención del extracto crudo de saponinas; 3) hidrólisis del extracto crudo que se sometió a reflujo en HCl 1N, 4) lavado del producto hidrolizado para la obtención del extracto de sapogeninas que implicó extraer con diclorometano y concluir mediante un lavado de la fase orgánica con Na₂HCO₃ al 5%.

Los resultados del análisis cromatográfico de cada grupo fueron interpretados para saber si existen diferencias en el contenido y el perfil químico, finalmente se determinó si el contenido que se presenta es significativo para considerar a *Agave fourcroydes* como fuente natural de sapogeninas esteroidales.

DISEÑO EXPERIMENTAL



CAPITULO II

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 SELECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

El material vegetal fue colectado en un invernadero perteneciente a la biofábrica del CICY, ubicado en el Parque Científico y Tecnológico de Yucatán. Se realizó una primera selección fenotípica visual basada en la longitud del ápice para posteriormente realizar una caracterización morfométrica que implicó el registro de la longitud de ápice, longitud y ancho de hoja apical, así como el peso fresco de cada subgrupo, estos datos fueron utilizados para hacer cálculos de biomasa.

Con base en la diferencia en el tamaño del ápice de cada planta se formaron 2 grupos de 30 plantas y estos a su vez se subdividieron en 3 grupos con 10 individuos cada uno.

Los grupos formados fueron denominados como H1 y H2, en H1 se incluyeron “plantas pequeñas” cuya característica es un tamaño de ápice no mayor a 3 cm y el grupo H2 “plantas grandes” en donde las plantas tenían una longitud de ápice superior a los 3 cm.

Una vez caracterizado todo el material, se colectó la hoja más próxima al ápice de cada planta, se le aplicó un lavado con agua y jabón al 10% para eliminar impurezas, finalmente se procedió a secar el material colectado en un horno de convección a 65 °C durante 2 días posteriormente se registró el peso seco obtenido.

2.2 EXTRACCION DE SAPOGENINAS

El material vegetal seco fue molido para posteriormente pesar 2 gramos y fueron puestos en viales de vidrio para iniciar el proceso de extracción.

Se comenzó con la fase de desengrasado, esta fase consistió en dos extracciones secuenciales con 10 ml de hexano ACS por 2 hrs a 70 rpm en una placa con agitación, la fase hexánica fue recuperada y se reservó. Se continuó trabajando con el material vegetal empapado al cual inmediatamente se le realizó una extracción con 10 ml de metanol-agua (4:1) durante 48 hrs dejándolo de nuevo a 70 rpm en una placa con agitación. La fase metanólica fue recuperada y el material vegetal fue descartado, el extracto metanólico se centrifugó, para eliminar impurezas, en un equipo Eppendorf centrifugue 5810R durante 20 min a 3000 rpm, el extracto se dejó reposando por 3 días en una mesa a temperatura ambiente para evaporar el metanol, transcurrido este tiempo se sometió a un secado con gas nitrógeno durante 30 min

para eliminar los residuos del solvente, posteriormente el extracto fue puesto en congelación, finalmente se liofilizó y se obtuvo el extracto crudo de saponinas.

Para la obtención del extracto de sapogeninas, se realizó la hidrólisis del extracto metanólico liofilizado, se pesaron 60 mg y se disolvieron en 7.5 ml de HCl 1N y 5 ml de agua, esta solución se sometió a reflujo por 2 horas, al producto hidrolizado se le realizaron dos extracciones secuenciales con diclorometano (12.5ml), se recuperó la fase orgánica a la cual se le realizó un lavado con bicarbonato de sodio al 5% (25 ml), nuevamente se recuperó la fase orgánica y se dejó durante 72 hrs a temperatura ambiente para evaporar el solvente, posteriormente el extracto se resuspendió en diclorometano (CH_2Cl_2) y fue puesto en viales aptos para uso en cromatografía de gases.

2.3 ANALISIS CG-MS

Los productos de hidrólisis se disolvieron en CH_2Cl_2 a una concentración del 3% y se inyectaron 1.5 μl en un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7890A acoplado a un espectrómetro de masas Agilent Technologies 5975C con las siguientes condiciones: temperatura del inyector 300°C, temperatura del detector 270°C, helio como gas acarreador con un flujo de 1ml/min, en una columna HP5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano, con 30 m de longitud, 0.25 mm diámetro interno, espesor de película de 0.25 μm , Agilent J&W modelo 19091S-433). La temperatura inicial del horno a 220°C por 2 min, luego se incrementó cada 5°C/min hasta 300°C por 15 min y se mantuvo por 11 min. Los metabolitos se identificaron comparando sus tiempos de retención y/o sus patrones de fragmentación con los de muestras contenidas en la biblioteca de patrones de fragmentación del equipo (NIST Library en Chem Station G1701DA).

2.4 CUANTIFICACIÓN

Inicialmente se realizó una cuantificación relativa de las sapogeninas de *A. fourcroydes* mediante la determinación del porcentaje de área de cada metabolito en los productos de hidrólisis, obteniendo el área bajo la curva. Los picos fueron identificados por comparación con la base de datos del equipo (NIST Library en Chem Station G1701DA).

Posteriormente, se realizó una cuantificación absoluta de la sapogenina principal detectada en los productos de hidrólisis. Este proceso se llevó a cabo mediante cromatografía de gases acoplada a un detector de ionización de flama (CG-FID, Varian 430-GC), utilizando una

columna capilar HP5MS (5%-fenil-metilpolisiloxano), con 30 m de longitud, 0.32 mm diámetro interno, espesor de película de 0.50 μm , Agilent J&W modelo 19091S-113).

Los productos de hidrólisis se re-suspendieron en CH_2Cl_2 a una concentración del 1% (p/v) y con un automuestreador (Varian PAL) se inyectó 1.5 μl de la muestra en modo splitless, se utilizó nitrógeno como gas acarreador con un caudal de 1ml/min. La temperatura del inyector fue de 250°C y la temperatura del detector de 290°C. La temperatura de la columna se mantuvo a 220°C durante 2 min y se programó un aumento de 8°C/min hasta una temperatura final de 290°C que se mantuvo durante 20 min. Se utilizó un estándar de tigogenina (Sigma-Aldrich) para la curva estándar, el contenido total de sapogenina se expresó como microgramos de equivalentes de tigogenina por gramo de extracto.

2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las características físicas de las plantas se sometieron a la prueba de *t* de comparación de medias utilizando el software SigmaPlot® versión 11.0. Los cálculos de biomasa, rendimiento y contenido de tigogenina fueron realizados en el software Microsoft® Excel® LTSC MSO 2021.

CAPITULO III

RESULTADOS

3.1 CARACTERIZACIÓN MORFOMÉTRICA

Las plantas seleccionadas para el estudio se dividieron en dos grupos contrastantes denominados H1 “plantas pequeñas” y H2 “plantas grandes” con 30 plantas por grupo, seguidamente cada grupo fue separado en tres subgrupos de 10 plantas, estos subgrupos fungen como repeticiones para dar sustento estadístico. Posteriormente, se realizó la medición de la longitud y ancho de la hoja más próxima al ápice de cada planta (figura 3.1), en la tabla 2 se muestra el valor promedio para cada grupo.

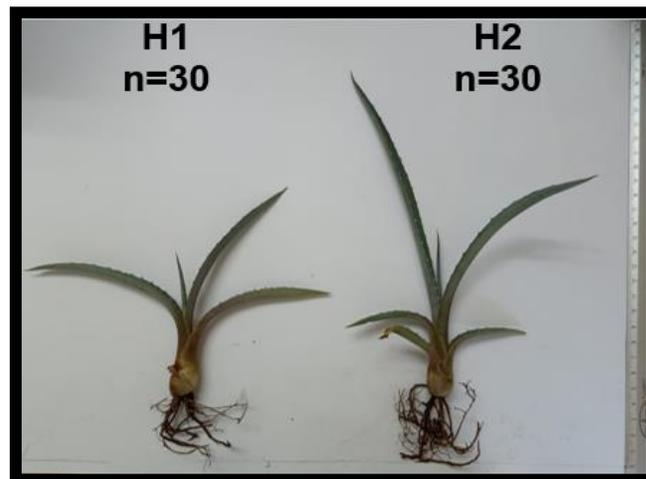


Figura 3.1. Caracterización morfométrica. Imagen representativa de individuos de cada grupo establecido.

Los valores registrados para la longitud apical validan la selección visual inicial puesto que el grupo H2 tiene una longitud promedio 2 veces mayor con respecto al grupo H1, los datos restantes fueron utilizados para realizar el cálculo de la biomasa, igualmente, H2 presenta un valor promedio 2.8 veces mayor respecto a H1 (tabla 3.1) siendo esta la característica que confirma la diferencia entre ambos grupos de plantas seleccionadas, puesto que Jiménez-Torres *et al.*, (2021) señalan que la biomasa acumulada se considera como una característica del crecimiento, con lo anterior se puede afirmar que H2 agrupa plantas de mayor tamaño y que los grupos establecidos son contrastantes.

Grupo	Biomasa (g/cm ²)	L.A (cm)	L.H (cm)	A.H (cm)
H1	47.7±15.1	3.0±0.4	11.5±1.7	1.7±0.1
H2	136.1±24.8	6.1±0.7	16.3±0.6	2.0±0.1

Tabla 3.1. Caracterización morfométrica de plantas agrupadas de *A. fourcroydes*. L.A corresponde a la longitud del ápice, L.H corresponde a la longitud de la hoja y A.H. presenta los valores del ancho de hoja.

3.2 CUANTIFICACION

El contenido total de sapogeninas para H1 fue de 81.8%, con base en el área bajo la curva; en cuanto al grupo H2 se registra un contenido total del 76.5% (tabla 3.2, para mayor detalle consulte anexo 1). Bajo las condiciones experimentales establecidas se observan resultados contrastantes con la hipótesis planteada puesto que se esperaba que en las plantas con mayor tamaño se obtuviera un mayor contenido de sapogeninas, por lo contrario, el grupo de plantas de menor tamaño (H1) presenta un mayor contenido de estos metabolitos, los resultados señalan que, bajo las condiciones del estudio, el tamaño de la planta no es proporcional al contenido de sapogeninas esteroidales, esto se determinó mediante la prueba de *t* de comparación de medias con $p=0.001$ (para mayor información consultar el anexo 2)

Metabolito	% detectado en extracto	
	H1	H2
16-allopregnen-3 β -ol-20-ona	27.9±9.3	11.5±4.9
Pregnen-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2-methyl-, (2 α)	7.4±2.9	4.8±1.5
Diosgenina	ND*	2.7±0.8
Tigogenina	29.9±5.7	35.2±4.2
Neotigogenina	5.6±1.9	7.4±1.2
Spirostan-3-ona, (5 α -,25R)	ND*	3.4±1.0
11- α -Hydroxy-oxodiosgenina	11.0±5.3	11.5±4.1
Total	81.8	76.5

Tabla 3.2. Porcentaje de metabolitos detectados. Porcentajes obtenidos en los extractos de cada grupo de plantas de henequén.

Como se mencionó con anterioridad, una limitación importante al momento de realizar la cuantificación es la disponibilidad de estándares, para el desarrollo de este trabajo solo se contó con el estándar de tigogenina, esta sapogenina fue el principal metabolito detectado en los extractos, además tiene gran importancia económica por su uso como material de partida para la síntesis de ciertos fármacos, por lo que trabajar únicamente con esta sapogenina no afectó negativamente el desarrollo de este estudio.

Con los datos obtenidos de la cuantificación absoluta, se reporta un total de 130.2 mg/g y 144.4 mg/g de tigogenina, con base a peso seco, para H1 y H2 respectivamente. El extracto de sapogeninas de H1 contiene un porcentaje mayor en comparación con H2, pero en este último se detecta una mayor cantidad de tigogenina (consultar el anexo 3 para mayor detalle).

El tamaño de la planta si importa cuando se trata de tigogenina pues en las plantas de mayor tamaño hay un mayor contenido de este metabolito, este resultado concuerda con la cuantificación relativa inicial pues H2 registró 35.2% de tigogenina en comparación con H1 que registró un 29.9% de este metabolito (consultar el anexo 1 para mayor información).

Los resultados obtenidos bajo las condiciones experimentales establecidas indican que el tamaño de la planta no es un indicador para el contenido total de sapogeninas esteroidales, pero si lo es para el contenido de tigogenina, el rechazar la hipótesis planteada depende de los datos que se consideren, sin embargo, para efectos de este trabajo se rechaza la hipótesis puesto que el conocer el contenido total de sapogeninas esteroidales era el propósito.

Verma (2015) señala que el crecimiento y desarrollo juegan un papel importante en la determinación de la concentración de metabolitos secundarios, la acumulación o no producción de estos compuestos depende de las necesidades fisiológicas de las plantas según condiciones climáticas favorables o no (Ncube, 2012).

Es posible que los resultados observados se deban a las condiciones mismas del invernadero donde se encontraban, considerando que los grupos de plantas que se estudiaron provienen del cultivo *in vitro* y que en estas condiciones se promueve el heterotrofismo pues se proporciona un medio ideal de acuerdo con el tipo de planta para su desarrollo.

Al dejar las condiciones *in vitro* y ser trasplantadas a invernadero debieron atravesar un proceso de aclimatación en donde se adaptaron a las nuevas condiciones de crecimiento.

Se considera el crecimiento como el aumento irreversible y permanente de volumen de una célula, es decir un aumento de masa, en cuanto al proceso de aclimatación, este implica ajustes fisiológicos, anatómicos o morfológicos dentro de un solo organismo que mejoran el rendimiento o la supervivencia en respuesta al cambio ambiental. La capacidad de modificar su fenotipo y metabolismo se conoce como plasticidad fenotípica (Nunes *et al.*, 2016).

De acuerdo con los parámetros de rendimiento de los grupos (tabla 3.3), existe evidencia de un crecimiento en H2 con respecto a H1 pues sus valores tanto de peso fresco y peso seco son casi dos veces superior, además el contenido de humedad y rendimiento entre los grupos son similares lo que indica que la diferencia de peso no es del todo por el contenido de agua de la planta, es por eso que se cree que las diferencias en contenido y tamaño se deben al proceso de aclimatación y plasticidad fenotípica de las plantas.

Grupo	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Rendimiento (%)	Humedad (%)
H1	24±4.0	2.5±0.3	10.4±0.5	89.6±0.5
H2	40.6±4.3	4.4±0.5	10.6±0.3	89.3±0.3

Tabla 3.3. Parámetros de rendimiento de peso obtenido en plantas agrupadas de *A. fourcroydes*.

3.3 PERFIL QUÍMICO

La identificación de las sapogeninas se hizo mediante la comparación de una base de datos (NIST Library en Chem Station G1701DA), en la tabla 3.4 se presentan los compuestos detectados y los tiempos de retención registrados, cabe señalar que el área porcentual de cada uno fue variando de acuerdo con la muestra analizada.

Número	Clave	Metabolito	t_R .	PM.
1	AP	16-allopregnen-3 β -ol-20-ona	8.6	316
2	PDH	Pregnen-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2-methyl-, (2 α)	9.3	344
3	DG	Diosgenina	15.4	414
4	TG	Tigogenina	15.6	416
5	NG	Neotigogenina	15.8	416
6	SP	Spirostan-3-ona, (5 α -,25R)	16.0	414
7	HG	11- α -Hydroxy-oxodiosgenina	16.3	444

Tabla 3.4. Metabolitos detectados en *Agave fourcroydes*. (t_R) tiempo de retención, (PM) peso molecular.

En total se registraron 7 compuestos de los cuales el 1 y 2 no son sapogeninas como tal por que poseen una estructura de 21 carbonos, técnicamente se les conoce como compuestos derivados del pregnano, los compuestos restantes si son sapogeninas.

De acuerdo a Deepak *et al.*, (1989), los derivados del pregnano o solo pregnanos son componentes esteroidales C21 (figura 3.2) que tienen el sistema anular habitual de 1,2-ciclopentanoperhidrofenantreno con:

- Grupos metilo angulares orientados en β en C10 y C13 (flechas negras).
- Una cadena lateral de dos atomos en C17 (flecha roja).
- Por lo general el derivado de pregnano posee la configuracion 14 β y lleva un grupo hidroxil en esta posicion (flecha azul).
- La configuracion en C5 suele ser α excepto para las moleculas que contienen un enlace Δ^5 .
- Los pregnanos de las plantas tambien tienen un grupo hidroxil en C3 que siempre tiene una orientacion β como en muchos esteroides naturales (flecha verde).

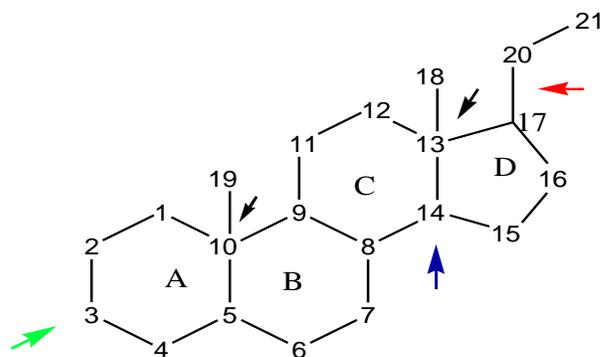


Figura 3.2. Esqueleto básico de un derivado de pregnano (tomado de Deepak *et al.*, 1989).

Los derivados del pregnano y las sapogeninas comparten la vía del mevalonato como ruta de biosíntesis por lo que fueron considerados en el desarrollo de este trabajo.

De los 7 metabolitos detectados en el presente trabajo, 5 están presentes en el grupo H1 (3 sapogeninas y 2 derivados de pregnano) mientras que el grupo H2 se detectaron 7 (5 sapogeninas y 2 derivados de pregnano).

En las figuras 3.3 y 3.4 se presentan las estructuras correspondientes a cada metabolito detectado en el grupo H1 y H2 respectivamente como información complementaria.

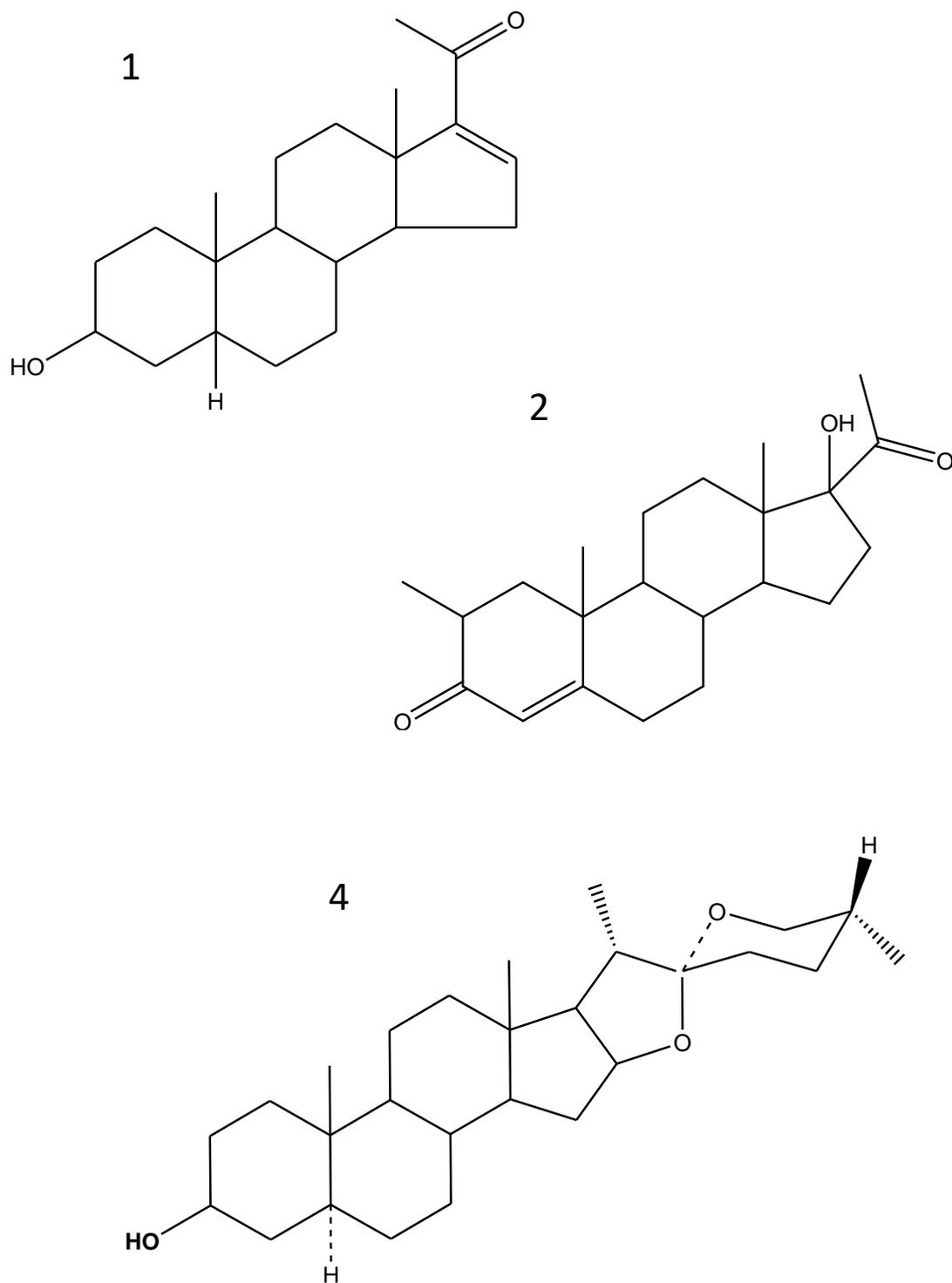


Figura 3.3. Estructuras químicas correspondientes a los metabolitos detectados en el grupo H1

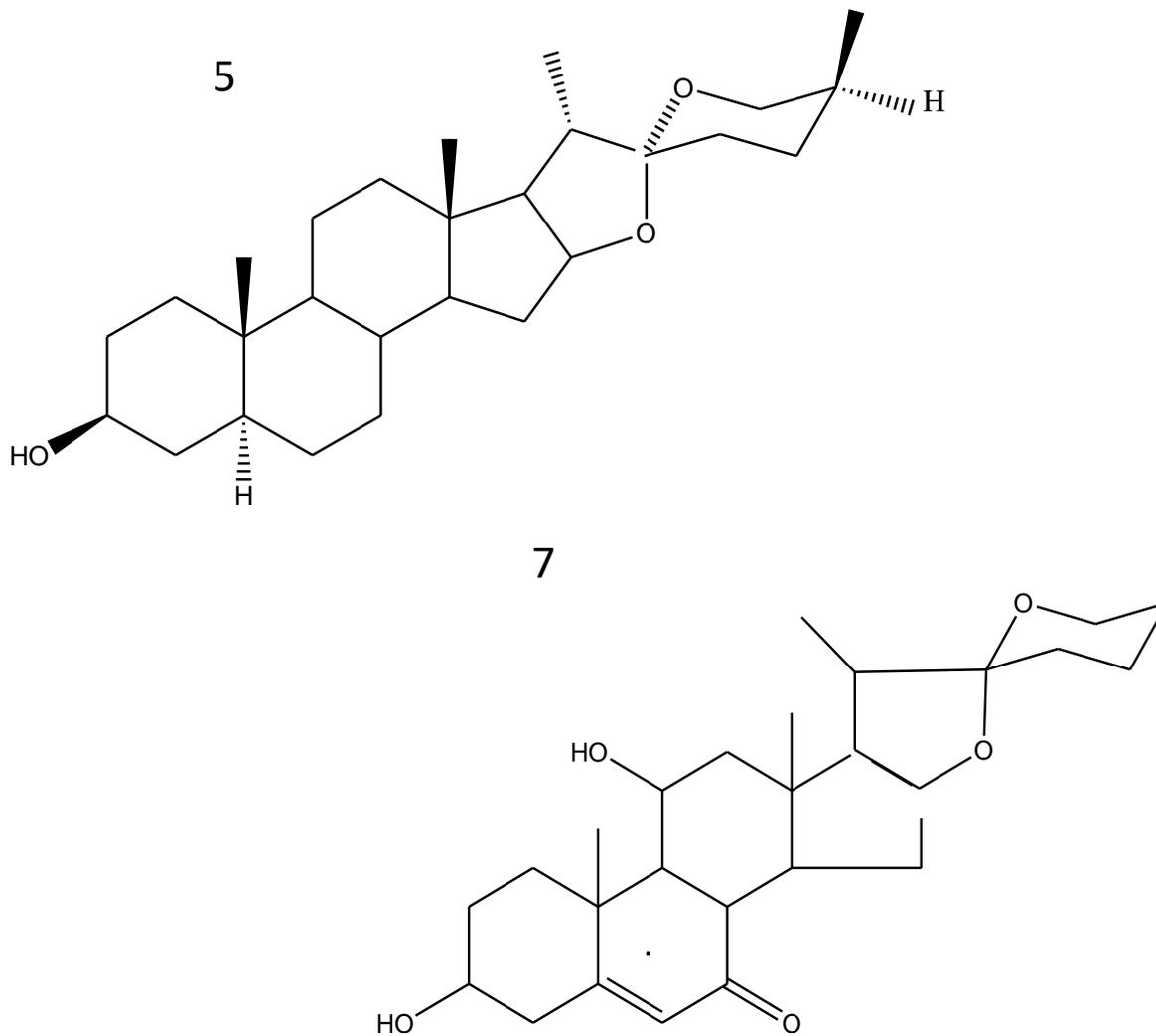


Figura 3.3. Estructuras químicas correspondientes a los metabolitos detectados en el grupo H1 (continuación).

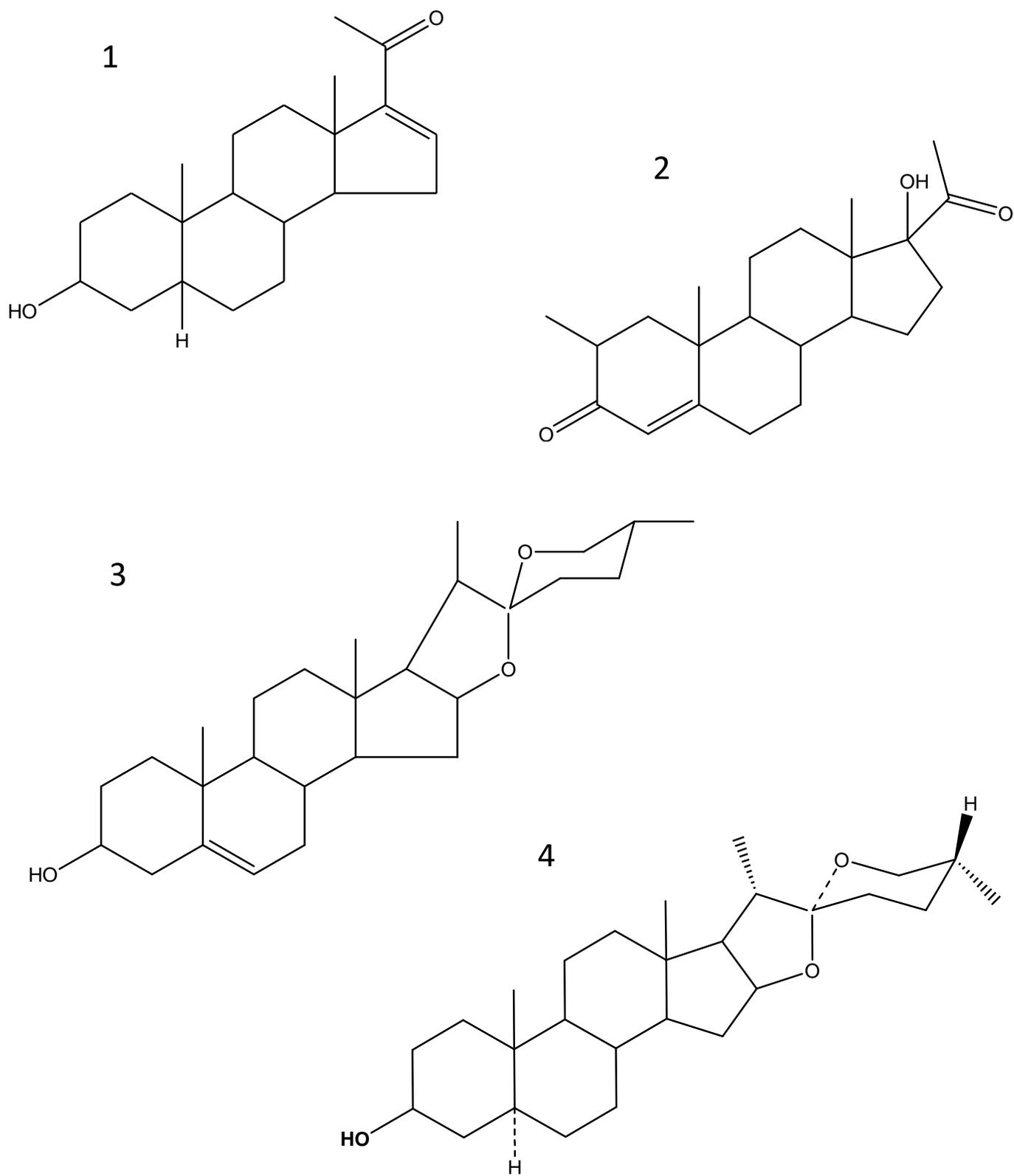


Figura 3.4. Estructuras químicas correspondientes a los metabolitos detectados en el grupo H2.

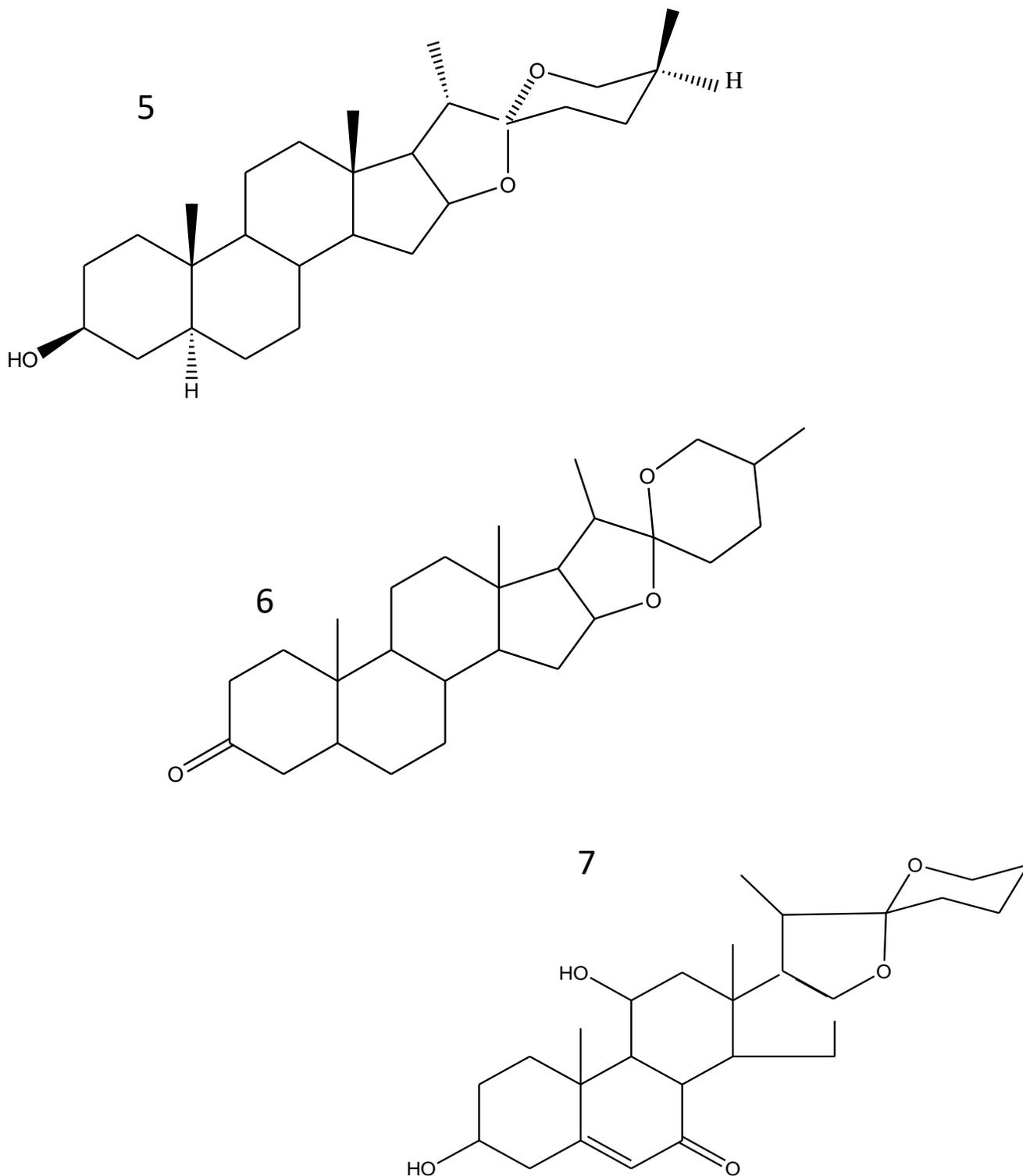


Figura 3.4. Estructuras químicas correspondientes a los metabolitos detectados en el grupo H2
(continuación).

Ambos grupos presentan tigogenina como componente principal, sobresaliendo el grupo H2 (plantas grandes) en donde se detecta un contenido en promedio el 35.2% con respecto al grupo H1 (plantas pequeñas) en donde constituye el 29.9% (figura 3.5).

Si bien neotigogenina se detectó en la mayoría de las muestras en cantidades menores, cabe señalar que se diferencia de tigogenina únicamente por la configuración espacial de un hidrogeno en el carbono 25 de su estructura molecular (figura 3.6). Después de tigogenina, los metabolitos 16-allopregnen-3 β -ol-20-ona (derivado de pregnano) y 11- α -Hydroxy-oxodiosgenina (sapogenina) se encuentran en el segundo y tercer lugar de abundancia en cuanto a porcentaje de área en las muestras.

En ambos casos existe una diferencia de contenido entre los grupos, la cual es mas notable en el caso de 16-allopregnen-3 β -ol-20-ona pues se reporta que H2 contiene un 27.9% detectado respecto a H1 con un 11.5%.

Para 11- α -Hydroxy-oxodiosgenina se reporta un 11 % para H1 y en H2 un 11.5%, la diferencia entre los grupos es minima a pesar de que este metabolito es el tercer compuesto más abundante (para mayor información, consultar anexo 1)

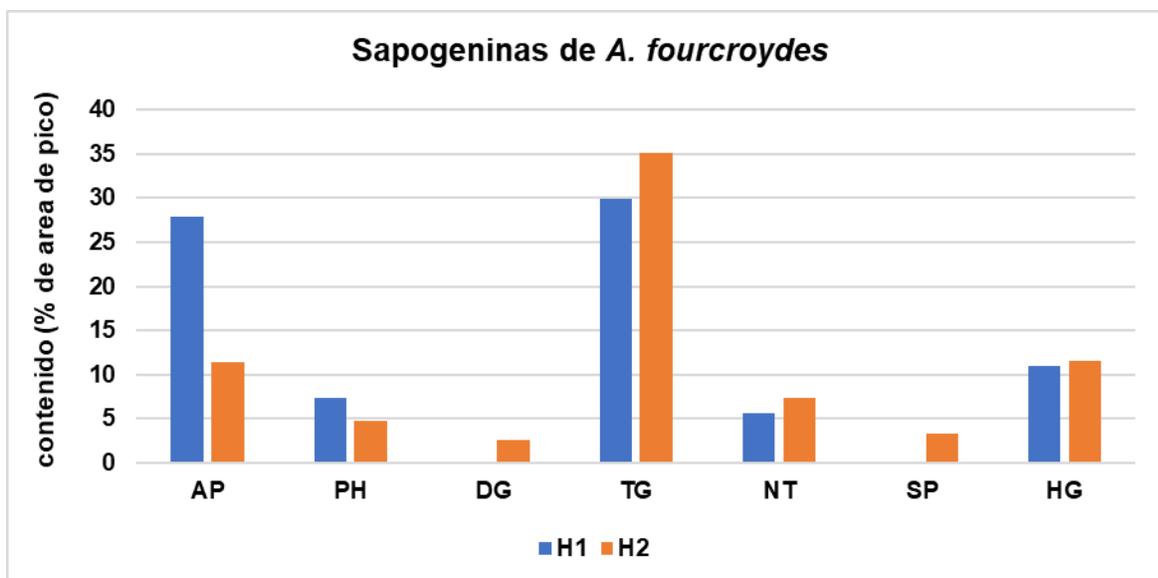


Figura 3.5. Composición química de grupos H1 y H2 de *Agave fourcroydes*. En donde H1 agrupa a las plantas pequeñas y H2 a las plantas grandes, respecto a las claves de identificación de los metabolitos, estos se encuentran en el siguiente orden: AP (16-allopregnen-3 β -ol-20-ona), PH (Pregnen-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2-methyl-, (2 α), DG (disogenina), TG (tigogenina), NG (neotigogenina), SP (Spirostan-3-ona, (5 α -,25R) y HG (11- α -Hydroxy-oxodiosgenina).

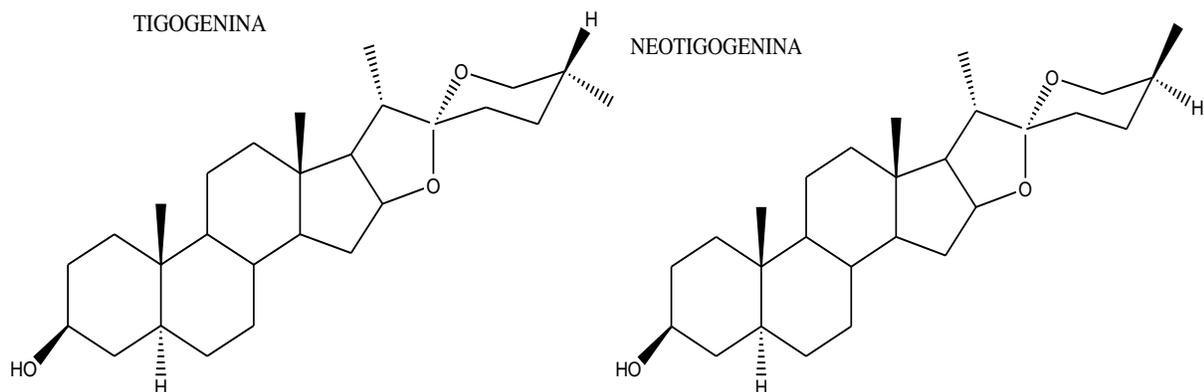


Figura 3.6. Estructura molecular de tigogenina y neotigogenina (Tomado de Santos y Branco, 2014).

En general, las sapogeninas esteroidales se utilizan ampliamente en la industria farmacéutica como materiales de partida para la síntesis química de varios medicamentos de hormonas esteroides (Liu *et al.*, 2021), de las cuales diosgenina, hecogenina y tigogenina son las que se utilizan principalmente como materia prima en la producción de estos esteroides (Ohta *et al.*, 1997).

Los resultados encontrados señalan que tigogenina es la sapogenina que sobresale como el componente mayoritario del contenido total, motivo por el cual se decidió analizar el estándar de tigogenina (figura 3.7) para realizar comparaciones y una cuantificación absoluta de este metabolito.

La diosgenina fue detectada únicamente en el grupo H2 y representó un 2.7% del contenido total. La detección tigogenina y diosgenina en *A. fourcroydes* podría impactar de forma positiva el cultivo de esta especie siendo una alternativa en la búsqueda de su aprovechamiento integral.

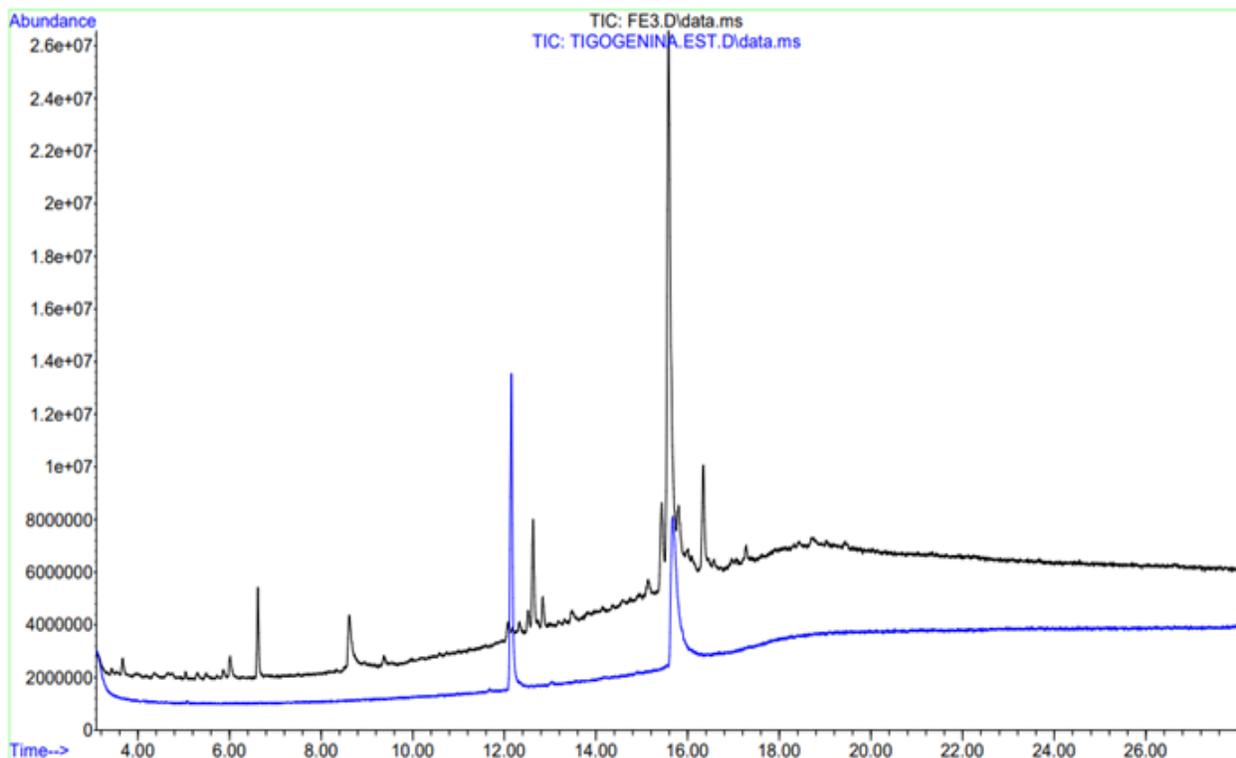


Figura 3.7. Comparación entre estándar de tigogenina y extracto de sapogeninas de *A. fourcroydes*. El pico registrado a un t_R de 15.6 es el correspondiente al estándar.

Ohta *et al.*, (1997) señala que la explotación de tigogenina es una necesidad urgente siendo que se encuentra abundantemente disponible en los recursos naturales, como el henequén. Por otra parte, diosgenina tiene una gran importancia industrial y ha sido objeto de interés para muchos investigadores de todo el mundo a lo largo de los años (Liu *et al.*, 2021; Mafalda *et al.*, 2016).

De los metabolitos mencionados anteriormente, el spirostan-3-ona, (5α -,25R) se detectó únicamente en H2 en un 3.4%

De acuerdo con los resultados encontrados se puede señalar que, a pesar de tener la misma edad y estar bajo condiciones similares de crecimiento, el perfil químico de los metabolitos presentes en ambos grupos es diferente, sobresaliendo el grupo H2 con mayor diversidad de sapogeninas.

Se han encontrado datos respecto a variaciones de la producción de saponina en órganos y tejidos individuales, por ejemplo, Zhou y colaboradores (2018), trabajaron con *Panax ginseng* y señalan que varias secciones de plantas tienen concentraciones y tipos específicos de saponina, el estudio brinda un indicio para explicar la diferencia en los perfiles de los grupos establecidos en esta investigación.

La figura 3.8 representa las estructuras químicas de los compuestos diosgenina, 16-allopregnen-3 β -ol-20-ona y spirostan-3-ona, (5 α -,25R) (figura 3.9). Se pudo observar que los metabolitos mencionados tenían en común el sistema anular habitual de 1,2-ciclopentanoperhidrofenantreno propio de los esteroides, por otra parte, diosgenina y 16-allopregnen-3 β -ol-20-one contienen en su estructura un grupo hidroxilo en C3 de su estructura lo que según Deepak *et al.*, (1989) les brinda actividad estrogénica. De acuerdo con estos rasgos estructurales, un compuesto que presenta las mismas características es la progesterona (figura 3.10) e incluso comparten la misma vía de biosíntesis.

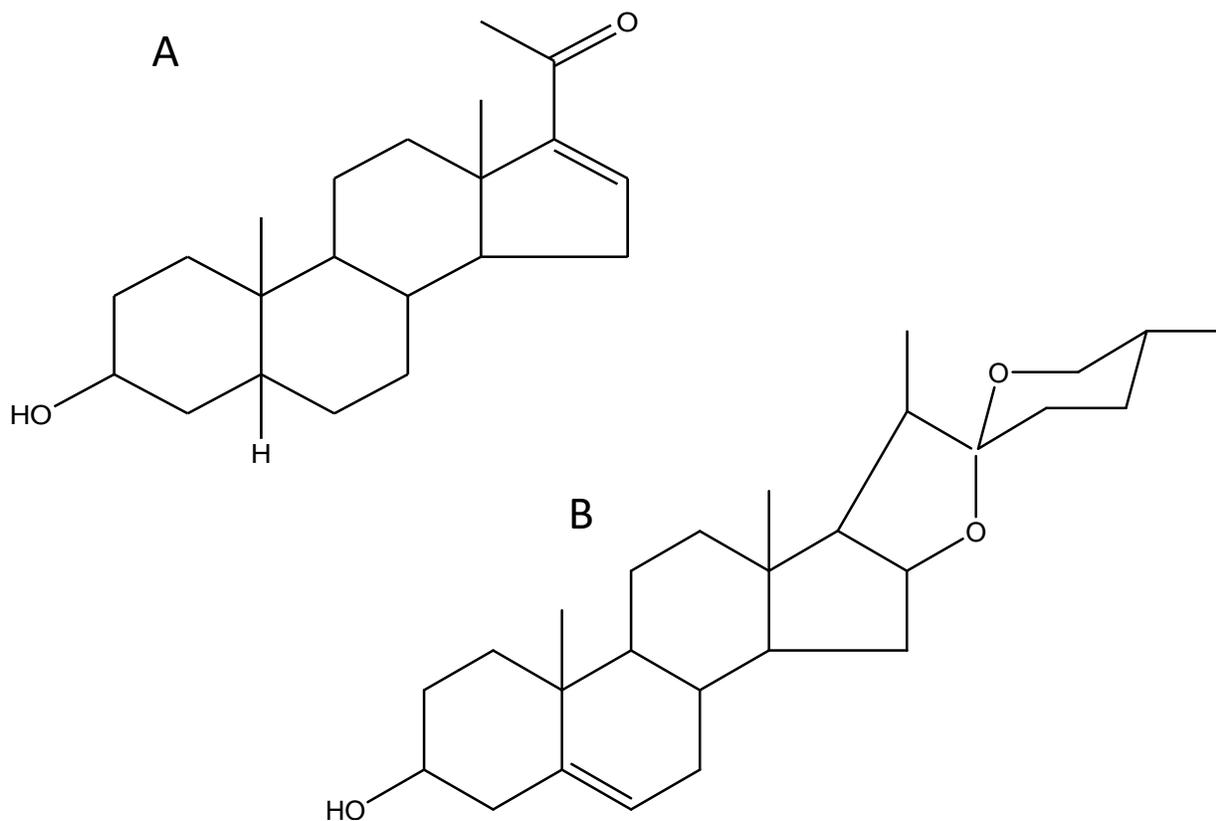


Figura 3.8. Estructura de 16-allopregnen-3 β -ol-20-one (A) y diosgenina (B).

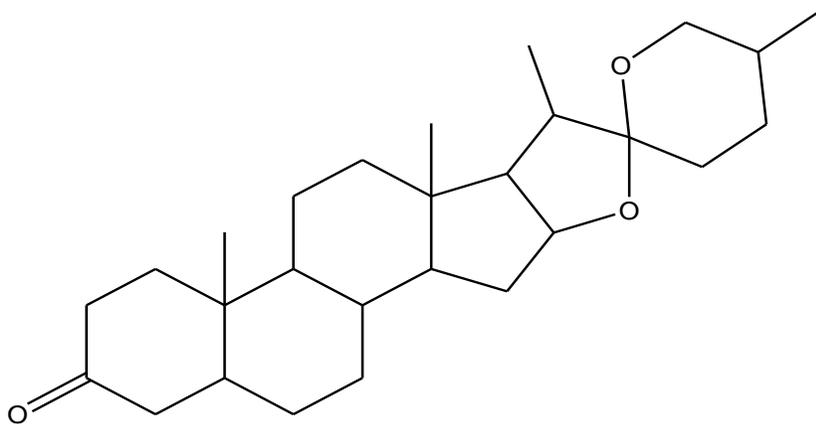


Figura 3.9. Estructura de spirostan-3-ona, (5 α -,25R).

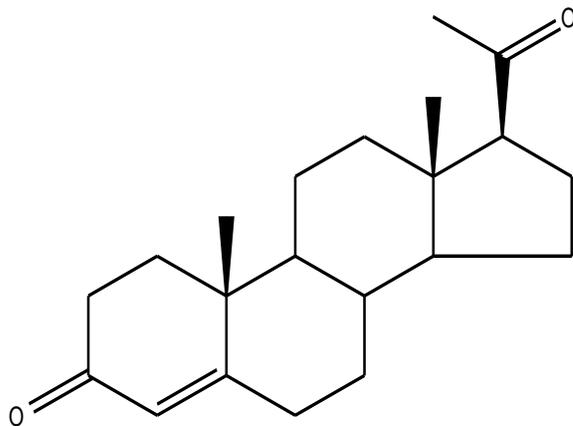


Figura 3.10. Estructura de progesterona.

A pesar de lo señalado, no se detectó la presencia de progesterona en las muestras analizadas, sin embargo, se encontró un metabolito con estructura similar, cuya diferencia es la presencia de un grupo metilo en C2 y un hidroxilo en C17, fue identificado como pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl-, (2 α)- (figura 3.11). El porcentaje de área de este metabolito es diferente entre H1 y H2 siendo de un 7.4% y 4.8% respectivamente.

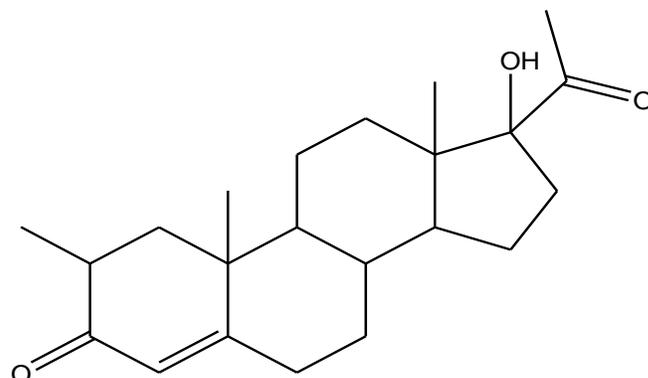


Figura 3.11. Estructura de pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl-, (2 α)-.

De acuerdo con la literatura relacionada con progesterona y basándose en las similitudes de esta molécula con el metabolito detectado en *A. fourcroydes*, se consideró que el pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl-, (2 α)- es un derivado de pregnano al igual que progesterona y 16-allopregnen-3 β -ol-20-one, por lo tanto, se asume que comparten la misma ruta de biosíntesis.

A pesar de que los estudios sobre progesterona vegetal no están desarrollados al nivel que la progesterona animal, se analizó el trabajo de Paul y colaboradores (2020) quienes presentan una ruta de biosíntesis para alopregnanolona (figura 3.12), en dicho estudio se identifica la progesterona como precursor de la alopregnanolona y se describen diversos metabolitos que comparten características estructurales con los metabolitos detectados en este trabajo.

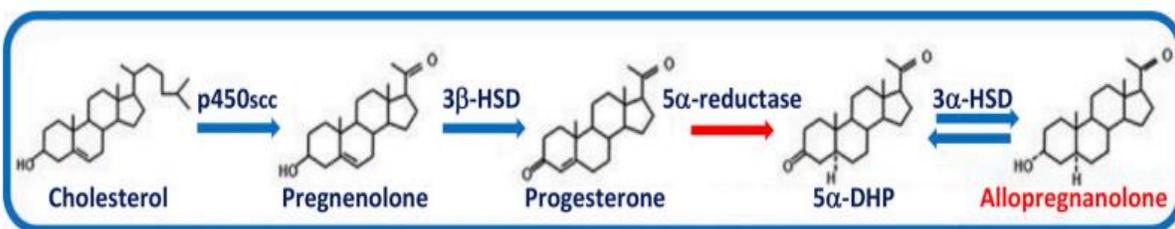


Figura 3.12. Biosíntesis de alopregnanolona (tomado de Paul *et al.*, 2020).

Se analizó el trabajo de Slavíková *et al.*, (2009), quienes reportaron la síntesis de un análogo de alopregnanolona, identificado como 3 α -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one (figura 3.13).

La importancia del trabajo radica en la similitud de la estructura de 16-allopregnen-3 β -ol-20-one (metabolito detectado en el presente estudio) también conocido como 3 β -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one, con el análogo sintetizado por el equipo de Slavíková.

La diferencia entre estos metabolitos radica en la configuración espacial de un grupo hidroxilo en el carbono 3 de su estructura molecular, de manera similar al caso de tigogenina y neotigogenina mencionado con anterioridad.

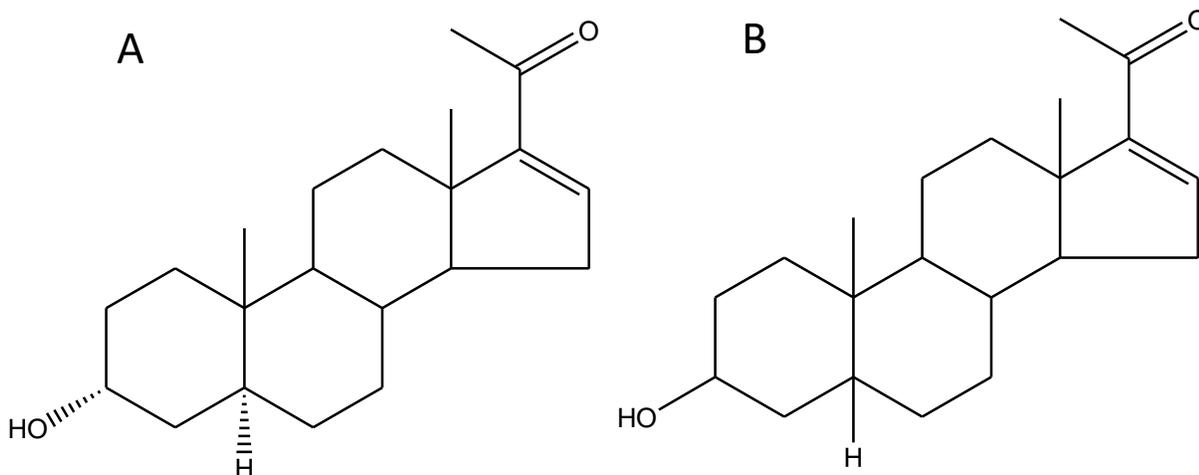


Figura 3.13. Estructura de 3 α -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one y de 3 β -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one. En A) estructura de 3 α -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one presentada por Slavíková *et al.*, (2009), en B) estructura de 3 β -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one detectada en este trabajo.

Con la información recabada, lo que se sugiere es que la progesterona comenzó a degradarse y por eso no fue detectada como tal, por el contrario, se encontraron compuestos que resultan de su degradación, es decir, que la progesterona en las plantas *in vitro* de *A. fourcroydes*, tendría el mismo comportamiento que la progesterona de origen animal reportada en el trabajo de Slavíková.

Este comportamiento sería acelerado en H1 en comparación con H2 generando así la diferencia en los porcentajes detectados para cada metabolito. Al encontrar información que señala una reacción de reducción en progesterona para la obtención de alopregnanolona, es posible que la reducción de pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl-, (2 α)- logre sintetizar 16-allopregnen-3 β -ol-20-one.

Se sugiere que en H1 no se genera una mayor cantidad de progesterona, por el contrario, este metabolito se degradó en mayor cantidad lo que coincide con el porcentaje mayor de pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl-, (2 α)- el cual al experimentar una posible reducción genera a su vez una mayor cantidad de 16-allopregnen-3 β -ol-20-one (figura 3.14).

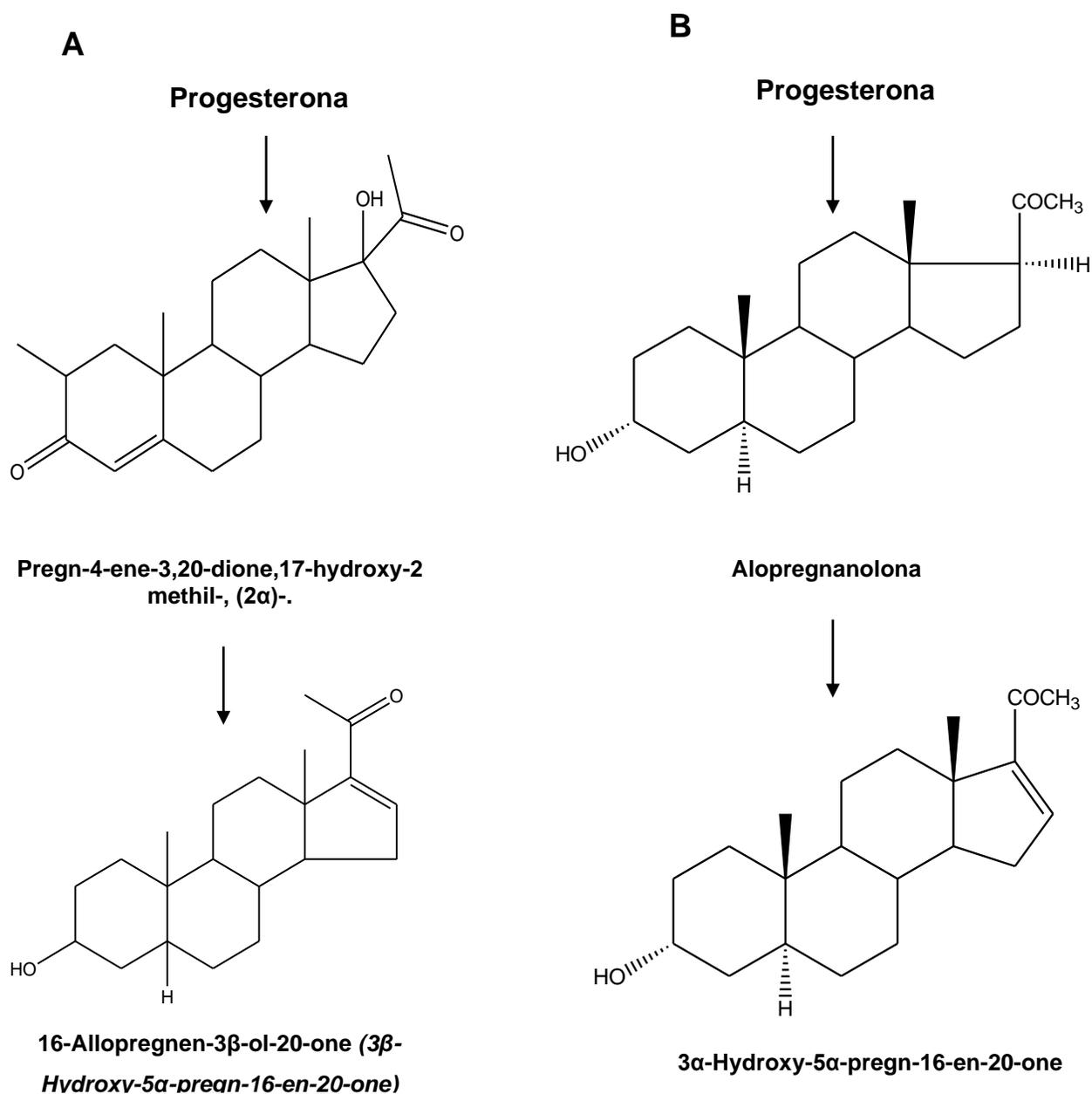


Figura 3.14. Posible degradación de la progesterona en plantas de *A. fourcroydes* derivadas de *in vitro*. En A) el esquema propuesto y en B) el esquema de degradación según Slavíková *et al.*, (2009).

Si bien solo se detectaron derivados del pregnano y no progesterona como tal, Ojogoro y colaboradores (2017), señalan que los productos de transformación de esteroides son de gran relevancia; especialmente porque pueden exhibir distintas actividades biológicas, aunque difieran sólo por una ligera modificación estructural de sus cadenas laterales.

Una modificación en la disposición de los átomos periféricos y/o grupos funcionales de estos compuestos puede modificar su farmacóforo, haciendo que sus productos resultantes se unan a diferentes ligandos (receptores nucleares) y provoquen respuestas biológicas no deseadas, por ejemplo, activación o desactivación de ciertos genes.

El farmacóforo se refiere a la disposición electrónica y espacial de los átomos de un compuesto, que determina su unión óptima con un sitio biológico objetivo para desencadenar o bloquear la señalización biológica (Overington *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que la modificación estructural de ubicaciones clave en la molécula de progesterona (figura 3.15) no solo modifica su actividad, sino que los productos resultantes también pueden demostrar actividad en otras vías de esteroides (Besse y Garric, 2009). Los receptores nucleares diana para cada esteroide (en este caso progesterona) son relativamente específicos, por ejemplo, un grupo hidroxilo en el carbono 3 confiere actividad estrogénica y pequeñas modificaciones como la sustitución o adición de un grupo funcional pueden cambiar su actividad biológica (Ojogoro *et al.*, 2017).

Cabe señalar que los compuestos 16-allopregnen-3 β -ol-20-one (también denominado 3 β -hydroxy-5 α -pregn-16-en-20-one) y pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl-, (2 α) que son sugeridos como causantes de la diferencia de tamaño y perfiles químicos en los grupos de plantas estudiados, conservan en su estructura un grupo hidroxilo en el carbono 3 por lo que conservarían su actividad estrogénica.

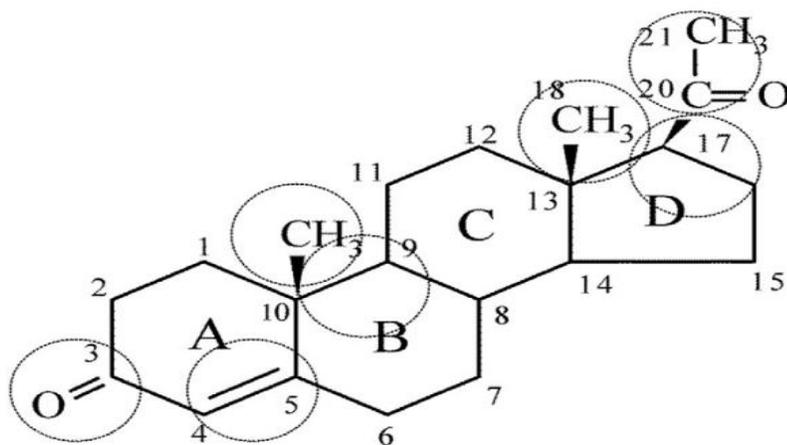


Figura 3.15. Puntos clave en la estructura química de la progesterona, señalados en círculos (tomado de Ojogoro *et al.*, 2017).

La presencia de estructuras similares a progesterona y derivados complementa el argumento respecto a la plasticidad fenotípica y el proceso de aclimatación (sección 3) puesto que la respuesta de las plantas al estrés abiótico depende de varios factores, pero las fitohormonas se consideran las sustancias endógenas más importantes para modular las respuestas fisiológicas y moleculares para la supervivencia (Fahad, *et al.*, 2015).

Por su parte Hao *et al.*, (2019) mencionan que el papel de esta hormona (progesterona) en las plantas no está comprendido totalmente, aunque en las últimas décadas se ha generado una amplia gama de estudios sobre progesterona natural en plantas.

La contribución de estas investigaciones permite establecer que esta hormona es importante en el metabolismo vegetal, Janeczko *et al.*, (2003) demostró que estimula el desarrollo generativo en plantas, mientras que Janeczko (2012), señala que la progesterona regula el crecimiento según la concentración, por ejemplo, una concentración de 1 μM de progesterona aplicada a plántulas de trigo *in vitro* estimuló el crecimiento de hojas y raíces, pero inhibió dicho crecimiento cuando se aplicó en concentraciones 10 veces mayores (Janeczko 2000, citado en Janeczko, 2012).

También se sabe que progesterona aumenta la cantidad de minerales (calcio, magnesio, fósforo y azufre) necesarios para los procesos de crecimiento de las plantas (Janeczko, 2012). Por su parte Janeczko, *et al.*, (2015), estudiaron el papel de la progesterona en la fotosíntesis encontrando que es posible la unión de este compuesto a la enzima RUBISCO, con esta unión sería capaz de regular la actividad de la enzima en etapas específicas de la fotosíntesis.

Los resultados presentados en este trabajo y la información recabada plantean nuevas cuestiones por analizar: ¿son los compuestos detectados la razón de que las plantas sean pequeñas? O ¿la planta sintetiza estos compuestos debido a su tamaño? ¿la progesterona afecta el crecimiento de las plantas de henequén? ¿se genera el mismo efecto en plantas obtenidas mediante *in vitro* a aquellas obtenidas mediante métodos de propagación tradicionales? ¿afecta de manera similar a todo el género *Agave* o es único para esta especie? Preguntas que, a futuro, mediante el desarrollo de la investigación científica y la colaboración con investigadores afines al tema, se esperan resolver para generar conocimiento en beneficio de la humanidad.

CAPITULO IV

DISCUSION GENERAL

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron plantas de *Agave fourcroydes* derivadas de cultivos *in vitro* las cuales fueron seleccionadas inicialmente de acuerdo con características morfológicas observadas. Se conformaron los grupos contrastantes H1 y H2, en H1 se agruparon las plantas “pequeñas” y en H2 se agruparon las plantas “grandes”, de igual manera se analizó el perfil químico de ambos grupos.

Como resultado de la selección inicial, las plantas en H2 resultaron con una longitud de ápice dos veces superior y un contenido de biomasa 3 veces superior en comparación con H1. Con respecto a la composición química, se encontraron diferencias cualitativas importantes en los perfiles químicos, el perfil más diverso se registró en H2 puesto que se detectaron 5 diferentes sapogeninas en comparación con H1 en donde se detectaron 3 tipos de sapogeninas, los derivados de pregnano fueron otros componentes detectados y en los que también se encontraron diferencias puesto que en H1 se detectaron 2 derivados en comparación con H2 en donde se detectaron 3 derivados.

Bajo las condiciones experimentales establecidas, existe una diferencia visual clara en los grupos conformados, esta diferencia es estadísticamente significativa, establecida mediante la prueba *t* de comparación de medias con $p=0.001$ (tabla 4.1, para mayor información revisar anexo 2), se sugiere que el motivo es el origen de las plantas utilizadas en el desarrollo de este trabajo puesto que fueron obtenidas por micropropagación, sobre esta técnica, Suarez (2020) señala que se obtienen plantas con altos grados de uniformidad genética y fenotípica, sin embargo, una de las limitantes de la técnica es la ocurrencia de altos niveles de variación somaclonal en ciertos tipos de plantas.

Grupo	H1			H2		
	L.A. (cm)	L.H. (cm)	A. H. (cm)	L. A. (cm)	L. H. (cm)	A.H. (cm)
Media	2.95	11.47	1.66	6.06	16.27	2.02
S.E *	0.19	0.55	0.05	0.54	0.64	0.06
Varianza	1.12	9.01	0.09	8.73	12.32	0.12

Tabla 4.1. Parámetros estadísticos aplicados a características morfológicas en plantas agrupadas de *A. fourcroydes*. L.A corresponde a longitud del ápice, L.H corresponde a longitud de la hoja y A.H. presenta los valores del ancho de hoja.

*Error estándar.

En el caso de *Agave fourcroydes*, Infante y colaboradores (2007) compararon la variabilidad genética de plantas de henequén obtenidas por embriogénesis somática, al comparar la similitud de los patrones moleculares de bandas AFLP entre plantas madre e hijas, su trabajo confirmó la estabilidad del proceso de micropropagación y demostró la conservación de características morfológicas, cabe señalar que este estudio no abarcó el análisis químico de las plantas.

Por su parte, Massad y colaboradores (2011), mencionan que la variabilidad genética puede expresarse como diferencias en la identidad o concentración de sustancias químicas vegetales entre genotipos y que el genotipo también puede limitar la variabilidad de la producción de metabolitos secundarios de las plantas lo que podría explicar la clara diferencia cualitativa referente al contenido de sapogeninas que se observa en los perfiles químicos de los grupos establecidos.

Como ejemplo, se menciona el trabajo realizado por Puente-Garza y colaboradores (2017) en plantas de *A. salmiana*, en donde demostró que el proceso de micropropagación incrementó el contenido de sapogeninas esteroidales y en el perfil químico de las plantas se detectaron metabolitos que no se detectaron en las plantas propagadas de manera tradicional, al respecto, Puente-Garza concluye que la micropropagación es una plataforma para manipular el contenido de saponinas aprovechando la plasticidad fenotípica de las plantas.

La plasticidad puede permitir a las plantas asumir el fenotipo más adaptativo en un ambiente particular, amortiguando los efectos de la variación espacial y temporal en la disponibilidad de recursos.

Hermes y Mattson, 1992, señalan que uno de los rasgos donde las plantas muestran plasticidad fenotípica es en el metabolismo secundario, estos autores señalan que los cambios en el perfil composicional que no alteran la asignación de recursos entre el crecimiento y el metabolismo secundario pueden no tener costo para la planta en forma de capacidad competitiva reducida.

Al ser las sapogeninas esteroidales del henequén el enfoque de este estudio es clave resaltar las diferencias en composición química de los grupos formados sobre todo en cuanto al aspecto cualitativo, en este contexto, la principal sapogenina esteroideal detectada fue tigogenina, en H1 se registró un 29.9% y en H2 el total registrado fue de 35.2%.

La tigogenina es reportada con frecuencia debido a que exhibe una variedad de actividades biológicas, además de ser un compuesto que se utiliza en la industria farmacéutica como material de partida para la síntesis química de dexametasona un corticosteroide muy conocido y que se ha utilizado en muchas afecciones por su efecto antiinflamatorio desde que fue aprobado en 1961 (Sen *et al.*, 2022; Adhikari y Sahu, 2021 Ohta *et al.*, 1997), en la actualidad este medicamento se está utilizando para el tratamiento de la COVID-19 (Beaumont *et al.*, 2023). Tigogenina también es materia prima para otros corticosteroides de importancia como cortisona, cortisol, prednisolona, prednisona, betametasona, triamcinolona, etc (Escamilla-Treviño, 2012) y se sigue explorando su uso para la síntesis de nuevos tipos de fármacos antimicrobianos esteroides (Czajkowska-Szczykowska *et al.*, 2022).

La diosgenina es otra sapogenina esteroideal que marca diferencia, puesto que en H1 no fue detectada y en H2 constituye el 2.7% del total de metabolitos detectados en este grupo. Esta sapogenina está ganando atención gracias a su efecto beneficioso sobre enfermedades crónicas como el colesterol, diabetes, cáncer y otras enfermedades metabólicas (Arya *et al.*, 2023) de igual manera es un precursor importante de los fármacos esteroides betametasona e hidrocortisona, este último es un glucocorticoide utilizado en el tratamiento de la COVID-19 (Sen *et al.*, 2022; Herráiz, 2017), por su parte la betametasona es un potente antiinflamatorio.

Ambas sapogeninas son de gran importancia económica considerando que, en China, quien se destaca como el mayor exportador a nivel mundial, se pueden producir 400 y 300 toneladas de diosgenina y tigogenina respectivamente cada año (Chen y Wu, 1994).

Respecto a la presencia de tigogenina en Agavaceae, Chen y Wu (1994), reportan un rendimiento del 0.12% en base a peso fresco de hojas de *Agave dong 1*, esta especie fue obtenida a partir de plantas de *Agave sisalana* introducidas y cultivadas en el sur de China (Ding *et al.*, 1993), siendo el principal material vegetal utilizado en la extracción de fibra dura en ese país, en este mismo estudio se reporta un rendimiento del 0.01% en base a peso fresco para *Agave fourcroydes*, el rendimiento obtenido por Chen y Wu contrasta con los obtenidos en el desarrollo del presente estudio pues se obtuvo un rendimiento del 0.07% y 0.08 % en base a peso seco para H1 y H2 respectivamente.

Por su parte, Wang y colaboradores (2014), reportan un rendimiento de 41.5 mg/g de tigogenina en *A. sisalana*, cabe señalar que este rendimiento se obtuvo mediante hidrólisis de saponinas y fue la misma técnica que se aplicó en el desarrollo del presente estudio, sin embargo, los resultados obtenidos son contrastantes puesto que se reportan una extracción de 130.2 mg/g para H1 y 144.4 mg/g para H2 lo que indica un rendimiento aproximadamente 3 veces superior en comparación con los reportado por Wang *et al.*, siendo que tanto *A. fourcroydes* como *A. sisalana* son utilizadas para la extracción de fibra. Sí bien es cierto que *A. fourcroydes* experimentó una reducción en su producción, actualmente va retomando importancia por lo que los resultados obtenidos son de importancia para el fomento de su cultivo y con ello un aprovechamiento integral de la especie.

Tigogenina también se ha aislado en forma de triglicósidos en plantas del género *Hosta* y *Tribulus* (Michalak *et al.*, 2020), de acuerdo con Wilkins y colaboradores, (1996) se ha logrado aislar hasta 8.1mg/kg en hojas de *Tribulus terrestris*, este rendimiento es inferior al reportado para henequén en este estudio, además, la especie *T. terrestris* es considerada como una maleza en cultivos como algodón y frijol en México (Delgado *et al.*, 2020).El valor en el mercado de los compuestos glucosídicos (entre ellos las saponinas) en el 2023 fue de 0.99 mil millones de dólares y se pronostica un crecimiento en la demanda tal que su valor en el mercado para 2028 sea de 1.2 mil millones de dólares (Marketdataforecast, 2023).

Informes sobre tigogenina en henequén son escasos puesto que la mayoría de los trabajos realizados en *Agave*, son en especies como *A. americana*, *A. salmiana*, *A. tequilana*, *A. sisalana*, etc., por su impacto económico, además, se enfocan en la búsqueda de nuevas sapogeninas, la detección y/o cuantificación de diosgenina u otros compuestos bioactivos y la búsqueda de nuevas actividades biológicas, en este contexto, el presente estudio sienta las bases para el desarrollo de futuras investigaciones en *A. fourcroydes* que se enfoquen en aspectos como el mejoramiento del contenido de sapogeninas, la selección en base a un marcador químico entre otros temas relacionados.

En el extracto de henequén, además de sapogeninas, se detectaron compuestos como 16-allopregnen-3 β -ol-20-one y pregn-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2 methyl, los cuales son clasificados como derivados del pregnano y también son señalados como causantes de la diferencia entre grupos, en ambos casos existe una diferencia de contenido, la cual es más notable en el caso de 16-allopregnen-3 β -ol-20-ona pues se reporta que H2 contiene el doble de porcentaje detectado respecto a H1.

Ambos metabolitos comparten ciertos rasgos estructurales con progesterona, los informes obtenidos sobre este compuesto señalan que es una hormona considerada importante en el metabolismo vegetal y que modificaciones en su estructura resultan en productos que pueden demostrar actividad en otras vías, es importante señalar estas características puesto que se sugiere que los compuestos detectados en el estudio podrían presentar actividad que afecte el desarrollo de las plantas existiendo la posibilidad de que sean compuestos derivados de progesterona, esto basándose en el hecho de que comparten un esqueleto químico en común con esta molécula. Como se ha señalado anteriormente, pequeñas modificaciones en la estructura de esteroides pueden cambiar la actividad biológica de estos compuestos, de cumplirse esta teoría, el cultivo de *A. fourcroydes* adquiriría mayor importancia de la que actualmente goza.

Lo cierto es que al encontrar metabolitos con estructuras similares a progesterona se puede dar pauta para generar estudios enfocados en este compuesto y su efecto en *Agave fourcroydes* o dirigir las investigaciones en la actividad biológica que pudieran presentar los compuestos para su posible uso en la salud humana, animal o en agricultura, sin duda alguna es un campo desconocido y con potencial para desarrollar.

CAPITULO V

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones analizadas, el tamaño de la planta de *Agave fourcroydes* no está relacionado de manera directa con el contenido total de sapogeninas esteroidales.

Las plantas utilizadas para desarrollar este trabajo se clasificaron en grupos contrastantes a pesar de que fueron obtenidas por un proceso de micropropagación y estar bajo igualdad de condiciones ambientales.

Existe una diferencia en el perfil químico de los grupos establecidos.

En el grupo H1 se registraron 3 sapogeninas mientras que en el grupo H2 se detectaron 5 sapogeninas por lo que este último resulto más diverso.

En el extracto de sapogeninas de *Agave fourcroydes* también se detectaron otros componentes químicos conocidos como derivados del pregnano, estos compuestos fueron considerados en el desarrollo del trabajo puesto que comparten características con las sapogeninas como la misma vía de síntesis y ciertas características estructurales.

La tigogenina es el componente principal del extracto de sapogeninas en plantas de henequén derivas de cultivo *in vitro*, 16-allopregnen-3 β -ol-20-ona (derivado de pregnano) y 11- α -Hydroxy-oxodiosgenina (sapogenina) se encuentran en segundo y tercer lugar respectivamente.

Se reporta un rendimiento promedio de 144.4 mg/g de tigogenina en plantas de henequén derivadas de *in vitro*.

Los derivados del pregnano detectados poseen ciertas características en su estructura química que los relaciona con la progesterona, una hormona de la cual se ha reportado que tiene un papel importante en la regulación del crecimiento vegetal según estudios anteriores.

CAPITULO VI

PERSPECTIVAS

El henequén es una especie vegetal que en años anteriores formó parte importante de la economía del estado de Yucatán y actualmente su cultivo va tomando auge. Esta planta pertenece al género *Agave* junto con más de 250 especies entre las cuales se sabe que más de 50 contienen saponinas. De la especie *Agave fourcroydes* también se sabe que es fuente de saponinas esteroidales, estas moléculas son de importancia gracias a la amplia gama de actividad biológicas que se les atribuyen, sin embargo su principal uso es como materia prima para la elaboración de medicamentos de tipo esteroide y hormonas.

En vista del notable incremento en la demanda del henequén, surgen cuestiones sobre el uso, manejo e implicaciones que su cultivo intensivo pueda conllevar.

En los últimos años la preocupación por el cuidado del medio ambiente ha aumentado, siendo las actividades agrícolas un factor de impacto en la conservación de este, por lo tanto, es de esperar que el cultivo del henequén se lleve a cabo considerando aspectos como la conservación del ambiente.

En este contexto, el término economía circular ha empezado a ganar terreno, su objetivo es reducir la entrada de materias primas en el sistema productivo, reutilizar, reciclar o valorizar los residuos producidos por las diferentes industrias, aplicar el concepto de circularización y crear nuevos modelos productivos rentables capaces de enfrentar los desafíos ambientales actuales (Jiménez -López *et al.*, 2020).

Siendo la extracción de fibra el principal uso del henequén, se deja gran parte de material sin uso específico y se considera que la acumulación de estos desperdicios podrían ser un problema a futuro, es por eso que, en la búsqueda del aprovechamiento integral de esta planta, surge como alternativa la utilidad de sus compuestos bioactivos en los que sobresalen las saponinas esteroidales.

Sin embargo, hablar de esta estrategia en la actualidad no sería posible pues aún no cuenta con suficiente base de estudio, es por eso que el presente trabajo se desarrolló a manera de antecedente en el aprovechamiento de estos compuestos en el henequén.

En este estudio se realizó una selección inicial en donde se conformaron grupos de plantas de *Agave fourcroydes* en base a características morfológicas sobresalientes para realizar análisis de sus componentes bioactivos y saber si existe una relación entre el tamaño de la planta y la cantidad de saponinas esteroidales presentes en sus tejidos a manera de encontrar un primer criterio para una selección temprana de individuos con el potencial para generar concentraciones altas de estos metabolitos.

Las plantas utilizadas en este estudio fueron obtenidas por la técnica de micropropagación, el proceso de obtención de plantas de *Agave fourcroydes* a través de esta técnica asegura una estabilidad morfológica de las plantas, sin embargo, en cuanto al perfil químico si existe variedad, la cual puede volver factible la clasificación de plantas por su fenotipo químico también conocido como quimiotipado, que normalmente tiene un efecto discreto y base genética (Despinasse *et al.*, 2020).

Siendo las saponinas compuestos bioactivos de interés en el henequén y con alta demanda en el sector farmacéutico e industrial por su rango de actividad biológica, la implementación del quimiotipado brindaría un efecto positivo para el aprovechamiento integral de este agave y demás compuestos bioactivos, agregando valor a la cadena de consumo.

En este sentido trabajos como los de Puente-Garza y colaboradores (2017), sientan las bases en lo que podrían ser programas de mejoramiento del contenido de saponinas y otros compuestos bioactivos mediante la técnica de micropropagación como lo son los derivados del pregnano que se lograron detectar en los extractos analizados, de los cuales, el compuesto identificado como 16-allopregnen-3 β -ol-20-one presenta una estructura similar a la alopregnanolona, este metabolito es un esteroide neuroactivo al que se le atribuyen neuro protección en caso de lesión, la reducción de los síntomas de enfermedades neurodegenerativas, efecto benéfico en el dolor neuropático y es candidato para el tratamiento de los trastornos del estado de ánimo y ansiedad (Melcangi y Panzica, 2013).

Se sugiere implementar una estrategia similar a la de este trabajo para el estudio de este compuesto dado la importancia que posee, tratar de encontrar una manera de aprovechar el contenido de los compuestos bioactivos del henequén agrega valor a su cultivo e incentiva a fomentar la economía circular en el desarrollo de esta especie.

En este trabajo se reportó un rendimiento de hasta 144.4 mg/g, este rendimiento fue obtenido por hidrolisis acida, este método produce subproductos, y cantidades de disolventes orgánicos como desecho, es por eso que estudiar las condiciones ideales de extracción para un posible mejor rendimiento, así como la aplicación de métodos más amigables con el medio ambiente son un área importante que necesita estudiarse ampliamente. Otros temas de investigación en el henequén son el aprovechamiento de sus compuestos bioactivos mediante la biotransformación, el desarrollo de nuevos productos y aplicaciones en base a las propiedades de las sapogeninas esteroidales, sin descuidar la investigación enfocada en entender a fondo el comportamiento de las sapogeninas de *A. fourcroydes*, pues factores como la edad de la planta, factores bióticos y abióticos, estado fisiológico, manejo del cultivo y origen pueden afectar la concentración de estos metabolitos.

BIBLIOGRAFIA

- Adhikari, B., & Sahu, N. (2021). COVID-19 into Chemical Science Perspective: Chemical Preventive Measures and Drug Development. *ChemistrySelect*, 6(9), 2010–2028. doi:10.1002/slct.202100127
- AGARED. (2017). Panorama del aprovechamiento de los agaves en México. Red temática del mexicana aprovechamiento integral sustentable y biotecnología de los agaves-CONACYT-CIATEJ. Recuperado de: https://www.academia.edu/34514972/Los_Agaves?from=cover_page
- Ahumada A., Ortega A., Chito D., Benítez R. (2016). Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): un subproducto con alto potencial biológico. *Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas*, 45(3), 438-469.
- Arya P., Munshi M., Kumar P. (2023). Diosgenin: Chemistry, extraction, quantification and health benefits. *Food Chemistry Advances*, 2, 100170, <https://doi.org/10.1016/j.focha.2022.100170>
- Beaumont, A. L., Rozencwajg, S., Peiffer-Smadja, N., & Montravers, P. (2023). COVID-19: Brief overview of therapeutic strategies. *Anaesthesia, critical care & pain medicine*, 42(1), 101181. <https://doi.org/10.1016/j.accpm.2022.101181>
- Besse, J.P., Garric, J. (2009). Progestagens for human use, exposure and hazard assessment for the aquatic environment. *Environ. Pollut.* 157 (12), 3485–3494
- Betancourt Velázquez E. (2003). Superóxido dismutasa en plantas de Henequén (*Agave fourcroydes* Lem.). Tesis de maestría. Centro de Investigación Científica del estado de Yucatán. México, pp.11
- Chen Y., Wu J., Yu D., Du X. (2021). Advances in steroidal saponins biosynthesis. *Plant* (2021) 254:91 <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03732-y>
- Chen Y.F., Yang C.H, Chang M.S, Ciou Y.P, Huang Y.C. (2010). Foam Properties and detergent ability of the saponins from *Camellia oleifera*. *International Journal of Molecular Sciences*. 11(11), 4417–4425.
- Chen, Y., & Wu, Y. (1994). Progress in Research and Manufacturing of Steroidal Saponins in China. *Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants*, 2(3), 59–70. doi:10.1300/j044v02n03_08
- Cheok, C. Y., Salman, H. A. K., & Sulaiman, R. (2014). Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Research International*, 59, 16–40. doi:10.1016/j.foodres.2014.01.057
- Colunga P, (1998). Origen, variación y tendencias evolutivas del Henequén (*Agave fourcroydes* Lem). *Boletín de la Sociedad Botánica de México*, (62) 109-128.
- Czajkowska-Szczykowska D., Olchowik-Grabarek E., Sękowski S., Zarkowski J., Morzycki J.W.(2022). Concise synthesis of E/F ring spiroethers from tigogenin. Carbaanalogs of steroidal saponins

-
- and their biological activity. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 224, 106174, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106174>
- Deepak, D., Khare, A., & Khare, M. P. (1989). Plant pregnanes. *Phytochemistry*, 28(12), 3255–3263. doi:10.1016/0031-9422(89)80327-9
- Delgado, J. C., de la Cruz, S., Clemente, J., & Solano, C. (2020, November). Malezas asociadas al cultivo de algodón en Chihuahua, México. In Memoria XLI Congreso Nacional de la Ciencia de la Maleza (pp. 24-26).
- Despinasse Y., Moja S., Soler C., Jullien F., Pasquier B., Bessiere J.M., Nous C., Baudino, S., Nicole F., (2020). Structure of the chemical and genetic diversity of the true lavender over its natural range. *Plants*, 9,1640. <https://doi.org/10.3390/plants9121640>.
- Dewick P. (2002). Medicinal natural products, a biosynthetic approach. Copyright, 174.
- Ding Y., Tian R. H., Yang C. R., Chen Y. Y., Nohara T. (1993). Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong No. 1. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 41(3), 557-560. <https://doi.org/10.1248/cpb.41.557>
- Dueñas, A. C. (2016). Presencia de saponinas en *Agave* spp. de México. *BIOZ Revista de Divulgación UACB*, 1(1).
- Escamilla-Treviño, L.L. (2012). Potential of Plants from the Genus *Agave* as Bioenergy Crops. *Bioenerg. Res.* 5, 1–9. <https://doi.org/10.1007/s12155-011-9159-x>
- Esqueda V., M., Coronado M. L., Gutiérrez A. H., Fragoso G. (2011). *Agave angustifolia* Haw. Técnicas para el trasplante de vitroplantas a condiciones de agostadero. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México 20 p.
- Evans, W. C., & Evans, D. (2009). *Saponins, cardioactive drugs and other steroids. Trease and Evans' Pharmacognosy*, 304–332. doi:10.1016/b978-0-7020-2933-2.00023-x
- Fahad S., Hussain S., A. Bano, S. Saud, S. Hassan, D. Shan, F.A. Khan, F. Khan, Y.T. Chen, C. Wu, M.A. Tabassum, M.X., Chun, M. Afzal, A. Jan, M.T. Jan, J.L. Huang. (2015). Potential role of phytohormones and plant growth-promoting rhizobacteria in abiotic stresses: consequences for changing environment, *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22 4907–4921.
- Faizal A., Geelen D. (2013). Saponins and their role in biological processes in plants. *Phytochem Rev* (2013) 12:877–893. DOI 10.1007/s11101-013-9322-4
- Francis, G., Kerem, Z., Makkar, H.P.S., Becker, K. (2002). The biological action of saponins in animal systems: a review. *Br. J. Nutr.* 88, 587–605. <http://dx.doi.org/10.1079/BJN2002725>.
- Gabr N., Ghaly N., Mina S. (2022). Structural characterization of three cytotoxic steroidal saponin from the leaves of *Agave desmetiana* Hort. *Phytochemistry* 195 (2022) 113057 <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2021.113057>
-

-
- García S., Corzo I., Silva F., Soto A., Rodríguez D., Pardo J., León J. (2022). Comparative study of steroidal saponins content in leaves of five *Agave* species. *Journal Society Chemical Industry*. DOI 10.1002/jsfa.11912
- Globenewswire. (11 de febrero de 2022). *Saponin Market Size Estimated USD 1149.2 Million by 2028, from USD 956.8 Million in 2022, at a CAGR of 3.1%*. Absolute Reports.
<https://www.globenewswire.com/en/newsrelease/2022/02/11/2383426/0/en/Saponin-Market-Size-Estimated-USD-1149-2-Million-by-2028-from-USD-956-8-Million-in-2022-at-a-CAGR-of-3-1-Absolute-Reports.html#:~:text=filingsmedia%20partners-,Saponin%20Market%20Size%20Estimated%20USD%201149.2%20Million%20by%202028%20C%20from,CAGR%20of%203.1%25%20%7C%20Absolute%20Reports>
- González L., Almaraz N., Proal J.B., Robles F., Valencia G., Quintos M. (2013). Surfactant properties of the saponins of *Agave durangensis*, application on arsenic removal. *International Journal of Engineering an Applied Sciences*. 4 (2) 87-94.
- Güçlü-Üstündağ, Ö., & Mazza, G. (2007). Saponins: Properties, Applications and Processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 47(3), 231–258. doi:10.1080/10408390600698197.
- Hao, J., Li, X., Xu, G., Huo, Y., & Yang, H. (2019). Exogenous progesterone treatment alleviates chilling injury in postharvest banana fruit associated with induction of alternative oxidase and antioxidant defense. *Food Chemistry*. doi:10.1016/j.foodchem.2019.02.02
- Heng, M. Y., Tan, S. N., Yong, J. W. H., Ong, E. S. (2013). Emerging green technologies for the chemical standardization of botanicals and herbal preparations. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 50, 1–10.
- Herms, D. A., & Mattson, W. J. (1992). The Dilemma of Plants: To Grow or Defend. *The Quarterly Review of Biology*, 67(3), 283–335. doi:10.1086/417659
- Hernández S., Rosa, Lugo C., Eugenia C., Díaz J., Lourdes Villanueva, Socorro (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. e-Gnosis,(3),0.[fecha de Consulta 19 de Abril de 2022]. ISSN: Disponible en:
<https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000311>
- Herráiz, I. (2017). Chemical Pathways of Corticosteroids, Industrial Synthesis from Saponins. *Methods in Molecular Biology*, 15–27. doi:10.1007/978-1-4939-7183-1_2
- Hostettmann K., & Marston A. (2005). Saponins. *Encyclopedia of Analytical Science*, 205–209. doi:10.1016/b0-12-369397-7/00548-3
- Infante, D., Osorio, M., Molina, S., & Gonzalez, G. (2007). Genetic improvement of asexually propagated plants. *Acta Horticulturae*, (738), 721–727. doi:10.17660/actahortic.2007.738.95

-
- International trade center (ITC). (28 de noviembre de 2023). *Trade map: trade statistics for international business development. Monthly, quarterly and yearly trade data*. Import & export values, volumes, growth rates, market shares, etc. <https://www.trademap.org/Index.aspx>
- Iser, M., Valdivia, M., Figueredo, L., Núñez, E., Mas, D., & Martínez, Y. (2020). Secondary metabolites, quality indicators and organoleptic characteristics of stems meal from *Agave fourcroydes* (Henequen). *Cuban Journal of Agricultural Science*, 54(1).
- Janeczko A. (2000) Influence of selected steroids on plant physiological processes – especially flowering induction (in Polish). Ph.D. dissertation, Agricultural University, Krakow, Poland.
- Janeczko, A. (2012). The presence and activity of progesterone in the plant kingdom. *Steroids*, 77(3), 169–173. doi:10.1016/j.steroids.2011.10.012
- Janeczko, A., Filek, W., Biesaga-Kościelniak, J., Marcińska, I., & Janeczko, Z. (2003). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72(2), 147–151. doi:10.1023/a:1022291718398
- Janeczko, A., Oklestkova, J., Novak, O., Śniegowska-Świerk, K., Snaczke, Z., & Pocięcha, E. (2015). Disturbances in production of progesterone and their implications in plant studies. *Steroids*, 96, 153–163. doi:10.1016/j.steroids.2015.01.025
- Jiménez-López, C., Fraga-Corral, M., Carpena, M., García-Oliveira, P., Echave, J., Pereira, A., Lourenco-López C., Prieto M., Simal-Gandara, J. (2020). Agriculture wastes valorisation as a source of antioxidant phenolic compounds within a circular and sustainable bio-economy. *Food & Function*. doi:10.1039/d0fo00937g
- Jiménez-Torres, J., Peña-Valdivia, C. B., Padilla-Chacón, D., & García-Nava, R. (2021). Physiological and biochemical responses of *Agave* to temperature and climate of their native environment. *Flora*, 278, 151797. doi:10.1016/j.flora.2021.151797
- Kang L., Zhao Y., Pang X., Yu H., Xiong C., Zhang J., Ma B. (2013). Characterization and identification of steroidal saponins from the seeds of *Trigonella foenum-graecum* by ultra high-performance liquid chromatography and hybrid time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 74, 257–267. doi:10.1016/j.jpba.2012.11.005
- Kongkathip, N., Kongkathip, B., & Noimai, N. (2006). Synthesis of Betamethasone from the Waste of Thai *Agave Sisalana*. *Synthetic Communications*, 36(7), 865–874. doi:10.1080/00397910500464855
- Liu, W., Xiang, H., Zhang, T., Pang, X., Su, J., Liu, H., ... Yu, L. (2021). Development of a New Bioprocess for Clean Diosgenin Production through Submerged Fermentation of an Endophytic Fungus. *ACS Omega*, 6(14), 9537–9548. doi:10.1021/acsomega.1c00010

-
- Mafalda J., Martins, A. P. J., Gallardo, E., & Silvestre, S. (2016). Diosgenin: Recent Highlights on Pharmacology and Analytical Methodology. *Journal of Analytical Methods in Chemistry*, 2016, 1–16. doi:10.1155/2016/4156293
- Marahatha, R., Gyawali, K., Sharma, K., Gyawali, N., Tandan, P., Adhikari, A. & Parajuli, N. (2021). Pharmacologic activities of phytosteroids in inflammatory diseases: mechanism of action and therapeutic potentials. *Phytotherapy Research*, 35(9), 5103-5124.
- Marketdataforecast. (marzo, 2022). Saponin market. Marketdataforecast. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/saponin-market>
- Marketdataforecast. (Noviembre, 2023). Saponin market. Marketdataforecast. <https://www.marketdataforecast.com/market-reports/saponin-market>
- Martínez A. (2020). Química de productos naturales. Universidad de Antioquia- facultad de ciencias farmacéuticas y alimentarias.
- Massad, T. J., Fincher, R. M., Smilanich, A. M., & Dyer, L. (2011). A quantitative evaluation of major plant defense hypotheses, nature versus nurture, and chemistry versus ants. *Arthropod-Plant Interactions*, 5(2), 125–139. doi:10.1007/s11829-011-9121-z
- Melcangi R. C., Panzica, G. C. (2013). Allopregnanolone: State of the art. *Progress in Neurobiology*, 113, 1–5. doi:10.1016/j.pneurobio.2013.09.005
- Michalak, O., Krzeczyński, P., Cieślak, M., Cmoch, P., Cybulski, M., Królewska-Golińska, K., J. Kaźmierczak-Barańskab, B. Trzaskowskid, Ostrowska, K. (2020). Synthesis and anti-tumour, immunomodulating activity of diosgenin and tigogenin conjugates. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 105573. doi:10.1016/j.jsbmb.2019.105573
- Miramontes, Luis E. (2001). La industria de esteroides en México y un descubrimiento que cambiaría el mundo. *Revista de la Sociedad Química de México*, 45(3), 102-104. Recuperado en 27 de septiembre de 2022, de http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0583-76932001000300003&lng=es&tlng=es.
- Mora L. J., Reyes A., Flores J.L., Peña V.C., Aguirre J.R. (2011). Variación morfológica y humanización de la sección *Salmianae* del género *Agave*. *Agrociencia*. 45: 445-467.
- Morán-Velázquez, D. C., Monribot-Villanueva, J. L., Bourdon, M., Tang, J. Z., López-Rosas, I., Maceda-López, L. F., Alatorre-Cobos, F. (2020). Unravelling Chemical Composition of Agave Spines: News from *Agave fourcroydes* Lem. *Plants*, 9(12), 1642. doi:10.3390/plants9121642
- Nartop, P. (2018). Engineering of Biomass Accumulation and Secondary Metabolite Production in Plant Cell and Tissue Cultures. *Plant Metabolites and Regulation Under Environmental Stress*, 169–194. doi:10.1016/b978-0-12-812689-9.00009-1

-
- Ncube, B., Finnie, J. F. y Van Staden, J. (2012). Calidad desde el campo: El impacto de los factores ambientales como determinantes de la calidad en plantas medicinales. *South African Journal of Botany*, 82, 11-20.
- Novel S. P. (1998) Los incomparables Agaves y Cactus. Trillas (ed). México 211 pp.
- Nunes, S., Santos, C., Moutinho-Pereira, J., Correia, C., Oliveira, H., Ferreira de Oliveira, J. M., Dias, M. C. (2016). Physiological characterization and true-to-typeness evaluation of in vitro and ex vitro seedlings of *Pinus elliottii*: A contribution to breeding programs. *Plant Physiology and Biochemistry*, 107, 222–227. doi:10.1016/j.plaphy.2016.05.039
- Ohta, T., Zhang, H., Torihara, Y., & Furukawa, I. (1997). Improved Synthetic Route to Dexamethasone Acetate from Tigogenin. *Organic Process Research & Development*, 1(6), 420–424. doi:10.1021/op9700338
- Ohtsuki, T., Koyano, T., Kowithayakorn, T., Sakai, S., Kawahara, N., Goda, Ishibashi, M. (2004). New chlorogenin hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 12(14), 3841–3845.
- Ojogoro O., Chaudhary A., Campo P., Sumpter J., Scrimshaw M. (2017). Progesterone potentially degrades to potent androgens in surface waters. *Science of the total environment*, 579: 1876-1884. Doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.11.176>.
- Olvera-García V., Martín del Campo S. T., Gutiérrez-Urbe J. A., & Cardador-Martínez, A. (2015). GC–MS and HPLC–MS–TOF characterization of *Agave atrovirens* extracts. A preliminary study. *Industrial Crops and Products*, 78, 39–47. doi:10.1016/j.indcrop.2015.09.068
- Orestes Guerra de León J. (2009). Los glicósidos esteroidales: aislamiento y elucidación estructural. Editorial Feijóo, 7p.
- Overington, J.P., Al-Lazikani, B., Hopkins, A.L., (2006). How many drug targets are there?. *Nature Review Drug Discovery*, 5 (12), 993–996.
- Paul, S. M., Pinna, G., & Guidotti, A. (2020). Allopregnanolone: From molecular pathophysiology to therapeutics. A historical perspective. *Neurobiology of Stress*, 12, 100215. doi:10.1016/j.ynstr.2020.100215
- Pérez, A. J., Calle, J. M., Simonet, A. M., Guerra, J. O., Stochmal, A., & Macías, F. A. (2014). Bioactive steroidal saponins from *Agave offoyana* flowers. *Phytochemistry*, 95, 298–307.
- Piven N., Barredo F., Borges 1., Herrera M., Mayo A., Herrera J. and Robert M. (2001). Reproductive biology of henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (*Agavaceae*). I. *Gametophyte development*. *Am. J. Bot.* 88: 1966 – 1976

-
- Puente-Garza, C. A., García-Lara, S., & Gutiérrez-Urbe, J. A. (2017). Enhancement of saponins and flavonols by micropropagation of *Agave salmiana*. *Industrial Crops and Products*, 105, 225–230. doi:10.1016/j.indcrop.2017.05.014
- Rodríguez-Garay. (2004). La materia prima *Agave tequilana* weber var. azul. Consejo Regulador del Tequila.
- Santos, J. D. G., & Branco, A. (2014). GC-MS Characterisation of saponin from sisal waste and a method to isolate pure hecogenin. *BioResources*, 9(1), 1325-1333.
- Santos-Zea, L., Leal-Díaz, A.M., Cortés-Ceballos, E., Gutiérrez-Urbe, J.A. (2012). Agave (*Agave* spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Curr. Bioact. Compd.* 8, 218–231. <http://dx.doi.org/10.2174/157340712802762410>.
- Sawai S, Saito K (2011) Triterpenoid biosynthesis and engineering in plants. *Front Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2011.00025>
- Sen S., Singh B., Biswas G. (2022). Corticosteroids: a boon or bane for COVID-19 patients? *Steroids*, 188, 109102. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2022.109102>
- Sharma, M., & Kaushik, P. (2021). Vegetable phytochemicals: An update on extraction and analysis techniques. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 36, 102149. doi:10.1016/j.bcab.2021.102149
- Sharma, P., Tyagi, A., Bhansali, P., Pareek, S., Singh, V., Ilyas, A., ... Poddar, N. K. (2021). Saponins: Extraction, bio-medicinal properties and way forward to anti-viral representatives. *Food and Chemical Toxicology*, 150, 112075. doi:10.1016/j.fct.2021.112075
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera) (2019). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. *Gobierno de México*. <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>
- Sidana, J., Singh, B., & Sharma, O. P. (2016). Saponins of Agave: Chemistry and bioactivity. *Phytochemistry*, 130, 22–46.
- Singh P, Singh G, Bhandawat A, Singh G, Parmar R, Seth R, Sharma RK. (2017) Spatial transcriptome analysis provides insights of key gene(s) involved in steroidal saponin biosynthesis in medicinally important herb *Trillium govaniatum*. *Sci Rep* 7:45295. <https://doi.org/10.1038/srep45295>
- Singh, B., & Kaur, A. (2018). Control of insect pests in crop plants and stored food grains using plant saponins: A review. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 93–101. doi:10.1016/j.lwt.2017.08.077
- Slavíková, B., Křištofiková, Z., Chodounská, H., Buděšínský, M., Durán, F. J., Veleiro, A. S., Burton G., Kasal, A. (2009). Allopregnanolone (3 α -Hydroxy-5 α -pregnan-20-one) Derivatives with a Polar

-
- Chain in Position 16 α : Synthesis and Activity. *Journal of Medicinal Chemistry*, 52(7), 2119–2125. doi:10.1021/jm801454a
- Sparg, S. G., Light, M. E., & van Staden, J. (2004). Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, 94(2-3), 219–243. doi:10.1016/j.jep.2004.05.016
- Suárez Padrón E.I. (2020). Cultivo de tejidos vegetales. Fondo Editorial Universidad de Córdoba
- Terry C. & Castellanos L. (2015). Posibilidades del henequén *Agave fourcroydes* Lemaire para el control de plagas en los cultivos. *Agroecosistemas*. 3. 514-524.
- Terry E.C., Terrero M. W., Vicent M. L. (2019). Tamizaje fitoquímico del extracto acuoso del jugo de *Agave fourcroydes* L. *Revista Científica Agroecosistemas*, 7(3), 112-115. <https://aes.ucf.edu.cu/index.php/aes/article/view/324>
- Upadhyay S, Phukan UJ, Mishra DS, Shukla RK (2014) De novo leaf and root transcriptome analysis identified novel genes involved in Steroidal saponin biosynthesis in *Asparagus racemosus*. *BMC Genomics*. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-746>
- Valdivia A, Rubio-Fontanills Y, Hernández-Álvarez L, Jiménez-Rabelo J, Pérez-Hernández Y., Portilla-Tundidor Y. (2018). Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de los extractos de las hojas de *Agave fourcroydes* Lem. (henequén). *Revista Cubana de Plantas Medicinales* [Internet]. 2018 [citado 23 Abr 2022]; 23 (2) Disponible en: <http://www.revplantasmedicinales.sld.cu/index.php/pla/article/view/452>
- Velásquez-Flórez, M. A., & Vélez-Salazar, Y. (2020). Diseño Conceptual de una Planta de Extracción de Saponinas Presentes en el Jugo de Fique. *Ingeniería*, 25(1), 50-67. <https://doi.org/10.14483/23448393.15298>
- Verma, N., & Shukla, S. (2015). Impact of various factors responsible for fluctuation in plant secondary metabolites. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 2(4), 105–113. doi:10.1016/j.jarmap.2015.09.00
- Villanueva Mukul E. (2012). Yucatán, historia y cultura henequenera. La consolidación del nacionalismo revolucionario 1938-1980, tomo II. Senado de la República, 132, 305p
- Vincken, J.-P.; Heng, L.; De Groot, A.; Gruppen, H. (2007) Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*, (68), 275.
- Wang Y., Li X., Sun H., Yi K., Zheng J., Zhang J. & Hao Z. (2014). Biotransformation of steroidal saponins in sisal (*Agave sisalana* Perrine) to tigogenin by a newly isolated strain from a karst area of Guilin, China, *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 28:6, 1024-1033, DOI: 10.1080/13102818.2014.978199

-
- Wei, G., Wei, F., Yuan, C., Chen, Z., Wang, Y., Xu, J., Zhang, Y., Dong, L., Chen, S., (2018). Integrated chemical and transcriptomic analysis reveals the distribution of protopanaxadiol-and protopanaxatriol-type saponins in *Panax notoginseng*. *Molecules* 23, 1773.
- Wilkins A., Miles C., De Kock W., Erasmus G., Basson A., Kellerman T. (1996). Photosensitivity in South Africa. IX. Structure elucidation of a β -glucosidase-treated saponin from *Tribulus terrestris*, and the identification of saponin chemotypes of South African *T. terrestris*. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 63, 327- 334.
- Wina, E., Muetzel, S., & Becker, K. (2005). The Impact of Saponins or Saponin-Containing Plant Materials on Ruminant Production. A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(21), 8093–8105. doi:10.1021/jf048053d
- Yang C.H, Huang Y.G, Chen Y.F , Hang M.H. (2010). Foam Properties, Detergent Abilities and Long-term Preservative Efficacy of the Saponins from *Sapindus mukorossi*. *Journal of Food Drug Analysis*. 18-3, 155–160.
- Yang Y., Laval S., Yu B. (2021). Chemical Synthesis of Saponins. En Baker D.C., *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, (p.p 63-150). Academic Press
- Zhou, Q.-L., Zhu, D.-N., Yang, X.-W., Xu, W., Wang, Y.-P., (2018). Development and validation of a UFLC–MS/MS method for simultaneous quantification of sixty-six saponins and their six aglycones: application to comparative analysis of red ginseng and white ginseng. *J. Pharmaceut. Biomed. Anal.* 159, 153–165.
- Zhu JH, Li HL, Guo D, Wang Y, Dai HF, Mei WL, Peng SQ. (2018). Identification, characterization and expression analysis of genes involved in steroidal saponin biosynthesis in *Dracaena cambodiana*. *J Plant Res* 131:555–562. <https://doi.org/10.1007/s10265-017-1004-7>.

ANEXOS

ANEXO 1

Porcentajes detectado de cada metabolito en los extractos de producto de hidrolisis por cada grupo de plantas establecido de *A. fourcroydes*, siendo H1 el grupo de plantas pequeñas y H2 el grupo de plantas grandes.

% detectado en extracto										
	H1					H2				
	1	2	3	Media	D.E	1	2	3	Media	D.E
Metabolito*										
AP	32.8	33.8	17.1	27.9	9.3	15.4	13.1	5.9	11.5	4.9
PDH	8.4	9.7	4	7.4	2.9	6.5	3.4	4.4	4.8	1.5
DG	ND*	ND*	ND*	/	/	2.3	2.1	3.6	2.7	0.8
TG	34.7	23.5	31.4	29.9	5.7	31.7	39.9	33.9	35.2	4.2
NT	4.7	4.2	7.8	5.6	1.9	7.4	8.6	6.1	7.4	1.2
SP	ND*	ND*	ND*	/	/	2.3	3.4	4.4	3.4	1.0
HG	9.6	17	6.5	11.0	5.3	9.7	8.6	16.3	11.5	4.1

*clave y significado correspondiente a cada metabolito

Metabolito	Clave
16-allopregnen-3 β -ol-20-ona	AP
Pregnen-4-ene-3,20-dione,17-hydroxy-2-methyl-, (2 α)	PDH
Diosgenina	DG
Tigogenina	TG
Neotigogenina	NT
Spirostan-3-ona, (5 α -,25R)	SP
11- α -Hydroxy-oxodiosgenina	HG

ANEXO 2

Todos los datos presentados fueron obtenidos con el programa estadístico SigmaPlot® versión 11.0

Análisis estadístico para carácter morfométrico de longitud de ápice

Prueba de *t*

Grupo	Media	Desviación estándar	Error estándar	I.C.M*	Percentiles	
					25%	75%
H1	3.10 ^a	1.16	0.21	0.43	2.4	3.8
H2	6.05 ^b	2.95	0.53	1.10	3.6	8.2

*Intervalo de confianza de la media

Estadístico U de Mann-Whitney= 177
T=642 (P=<0.001)

La diferencia entre los valores de la media entre ambos grupos es mayor de lo que se esperaría por casualidad, hay una diferencia estadísticamente significativa (P=<0.001)

Análisis estadístico para carácter morfométrico de longitud de hoja

Prueba de *t*

Grupo	Media	Desviación estándar	Error estándar	I.C.M*	Percentiles	
					25%	75%
H1	11.47 ^a	3.0	0.54	1.12	10	13.5
H2	16.26 ^b	3.5	0.64	1.30	13.5	18.3

*Intervalo de confianza de la media

t= -5.69 con 58 grados de libertad (p=<0.001)

Intervalo de confianza del 95 por ciento para la diferencia de las medias: -6.48 a -3.11

La diferencia entre los valores de la media entre ambos grupos es mayor de lo que se esperaría por casualidad, hay una diferencia estadísticamente significativa (P=<0.001)
Poder de la prueba realizada con alfa= 0.05: 1.0

Análisis estadístico para carácter morfométrico de ancho de hoja

Prueba de t

Grupo	Media	Desviación estándar	Error estándar	I.C.M*	Percentiles	
					25%	75%
H1	1.66 ^a	0.30	0.05	0.11	1.5	1.9
H2	2.01 ^b	0.34	0.06	0.13	1.8	2.1

*Intervalo de confianza de la media

t= -4.214 con 58 grados de libertad (p=<0.001)

Intervalo de confianza del 95 por ciento para la diferencia de las medias: -0.526 a - 0.187

La diferencia entre los valores de la media entre ambos grupos es mayor de lo que se esperaría por casualidad, hay una diferencia estadísticamente significativa (P=<0.001) Poder de la prueba realizada con alfa= 0.05: 0.989

Anexo 3

Cuantificación absoluta de tigogenina

Contenido de tigogenina (mg/g)		
	H1	H2
1	131.45	126.64
2	69.55	189.67
3	189.55	116.94
Media	130.18	144.42
Desviación estándar	60.01	39.49
Error estándar	34.65	22.80