

Actividad espermicida de saponinas esteroidales y triterpénicas extraídas de diferentes plantas

Spermicidal activity of steroidal and triterpenoid saponins extracted from various plants

QF. Vanessa Gallego Londoño, QF. Susana Arango Villa, Dra. Luisa Ospina Medina, Dr. Víctor Arango Valencia, Dr. Walter Cardona Maya

Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.

RESUMEN

Introducción: la planificación familiar se ha planteado como un mecanismo para permitirle a las parejas decidir el momento adecuado de tener hijos. Sin embargo, estudios realizados por la Organización Mundial de la Salud han demostrado que esta no es solo importante en el interior de los núcleos familiares, porque los jóvenes generalmente inician su vida sexual desde muy temprana edad, lo cual hace necesario establecer estrategias para promover la salud sexual en este grupo etario.

Objetivos: evaluar si la estructura molecular de las saponinas influye en la actividad espermicida que estas reportan e indagar si existen diferencias en el rendimiento de las saponinas triterpénicas y los esteroides como agentes espermicidas.

Métodos: el proceso de obtención del extracto polar de cada una de las plantas se obtiene bajo el esquema general descrito sobre las saponinas esteroides. La evaluación previa de las muestras de semen se realizó bajo los protocolos propuestos por el manual de la Organización Mundial de la Salud de metodologías para el examen y procesamiento del semen humano de 2010.

Resultados: las saponinas con núcleo triterpénico promueven una disminución significativa de la movilidad espermática ($p < 0,05$) al ser comparadas con aquellos tratamientos con extractos obtenidos a partir de plantas con núcleo esteroide. Además se observó diferencia entre una misma especie proveniente de diferentes lugares.

Conclusión: las plantas seleccionadas para el estudio permiten observar diferencias entre los núcleos triterpénicas y esteroides.

Palabras clave: espermatozoide, sapogenina, núcleo triterpenoide, núcleo esteroide, espermicida.

ABSTRACT

Introduction: family planning is the mechanism allowing couples to choose the right moment to have children. However, studies conducted by the World Health Organization have shown that planning is not only important within households. Young people usually start their sex life at a very early age, which makes it necessary to establish strategies to promote sexual health in this age group.

Objectives: determine whether the molecular structure of saponins influences their spermicidal activity, and contrast the performance of triterpenoid and steroidal saponins as spermicidal agents.

Methods: polar extract of each plant was obtained by the general procedure described for steroidal saponins. Preliminary evaluation of semen samples was conducted following the methodologies recommended by the World Health Organization for the examination and processing of human semen (2010).

Results: triterpenoid core saponins bring about a significant decrease in sperm mobility ($p < 0.05$) in comparison with treatments based on extracts from steroidal core plants. Differences were also found between specimens of the same species collected from different locations.

Conclusion: the plants selected for the study show differences between the triterpenoid and steroidal cores.

Key words: sperm, sapogenin, triterpenoid core, steroidal core, spermicide.

INTRODUCCIÓN

El número de embarazos no deseados y la aparición de infecciones de transmisión sexual (ITS) en la población joven es un problema recurrente de salud pública en todo el mundo.¹ El mecanismo de prevención de ITS y de planificación más popular en la población es el condón, debido seguramente al bajo costo y la facilidad en su uso, sin embargo los resultados obtenidos por la OMS permiten evidenciar que si bien es cierto que los condones son un método anticonceptivo clave para los jóvenes, muchos de ellos no los usan porque los consideran como un símbolo de desconfianza y creen que su uso disminuye la intimidad y el placer.^{2,3} Es debido a esto que otros métodos también de barrera como los espermicidas se presentan como una opción interesante, porque son un método de bajo costo y fácil uso, controlado principalmente por la mujer. También constituyen una importante alternativa para la población joven que practica relaciones sexuales ocasionales, además de no generar cambios hormonales en las mujeres y que se puede discontinuar su administración sin grandes repercusiones.⁴

Los espermicidas evitan la fecundación, gracias a que son una barrera química que puede matar o inmovilizar los espermatozoides, para impedir que estos entren al cérvix y lleguen finalmente al oocito; deben ser métodos seguros y no contener agentes irritantes para la mucosa vaginal o del pene,³ sin embargo, a los espermicidas que se encuentran hoy día que en general están fabricados sobre la base de un surfactante no iónico denominado nonoxinol-9, cuyo mecanismo de acción consiste en la disolución de los lípidos de membrana del espermatozoide, que causa su muerte⁴ y se le han atribuido efectos adversos como el aumento de la citotoxicidad sobre el epitelio vaginal.⁵ Esto conduce al aumento de infecciones en el sistema reproductivo femenino, porque también afecta la flora vaginal,⁶

umentando la posibilidad de contraer infecciones de transmisión sexual (ITS), lo cual ha hecho que se cuestione su uso. Otras desventajas del nonoxinol-9 son el posible efecto teratogénico⁷ y la reacción alérgica local, que podría provocar, ocasionalmente, en algunas mujeres o en sus parejas.^{5,8}

Debido a esto, desde hace algunos años se ha realizado una búsqueda de nuevos productos, muchos de procedencia natural, que además de contar con efecto espermicida podrían plantearse como buenas opciones, porque cuentan con reacciones secundarias menores sobre la flora y el epitelio vaginal, en comparación con el nonoxinol-9. Tal es el caso del extracto de *Passiflora edulis* o maracuyá que causa la muerte espermática y no tiene efecto citotóxico sobre las células epiteliales,⁹ del extracto de jaboncillo que además de promover la inmovilización de los espermatozoides no presentó efecto citotóxico sobre una línea celular epitelial,¹⁰ y del extracto de piña que junto a promover un aumento significativo de los espermatozoides inmóviles no presentó efecto citotóxico sobre la línea celular HeLa¹¹ y, de forma más específica, se ha demostrado que las saponinas purificadas provenientes de varios extractos de plantas presentan actividad espermicida.^{10,12}

Las saponinas son compuestos secundarios de las plantas y poseen un peso molecular entre 600 y 2 000 Daltons. Su estructura hidrocarbonada es compleja y puede ser subdividida en una aglicona o sapogenina y en una cadena de azúcar o más. Según la naturaleza de la sapogenina y el tipo de esqueleto por el que esté compuesta, las saponinas se pueden clasificar en esteroides (neutras) y triterpenoides (ácidas).¹³

La sapogenina, para ambos tipos de saponinas, se origina por la ruta de la acetil coenzima vía ácido mevalónico y escualeno.¹⁴ La diferencia de los núcleos radica en el número de carbonos que hacen parte de la aglicona, siendo para la de tipo esteroide 27 átomos de carbono que forma un triterpenoide tetracíclico; y 30 átomos de carbono para la de tipo triterpenoide, que conforma un núcleo pentacíclico.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de estos dos núcleos de saponinas obtenidos de los extractos de seis plantas sobre los espermatozoides humanos *in vivo*.

MÉTODOS

Obtención del material vegetal

Las plantas clavel (*Dianthus caryophyllus* L., 55177 HUA¹³), sábila (*Aloe vera* L., 179612 HUA¹⁵), ajo (*Allium sativum* L., 167771 HUA¹⁶) y cebolla (*Allium cepa* L., 019928 HUA¹⁷) fueron adquiridas en *La Placita de Flores*, un centro distribuidor de productos naturales de la ciudad de Medellín. De otro lado, el mamoncillo (*Melicoccus bijugatus* Jacq., 156112 HUA¹⁸), se adquirió de 2 pisos térmicos diferentes la ciudad Medellín y una población cercana más cálida como Santa Fé de Antioquia. Además, el jaboncillo (*Sapindus saponaria* L., 179675 HUA¹⁰), se obtuvo directamente de los jardines que hacen parte de la Universidad de Antioquia. Cada una de las plantas se analizó en el laboratorio de Botánica ubicado en la Universidad de Antioquia, con el fin de corroborar su identidad.

Obtención del extracto polar

De cada planta se obtuvieron 30 g molidos que después se desecaron y se adicionaron 100 mL de solución salina 0,9 % (Corpaul[®], Medellín, Colombia). La mezcla se licuó durante 2 a 4 min para posteriormente ser filtrada 2 veces con gaza.

Finalmente, se realizó una extracción líquido-líquido utilizando acetato de etilo (Merck[®]) para obtener la fase acuosa o polar de interés en cada espécimen.

Muestras de semen

Las muestras de semen se obtuvieron de individuos aparentemente sanos entre 22 y 35 años de edad, después de una abstinencia sexual de 2 a 7 días; el análisis seminal se realizó siguiendo las normas establecidas en el manual de procesamiento de semen de la OMS 2010.¹⁹ La concentración espermática se evaluó usando la cámara de Makler.²⁰

Para poder usar las muestras, estas debían tener un porcentaje mínimo de movilidad progresiva y no progresiva (tipo I + tipo II) igual o mayor que 40 % o un porcentaje de espermatozoides tipo I igual o mayor que 32 %, además, el porcentaje de viabilidad debía ser mayor que 58 %.¹⁹

Evaluación de la actividad espermicida

La viabilidad y la movilidad espermática se evaluaron en 3 tiempos, tanto para los tratamientos con extractos que contenían saponinas como con un control positivo, utilizando óvulos de nonoxinol-9 (óvulos espermicidas Norforms[®] Boehringer Ingelheim, Colombia).

En primer lugar se realizó evaluación de cada muestra para verificar que esta cumpliera con los parámetros espermáticos mínimos antes mencionados; posteriormente, con cada tratamiento se realizó evaluación de la movilidad y viabilidad espermática luego de 20 s, 3 min y 5 min de contacto con las fracciones polares y el control positivo.

Para evaluar la movilidad espermática se tomaron 10 µL de la muestra inicial o de la mezcla de cada tratamiento y muestra, para ser observados en el microscopio de luz (Eclipse-Nikon) usando un objetivo de 40x. Se realizó un conteo de espermatozoides, clasificándolos según los diferentes tipos de movilidades (tipo I, II y III);¹⁹ cada valoración fue realizada por duplicado.

Para determinar la viabilidad de los espermatozoides en la muestra intacta o de la mezcla de cada tratamiento más semen, se tomaron 10 µL y se adicionaron 10 µL del colorante vital eosina Y 0,5 % (IHR[®]); se consideraron como espermatozoides vivos aquellos que no tenían su cabeza teñida con el colorante.

En el caso de nonoxinol-9 se hicieron diluciones sucesivas de este con PBS 1X (GIBCO Invitrogen), para hallar la dilución mínima que permite obtener 100 % de inmovilización espermática.

Análisis estadístico

Se realizó un análisis descriptivo determinando los valores de la mediana y el rango de la movilidad y la viabilidad espermática, antes y después de la incubación, con

cada uno de los extractos polares de las plantas o el control positivo. Se compararon los valores para los resultados con los extractos de clavel, mamoncillo y jaboncillo, porque esos análisis se realizaron por triplicado, utilizando diferentes muestras de semen; en el caso de los resultados de los tratamientos con las fracciones polares de sábila, ajo y cebolla se graficaron los resultados absolutos porque con estas solo se realizaron análisis por duplicado utilizando una misma muestra.

Para el caso de ensayos por triplicado se usó la prueba no paramétrica Friedman y la pos prueba de Dunns mediante el programa estadístico Prism 5.0[®].

RESULTADOS

Las muestras utilizadas en este estudio, un total de 12, presentaban parámetros espermáticos superiores a los límites inferiores establecidos por la OMS: volumen 3.7 mL, movilidad tipo I: $55,57 \pm 10,3 \%$; movilidad tipo I + tipo II: $71,24 \pm 8,0 \%$; viabilidad: $81,92 \pm 7,4 \%$.

Los espermatozoides tratados con las fracciones polares provenientes de los extractos de clavel, mamoncillo de la región más cálida y jaboncillo presentan una disminución significativa en la movilidad espermática tipo I y II ($p < 0,05$). A su vez, los tratamientos hechos con el extracto de clavel demuestran que este induce a un aumento significativo de la movilidad tipo III ($p < 0,05$) y disminución significativa ($p < 0,05$) de la movilidad tipo I a los 5 min de contacto.

Las saponinas con núcleo triterpénico que se encontraron en las fracciones polares de clavel, mamoncillo y jaboncillo, demostraron ejercer un efecto inmovilizante al estar en contacto durante 5 min con la muestra de semen. Así lo evidencia un aumento de la movilidad tipo III con respecto a las muestras sin tratamiento, que tuvo un incremento desde 31,25, 21,94 y 28,00 %, hasta 99,10, 95,80 y 91,50 %, respectivamente (Fig. 1).

De otro lado, las plantas con núcleo esteroide (ajo, cebolla, sábila) no mostraron un aumento en la movilidad tipo III mayor que 77,00 %, luego de 5 min de contacto con la muestra. El porcentaje de movilidad tipo III solo aumentó de 28,50, 44,00 y 22,15 % hasta 76,70, 71,30 y 73,05 %, respectivamente; en este caso no hubo aumento significativo de los espermatozoides con movilidad tipo III en ninguno de los tiempos de contacto con el extracto.

En el caso específico del extracto de cebolla se observó cómo la movilidad tipo III alcanzó su máximo valor a los 3 min (84,05 %), sin embargo, a los 5 min disminuyó (71,30 %), lo cual muestra que el efecto inmovilizante puede ser reversible.

En el caso de la viabilidad espermática, se observó diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) para los extractos de clavel y mamoncillo a los 5 min de exposición. Sin embargo, el tratamiento con el extracto de jaboncillo a pesar de haber mostrado actividad inmovilizante, no alteró la viabilidad espermática (Fig. 2).

Porcentaje de movilidad tipo III

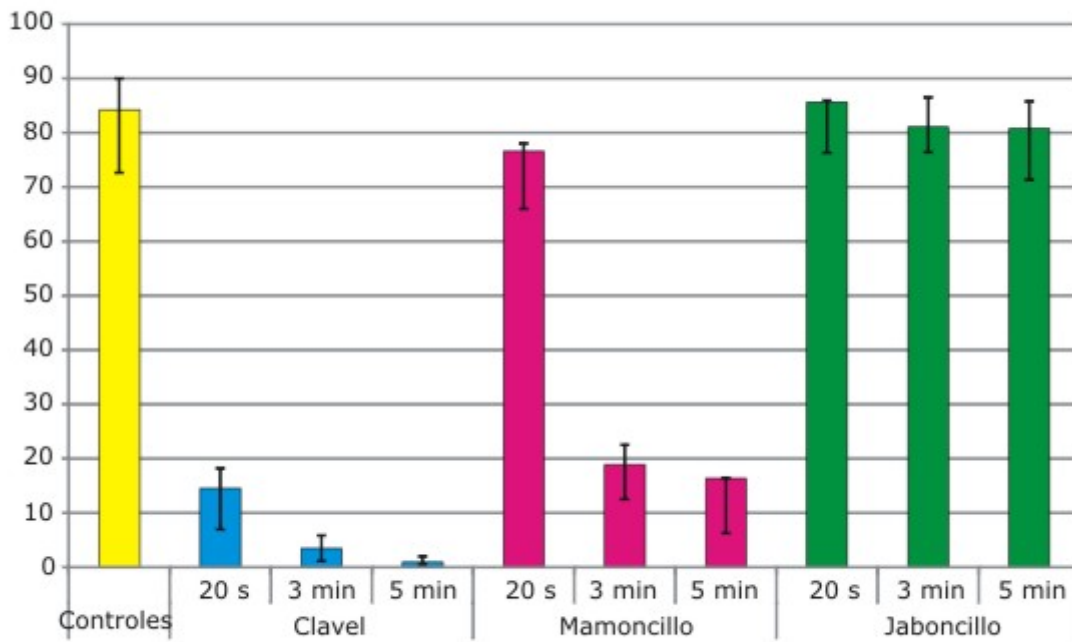


Fig. 1. Efecto de los extractos polares de clavel, mamoncillo y jaboncillo sobre la movilidad espermática tipo III con respecto al tiempo. n= 3.

Porcentaje de viabilidad

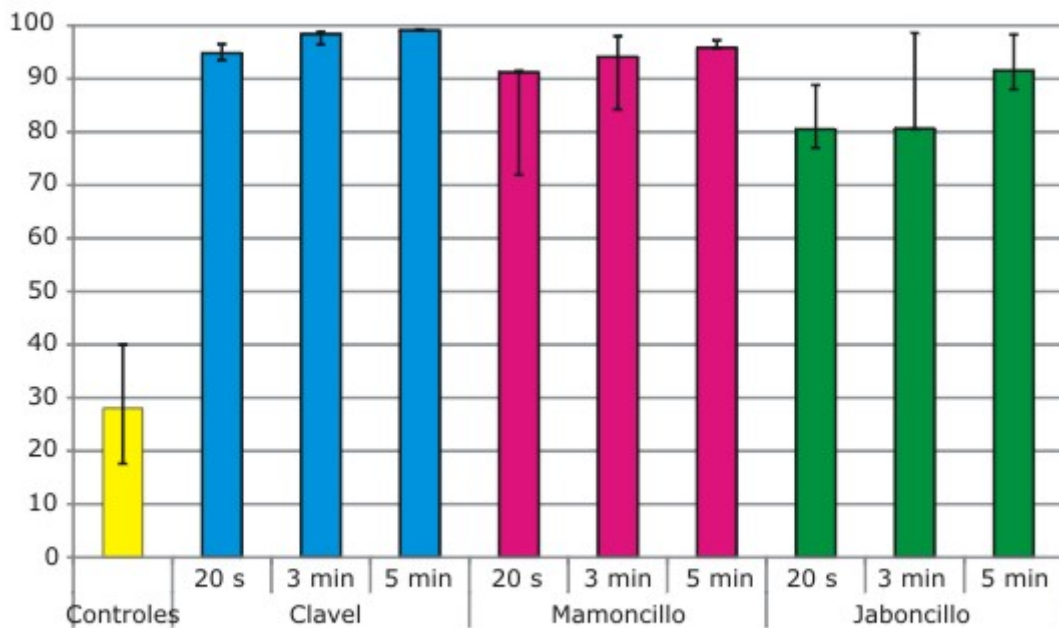


Fig. 2. Efecto de los extractos polares de clavel, mamoncillo y jaboncillo sobre la viabilidad espermática con respecto al tiempo. n=3.

Las saponinas con núcleo esteroide encontradas en las fracciones polares de sábila, ajo y cebolla, no producen un efecto sobre la viabilidad espermática, como se hizo evidente en la disminución del porcentaje de espermatozoides vivos con respecto a los controles luego de 5 min de contacto, los cuales disminuyen desde 93,80, 78,45 y 69,80 % hasta 80,25, 67,15 y 38,00 %.

Adicionalmente, se encontraron diferencias entre la actividad espermática de una misma especie, proveniente de diferentes fuentes geográficas. Por su parte, el mamoncillo obtenido de Santa Fe de Antioquia demostró diferencia en el incremento de la movilidad tipo III respecto al mismo, pero proveniente de la ciudad de Medellín. El primero presenta un incremento de 73,86 % respecto al control, mientras que el último aumenta tan solo en 57,4 %.

En los 2 ensayos realizados con nonoxinol-9, se observa la formación de una red densa que evita el desplazamiento de los espermatozoides en el campo visual y un porcentaje de espermatozoides muertos de 100 % a los 20 s.

Al hacer las diluciones de nonoxinol-9, se observó que hasta en una dilución de 1:80 se inmovilizaba 100 % de los espermatozoides

DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que 3 de las 6 plantas evaluadas presentan una promisoriosa acción espermicida (*Melicoccus bijugatus* Jacq., *Dianthus caryophyllus* L., y *Sapindus saponaria* L.), debido al aumento en la movilidad tipo III en los espermatozoides humanos. Los 3 extractos restantes (*Allium sativum* L., *Aloe vera* L., y *Allium cepa* L.) no presentaron el mismo efecto, por lo cual podría proponerse la estructura molecular de las saponinas que componen los extractos de cada planta, como la responsable de esta diferencia. Estos extractos sin efecto sobre los espermatozoides se consideran como posibles moléculas capacitantes.²¹

En el caso del extracto de *Sapindus saponaria* se encontró que los resultados para los ensayos realizados coinciden con datos anteriores, con los cuales se evidenció que también la fracción polar promueve un aumento significativo del porcentaje de espermatozoides inmóviles, mas no afecta la viabilidad espermática.¹⁰

A pesar que las plantas de núcleo triterpénico muestran actividad espermicida, no evidencian un efecto totalmente inmovilizante y letal sobre los espermatozoides humanos. Caso contrario al nonoxinol-9, agente químico ampliamente distribuido en el mercado, capaz de causar daño sobre la membrana plasmática de los espermatozoides y ocasionar su muerte.⁵

Las diferencias encontradas entre hojas de mamoncillo obtenidas de diferentes espacios geográficos, demuestran que a pesar de tratarse de una misma especie, los metabolitos presentes en cada planta, pueden variar de acuerdo a ciertas características como son el suelo, la temperatura, humedad y otros; por lo cual se hace necesario revisar la procedencia, época de recolección e identidad de cada uno de los especímenes.

Una amplia variedad de plantas que reportan actividad espermicida atribuyen esa característica a la presencia de saponinas.^{2,10} En el presente estudio se observa que los extractos polares de las plantas *Melicoccus bijugatus*, *Dianthus caryophyllus* y *Sapindus saponaria* presentan efectos sobre la movilidad o viabilidad espermática,

sin efecto citotóxico (datos no mostrados), lo cual permite hacer una clasificación preliminar en miras de estudios posteriores.

La estructura molecular de las saponinas según la naturaleza de la sapogenina, influye en la actividad espermicida que este compuesto tiene frente a los espermatozoides. Además, existen diferencias en el rendimiento de las saponinas triterpénicas y esteroides. Las plantas seleccionadas para el primer núcleo muestran efecto inmovilizante. Sin embargo, solo una de las 3 plantas evaluadas con núcleo triterpénico no mostró efecto sobre la viabilidad espermática.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Antioquia, Estrategia de Sostenibilidad Grupo Reproducción 2013-2014, y a COLCIENCIAS, por el apoyo como joven investigador a Luisa Ospina Medina.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Unicef, Onusida, Organización Mundial de la Salud. Los jóvenes y el VIH/SIDA: Una oportunidad en un momento crucial; 2002. [Citada 8 Mar 2013]. Disponible en: http://www.unicef.org/lac/jovenes_y_el_vih.pdf
2. Alvarez-Gomez AM, Cardona-Maya WD, Castro-Alvarez JF, Jimenez S, Cadavid A. Nuevas opciones en anticoncepcion: posible uso espermicida de plantas colombianas. Actas Urol Esp. 2007 Apr; 31(4):372-81.
3. Uribe-Clavijo M, Ospina-Medina L, Alvarez Gomez AM, Cortes-Mancera FM, Cadavid Jaramillo A, Cardona Maya W. Espermicidas: Una alternativa de anticoncepcion para considerar. Tecnológicas. 2012; 28:129-45.
4. Cook RL, Rosenberg MJ. Do spermicides containing nonoxynol-9 prevent sexually transmitted infections?: A meta-analysis. Sexually transmitted diseases. 1998; 25(3):144-50.
5. Ojha P, Maikhuri J, Gupta G. Effect of spermicides on *Lactobacillus acidophilus* in vitro-nonoxynol-9 vs. *Sapindus saponins*. Contraception. 2003; 68(2):135-8.
6. Watts DH, Rabe L, Krohn MA, Aura J, Hillier SL. The effects of three nonoxynol-9 preparations on vaginal flora and epithelium. J Infect Dis. 1999; 180(2):426-37.
7. Mimaki Y, Satou T, Kuroda M, Sashida Y, Hatakeyama Y. Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium candidum*. Phytochemistry. 1999; 51(4):567-73.
8. Abbet C, Slacanin I, Hamburger M, Potterat O. Comprehensive analysis of *Phyteuma orbiculare* L., a wild Alpine food plant. Food chemistry. 2013 Jan 15; 136(2):595-603.
9. Alvarez-Gómez AM, Cardona-Maya W, Forero J, Cadavid AP. Human spermicidal activity of *Passiflora edulis* extract. J Reproduction Contraception. 2010; 21(2):95-100.

10. Ospina L, Álvarez-Gomez A, Arango V, Cadavid A, Cardona-Maya W. Evaluación de la actividad espermicida y citotóxica del extracto de *Sapindus saponaria* L. (jaboncillo). Rev Cubana Plant Med. 2013;18(2).
11. Uribe-Clavijo M, Alvarez Gomez A, Arango V, Cortes-Mancera FM, Cadavid Jaramillo A, Cardona Maya W. Efecto *in vitro* del extracto vegetal de *Ananas comosus* sobre espermatozoides humanos. Tecnológicas. 2012;28:55-70.
12. Saha P, Majumdar S, Pal D, Pal B, Kabir S. Evaluation of spermicidal activity of Mi-Saponin A. Reproductive Sciences. 2010;17(5):454-64.
13. Böttger S, Melzig MF. Triterpenoid saponins of the Caryophyllaceae and Illecebraceae family. Phytochemistry Letters. 2011;4(2):59-68.
14. Martínez MA. Saponinas esteroides. Antioquia: Facultad de Química Farmacéutica, Universidad de Antioquia; 2001.
15. Vázquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. J Ethnopharmacol. 1996;55(1):69-75.
16. Lanzotti V, Barile E, Antignani V, Bonanomi G, Scala F. Antifungal saponins from bulbs of garlic, *Allium sativum* L. var. Voghiera. Phytochemistry. 2012 Jun;78:126-34.
17. Yuan L, Ji TF, Wang AG, Yang JB, Su YL. Two new furostanol saponins from the seeds of *Allium cepa* L. Chinese Chemical Letters. 2008;19(4):461-4.
18. Montiel M. Introducción a la flora de Costa Rica. Costa Rica: Editorial Universidad de Costa Rica; 1991.
19. WHO. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. Geneva: World Health Organization; 2010.
20. Cardona-Maya W, Berdugo J, Cadavid A. Comparación de la concentración espermática usando la cámara de Makler y la cámara de Neubauer. Actas Urol Esp. 2008;32(4):443-5.
21. Gallego G, Dubier H, Ospina L, Alvarez Gomez A, Arango V, Cardona Maya W, et al. Efecto de cinco extractos de plantas colombianas sobre espermatozoides humanos. Rev Cubana Plant Med. 2012;17(1):84-92.

Recibido: 5 de abril de 2013.

Aprobado: 20 de septiembre de 2013.

Walter Cardona Maya. Grupo de Reproducción, Universidad de Antioquia. Sede de Investigación Universitaria, calle 62 No. 52-59, lab 534. Medellín, Colombia. (574) 2196476. Correos electrónicos: wdcmaya@medicina.udea.edu.co; wdcmaya@gmail.com