

Evaluación del contenido de sapogeninas en variedades nativas de ñame (*Dioscorea spp.*), provenientes de la colección de la Universidad de Córdoba

Yoshie Hata*¹, María Teresa Reguero**, Lucía Arteaga de García*², Gustavo Buitrago**, Andrés Álvarez***

Resumen

Una de las estrategias para incrementar la sostenibilidad de los pequeños productores de ñame de la costa atlántica colombiana, es dar valor agregado a la producción del mismo por medio de la obtención de metabolitos secundarios. Teniendo en cuenta que los principales metabolitos secundarios presentes en los tubérculos del género *Dioscorea* son las saponinas esteroidales, se propuso evaluar el contenido de sapogeninas en variedades cultivadas de ñame provenientes de la costa Atlántica colombiana. Se seleccionaron con criterios agronómicos y quimiotaxonómicos 50 variedades de *Dioscorea spp.* (*D. alata*, *D. rotundata*, *D. bulbifera* y *D. trifida*), se evaluaron y estandarizaron metodologías para la detección y cuantificación de sapogeninas en los tubérculos. Se encontró que las muestras de ñame contienen de 4 a 7 sapogeninas esteroidales diferentes, entre las cuales están la diosgenina y/o yamogenina, sarsapogenina y/o esmilagenina y finalmente tigogenina y/o neotigogenina. De las especies estudiadas la más promisoria por su contenido de sapogeninas es la *Dioscorea rotundata*, con un promedio de 28.4 mg/100g de tubérculo en base seca y de las 50 muestras analizadas el 34% contienen diosgenina.

Palabras clave: Ñame - Diosgenina - Sapogeninas esteroidales - *Dioscorea sp.*

Summary

Evaluation of sapogenin contents in native yam varieties (*Dioscorea spp.*), from Colombian Cordoba University collection

In order to improve sustainability of small yam producers in Atlantic Colombian coast, it has been proposed the extraction of secondary metabolites. If we consider that the main secondary metabolites in *Dioscorea* genus tuber are steroid saponins, in the present work the sapogenin contents of some cultivated yam varieties from Atlantic colombian coast were evaluated. 50 *Dioscorea spp.* (*D. alata*, *D. rotundata*, *D. bulbifera* y *D. trifida*) varieties were selected by agronomic and chemotaxonomic criteria. The evaluation and standardization of methodologies were carried out for detection and quantification of sapogenins in the yams. The results showed that all yam specimens contain 4 to 7 different steroid sapogenins, among them diosgenin y/o yamogenina, tigogenin y/o neotigogenina and sarsapogenin y/o esmilagenina. From the studied varieties *Dioscorea rotundata* exhibited the highest sapogenin content: 28.4 mg per 100g of dried weight and finally the 34% of specimens contained diosgenin.

Key words: Yam - Diosgenin - Steroidal sapogenins - *Dioscorea sp.*

Recibido para evaluación:

Octubre 10 de 2003

Aceptado para publicación:

Noviembre 30 de 2003

* Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A.A. 14490.

*¹ E-mail: yahatau@unal.edu.co

*² E-mail: ldarteagad@unal.edu.co

** Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Instituto de Biotecnología

*** Universidad de Córdoba, Facultad de Ciencias Agrícolas, Montería, Córdoba, CP 354.

Introducción

El ñame pertenece a la familia Dioscoreaceae, género *Dioscorea* y se encuentra distribuido en regiones tropicales de alta pluviosidad. Esta planta se presenta como una enredadera y se caracteriza por la presencia de tubérculos subterráneos y/o aéreos (bulbillos), los cuales junto con la papa, yuca, arracacha y batata ocupan un lugar importante dentro de la alimentación humana, pues son ricos en almidón. Además del almidón, algunas especies contienen saponinas esteroidales y otros compuestos como alcaloides (1, 2).

Aún cuando actualmente se conoce el ñame en todo el mundo, en Colombia se ha caracterizado como producto de cultivo y consumo tradicional en la costa Atlántica. Su condición de alimento regional ha estancado su explotación a nivel industrial, existiendo además factores limitantes de la producción de ñame como son la siembra cíclica por largos períodos de tiempo, problemas sanitarios del cultivo (virus y antracnosis principalmente) y falta de desarrollo tecnológico.

Por las anteriores razones, dentro del Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola para Pequeños Productores (PBA), se adelanta un subprograma sobre el cultivo de ñame. Una de las estrategias para incrementar la sostenibilidad de los pequeños productores de ñame es dar valor agregado a la producción del mismo, lo cual se puede lograr por medio de la obtención de metabolitos secundarios.

Como se mencionó anteriormente, los principales metabolitos secundarios presentes en los tubérculos del género son las saponinas esteroidales, que pertenecen al grupo de los glicósidos. Los glicósidos son compuestos que al hidrolizarse liberan una ó más moléculas de azúcar y un componente no azucarado llamado aglicón. Para el caso de las saponinas, luego de su hidrólisis se obtiene un aglicón conocido como sapogenina (2, 3).

Las sapogeninas esteroidales son utilizadas por la industria farmacéutica como precursores de hormonas esteroidales, las cuales tienen una gran importancia terapéutica y económica. Estos compuestos poseen una estructura química con relaciones estereoquímicas bastante complejas, que hacen de su síntesis química un proceso difícil y poco rentable, siendo la semisíntesis a partir de las sapogeninas esteroidales, la estrategia económicamente viable más usada por la industria farmacéutica. Esta razón motivó la investigación orientada a determinar el contenido y tipo de sapogeninas en las plantas. Luego de muchos años de investigación, los esteroides derivados de plantas más importantes para la síntesis parcial de hormonas esteroidales son la diosgenina y la batogenina en el género *Dioscorea*; la hecogenina y gitogenina de las especies de *Agave*, sarsapogenina y esmilagenina del género *Smilax* y el -sitosterol de aceites vegetales crudos (3, 4).

Por todo lo anterior se propuso realizar este trabajo cuyo objetivo fue evaluar el contenido de sapogeninas en variedades cultivadas de ñame, provenientes de la costa Atlántica colombiana. Para llevar a cabo este objetivo se seleccionaron de la colección de ñame de la Universidad de Córdoba las accesiones a estudiar, se evaluaron y estandarizaron metodologías para la detección y cuantificación de sapogeninas presentes en los tubérculos de ñame.

La estandarización de una metodología analítica se realiza por medio de la evaluación de alguno de los parámetros, usados para estudiar el desempeño de las aplicaciones analíticas. Estos son precisión, exactitud, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad y rango. En este estudio se escogió la precisión. La precisión de un método es el grado de concordancia entre medidas que resultan de ensayos individuales cuando el procedimiento es aplicado repetidamente a muestras múltiples de una muestra homogénea. Se expresa usualmente en

terminos de coeficiente de variación. La precisión puede ser estimada como repetibilidad, que se refiere al uso de un procedimiento analítico dentro de un laboratorio en un corto período de tiempo, usando el mismo equipo (5, 6).

Metodología

Reactivos y Materiales

Todos los reactivos y patrones fueron calidad reactivo, los patrones empleados fueron adquiridos en Sigma (Diosgenina aprox., 95%, hecogenina aprox 95%, sarsapogenina min. 98% y tigogenina min. 98%), cromatofolios de aluminio Merck, sílica gel 60 F₂₅₄, jeringa Hamilton 0-100 μ L.

Equipos

Espectrofotómetro Spectronic 20 Milton Roy Co., espectrofotómetro Unicam UV2-100 UV/VIS.

Recolección de las muestras de ñame de la colección de la Universidad de Córdoba

Se revisó la información existente sobre la colección de ñame de la Universidad de Córdoba, encontrándose que las diferentes accesiones estaban clasificadas según su especie. Se seleccionaron las accesiones, utilizando para ello criterios agrotaxonómicos, características organolépticas y otras particularidades como son:

- La época de inclusión de cada accesión a la colección, esto debido a que la dinámica de mantenimiento de la colección puede tener consecuencias sobre el contenido de sapogeninas.
- La resistencia a enfermedades como la antracnosis y la presencia de pigmentos, ya que la

existencia de metabolitos secundarios específicos y/o en concentración variable puede determinar estas características.

Una vez seleccionadas las accesiones, se colectaron muestras, las cuales consistieron de tubérculos, envasados y empacados en bolsas de papel y cajas, transportadas al Instituto de Biotecnología y almacenadas allí en condiciones de refrigeración (2-8°C) hasta el momento de su procesamiento.

Tratamiento de las muestras

Los tubérculos se pelaron, cortaron, secaron en estufa de aire recirculante a 50°C, se molieron y el polvo obtenido fue almacenado en recipientes que los mantuvieran protegidos de la humedad y de la luz. Posteriormente las muestras fueron sometidas a hidrólisis. Con el fin de determinar las mejores condiciones hidrolíticas se ensayaron varias metodologías descritas en la literatura (7-12) cuyos resultados se siguieron mediante cromatografía en capa delgada.

Las condiciones de hidrólisis ácida elegidas fueron: ácido clorhídrico 2.5N (medio acuoso) en proporción 1:8 (material seco: ácido) por 3 horas a temperatura aproximada de 95°C con agitación continua. La suspensión de material hidrolizado se neutralizó con bicarbonato de sodio hasta pH 7.0, se filtró y el material sólido se secó a 50°C. El material sólido se extrajo durante 4 horas con cloroformo en un equipo de extracción "soxhlet". Finalmente se obtuvo el extracto de sapogeninas por evaporación del solvente en un evaporador rotatorio a 30°C.

Detección de las sapogeninas

La cromatografía en capa delgada fue el método seleccionado para detectar las sapogeninas presentes en los extractos obtenidos a partir de las muestras de ñame. Luego de ensayar diversas

condiciones cromatográficas (13-17), se seleccionaron las siguientes:

Fase estacionaria: sílica gel F₂₅₄, fase móvil: cloroformo:acetato de etilo (4:1) y el revelado se realizó con el reactivo de p-anisaldehído (0.5mL de p-anisaldehído, 10 mL de ácido acético, 85 ml de metanol y 5mL de ácido sulfúrico, preparado inmediatamente antes de usar), cloruro de antimonio al 20% en cloroformo y luz ultravioleta (254 y 365 nm) (18, 19).

Como patrones de sapogeninas se utilizaron soluciones clorofórmicas de diosgenina, hecogenina, sarsapogenina y tigogenina de 1 mg/mL. En la Figura 1 se muestran sus estructuras.

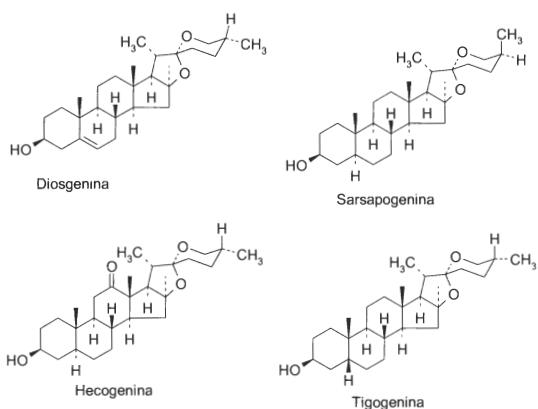


Figura 1. Estructuras moleculares de las sapogeninas.

El extracto obtenido se pesó y se disolvió en 10 mL de cloroformo. De esta solución se tomaron 10 L con la jeringa y se aplicaron en cromatofolios diferentes por duplicado, luego de lo cual se desarrollaron y revelaron, uno con p-anisaldehído y el otro con cloruro de antimonio. Los cromatofolios fueron calentados a 100°C y se compararon las características cromatográficas de los patrones y las muestras.

Cuantificación de las sapogeninas

La cuantificación de las sapogeninas totales presentes en cada una de las muestras fue realizada mediante espectrofotometría. De los métodos espectrofotométricos revisados en la literatura (12, 14, 17, 20) se ensayaron dos y se escogió el que mejor reproducibilidad presentó para su estandarización. Éste consiste en la generación de un complejo coloreado con p-anisaldehído cuyo máximo de absorción es de 430 nm (14).

Curva de calibración: la concentración de sapogeninas se expresó como diosgenina, ya que éste fue el patrón empleado para la cuantificación. Inicialmente se tomó un espectro de absorción molecular de la diosgenina luego de haber sido sometida a la reacción de coloración para determinar la longitud de onda de máxima absorción (430 nm). Las concentraciones de diosgenina empleadas para la curva de calibración fueron 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Se preparó una solución madre de diosgenina en cloroformo y de allí se tomaron alícuotas para hacer soluciones en acetato de etilo con las concentraciones anteriormente señaladas.

A la curva de calibración obtenida con los seis resultados de absorbancia para cada una de las concentraciones se le evaluó la linealidad y fue utilizada para interpolar las absorbancias de cada una de las muestras de *ñame* y obtener así la concentración de sapogeninas.

Estandarización del método: el parámetro analítico elegido para realizar la estandarización fue la precisión, evaluada como repetibilidad. Para su estimación se calculó el coeficiente de variación de las pendientes de cada una de las curvas de calibración por separado (6).

Preparación de las diluciones de las muestras para su cuantificación: los extractos clorofórmicos obtenidos a partir de 50 g de material seco de cada una de las 50 muestras fueron

disueltos en 10 mL de cloroformo, de estas soluciones se tomaron alícuotas de 50 a 200 μ L y se diluyeron a 10 mL con acetato de etilo.

Reacción de coloración: Una vez preparadas las soluciones tanto para la curva de calibración, como para la cuantificación de las muestras se realizó la reacción química. En tubos de ensayos de 20 mL se adicionaron 2 mL de la disolución de patrón y/o muestra, 1 mL de p-anisaldehído al 0.5% en acetato de etilo (Reactivos 1) y 1 mL de ácido sulfúrico concentrado al 50% en acetato de etilo (Reactivos 2). Esta mezcla se homogeneizó en un agitador para tubos de ensayo y de inmediato fue calentada en el baño termostata- do a 60°C. Luego de 20 minutos, cada tubo se colocó en un baño de agua a temperatura ambiente y la absorbancia de las soluciones se determinó de inmediato. Los tubos se protegieron de la luz durante la reacción, forrándolos con papel de aluminio. Para cada set de muestras (cada curva de calibración y 5 muestras por duplicado) se preparó una solución blanco (acetato de etilo, Reactivo 1 y Reactivo 2) y para cada extracto un control (no se adicionó p-anisaldehído y en su lugar el volumen se reemplazaba con acetato de etilo). La cuantificación de cada muestra se realizó por duplicado y el promedio de las dos absorbancias se interpoló en la curva de calibración.

El material de vidrio fue lavado con un jabón de laboratorio apropiado (se usó Extrán neutro Merck) y ácido nítrico caliente. Luego se enjuagó hasta fin de acidez, se purgó con agua destilada y se secó (21).

Resultados y Discusión

Selección de las accesiones

En la Figura 2 se presentan los porcentajes por especie de accesiones seleccionadas de la colección de ñame de la Universidad de Córdoba.

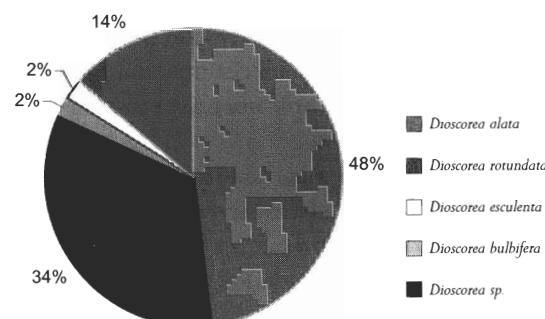


Figura 2. Representación por especie de las 50 accesiones colectadas

Uno de los más importantes criterios de selección tenidos en cuenta fueron las características organolépticas de las muestras, en especial su grado de aceptación para el consumo. Esto se debe a que las sapogeninas le confieren un sabor amargo al tubérculo, caso en el cual son rechazados para alimentación. Es de tener en cuenta que la colección de ñame de la Universidad de Córdoba fue realizada visitando pequeños agricultores de la costa Atlántica colombiana (22), razón por la cual las accesiones que conforman la colección son en su mayoría comestibles.

Un segundo criterio de selección fue la clasificación morfológica de las plantas. Se escogieron 4 especies (*D. alata*, *D. rotundata*, *D. bulbifera* y *D. esculenta*) de las 5 que hacen parte de la colección (incluyendo la *D. trifida*). Como se observa en la Figura 2, el mayor número de muestras evaluadas corresponde a *D. alata* (48%) y a *D. rotundata* (34%) como es de esperarse, pues son las especies más cultivadas en la región (1). Este porcentaje refleja la composición de la colección.

Detección de las sapogeninas

Los patrones, sarasapogenina, diosgenina y tiogogenina se eligieron por estar presentes en estas plantas, según reportes bibliográficos (3,

23). La hecogenina se escogió por ser una sapogenina presente en especies como *Agave sp.* y por tanto permite establecer una comparación con las sapogeninas típicamente presentes en el género *Dioscorea* (3).

Con respecto a las condiciones de trabajo la fase móvil elegida (cloroformo:acetato de etilo, 4:1) permitió obtener un valor de Rf entre 0.3 y 0.7 y separación de los patrones de sapogeninas empleados. En cuanto a los sistemas reveladores, con el cloruro de antimonio se obtuvo mayor selectividad y con el p-anisaldehído mejor sensibilidad (19).

En la Tabla 1 se indican las sapogeninas presentes en cada una de las muestras, como resultado de la comparación de las características cromatográficas con los patrones elegidos.

De los perfiles cromatográficos obtenidos se pueden advertir resultados similares para todas las muestras como son presencia de sarsapogenina y/o esmilagenina en todas las muestras y la ausencia de hecogenina, como era de esperarse.

También se pueden observar resultados diferenciales para las muestras, según la especie a la cual pertenecen, como es el caso de la presencia de diosgenina. La diosgenina se pudo detectar en el 83.3% de muestras de *D. rotundata*, el 8.7% de *D. alata*, mientras que ni en *D.*

bulbifera, ni en *D. esculenta* pudo observarse su presencia. Se observa que la mayoría de las muestras de *D. rotundata* contienen diosgenina.

La tigogenina se encuentra presente en un 73.3% de las muestras de *D. rotundata* y tan sólo en un 4.3% de *D. alata*. En *D. bulbifera* y en *D. esculenta* no se detectó obteniéndose resultados similares en el caso de la diosgenina.

En el periodo comprendido entre la cosecha de los tubérculos y la colección del material se presentó dormancia (germinación durante el almacenamiento) en algunos tubérculos, en especial los pertenecientes a *D. rotundata*, los cuales mostraron mayor contenido de sapogeninas y presencia de diosgenina.

Se puede inferir que el fenómeno de dormancia tiene relación con un aumento en el contenido de algunas sapogeninas, porque al consumirse almidón del tubérculo, la proporción de sapogeninas aumenta, con respecto a la cantidad de material seco, lo cual se puede constatar por los resultados obtenidos.

Cuantificación de las sapogeninas

Estandarización del método: el coeficiente de variación de la pendiente para las seis curvas

Tabla 1. Sapogeninas presentes en las muestras de las especies analizadas

Especie Geninas	Muestras con Hecogenina	Muestras con Tigogenina / Neotigogenina	Muestras con Diosgenina / Yamogenina	Muestras con Sarsapogenina / Esmilagenina	Número total de muestras
<i>D. alata</i>	0	2/23	1/23	23/23	23
<i>D. rotundata</i>	0	14/15	11/15	15/15	15
<i>D. esculenta</i>	0	0	0	1/1	1
<i>D. bulbifera</i>	0	0	0	1/1	1
<i>Dioscorea sp.</i>	0	1/10	0	10/10	10

de calibración fue 0.061, el cual es menor al límite establecido para los ensayos espectrofotométricos, por lo cual el método es repetible y se encuentra estandarizado.

Cuantificación de las sapogeninas: se realizó una curva de calibración con los seis resultados de absorbancia para cada una de las concentraciones ensayadas, la cual fue sometida a un análisis de regresión con el fin de evaluar su linealidad. Las hipótesis fueron probadas con un nivel de confianza de $\alpha=0.05$ y son enunciadas a continuación:

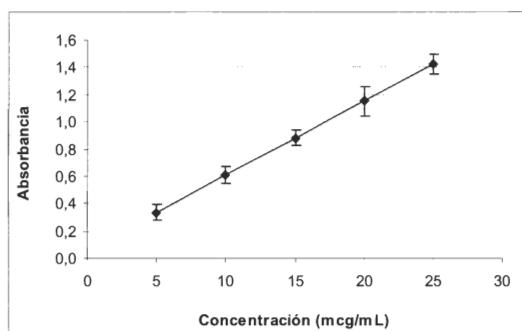


Figura 3. Curva de calibración para la diosgenina (Regresión, $y = 0.0627 + 0.0545x$)

- Hipótesis nula (H_0): La concentración de diosgenina y la absorbancia NO presentan una relación lineal.

- Hipótesis alterna (H_1): La concentración de diosgenina y la absorbancia presentan una relación lineal.

El resultado del análisis de regresión, realizado a través de un ANOVA, presentó un valor p (7.35×10^{-21}) mucho menor a 0.05, entonces es posible rechazar la hipótesis nula, es decir, que la concentración de diosgenina y la absorbancia presentan una relación lineal. La curva se muestra en la Figura 3 y en esta fueron interpoladas las absorbancias de cada una de las muestras para hallar las concentraciones de las sapogeninas totales, expresadas como diosgenina.

Es importante resaltar que el intercepto de la curva es muy cercano a cero (0.06), lo que permite descartar errores sistemáticos.

En la Figura 4 se presentan los contenidos de sapogeninas totales en cada una de las muestras. Se observa que la concentración obtenida para cada uno de los extractos es más baja (entre 0 y 78.2 mg/100g de tubérculo seco) con respecto a las especies que actualmente se emplean

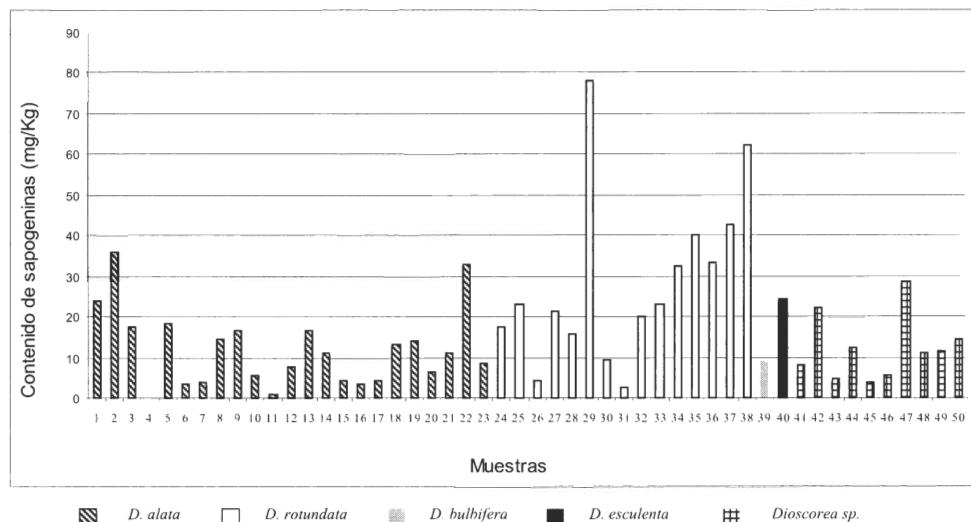


Figura 4. Contenido de sapogeninas totales en cada una de las muestras de ñame

para la obtención de diosgenina con fines comerciales (alrededor del 3%, en base seca).

La *D. rotundata* es la especie que presenta mayor concentración de sapogeninas totales con un promedio de 28.4 mg/100g de tubérculo seco, la *D. alata* contiene en promedio 11.9 mg/100g de tubérculo seco. La accesión cuantificada de *D. esculenta* presenta 24.4 mg/100g de tubérculo seco, contenido intermedio entre la *D. Rotundata* y *D. alata* y finalmente la *D. bulbifera* presenta un contenido bajo de sapogeninas, 9.1 mg/100g de tubérculo seco. En las dos últimas especies se realizó la evaluación en una sola accesión, razón por la cual a partir de este dato no es posible hacer una conclusión sobre la especie.

Observando la concentración de sapogeninas obtenida para cada muestra y relacionándola con el número de sapogeninas detectadas, se concluye que existe una correlación entre ambos resultados, es decir que la *Dioscorea rotundata* presenta un mayor número de sapogeninas y así mismo, una mayor concentración de estos compuestos. Otra característica de interés en esta especie es el hecho de haber sido detectadas por cromatografía en capa delgada diosgenina/yamogenina y tigogenina/neotigogenina en la mayoría de las accesiones, lo que indica que un mejoramiento de estas especies puede convertirlas en especies promisorias para la obtención de sapogeninas esteroidiales.

En la parte inicial de esta discusión se mencionó que se colectaron algunas accesiones con características especiales como aquella que presentaba un abundante pigmento púrpura. Durante el procesamiento de la muestras se observó que el pigmento es hidrosoluble, lo cual hace que durante la hidrólisis se pierda y desde entonces el material presenta características similares a las otras accesiones. Con respecto al contenido de sapogeninas se obtuvo un bajo contenido, el más bajo presentado por

todas las muestras, además de mostrar ausencia de diosgenina; esta observación abre la posibilidad de estudiar más profundamente la relación entre el color y el contenido de sapogeninas.

Agradecimientos

Al Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola, al Ministerio de Cooperación de Holanda (DGIS), por la financiación del presente trabajo. Al Grupo "Búsqueda de Productos Bioactivos" del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia y a éste último, por facilitar sus instalaciones y equipos para la realización del presente. A la Universidad de Córdoba por suministrar las muestras de nombre de su colección.

Bibliografía

1. M. Perea y G. Buitrago, En "Ñame: Producción de Semillas por Biotecnología", Ed. por M. Guzmán y G. Buitrago, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia, Santafé de Bogotá, 2000, pp. 17-25
2. V. S. Venturella. En: "Remington Farmacia", Ed. por A. R. Gennaro 19^a ed., Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires, 1998, pp. 563 - 565.
3. V. E. Tyler, M. K. Speedie y J. E. Robbers, "Pharmacognosy and Pharmacobio-technology", 9th ed., Williams & Wilkins, Pensylvania, 1998, pp. 49-57, 120-230.
4. W. C. Evans, "Farmacognosia", 13^a. ed., McGraw-Hill, México, 1991, pp. 522-525.
5. S. Ospina de Nigrinis, El método de análisis para los estudios de estabilidad y de biodisponibilidad de medicamentos. Parte II, *Rev. Col. Cienc. Quím. Farm.*, **23**, 95 (1995).

6. S. Ospina de Nigrinis, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, Comunicación personal, 1999.
7. A. López, "Estudio sobre la obtención de diosgenina en cultivo de tejidos de una especie nativa de diosgenina", Tesis de Grado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia, 1989, p.6.
8. W. G. Taylor, M. S. Zaman, Z. Mir, P. S. Mir, S. N. Acharya, G. J. Mears y J. L. Elder, Analysis of steroid sapogenins from amber fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) by capillary gas chromatography and combined gas chromatography-mass spectrometry, *J. Agricult. Food Chem.*, **45**, 753 (1997). Via Analytical Abstracts.
9. Q. Wang, X. Yu y R. Pan, Determination of steroid sapogenins in the Chinese drug Chonglou (*Rhizoma paridis*), *Yao-wu-Fenix-Zazhi*, **11**, 90 (1991). Via Analytical Abstracts.
10. B. Liu, G. B. Lockwood y L. A. Gifford, Supercritical fluid extraction of diosgenin from tubers of *Dioscorea nipponica*, *J. Chromatography A.*, **690**, 250 (1995).
11. S. Da, X. Tang, H. Da y J. Yang, Determination of diosgenin in *Dioscorea zingiberensis* by reversed-phase high-performance liquid chromatography, *Sepu.* **10**, 98 (1992). Via Analytical Abstracts.
12. L. Xu y A. Liu, Determination of diosgenin (25R-spirost-5-en-3 β -ol), in *Dioscorea* (yam), *Yaoxue-Xuebao*. **19**, 141 (1984). Via Analytical Abstracts.
13. F. da Costa y R. Mukherjee, Diosgenin and yamogenin from *Dioscorea multiflora*, *J. Nat. Prod.*, **47**, 909 (1984).
14. D. Ntahomvukiye, L. Van Puyvelde y P. C. Nkinamubanzi, Diosgenine dans diverses espèces de *Dioscorea* et de *Solanum* au Rwanda (Afrique Centrale), *J. Nat. Prod.*, **44**, 596 (1981).
15. J. T. Xu, G. P. Tang, M. Wu y Y. Zou, Determination of ophiopogonin constituents by Thin Layer Chromatography, *Yaowu-Fenxi- Zazhi*, **17**, 164 (1997). Via Analytical Abstracts.
16. D. X. Chen, Y. Z. Zhao y D. W. Zhao, Identification study of the chinese drug Tu Fuling and its adulterants, *Sep.* **13**, 302 (1993). Via Analytical Abstracts.
17. G. B. Iskenderov, A. Z. Babaev y M. N. Velieva, Chromatographic determination of diosgenin in polysponin tablets, *Farmatsya*, **34**, 76, (1985). Via Analytical Abstracts.
18. R. Neher. En: "Thin - Layer Chromatography", Ed. por E. Stahl, 2nd ed., Springer - Verlag, Berlin, 1969, pp. 322-324, 346-347.
19. H. Wagner, S. Bladt y E. M. Zgainski, "Plant Drug Analysis -A Thin Layer Chromatography Atlas", Springer-Verlag, Berlin, 1984, pp. 225-245.
20. A. G. Chen, Z. Geng, Q. G. Liu y W. H. Huang, Spectrophotometric determination of diosgenin in plants, *Fenix-Huaxue*, **24**, 227 (1996). Via Analytical Abstracts.
21. The United States Pharmacopeial Convention, "The United States Pharmacopeia", USP 24, Rockville, MD, 2000, pp. 1992-1997.
22. R. E. Durango y A. J. Padilla, "Caracterización morfológica de un Banco de Germoplasma de ñame *Dioscorea* spp recolectado en la Costa Atlántica Colombiana" Tesis de Grado, Programa de Ingeniería Agronómica, Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Córdoba, Montería, 1998, pp 3, 14-18, 20,29.
23. J. Correa y H. Bernal, "Especies Vegetales Promisorias de los Países del Convenio Andrés Bello", Editorial Guadalupe, Santa-fé de Bogotá, 1995, Tomo VII, pp. 1 - 53.