



**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS RAÍCES DE  
*Solanum erianthum* D. DON.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**QFB ADRIÁN ALBERTO LÓPEZ CEN**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

**MÉRIDA, YUCATÁN**

**2020**





**UADY**

POSGRADO  
INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y  
BIOQUÍMICAS

**ESTUDIO FITOQUÍMICO DE LAS RAÍCES DE  
*Solanum erianthum* D. DON.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR**

**QFB ADRIÁN ALBERTO LÓPEZ CEN**

**EN OPCIÓN AL GRADO DE**

**MAESTRO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICA**

**MÉRIDA, YUCATÁN**

**2020**





# UADY

UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA  
DE YUCATÁN

COORDINACIÓN GENERAL  
DEL SISTEMA DE POSGRADO  
INVESTIGACIÓN Y VINCULACIÓN

MAESTRÍA EN CIENCIAS  
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS

Mérida, Yuc., 28 de agosto de 2020

Oficio Num.: PICQB/179//2020

**Asunto:** Autorización de digitalización

La tesis “Estudio Fitoquímico de las raíces de *Solanum erianthum* D. Don” presentada por el Q.F.B. Adrián Alberto López Cen, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas y Bioquímicas, ha sido aprobada en cuanto a su contenido científico y en cuanto a lo establecido en el Manual de Procedimientos del Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas, por lo que se le autoriza la digitalización de los ejemplares correspondientes.

Dr. Gumersindo Mirón López

**Directora de la tesis**

M. en C. Manlio Graniel Sabido

Sinodales

Dr. Gonzalo J. Mena Rejón

Dr. David Muñoz Rodríguez

Dr. Sergio Peraza Sánchez

Dra. Zhelmy Martín Quintal

Firmas

**ATENTAMENTE**  
**“LUZ, CIENCIA Y VERDAD”**

**DRA. MAIRA RUBI SEGURA CAMPOS**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO INSTITUCIONAL**  
**EN CIENCIAS QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**



POSGRADO INSTITUCIONAL  
EN CIENCIAS QUÍMICAS  
Y BIOQUÍMICAS

c.c. Archivo  
MRSC



## AGRADECIMIENTOS

Mi mayor agradecimiento al Dr. **Gumersindo Mirón López** y al M. en C. **Manlio Joaquín Graniel Sabido** directores de este trabajo, por su dedicación, paciencia y confianza en mí para realizarlo.

A los miembros del Comité Revisor y H. Sínodo, Dr. **Gonzalo Joaquín Mena Rejón**, Dr. **Sergio Rubén Peraza Sánchez** y Dr. **David Muñoz Rodríguez**, por el tiempo y atención dedicados a la revisión y corrección de este trabajo, así como sus consejos y observaciones durante la redacción del mismo.

Al Dr. **Juan Tun Garrido** por la identificación de la especie estudiada.

Al M. en C. **Marco Antonio Palacios Cornejo** y al QFB. **Carlos Alfonso Pech Cauch** por todo el apoyo y esfuerzo que me brindaron en la recolección del material vegetal empleado en este trabajo.

A la Q. **Wendy Citlali Manzanarez Pech**, al QFB. **Carlos Alfonso Pech Cauch** y a la p. QFB. **Mónica Nallely Arteaga Rosas** por su valioso apoyo y consejo en la realización y procesamiento de los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.

Al M. en C. **Manlio Joaquín Graniel Sabido** por su apoyo incondicional en la elucidación estructural de los compuestos en el presente trabajo, así como el apoyo brindado en cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

A mis amigos mastrandos, y a los que hoy ya son maestros en ciencias: **Wendy Manzanares**, **Carlos Pech**, **Vicente López Sáenz**, **Marco Palacios** y **Carolina Castro** por todo el ánimo, la paciencia y sobre todo por la valiosa amistad que siempre me brindaron, los recordaré siempre con una sonrisa.

A mis padres y hermanos (Alberto, Norma, Andrés y Angélica) así como a mi prometida Karen por apoyarme siempre en mi crecimiento personal y académico. Sin ellos, no sería el hombre que soy.

A las autoridades de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán por permitir la realización de este trabajo en sus instalaciones.



El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán, bajo la dirección del Dr. Gumersindo Mirón López y el M. en C. Manlio Joaquín Graniel Sabido, formó parte del proyecto “Bioprospección de la diversidad química presente en especies de recursos naturales terrestres y marinos del estado de Yucatán”, con registro SISTPROY FQUI-2018-0004. Financiado con recursos propios de la Facultad de Química, UADY. Asimismo, se contó con el apoyo de la beca número 724529 otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).



## RESUMEN

El género *Solanum* es reconocido como el mayor y más complejo género de la familia Solanaceae e incluye a varias especies de interés medicinal y económico. Las plantas pertenecientes a este género producen una amplia variedad de compuestos bioactivos, siendo los glicósidos y glicoalcaloides esteroidales los más característicos.

*Solanum erianthum* D. Don es una especie vegetal ampliamente distribuida en la Península de Yucatán, se ha reportado su uso en la medicina tradicional oriental. Sin embargo, hay escasos estudios encaminados a la caracterización química de sus metabolitos secundarios. Por lo anterior, el presente trabajo se enfocó en el aislamiento de los glicósidos esteroidales presentes en las raíces de esta especie, a partir de la partición butanólica del extracto metanólico.

La partición butanólica se fraccionó por cromatografía en columna con gel de sílice C<sub>18</sub>, como resultado de este proceso se obtuvieron ocho fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en columna de manera sucesiva, empleando fases estacionarias normales; también se empleó la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) de fase normal para la resolución de algunas fracciones. Al finalizar el proceso se obtuvieron un glucósido esteroide y tres glicoalcaloides esteroidales. El análisis por resonancia magnética nuclear (RMN) permitió identificar a los compuestos como prosapogenina B de la dioscina, kasianina, solamargina y el glicoalcaloide esteroide (3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 25R)-espirosol-5-en-3-il-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranosido, este último compuesto no ha sido reportado en la literatura.



## ABSTRACT

*Solanum* is considered the biggest and the most complex genus of Solanaceae family and include several species of medicinal and economic interest. The plants that belong to this genus generate a wide variety of bioactive compounds, where the steroidal glycosides and glycoalkaloids are the most characteristic.

*Solanum erianthum* D. Don is a vegetal species widely distributed in the Yucatan peninsula. It has been used in the oriental traditional medicine. However, there are few studies about the chemical characterization of its secondary metabolites. Therefore, this study focus on the isolation of the steroidal glycosides present in the roots of this vegetal species, from the butanolic partition of the methanolic extract.

The butanolic partition was fractionated by column chromatography using silica gel C<sub>18</sub>, eight fractions were obtained from this process, which were analyzed by column chromatography using normal stationary phases; also it was utilized high performance liquid chromatography (HPLC) of normal phase to resolve some fractions. At the end of the process, a steroidal glycoside and three steroidal glycoalkaloids were isolated. The nuclear magnetic resonance (NMR) analysis allowed us to identify the compounds as prosapogenina B of dioscoreine, khasianine, solamargina, and a new steroidal glycoalkaloid (3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 25R)-spirosol-5-en-3-yl-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-apiofuranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)]-O-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopyranoside, this novel compound has not been reported in the literature.



## ÍNDICE

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>ANTECEDENTES</b> .....	3
<b>Medicina tradicional</b> .....	3
<b>Familia Solanaceae</b> .....	3
<b>Género <i>Solanum</i></b> .....	4
<b><i>Solanum erianthum</i> D. Don</b> .....	4
<b>Glicósidos esteroidales</b> .....	6
<b>Glicósidos esteroidales aislados en especies del género <i>Solanum</i></b> .....	10
<b>OBJETIVO</b> .....	21
<b>HIPÓTESIS</b> .....	23
<b>JUSTIFICACIÓN</b> .....	25
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	27
<b>Recolección del material vegetal</b> .....	28
<b>Aislamiento y purificación de glicósidos esteroidales</b> .....	31
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	37
<b>Compuesto I</b> .....	37
<b>Compuesto II</b> .....	47
<b>Compuesto III</b> .....	60
<b>Compuesto IV</b> .....	69
<b>CONCLUSIONES</b> .....	81
<b>REFERENCIAS</b> .....	83



## INTRODUCCIÓN

En la última década se ha incrementado el interés por la búsqueda de moléculas con potencial biomédico, debido a la continua necesidad de preservar la salud frente a las diversas enfermedades y trastornos que afectan a la población. En este sentido, la naturaleza es una fuente inagotable de moléculas activas que pueden ser empleadas para el tratamiento de muchas enfermedades.<sup>1</sup>

En la península de Yucatán cerca de 800 plantas son empleadas en la medicina tradicional, de las cuales sólo algunas han sido estudiadas fitoquímicamente o evaluadas por su actividad biológica.<sup>2</sup> De las especies comúnmente empleadas en la medicina tradicional yucateca se encuentran las pertenecientes al género *Solanum*. Éstas se emplean por sus propiedades cicatrizante, antiinflamatoria y antitumoral, así como para el tratamiento de enfermedades en los riñones, vejiga y algunas heridas.<sup>3-5</sup>

Estudios fitoquímicos realizados a especies del género *Solanum* indican la presencia de diversos metabolitos secundarios tales como flavonoides, compuestos fenólicos, taninos y terpenoides, metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Sin embargo, en la mayoría de estos estudios también se ha reportado el aislamiento de glicoalcaloides y saponinas esteroidales.<sup>5-8</sup> Estos compuestos tienen un amplio espectro de efectos biológicos como la actividad antifúngica, antitumoral, hemolítica, citostática e inmunomoduladora, por lo que han sido empleados como punto de partida para la semi-síntesis de fármacos esteroides en la industria farmacéutica,<sup>6-9</sup> motivo por el cual se consideran compuestos con múltiples aplicaciones en química farmacéutica.

Una de las especies menos estudiadas del género *Solanum* es *S. erianthum* D. Don, la cual se encuentra ampliamente distribuida en la península de Yucatán.<sup>10</sup> La limitada información acerca de la diversidad química presente en las raíces de esta especie vegetal hace necesario realizar estudios fitoquímicos con el propósito de contribuir al conocimiento químico de esta especie.



## ANTECEDENTES

### Medicina tradicional

Por generaciones, los seres humanos han recurrido a la naturaleza como una fuente de medicamentos invaluable, donde los organismos terrestres tradicionalmente proporcionan los remedios más efectivos. Se estima que 80% de la población mundial depende de remedios herbolarios tradicionales y que al menos 35,000 especies vegetales presentan potencial para uso medicinal.<sup>11,12</sup>

Las plantas han sido una fuente de medicamentos durante miles de años. El uso de extractos de plantas medicinales para el tratamiento de enfermedades humanas es una práctica antigua, sin embargo, ha aumentado enormemente en los últimos años.<sup>13,14</sup>

La gran diversidad vegetal y la amplia riqueza cultural de México han favorecido el aprovechamiento de las plantas con fines medicinales desde épocas prehispánicas. En México, de las 30,000 especies de plantas conocidas hasta la fecha, aproximadamente 4,500 son empleadas comúnmente en la práctica de la medicina tradicional, gracias a esto nuestro país ocupa el segundo lugar a nivel mundial en el número de plantas medicinales registradas.<sup>2,12</sup>

En la Península de Yucatán se ha registrado el uso de aproximadamente 800 plantas en la medicina tradicional, de las cuales un número reducido han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico o evaluadas por su actividad biológica.<sup>2</sup> Actualmente, y a lo largo de este siglo, los productos naturales han sido reconocidos como una herramienta importante en el proceso de descubrimiento de fármacos.<sup>1</sup>

De las plantas comúnmente empleadas en la medicina tradicional se encuentran aquellas pertenecientes a la familia Solanaceae, la cual es una de las familias económicamente más importantes a nivel mundial y México es reconocido como uno de sus centros de diversificación. Asimismo, incluye especies de gran importancia: alimenticia (papa, tomate, berenjena y chile); industrial (tabaco); ornamental (petunias, copa de oro y floripondio) y medicinal (toloache y belladona).<sup>15</sup>

### Familia Solanaceae

La familia Solanaceae contiene aproximadamente 96 géneros y 2,300 especies. Posee una gran variedad de formas vegetativas y reproductivas, lo que le confiere la capacidad de colonizar distintos tipos de hábitats, por tanto, esta familia presenta una distribución cosmopolita, con mayor frecuencia en regiones tropicales, subtropicales y templadas, en un intervalo altitudinal de 0 a 4,000 m.<sup>15</sup>

Dentro de la familia Solanaceae, los géneros con mayor número de especies son: *Solanum* (1,000), *Lycianthes* (200), *Cestrum* (175), *Nicotiana* (95), *Physalis* (80) y *Lycium* (75).<sup>15</sup>

### **Género *Solanum***

*Solanum* L. es uno de los géneros más grandes de angiospermas con una amplia distribución mundial. Se estiman entre 1,000 y 2,000 especies distribuidas en los trópicos, subtropicos y en las regiones templadas de ambos hemisferios. De igual forma, es importante mencionar que las especies pertenecientes a este género son plantas herbáceas, arbustivas o trepadoras.<sup>15,16</sup>

En México, el género *Solanum* está integrado por 158 especies, es notable por algunas plantas alimenticias importantes, como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y otras menores como la berenjena (*Solanum melongena*).<sup>15-18</sup>

En la Península de Yucatán se han identificado 22 especies pertenecientes al género *Solanum*, las cuales se distribuyen desigualmente en los tres estados, siendo el estado de Quintana Roo el lugar donde se encuentra la mayoría de estas especies (22 especies), mientras que en los estados de Yucatán y Campeche se encuentran 14 y 10 especies, respectivamente.<sup>18,19</sup>

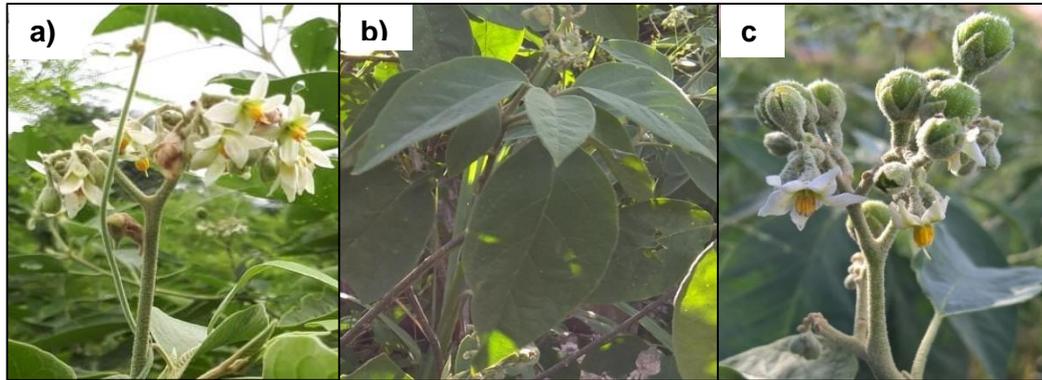
### ***Solanum erianthum* D. Don**

La especie *Solanum erianthum* D. Don, es conocida popularmente como berenjena macho o berenjena sin espinas, en lengua maya se conoce como *ukuuch*, *xaxux*, *chalche'* o *tóom p'aak*.<sup>10,20</sup>

Esta especie vegetal se encuentra como arbustos o árboles pequeños, de 2-8 m de altura; tallos de hasta 25 cm de diámetro con pelos estrellados suaves; ramas jóvenes blanquecinas a amarillentas, granulares tomentosas con pelos equinoides y dendrítico-equinoides, sésiles y cortante estipitados.<sup>20,21</sup>

Posee hojas engrosadas, ovaladas u ovalo-elípticas, 10-25 cm de largo, 3-15 cm de ancho, el ápice foliar agudo, la base redondeada a aguda; peciolos de 1-10 cm de largo. Flores bisexuales, regulares, pentámeras; cáliz campanulado de 5 mm de largo con lóbulos ovalados; corola estrellada de 1.5 cm de diámetro color blanco; los estambres se alternan con los lóbulos de la corola, filamentos de 1.5 mm de largo, glabros, anteras oblongas, de 4 mm de largo, apertura con poros apicales; ovario superior, casi glabro, estilo glabro.<sup>20,21</sup>

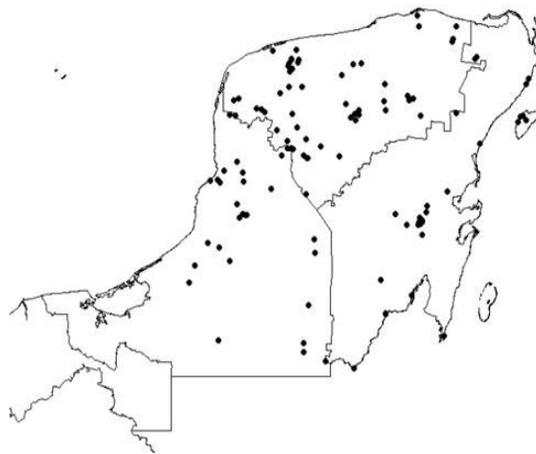
El fruto es una baya globosa, generalmente visto en estado verde, pero amarillo cuando está completamente maduro, de 9-12 mm de diámetro, tomentoso; con semillas numerosas, de 1.4-2 mm de largo y 1.1-1.6 mm de ancho. (Figura 1).<sup>20,21</sup>



**Figura 1.** *Solanum erianthum*. a) Flores, b) Hojas, y c) Frutos.

*S. erianthum* es originaria de las Indias Occidentales, América Central y México, sin embargo, ahora es una hierba ampliamente distribuida en los trópicos, aunque apenas penetra en Sudamérica. En México presenta una amplia distribución, con una mayor concentración en el lado sur de la República. Esta especie vegetal tiene presencia en la Península de Yucatán, siendo el Estado de Yucatán el lugar donde se presenta con mayor distribución (Figura 2).<sup>10,20,21</sup>

Esta especie se encuentra en selvas altas perennifolias y subperennifolias, selvas bajas caducifolias, en dunas costeras, generalmente en vegetación secundaria derivada de éstos; habita en climas cálidos, semicálidos, semisecos y templados.<sup>10,20,21</sup>



**Figura 2.** Distribución de *S. erianthum* en la península de Yucatán.<sup>10</sup>

## Descripción taxonómica de *Solanum erianthum*

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Solanales

**Familia:** Solanaceae

**Tribu:** Solaneae

**Género:** *Solanum*

**Especie:** *Solanum erianthum*<sup>20</sup>

Se tienen registros del empleo de *S. erianthum* en la medicina tradicional asiática y africana para tratar enfermedades inflamatorias, quemaduras y heridas. Las raíces y las hojas de esta planta han sido utilizadas como medicina popular para el tratamiento de metrorragias, edemas, gota, carbuncos, eccemas, dolores de muelas, dermatitis e infección bacteriana. Se informa que la decocción de la raíz se usa para dolores corporales, vértigo y problemas urinarios.<sup>13,20,21</sup>

En África occidental, se toma una decocción de hoja de *S. erianthum* por sus propiedades diuréticas y purgativas para curar la malaria, la lepra y las enfermedades venéreas, y también se toma para estimular funciones hepáticas.<sup>21</sup>

En la literatura se ha descrito que estas propiedades curativas son debidas a los diversos metabolitos secundarios presentes en el material vegetal. Estudios químicos realizados a especies del género *Solanum* indican la presencia de metabolitos secundarios, tales como glicoalcaloides, fenoles, flavonoides e isoprenoides (aceites esenciales y saponinas), de los cuales los glicoalcaloides y las saponinas son los más característicos ya que poseen diversas actividades biológicas, que incluyen las antitumorales, antimicrobianas y antivirales.<sup>21</sup>

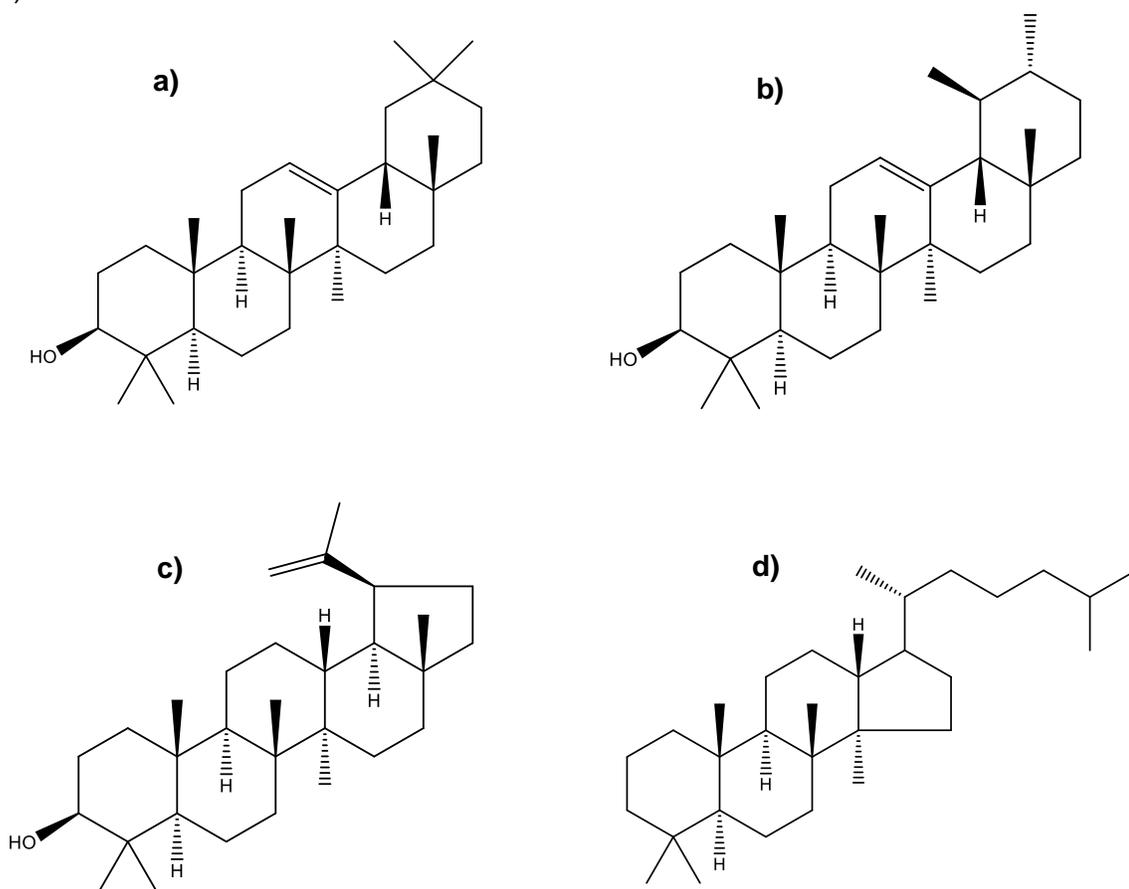
### Glicósidos esteroidales

Los glicósidos esteroidales, también denominados saponinas, son metabolitos secundarios ampliamente distribuidos en el reino vegetal. El nombre “saponina” se deriva del latín *sapo*, que significa “jabón”, debido a la capacidad de estas moléculas para formar espuma cuando se agitan en agua.<sup>22</sup> Estos compuestos actúan como una barrera

química en el sistema de defensa de las plantas frente a patógenos y herbívoros, por tanto, suelen encontrarse en los tejidos vegetales que son más vulnerables a los ataques de hongos, bacterias o la depredación de insectos.<sup>6,23</sup>

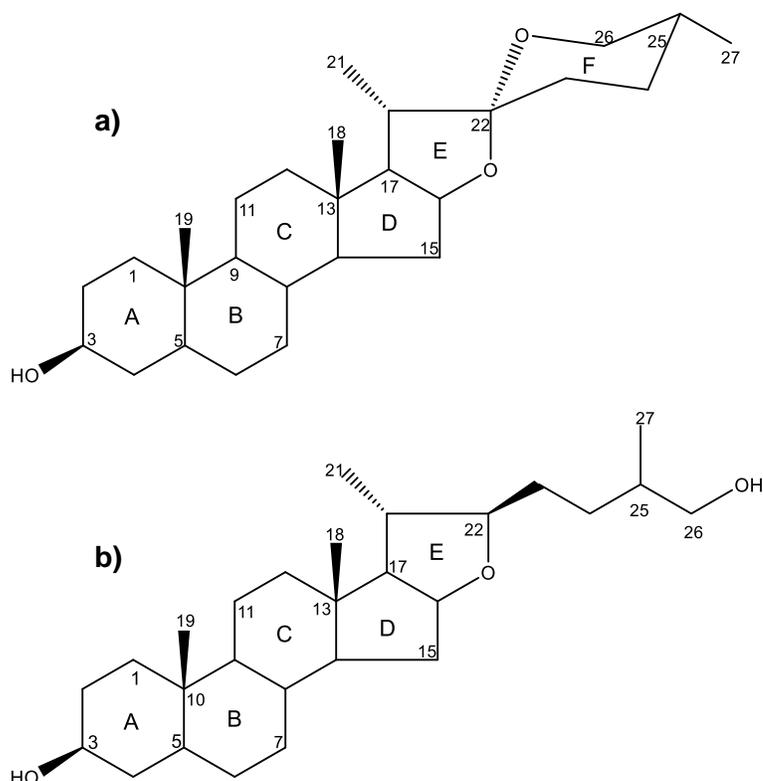
Las saponinas son compuestos complejos, heterósidos, formados de una porción glicosídica (fracción hidrosoluble) conectada a una aglicona hidrófoba denominada sapogenina. Dependiendo del número de átomos de carbono que componen el esqueleto de la sapogenina, las saponinas se clasifican en dos clases principales, los glicósidos triterpénicos y esteroidales, cuya caracterización estructural varía según el número de unidades de azúcar conectadas en diferentes posiciones.<sup>6,22,23</sup>

Las sapogeninas triterpenoidales, son mucho más diversas desde el punto de vista estructural que las sapogeninas esteroidales, el sistema de anillo básico suele ser de 5 o más raramente, de cuatro unidades. Entre las sapogeninas triterpenoidales pentacíclicas se pueden mencionar la alfa y beta amirina, así como el lupano. El esqueleto dammarano es un ejemplo de sapogenina triterpénica tetracíclica (**Figura 3**).<sup>22,23</sup>



**Figura 3.** Sapogeninas triterpénicas. a)  $\beta$ -Amirina, b)  $\alpha$ -Amirina, c) Lupeol y d) Dammarano.

Las sapogeninas esteroidales poseen una aglicona con 27 átomos de carbono en su estructura, siendo el esqueleto base el colestano, el cual puede ser de tipo espirostano de seis anillos o uno de furostano de cinco anillos (**Figura 4**).<sup>22,23</sup>

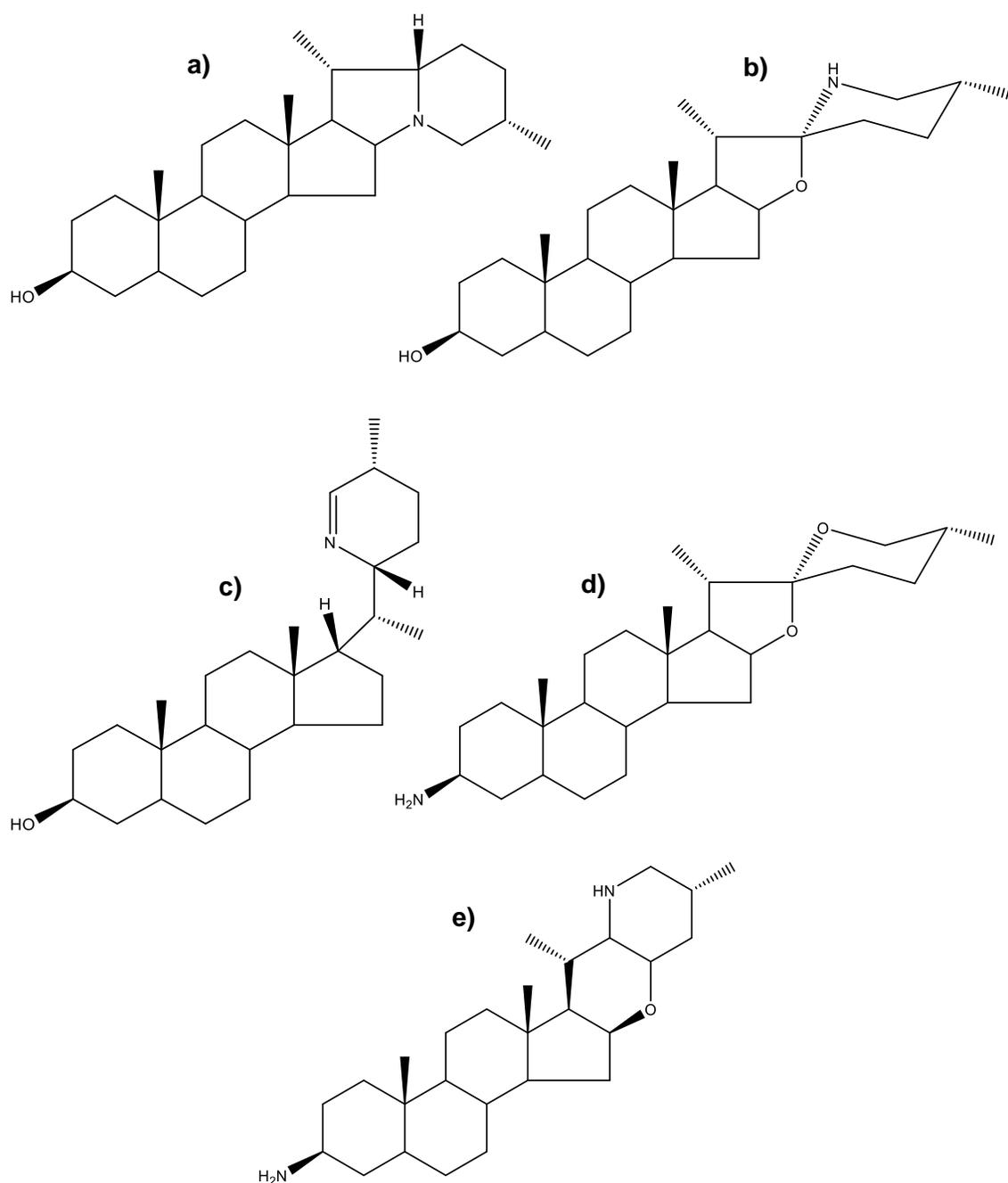


**Figura 4.** Sapogeninas esteroidales. a) Espirostanol, b) Furostanol.

En las especies del género *Solanum* se han aislado principalmente saponinas de tipo esteroideal. Adicionalmente, las especies vegetales pertenecientes a la familia Solanaceae son reconocidas por su capacidad de sintetizar una clase especial de saponinas, los llamados alcaloides esteroidales o glicoalcaloides.<sup>24</sup> Estos compuestos son estructuralmente similares a las saponinas esteroidales, poseen una aglicona, cuyo esqueleto base es el colestano, con un átomo de nitrógeno en alguno de los anillos y una cadena de oligosacáridos.<sup>25</sup>

Las agliconas se dividen en cinco categorías diferentes según su estructura: solanidanos (con anillos de indolizidina fusionados), espirosolanos, epiminocolestanos,  $\alpha$ -epiminociclohemietales y 3-aminospirostanos (**Figura 5**).<sup>25</sup> Siendo los glicoalcaloides

de tipo espirosolano (similar al esteroestano, pero con nitrógeno en lugar de oxígeno en el anillo F) y solanidano (donde el átomo de nitrógeno conecta a los anillos E y F) los más comunes.<sup>24,25</sup>



**Figura 5.** Estructura de alcaloides esteroidales. a) Solanidanos, b) Espirosolanos, c) Epiminocolestanos, d)  $\alpha$ -Epiminociclohemiacetales y e) 3-Aminospirostanos.

Se ha reportado que los glicoalcaloides inducen toxicidad, lo que ha sido un tema importante para la salud de la población, ya que están presentes en diversos alimentos de la dieta humana como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Solanum lycopersicum*) y la berenjena (*Solanum melongena*).<sup>24,25</sup>

No obstante, los alcaloides y glicósidos esteroidales representan compuestos de gran interés para la química farmacéutica, ya que poseen una amplia gama de actividades farmacológicas tales como: actividad expectorante, antiinflamatoria, antioxidante, inmunomoduladora, antitumoral, antimicrobiano, antimicótico y antiparasitario. Desde una perspectiva industrial, estos compuestos pueden emplearse como punto de partida para la semi-síntesis de fármacos esteroides en la industria farmacéutica.<sup>9,22</sup>

### **Glicósidos esteroidales aislados en especies del género *Solanum***

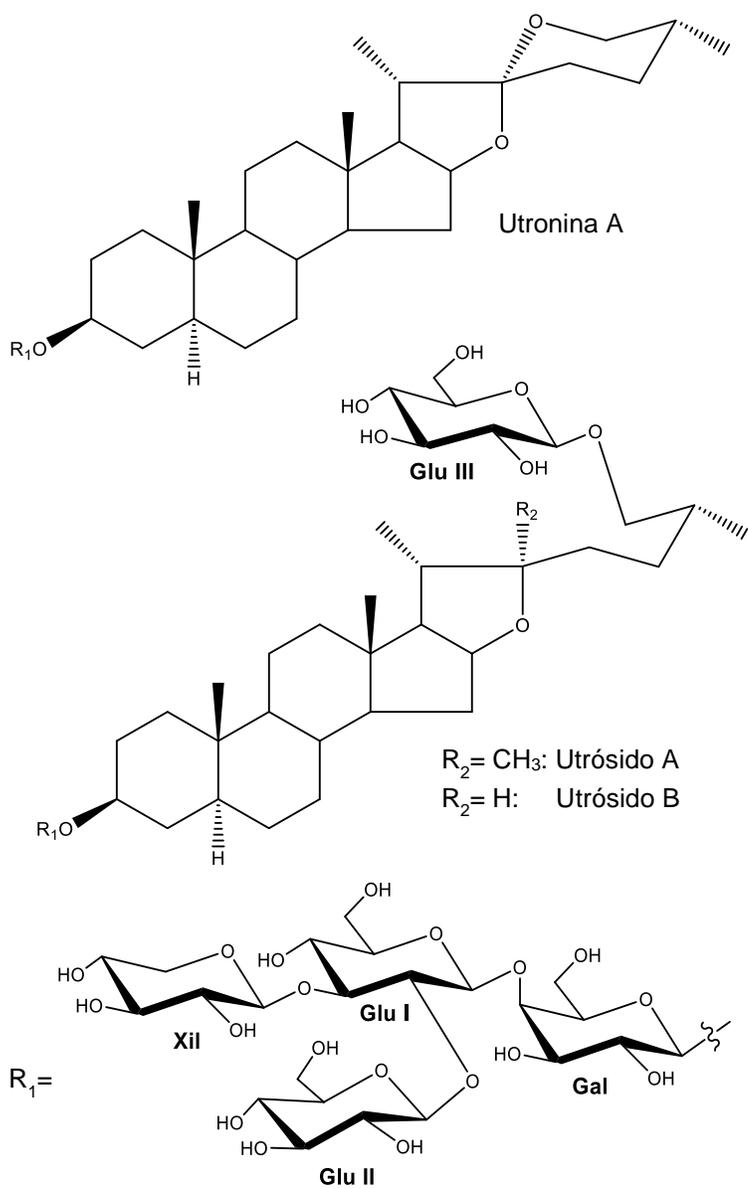
Como se mencionó anteriormente, el género *Solanum* es uno de los géneros más grandes de la familia Solanaceae, por lo que en la literatura podemos encontrar numerosos estudios que reportan el aislamiento de glicósidos esteroidales a partir de diversas especies vegetales pertenecientes a este género, tales como: *Solanum nigrum*, *Solanum melongena*, *Solanum torvum*, *Solanum tridynamum* y *Solanum erianthum*.

#### *Solanum nigrum*

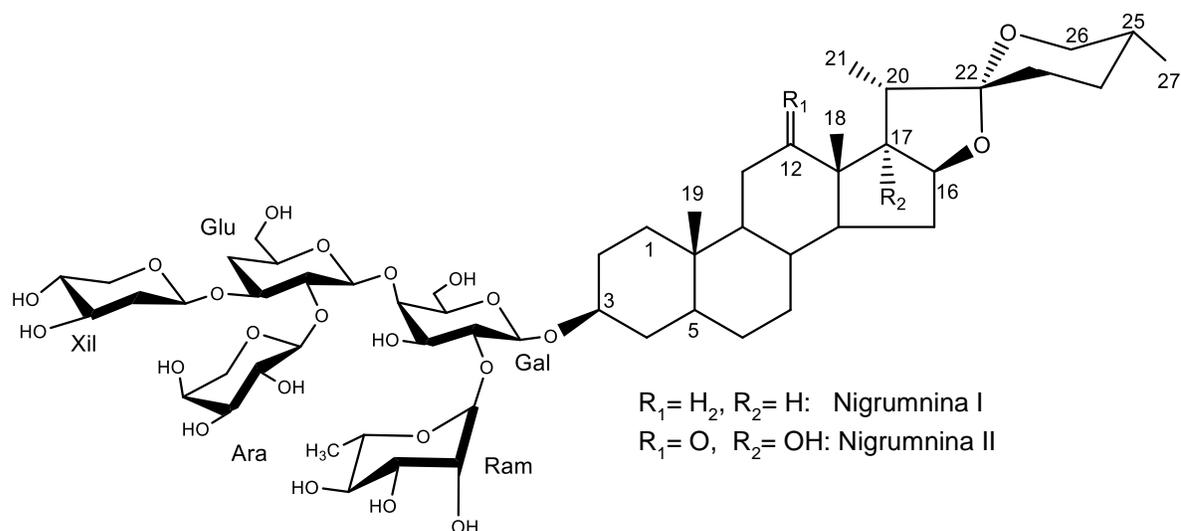
Especie vegetal conocida como sombra oscura de noche, las hojas y raíces de esta especie son empleadas en la medicina tradicional hindú y otras partes del mundo para curar trastornos hepáticos, afecciones crónicas de la piel, afecciones inflamatorias, períodos dolorosos, fiebre, diarrea y enfermedades oculares.<sup>26</sup>

A partir del extracto metanólico de las raíces de esta especie se aislaron y caracterizaron un glicósido esteroideal de tipo espiroetano y dos glicósidos esteroidales de tipo furoetano. Los compuestos fueron identificados como la utronina A y los utrosidos A y B (**Figura 6**).<sup>27</sup>

Del extracto metanólico de toda la planta se obtuvieron dos oligoglicósidos esteroidales, denominados nigrumninas I y II (**Figura 7**). Estos compuestos se aislaron mediante cromatografía en columna empleando fases estacionarias como resina Diaion HP-20 y gel de sílice, mientras que la caracterización se llevó a cabo sobre la base del análisis espectroscópico por experimentos mono y bidimensionales de RMN y espectrometría de masas empleando ionización por bombardeo con átomos rápidos (FAB, por sus siglas en inglés).<sup>28</sup>

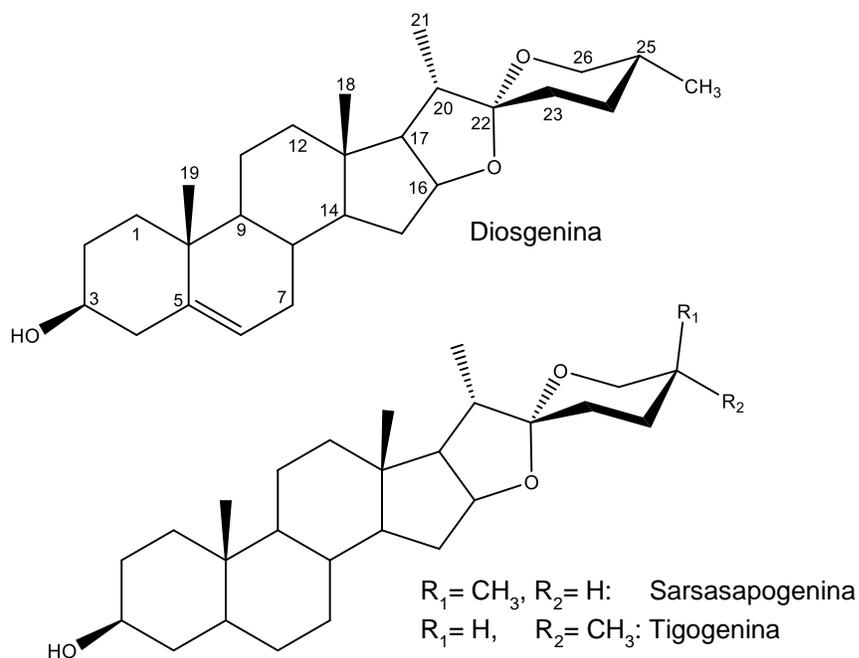


**Figura 6.** Glicósidos esteroidales aislados de *S. nigrum*.



**Figura 7.** Oligoglicósidos esteroidales aislados a partir de *S. nigrum*.

Estudios más recientes reportan la presencia de tres sapogeninas esteroidales: diosgenina, sarsasapogenina y tigogenina, compuestos aislados en el extracto metanólico obtenido a partir del material vegetal entero de esta especie (**Figura 8**).<sup>29</sup>

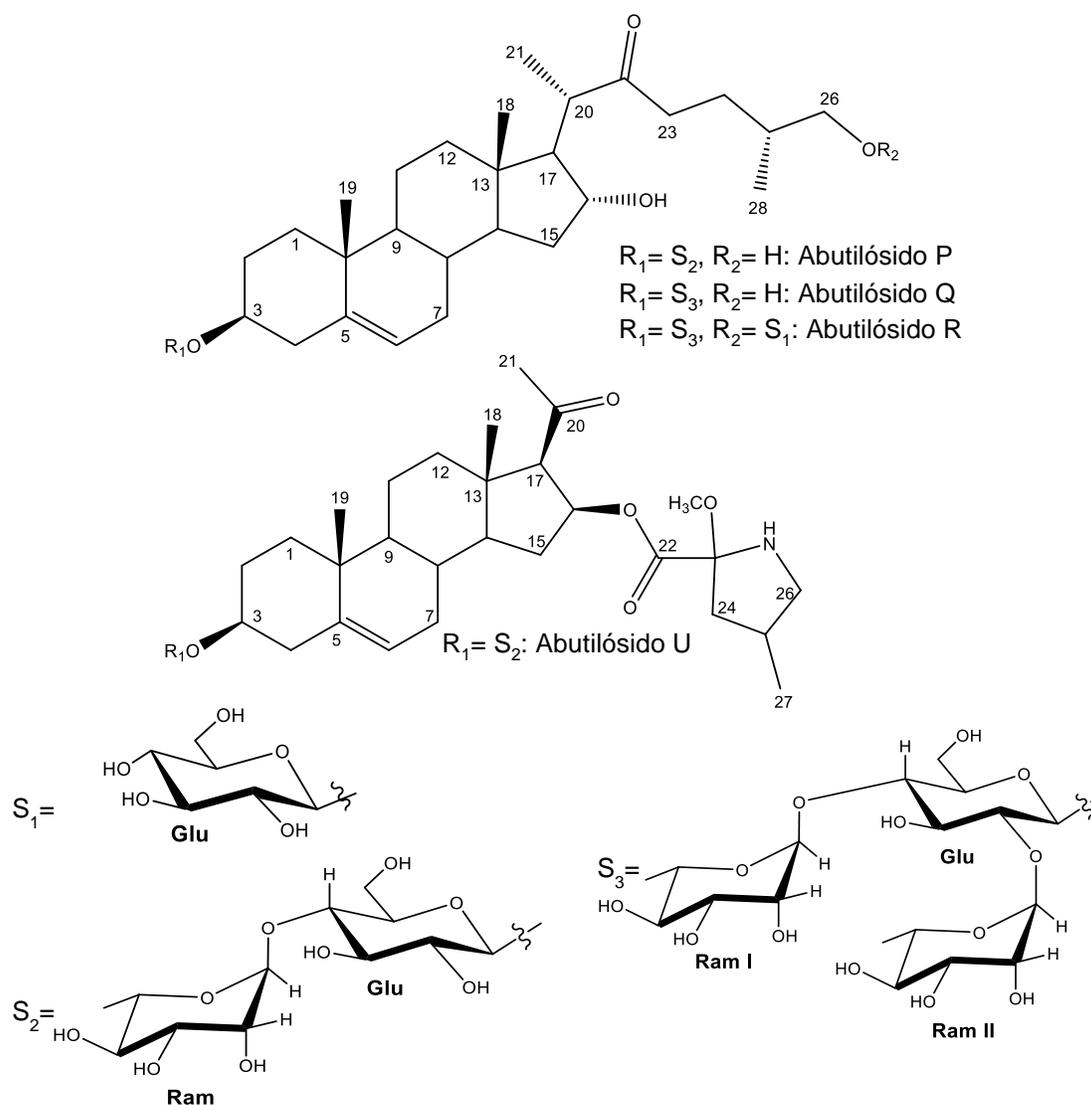


**Figura 8.** Sapogeninas esteroidales aislados a partir de *S. nigrum*.

## *Solanum melongena*

La especie *S. melongena* es usada en la medicina tradicional china, sus raíces se usan para tratar beriberi, prurito, dolor de muelas, asma, sífilis, etc. De igual forma, se ha informado que compuestos puros y extractos crudos de las raíces de esta especie poseen diversas actividades biológicas, como efectos antiinflamatorios, sedantes, hipnóticos, analgésicos, neuroprotectores y promotores de la circulación sanguínea.<sup>8</sup>

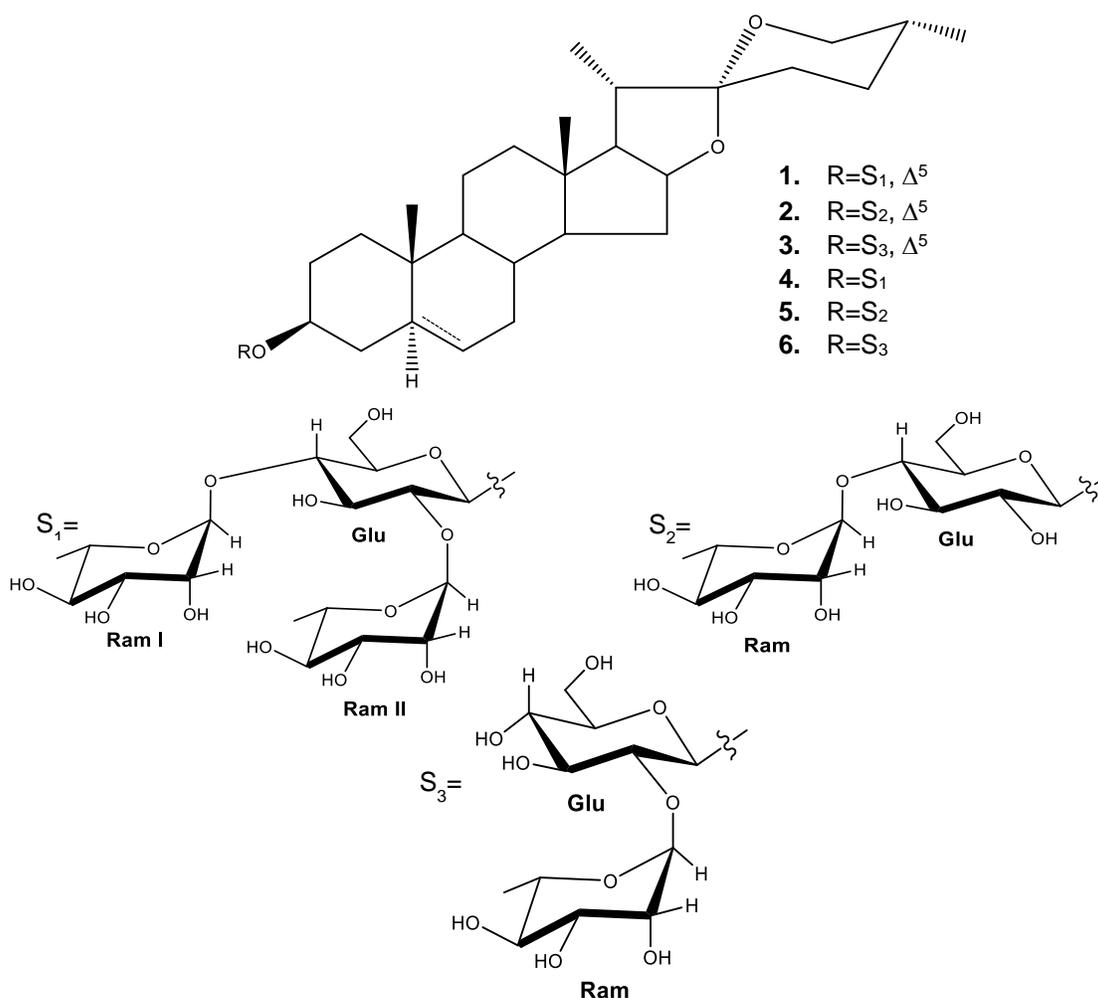
De la fracción butanólica, proveniente del proceso de partición de un extracto etanólico de raíces de *S. melongena*, se identificaron tres nuevas saponinas esteroidales de tipo furostano y un nuevo alcaloide esteroidal. Las saponinas identificadas fueron los abutilósidos P, Q y R; mientras que el alcaloide aislado fue el abutilósido U (**Figura 9**).<sup>8</sup>



**Figura 9.** Saponinas esteroidales de tipo furostano aislados de *S. melongena*.

También se han aislado y caracterizado seis glicósidos esteroidales de tipo espirostanos en la fracción butanólica obtenida a partir del extracto acuoso de las raíces de esta especie. Los compuestos aislados fueron identificados como: diosgenina 3-O-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosido] (**1**), diosgenina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosido (**2**), diosgenina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosido (**3**), tigenenina 3-O-[[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)]- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosido] (**4**), tigenenina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopiranosido (**5**) y tigenenina 3-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-glucopiranosido (**6**).<sup>30-32</sup>

Los compuestos se aislaron mediante cromatografía en columna empleando fases estacionarias como gel de sílice, Sephadex LH-20 y C<sub>18</sub>, así como CLAE, mientras que la caracterización se llevó a cabo mediante experimentos mono y bidimensionales de RMN y espectrometría de masas (**Figura 10**).<sup>8,30-32</sup>



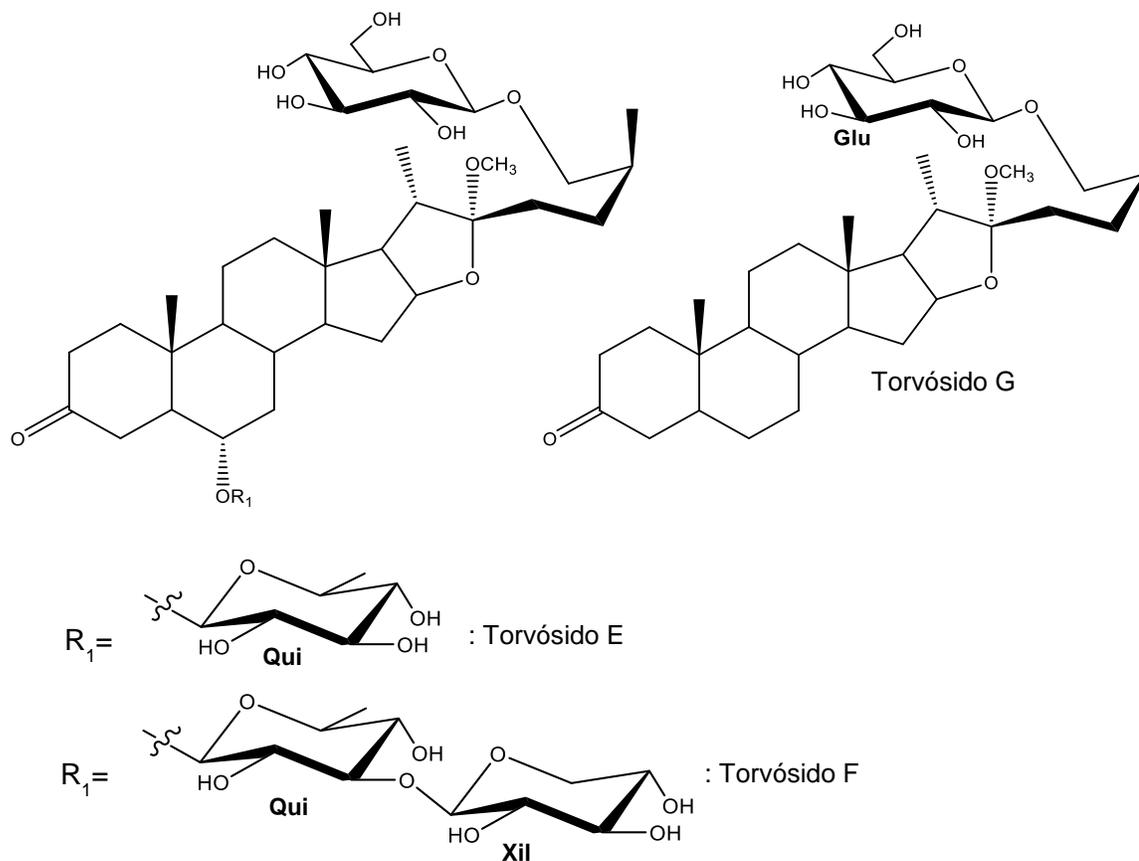
**Figura 10.** Saponinas esteroidales de tipo espirostanos aislados de *S. melongena*.

## *Solanum torvum*

Es una especie de importancia farmacológica de la familia Solanaceae. Durante muchas décadas, diferentes grupos étnicos han utilizado el tallo seco y la raíz de esta planta para el tratamiento de diversas dolencias, tales como: el resfriado, la tos, fiebre, asma, diabetes, hipertensión, así como para tratar enfermedades del hígado, tuberculosis y como antianémico.<sup>4,33</sup>

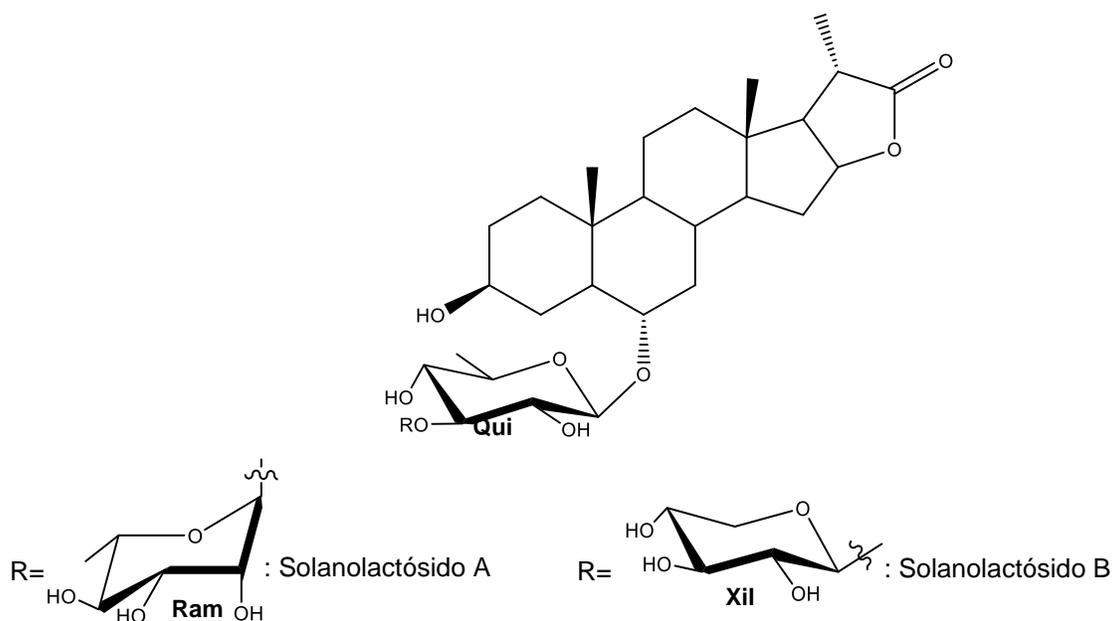
Entre los componentes químicos principales de *S. torvum* se encuentran los esteroides, las saponinas esteroidales, los glicoalcaloides y los fenoles. Diversos estudios farmacológicos indican que el tallo y la raíz de esta especie tienen efectos antitumorales, antibacterianos, antivirales, antiinflamatorios y otros efectos de importancia medicinal.<sup>4,33,34</sup>

El extracto metanólico de las raíces de *S. torvum* se aislaron tres glicósidos esteroidales, denominados torvósidos E, F y G (**Figura 11**). La caracterización estructural de estos compuestos se llevó a cabo mediante experimentos mono y bidimensionales de RMN y espectrometría de masas empleando ionización por FAB.<sup>4,35</sup>

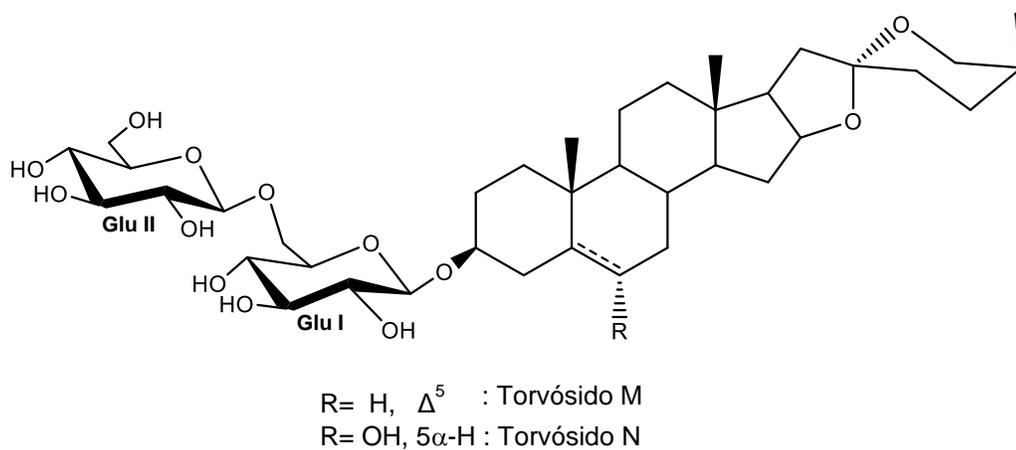


**Figura 11.** Glicósidos esteroidales aislados de las raíces de *S. torvum*.

A partir del extracto etanólico de las partes aéreas de *S. torvum* se aislaron dos saponinas esteroideas con una lactona en C-22, denominadas solanolactósidos A y B (**Figura 12**), también fueron caracterizadas dos saponinas esteroideas de tipo espirostano, llamados torvósidos M y N (**Figura 13**).<sup>36</sup>



**Figura 12.** Solanolactósidos aislados de *S. torvum*.

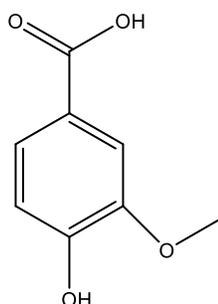


**Figura 13.** Torvósidos M y N aislados de *S. torvum*.

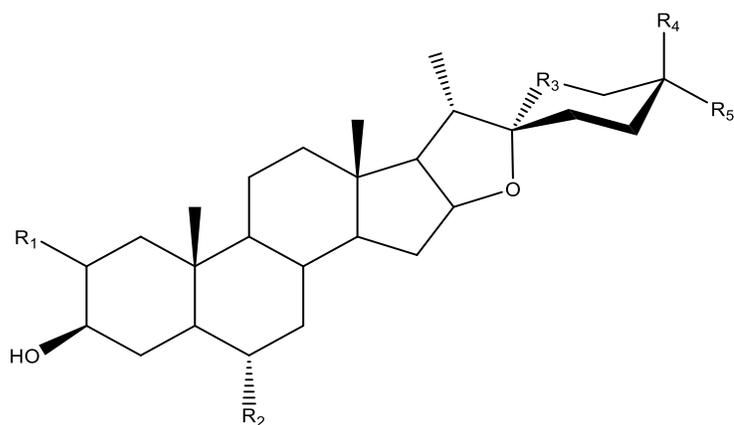
### *Solanum tridynamum*

Es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas, endémica de México, de la cual se ha reportado su empleo en la medicina tradicional. Las flores y hojas son empleadas, directamente o en forma de té, para tratar la sordera; de igual forma las flores se hierven y se emplean para adelgazar, así como para baños calientes después del parto para limpiar.<sup>37,38</sup>

Se ha reportado la presencia de cuatro sapogeninas esteroidales, un alcaloide esteroideal y ácido vainílico (**Figura 14**) a partir del extracto metanólico de las raíces de *S. tridynamum*. Las sapogeninas esteroidales fueron: diosgenina, yucagenina, clorogenina y neoclorogenina; el alcaloide esteroideal fue la solasodina (**Figura 15**).<sup>39</sup>



**Figura 14.** Estructura química del ácido vainílico



$R_1 = H$	$R_2 = H$	$R_3 = NH, \Delta^5$	$R_4 = CH_3$	$R_5 = H$ : Solasodina
$R_1 = OH$	$R_2 = H$	$R_3 = O, \Delta^5$	$R_4 = H$	$R_5 = CH_3$ : Yucagenina
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	$R_3 = O$	$R_4 = H$	$R_5 = CH_3$ : Clorogenina
$R_1 = H$	$R_2 = OH$	$R_3 = O$	$R_4 = CH_3$	$R_5 = H$ : Neoclorogenina

**Figura 15.** Compuestos esteroidales aislados de las raíces de *S. tridynamum*.

### *Solanum erianthum*

Se han realizado diversos estudios fitoquímicos en los frutos, hojas y raíces de esta especie, y en la mayoría de estos estudios se emplearon pruebas preliminares o cualitativas para determinar la presencia de algunos tipos de metabolito secundarios. Los ensayos preliminares indicaron la presencia de saponinas, esteroides, taninos y flavonoides a partir del extracto metanólico de *S. erianthum*. La **Tabla 1** muestra los metabolitos secundarios presentes en las diferentes fracciones resultantes de la partición del extracto metanólico de esta especie.<sup>20,40,41</sup>

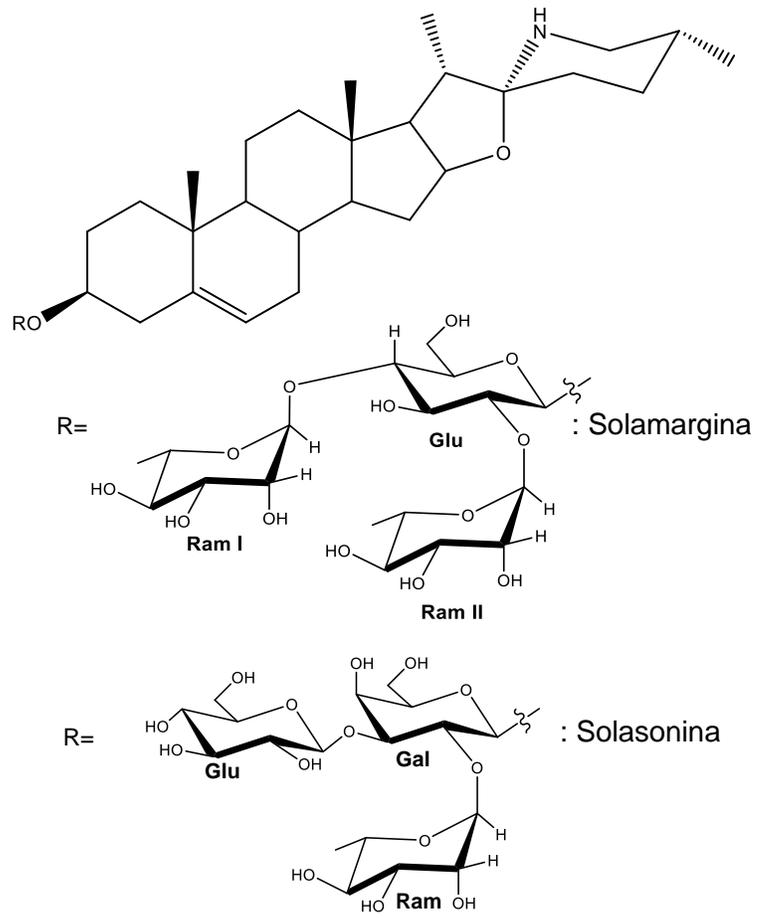
**Tabla 1.** Metabolitos secundarios identificados en los diversos extractos orgánicos de *S. erianthum* por pruebas cualitativas.<sup>20,40,41</sup>

Metabolito secundario	Hexano	Acetato de etilo	Acetona	Metanol	Acuoso	Pruebas
Glicósidos	-	-	-	-	-	Prueba de Molish
Saponinas	-	-	-	+	+	Prueba de espuma Rosenthaler
Alcaloides	-	-	+	+	+	Pruebas de Mayer, Wagner, Dragendorff
Esteroides	+	+	+	-	-	Liebermann-Burchard, Salkowski
Taninos	-	-	-	+	+	Prueba de FeCl <sub>3</sub> al 2%
Flavonoides	-	+	+	+	-	Prueba de Shinoda

(-): Ausencia, (+): Presencia

En la literatura existen pocos estudios encaminados al aislamiento y caracterización estructural de glicósidos esteroidales presentes en esta especie, uno de ellos es el realizado por Chou y col.<sup>42</sup> donde a partir de la fracción butanólica, proveniente del proceso de partición de un extracto metanólico de las hojas de esta especie, identificaron los glicoalcaloides esteroidales solamargina y solasonina (**Figura 16**). Estos compuestos se aislaron por medio de cromatografía en columna empleando fases estacionarias como gel de sílice y Sephadex LH-20, así como CLAE, mientras que la caracterización estructural se llevó a cabo por experimentos mono y bidimensionales de RMN y espectrometría de masas empleando ionización por electrospray (IEE).<sup>42</sup>

Por lo anterior, se hace necesario realizar más estudios químicos dirigidos a la caracterización de los metabolitos secundarios presentes en esta especie vegetal con el objetivo de ampliar la información fitoquímica disponible.



**Figura 16.** Glicoalcaloides esteroidales aislados de las hojas de *S. erianthum*.



## OBJETIVO

### General

Caracterizar estructuralmente saponinas esteroidales aisladas de las raíces de *Solanum erianthum* D. Don.

### Específicos

Aislar saponinas esteroidales del extracto metanólico de *S. erianthum* D. Don por técnicas cromatográficas convencionales y de alta eficiencia.

Elucidar las saponinas esteroidales con base en sus características espectroscópicas y espectrométricas.



## HIPÓTESIS

Las raíces de la especie vegetal *Solanum erianthum* D. Don poseen glicósidos esteroidales que pueden ser extraídos con un disolvente orgánico polar como el metanol.



## JUSTIFICACIÓN

En la medicina tradicional se han empleado especies pertenecientes al género *Solanum*. Estudios realizados a especies de este género indican la presencia de saponinas esteroidales, compuestos de gran interés por su amplio espectro de actividad biológica.<sup>9,21</sup>

Se conoce que hasta la fecha se han realizado estudios químicos para determinar la diversidad de metabolitos secundarios presentes en las hojas, flores y frutos de la especie *S. erianthum* D. Don.<sup>20,21</sup> Sin embargo, no se han realizado estudios encaminados a la caracterización química de los metabolitos secundarios presentes en las raíces de esta especie.

Los primeros estudios acerca de la presencia de metabolitos secundarios como flavonoides, saponinas, esteroides y alcaloides en *S. erianthum* D. Don fueron pruebas cualitativas y cuantitativas sin la caracterización estructural de los compuestos.<sup>40,41</sup> Actualmente, con el advenimiento de nuevas técnicas dedicadas al estudio químico, tales como los experimentos de resonancia magnética nuclear mono y bidimensionales, homo- y heteronucleares, así como los experimentos selectivos permiten la caracterización química de los metabolitos secundarios de manera exacta e inequívoca.<sup>43</sup>

Es por esto que se propone la determinación de metabolitos secundarios en las raíces de *S. erianthum* D. Don con el fin de contribuir al enriquecimiento de la información fitoquímica disponible para este recurso natural regional. Además, los compuestos aislados podrían representar nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de diversas enfermedades, así como materia prima para el desarrollo de fármacos en la industria farmacéutica.<sup>1,6,9</sup>



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material de laboratorio

Los disolventes para los procesos de extracción y separación fueron destilados en el laboratorio previamente a su utilización. Mientras que los disolventes utilizados para cromatografía de líquidos de alta eficiencia fueron de grado HPLC de la marca J.T. Baker.

Los análisis por cromatografía en capa delgada (CCD) se realizaron en cromatofolios de aluminio impregnados de gel de sílice GF de 0.25 mm de espesor marca Aldrich. Los agentes reveladores utilizados en cada ocasión fueron luz UV de onda corta (254 nm) y de onda larga (366 nm), como reveladores químicos se emplearon el óleum (mezcla de ácido acético glacial, agua y ácido sulfúrico en proporción 20:4:1) y el reactivo de Lieberman (mezcla de anhídrido acético, cloroformo y ácido sulfúrico en proporción 1:1:0.1).

Para las separaciones por cromatografía en columna (CC), se utilizaron columnas de vidrio con diámetro interno de 5, 3, 2.5 y 2 cm, empacadas hasta una altura de 15 cm con gel de sílice con tamaño de partícula 70-230  $\mu\text{m}$ , marca Merck, gel de sílice de octadecilsilano ( $\text{C}_{18}$ ) marca Aldrich y gel de sílice para CCD grado estándar sin aglutinante con tamaño de partícula 2-25  $\mu\text{m}$  y tamaño de poro 60 Å marca Aldrich.

### Equipos cromatográfico, espectroscópico y espectrométrico

El análisis por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se llevó a cabo en un cromatógrafo de líquidos marca Thermo Scientific Surveyor series con detector de UV-Vis con software de control ChromQuest versión 3.2.1. Agilent Chemstation

Los experimentos de RMN monodimensionales ( $\text{RMN-}^1\text{H}$ ,  $\text{RMN-}^{13}\text{C}$ ), bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY) y heteronucleares (HSQC, HMBC), así como experimentos de RMN selectivos se efectuaron en un espectrómetro marca Bruker Avance Ultrashield 400 MHz con sonda dual de 5 mm y software de control TopSpin versión 3.6. Para los análisis se emplearon como disolventes deuterados el metanol ( $\text{CD}_3\text{OD}$ ) y la piridina (piridina- $d_5$ ). Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) reportados se establecieron teniendo como referencia la señal residual de los protones del disolvente.

La masa molecular de los compuestos aislados se determinó por espectrometría de masas de baja resolución empleando ionización por IEE en un cromatógrafo de líquidos de alta eficiencia marca Agilent Technologies modelo 1290 con compartimiento de

bomba binaria modelo 1290, compartimiento de automuestreador modelos 1290 y compartimiento termostatzado para columna modelo 1290, acoplado a un detector másico de la misma marca modelo G6470A Triple Quad LC/MS, corriendo el software de control Agilent ChemStation versión B.04.03. Se empleó una columna Eclipse plus C18 (2.1 x 50 mm, 1.8  $\mu$ m, Agilent Technologies). La fase móvil fueron agua con 0.1% de ácido fórmico (solvente A) y metanol con 0.1% de ácido fórmico (solvente B). El programa de gradiente fue el siguiente: isocrático al 85% de solvente A desde el inicio a los 3 min, isocrático al 100% de solvente B hasta los 5 min, del 100% al 20% del solvente B de 5 a 6 min. La separación cromatográfica se realizó a un flujo de 0.500 mL/min a 40°C. El volumen de inyección fue de 2  $\mu$ L.

La detección de espectrometría de masas se realizó utilizando UHPLC-MS-ESI. Los parámetros de ionización optimizados para IEE fueron los siguientes: un voltaje capilar de 3.7 kV, nebulización con nitrógeno a 45 psi, flujo de gas seco de 5 L/min a una temperatura de 300 °C. Con base a los resultados de los experimentos preliminares, los espectros de masas se registraron dentro del rango de masas de 100-1500 y 70-1500 m/z para los espectros de MS/MS (tiempo de exploración 1 s). Se registraron los espectros de masas de ion de producto de disociación inducida por colisión (CID, por sus siglas en inglés), en modo auto-MS/MS con una energía de colisión de 100 eV.

### **Software de análisis de datos**

Los espectros de RMN fueron analizados en el software MestReNova versión 12.0.1.

Las estructuras químicas presentadas en este trabajo fueron elaboradas en el software ChemDraw Professional versión 16.0.

### **Recolección del material vegetal**

La especie *Solanum erianthum* fue recolectada en enero de 2019 en la ciudad de Mérida, Yucatán en el punto 20°59' N, 89°38' W. La especie vegetal fue identificada por el Dr. Juan Tun Garrido y un ejemplar completo se destinó para muestra de herbario a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia UADY (N° JT13250).

## Preparación de la muestra

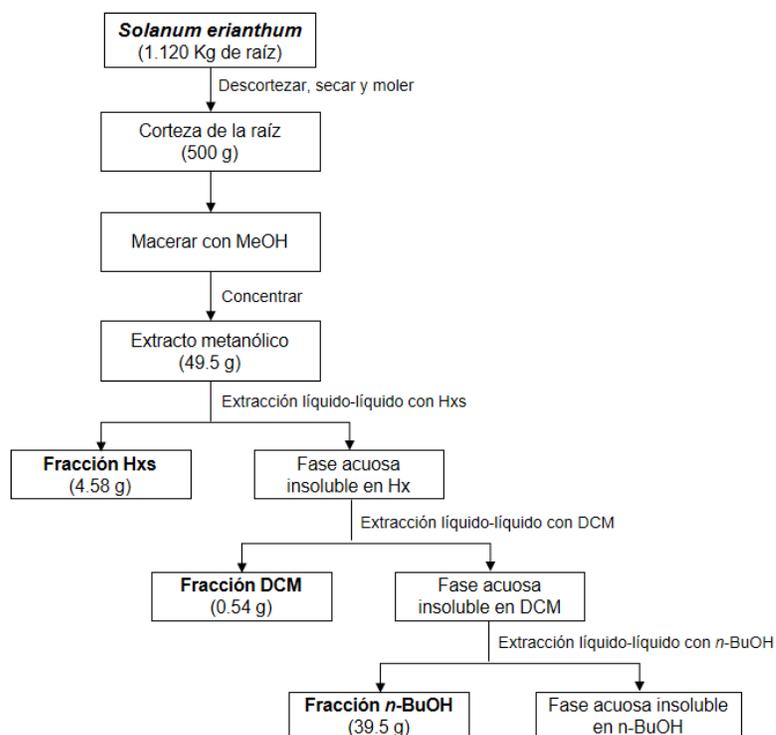
El material vegetal se dividió en sus diferentes partes: flores, frutos, hojas, tallos y raíces. Las raíces (1.120 kg) fueron limpiadas manualmente con un cepillo de cerdas. Posteriormente, fueron descortezadas de manera manual y la corteza se llevó a sequedad en un desecador de herbario a una temperatura de 65 °C durante tres días. El material vegetal seco fue triturado y molido empleando un molino automático de tamiz 10.

## Extracción

Unos 500 g de corteza, seca y molida, se sometieron a extracción por maceración con MeOH durante 72 h repitiéndose el proceso cinco veces. El extracto metanólico obtenido se concentró en un evaporador rotatorio a presión reducida para obtener el residuo seco (49.5 g).

### *Fraccionamiento primario*

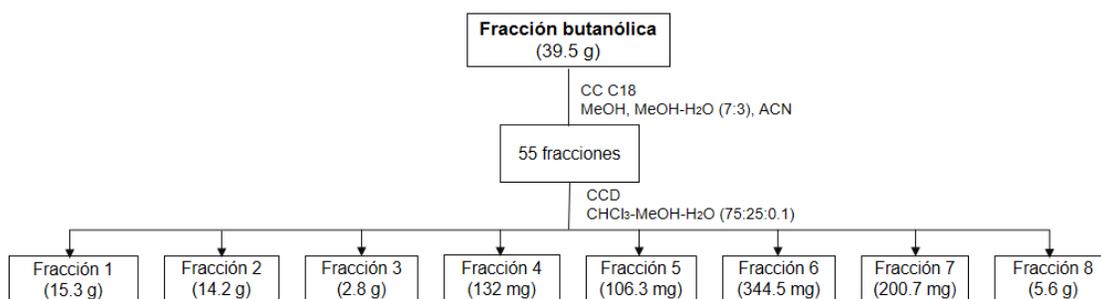
El residuo seco se suspendió en una mezcla de metanol (MeOH):H<sub>2</sub>O en proporción 1:3, y luego fue fraccionado por partición líquido-líquido con hexanos (Hxs), diclorometano (DCM) y *n*-butanol (*n*-BuOH), sucesivamente. Las fracciones obtenidas se llevaron a sequedad en un evaporador rotatorio a presión reducida. El proceso para la obtención de las fracciones se describe de manera resumida en la **Figura 17**. Dada la naturaleza polar de los compuestos de interés se procedió al fraccionamiento secundario de la fracción butanólica (*n*-BuOH). Las fracciones obtenidas con Hxs y DCM, así como el resto de la mezcla MeOH:H<sub>2</sub>O fueron almacenadas a baja temperatura (4 °C).



**Figura 17.** Proceso de extracción y fraccionamiento por partición líquido-líquido.

#### *Fraccionamiento secundario*

La fracción de *n*-BuOH (39.5 g) fue fraccionada en una columna cromatográfica empacada con gel de sílice en fase reversa (C<sub>18</sub>) y eluída con una fase móvil de MeOH:H<sub>2</sub>O en proporción 70:30, seguido de MeOH y finalmente, acetonitrilo (ACN). Se obtuvieron 55 fracciones las cuales fueron analizadas por CCD y posteriormente reunidas de acuerdo a su similitud en ocho fracciones nombradas de F1 a F8. En la **Figura 18** se resume el proceso del fraccionamiento secundario.



**Figura 18.** Fraccionamiento secundario.

Las ocho fracciones obtenidas se analizaron por RMN-<sup>1</sup>H, donde en los espectros de protón de las fracciones F2 y F3 se observaron las señales características de los compuestos de interés, adicionalmente fueron de las fracciones con mayor cantidad. Por lo anterior, estas fracciones se sometieron a fraccionamiento por cromatografía en columna. A partir de este fraccionamiento terciario, las fracciones de interés fueron seleccionadas con base en su cantidad y en lo observado en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H.

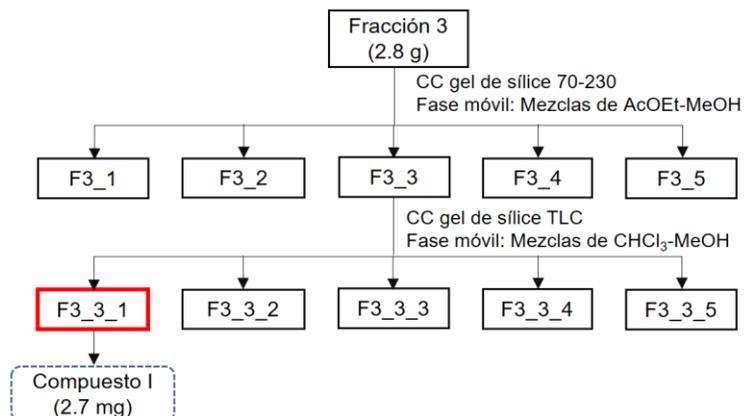
## Aislamiento y purificación de glicósidos esteroidales

### Fraccionamiento terciario/ Análisis de la fracción F3

La fracción F3 (2.8 g) fue fraccionada en una columna cromatográfica empacada con gel de sílice para CCD utilizando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo (AcOEt):MeOH en gradiente en las proporciones 100:0, 97:3, 94:6, 91:9, 88:12, 85:15, 82:18, 79:21, 70:30, 60:40, 50:50 y 0:100. Se obtuvieron 31 fracciones las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo con su similitud en cinco fracciones nombradas de F3\_1 a F3\_5.

### Fracción F3\_3

La fracción F3\_3 (223.5 mg), fue fraccionada en una columna cromatográfica empacada con gel de sílice para CCD utilizando como fase móvil una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MeOH en gradiente en las proporciones: 95:5, 90:10, 85:15, 80:20, 75:25, 70:30, 60:40, 50:50 y 0:100. Se obtuvieron 35 fracciones y por análisis en CCD fueron reunidas por similitud a un total de seis fracciones nombradas de F3\_3\_1 a F3\_3\_5. Donde se obtuvo el **compuesto I** en la fracción F3\_3\_1, el cual fue sometido a análisis espectroscópicos y espectrométricos (**Figura 19**).



**Figura 19.** Obtención del **compuesto I** a partir de la fracción

### *Análisis de la fracción F2*

La fracción F2 (14.2 g) se analizó por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria gel de sílice 70-230 y como fase móvil mezclas de AcOEt-MeOH en las proporciones: 90:10, 80:20, 70:30, 75:25, 60:40, 50:50, 0:100. De este proceso se obtuvieron 44 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo con su similitud en ocho fracciones denominadas F2\_1 a F2\_8.

### *Fracción F2\_3*

La fracción F2\_3 (1.8 g), fue fraccionada en una columna cromatográfica empacada con gel de sílice TLC utilizando como fase móvil una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MeOH en gradiente (75:25, 70:30 x2, 65:25, 50:50 y 0:100). Se obtuvieron 86 fracciones y por análisis en CCD fueron reunidas por similitud a un total de siete fracciones nombradas de F2\_3\_1 a F2\_3\_7.

### *Fracción F2\_3\_5*

La fracción F2\_3\_5 (942.3 mg) se fraccionó por cromatografía en columna, empleando como fase estacionaria gel de sílice TLC y como fase móvil mezclas de CHCl<sub>3</sub>:MeOH en gradiente en las siguientes proporciones: 75:25, 72:28, 70:30, 68:32 y 0:100. Se obtuvieron 126 fracciones, las cuales fueron analizadas por CCD y reunidas de acuerdo a su similitud en 11 fracciones nombradas de F2\_3\_5\_1 a F2\_3\_5\_11.

### *Fracción F2\_3\_5\_11*

La fracción F2\_3\_5\_11 (304.3 mg) fue fraccionada por cromatografía en columna empacada con gel de sílice TLC y empleando una elución isocrática en la cual la fase móvil fue una mezcla de CHCl<sub>3</sub>:MeOH en proporción 70:30. De este proceso se obtuvieron 52 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo a su similitud en 10 fracciones nombradas de A1 a A10.

### *Fracción A10*

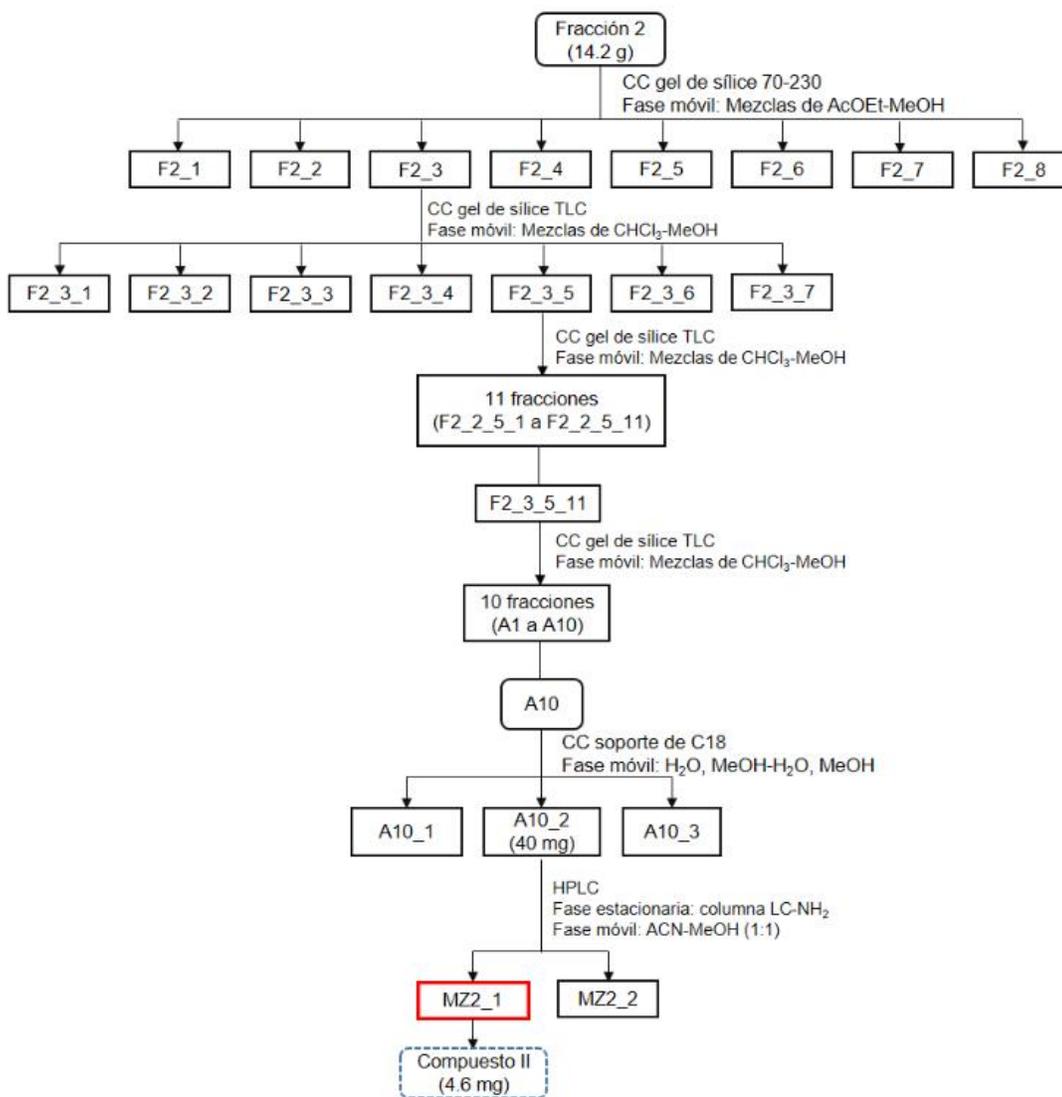
La fracción A10 (179.9 mg) se fraccionó por cromatografía en columna con soporte de octadecilsilano (C18), empleando como fase móvil una mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O en gradiente en las proporciones 0:100, 80:20, 78:22, 76:24, 74:26, 72:28, 70:30 y 100:0. Se obtuvieron 99 fracciones, las cuales se analizaron por CDD y se reunieron de acuerdo a su similitud en tres fracciones nombradas de A10\_1 a A10\_3.

### *Fracción A10\_2*

La fracción A10\_2 (40 mg) se analizó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice TLC. Se utilizó una elución isocrática en la cual la fase móvil fue una mezcla de AcOEt:MeOH en proporción 55:45. Se obtuvieron 47 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo a su similitud en tres fracciones nombradas de MZ1 a MZ3.

### Fracción MZ2

La fracción MZ2 (16.7 mg) se analizó por cromatografía de líquidos de alta eficiencia, empleando como fase estacionaria una columna analítica de tipo amino (LC-NH<sub>2</sub>) marca Supelco con tamaño de partícula de 5 µm y 4.6 mm de diámetro interno. La elución se realizó de manera isocrática y como fase móvil se empleó una mezcla de ACN:MeOH en proporción 50:50 y con un flujo de 1 mL/min. Al final del proceso se obtuvieron dos fracciones nombradas como MZ2\_1 y MZ2\_2. El **compuesto II** se obtuvo de la fracción MZ2\_1, este compuesto se sometió a análisis espectroscópicos y espectrométricos. El proceso de obtención del **compuesto II** se describe de manera resumida en la **Figura 20**.



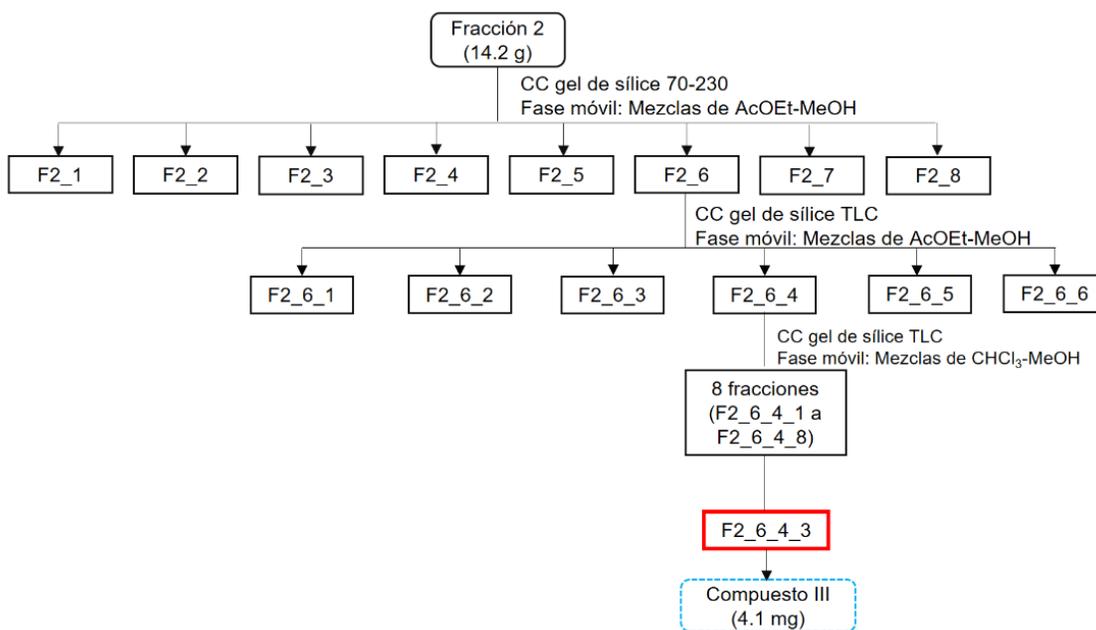
**Figura 20.** Obtención del **compuesto II** a partir de la fracción F2.

### Análisis de la fracción F2\_6

También se analizó la fracción F2\_6 obtenida a partir de la fracción F2. La fracción F2\_6 (1.14 g) se analizó por cromatografía en columna empacada con gel de sílice TLC y se empleó como fase móvil mezclas de AcOEt:MeOH a gradiente en las proporciones 80:20, 75:25, 70:30, 60:40 y 50:50. Se obtuvieron 35 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo con su similitud en seis fracciones nombradas de F2\_6\_1 a F2\_6\_6.

### Fracción F2\_6\_4

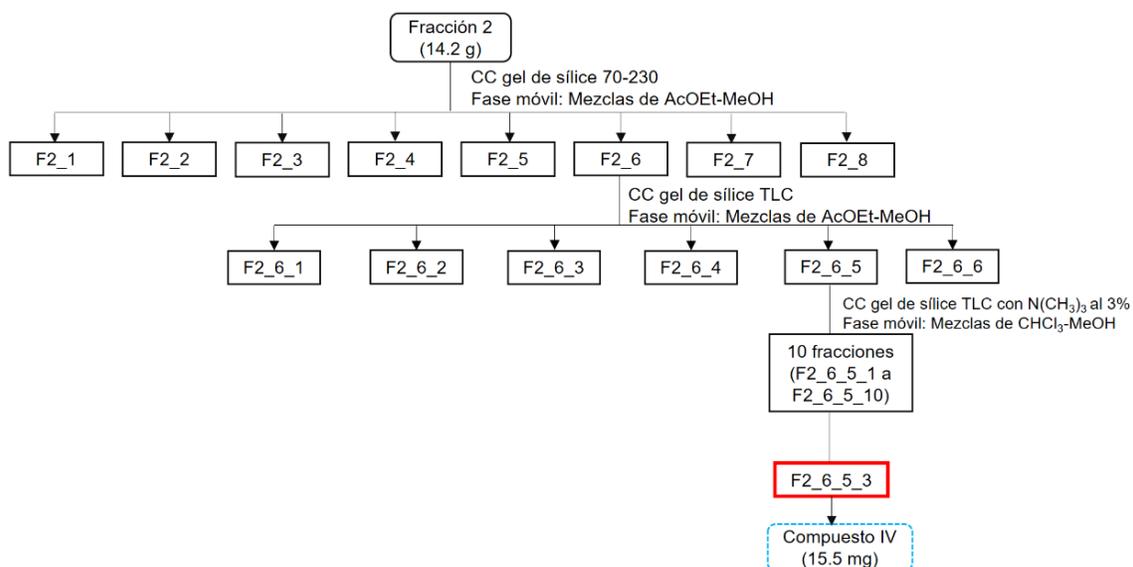
La fracción F2\_6\_4 (275 mg) se analizó por cromatografía en columna empleando como fase estacionaria gel de sílice TLC y como fase móvil mezclas de CHCl<sub>3</sub>:MeOH en gradiente con proporciones 75:25, 72:28, 70:30, 68:32, 50:50 y 0:100. De este proceso se obtuvieron 72 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo a su similitud en ocho fracciones nombradas de F2\_6\_4\_1 a F2\_6\_4\_8). Obteniéndose el **compuesto III** de la fracción F2\_6\_4\_3, el cual fue sometido a análisis espectroscópicos y espectrométricos. El proceso de obtención del **compuesto III** se describe en la **Figura 21**.



**Figura 21.** Obtención del **compuesto III** a partir de la fracción F2.

### Análisis de la fracción F2\_6\_5

También fue analizada la fracción F2\_6\_5 (203 mg) obtenida a partir de la fracción F2\_6. La fracción F2\_6\_5 fue analizada por cromatografía en columna empacada con gel de sílice TLC, la cual fue desactivada con  $N(CH_3)_3$  al 3% v/v. Como fase móvil se emplearon mezclas de  $CHCl_3$ :MeOH en gradiente con proporciones 80:20, 78:22, 75:25, 73:27, 70:30, 65:35, 50:50 y 0:100. Se obtuvieron 132 fracciones, las cuales se analizaron por CCD y se reunieron de acuerdo a su similitud en 10 fracciones, nombradas de F2\_6\_5\_1 a F2\_6\_5\_10. Donde se obtuvo el **compuesto IV** a partir de la fracción F2\_6\_5\_3, el cual se sometió a análisis espectroscópicos y espectrométricos. El proceso de obtención del **compuesto IV** se describe en la **Figura 22**.



**Figura 22.** Obtención del **compuesto IV** a partir de la fracción F2.



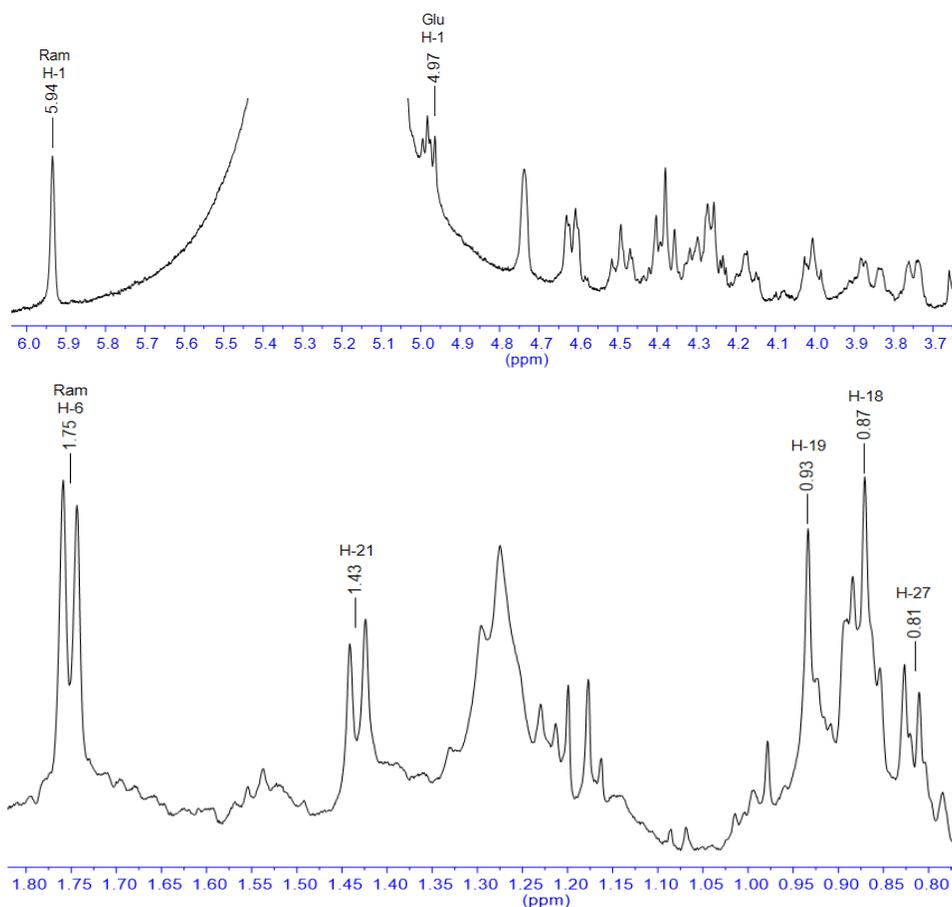
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Dada la naturaleza polar de los compuestos de interés se seleccionó la fracción *n*-BuOH, proveniente del proceso de partición del extracto metanólico, para su análisis por cromatografía en columna. A partir de este fraccionamiento secundario, las fracciones de interés fueron seleccionadas con base en la cantidad de muestra disponible, así como en lo observado en CCD y en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, en el cual se observaron las señales características de un glicósido esteroidal (dos señales dobles y dos señales simples entre  $\delta_H$  0.80 y 1.40 correspondientes a los grupos metilo de la aglicona esteroidal, así como la presencia de señales dobles y simples entre  $\delta_H$  4.50 y 6.50 correspondientes a los protones anoméricos de los monosacáridos que componen la cadena de azúcares).<sup>44,45</sup>

### Compuesto I

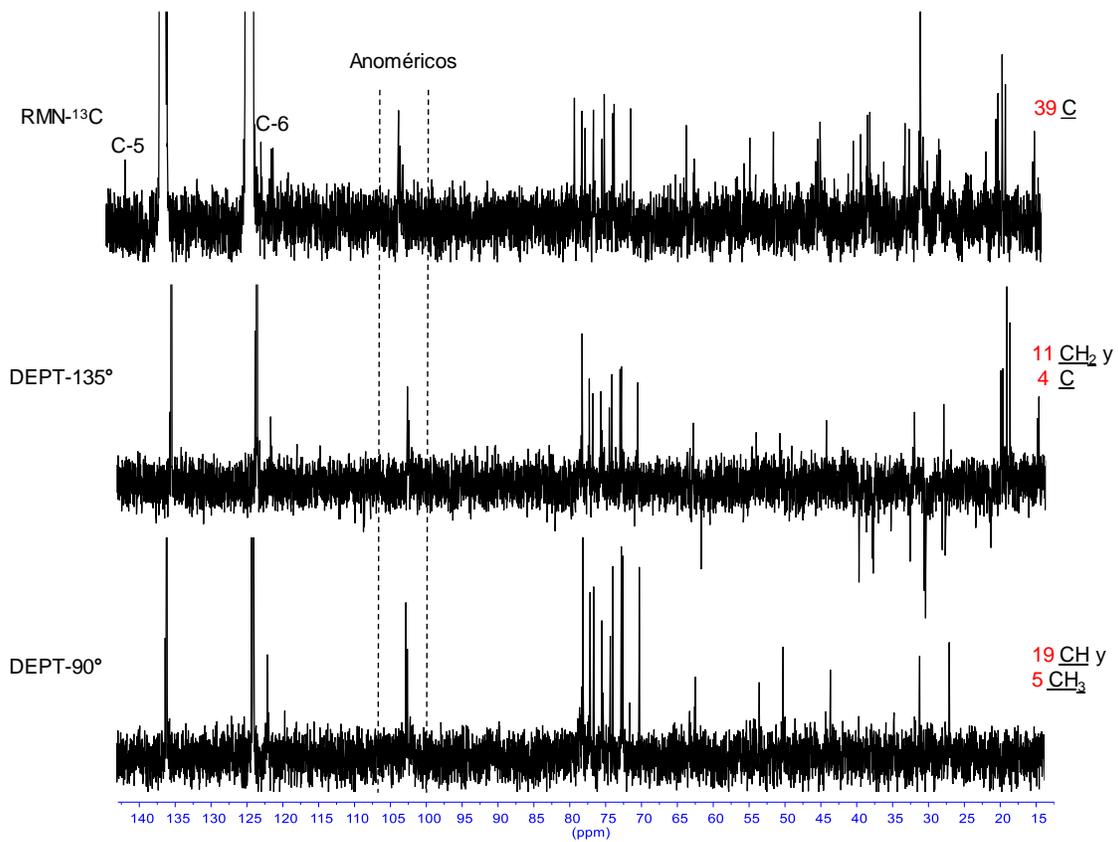
El **compuesto I** (3 mg) se obtuvo como un polvo blanco, con un rendimiento de 0.0006%. El **compuesto I** mostró un pico de ion molecular a 723 *m/z* [M+H]<sup>+</sup>.

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 23**) se puede observar la presencia de dos señales simples a  $\delta_H$  0.87 (H-18) y 0.93 (H-19), así como dos señales dobles a  $\delta_H$  0.81 (H-27, *J* = 6.5 Hz) y 1.43 (H-21, *J* = 7 Hz) pertenecientes a los grupos metilo angulares característicos de un núcleo esteroidal, adicionalmente se observa una señal doble centrada a  $\delta_H$  1.75 (*J* = 6.1 Hz) atribuida al metilo del desoxiazúcar ramnosa.<sup>8</sup> Asimismo, se observan señales múltiples entre 3.60 y 4.80 ppm, que se asignaron a metinos y metilenos propios de azúcares; igualmente, se observaron una señal doble a  $\delta_H$  4.97 con *J* = 7.6 Hz y una señal simple ancha a  $\delta_H$  5.94, características de protones anoméricos de dos monosacáridos, glucosa y ramnosa, respectivamente.<sup>8,45</sup>



**Figura 23.** Espectro de RMN- $^1\text{H}$  del **compuesto I**, determinado a 400 MHz en piridina- $d_5$  donde se observan las señales características de un glicósido esteroidal.

En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  se identificaron 39 señales de átomos de carbono pertenecientes a la molécula. Mediante los experimentos de mejoramiento sin distorsión por transferencia de polarización (DEPT, por sus siglas en inglés)  $135^\circ$  y  $90^\circ$ , se determinó la presencia de 11 metilenos ( $\text{CH}_2$ ), 19 metinos ( $\text{CH}$ ), cinco grupos metilo ( $\text{CH}_3$ ) y cuatro carbonos cuaternarios (**Figura 24**). En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  destacan las señales obtenidas a  $\delta_{\text{C}}$  122.0 (C-6) y 141.3 (C-5), asignadas a los átomos de carbono insaturados característicos del esqueleto esteroidal de diosgenina ( $\Delta^5$  espirostanos).<sup>46</sup> También se observaron señales a  $\delta_{\text{C}}$  102.6 y 102.8, pertenecientes a los carbonos anoméricos de los azúcares presentes, glucosa y ramnosa, respectivamente. El resto de las señales se resume en la **Tabla 2**.



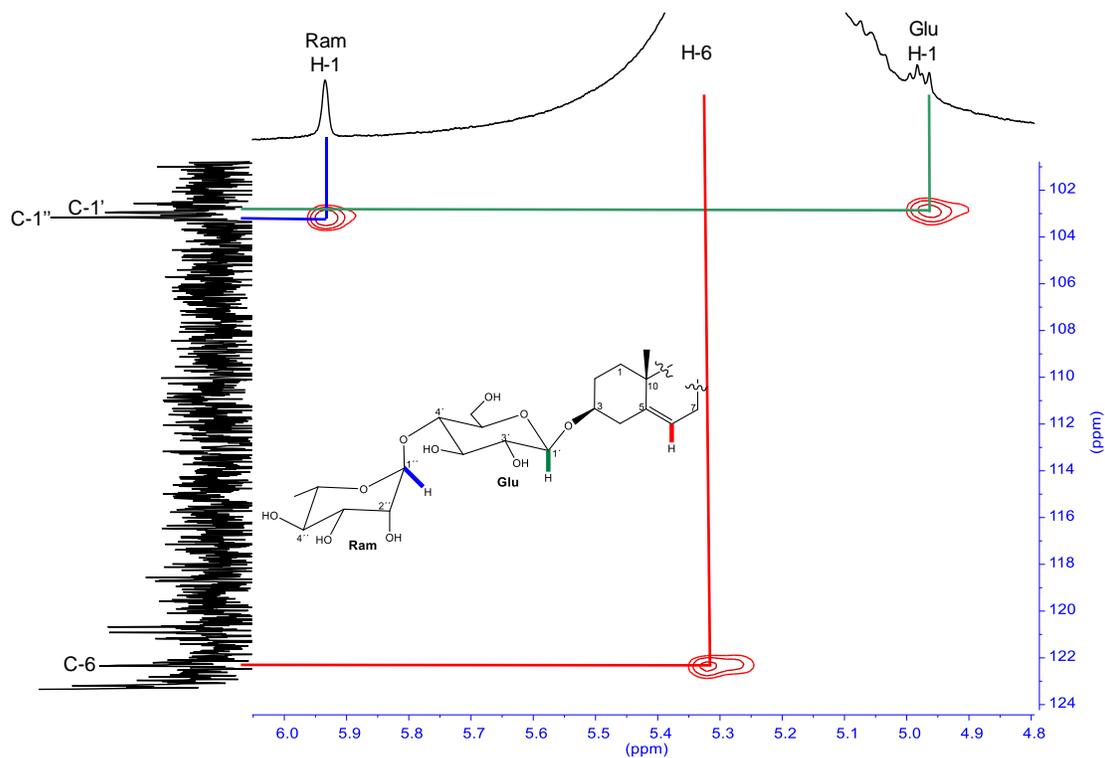
**Figura 24.** Espectros de RMN- $^{13}\text{C}$ , DEPT 135° y DEPT 90° del **compuesto I**.

**Tabla 2.** Datos RMN de la aglicona del **compuesto I** en piridina- $d_5$ .

Posición	$^1\text{H}$ ( $\delta$ en ppm, m, J en Hz) a 400 MHz	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ en ppm) a 100 MHz	Agrawal <sup>46</sup> $^{13}\text{C}$ ( $\delta$ en ppm) <sup>a</sup>
1	1.73, 0.98	37.5	37.4
2	2.07, 1.71	30.2	32.2
3	3.88	78.2	78.2
4	2.71, 2.45	39.4	38.9
5	---	141.3	140.8
6	5.29	122.0	121.7
7	1.89, 1.53	32.2	32.1
8	1.41	31.6	31.6
9	0.92	50.5	50.2
10	---	37.1	37.1
11	1.41	20.9	21.0
12	1.29, 1.87	39.9	39.8
13	---	44.6	40.4
14	1.52	53.8	56.6
15	1.83, 1.38	34.9	31.8
16	4.5	78.4	81.0
17	1.94	62.7	62.8
18	0.87 (s)	14.3	16.3
19	0.91 (s)	19.5	19.3
20	2.93	44.0	41.9
21	1.43 (d, 7)	18.2	15.0
22	---	109.7	109.2
23	1.27	30.0	30.1
24	1.62, 1.12	38.4	34.2
25	1.40	31.6	30.5
26	3.05, 3.85	55.7	63.6
27	0.81 (d, 6.5)	19.3	17.3

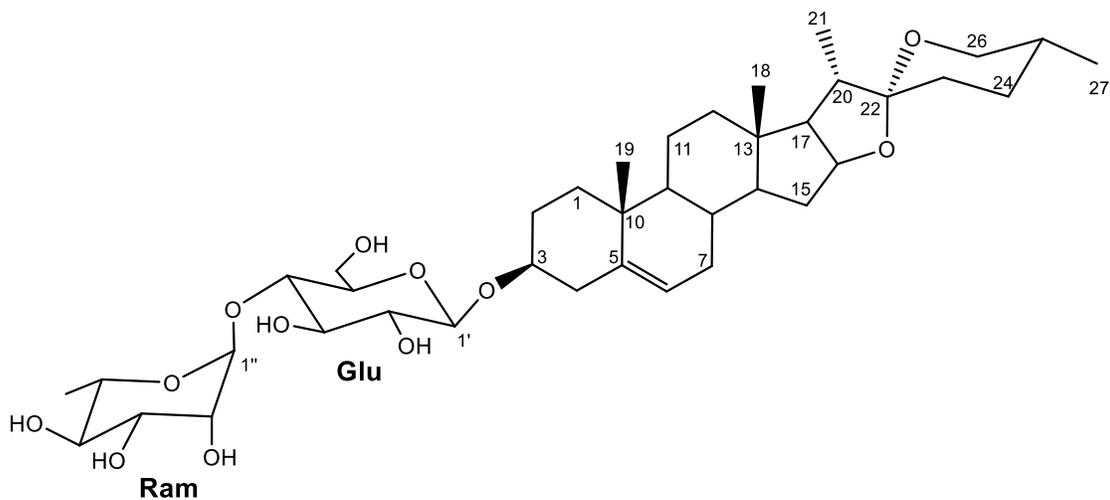
<sup>a</sup> Medido en cloroformo deuterado ( $\text{CDCl}_3$ )

Por medio del experimento de espectroscopia de correlación heteronuclear de cuanto único (HSQC, por sus siglas en inglés), se determinó que los protones anoméricos a  $\delta_{\text{H}}$  4.97 (Glu H-1) y 5.94 (Ram H-1) se encuentran enlazados a los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  102.6 (C-1') y 102.8 (C-1''), respectivamente. Este experimento reveló también que la señal del protón seis (H-6 a  $\delta_{\text{H}}$  5.32), enmascarada por la señal del  $\text{D}_2\text{O}$  en el disolvente en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , se encuentra enlazado al carbono a  $\delta_{\text{C}}$  122.0 (C-6) (**Figura 25**).



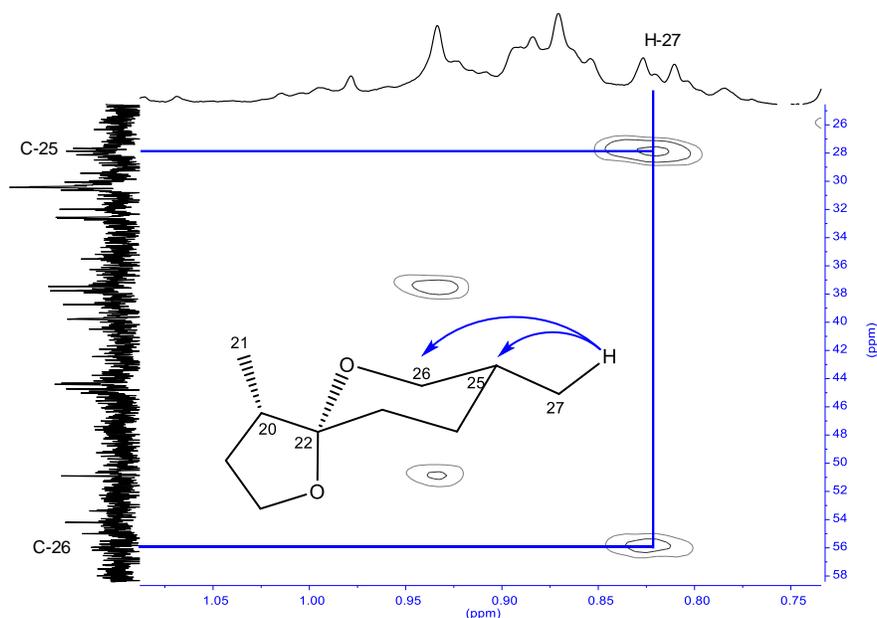
**Figura 25.** Sección de espectro HSQC del **compuesto I**, en el que se observa la correlación C–H de los protones anoméricos y el protón H-6.

Todo lo anterior sugiere que se trata de un glicósido esteroidal de tipo espirostan, el cual posee un doble enlace que, por su desplazamiento químico característico, se encuentra situado entre las posiciones cinco y seis, además de encontrarse unido a una cadena de azúcares conformada por dos monosacáridos (**Figura 26**).

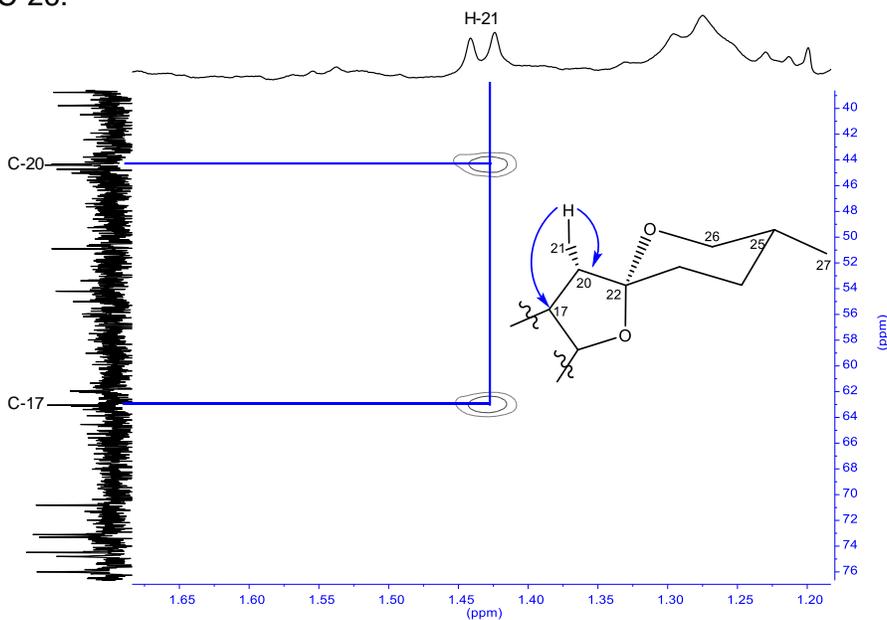


**Figura 26.** Glicósido esteroidal que posee un doble enlace en posición  $\Delta^5$  y una cadena conformada por dos unidades de azúcar.

Para confirmar la posición de los diferentes grupos funcionales en la estructura se empleó el experimento bidimensional de espectroscopia heteronuclear de correlación de enlace múltiple (HMBC, por sus siglas en inglés), el cual confirmó la correlación de la señal doble a  $\delta_H$  0.81 (H-27) con un metino a  $\delta_C$  27.6 (C-25) y un metileno a  $\delta_C$  55.7 (C-26) (**Figura 27**). En el experimento HMBC se observa también la interacción la señal doble a  $\delta_H$  1.42 (H-21) con los metinos a  $\delta_C$  63.1 (C-17) y 44.4 (C-20) (**Figura 28**).

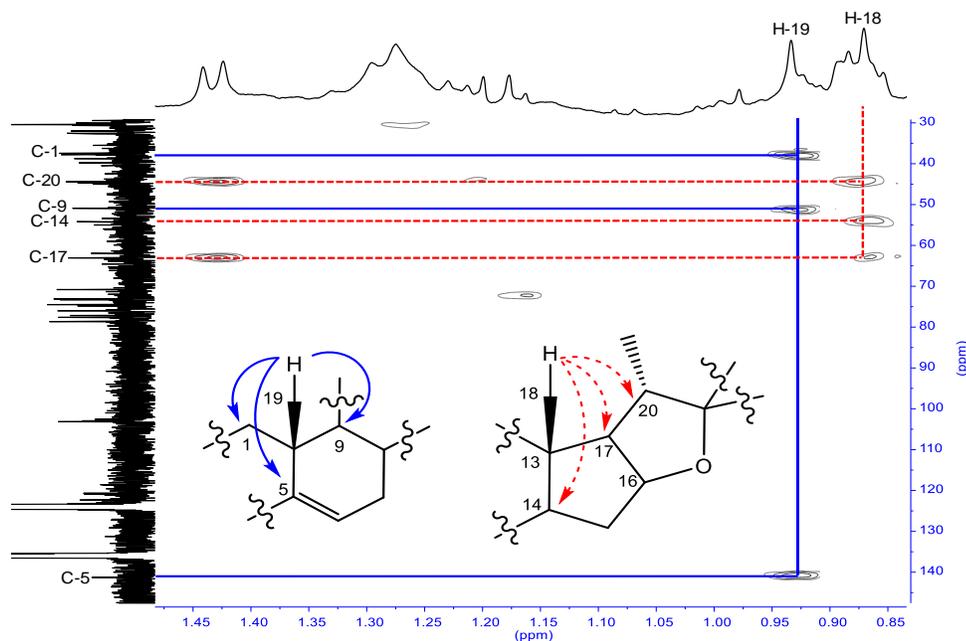


**Figura 27.** Sección del espectro HMBC donde se observa la correlación de H-27 con C-25 y C-26.



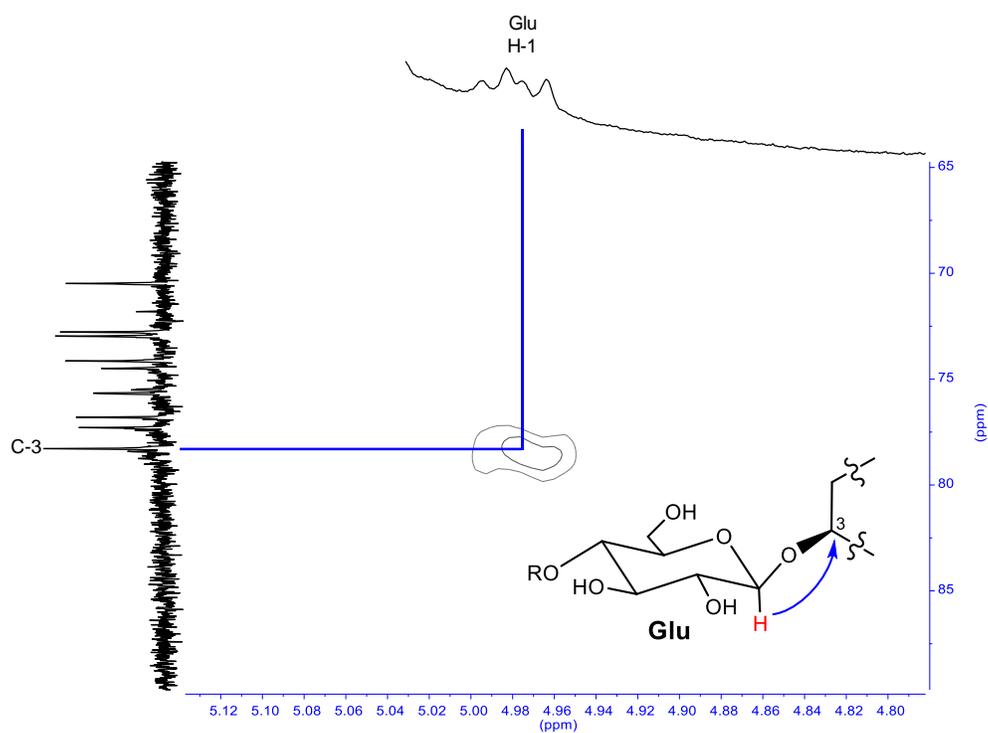
**Figura 28.** Sección del espectro HMBC donde se observa la correlación de H-21 con C-17 y C-20.

Por su parte, la señal simple a  $\delta_H$  0.87 (H-18) presentó correlación con los metinos a  $\delta_C$  53.8 (C-14), 62.7 (C-17) y 44.0 (C-20); mientras que la señal simple a  $\delta_H$  0.91 (H-19) presentó correlaciones con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  141.3 (C-5), un metileno a  $\delta_C$  37.6 (C-1) y un metino a  $\delta_C$  50.5 (C-9) (**Figura 29**).

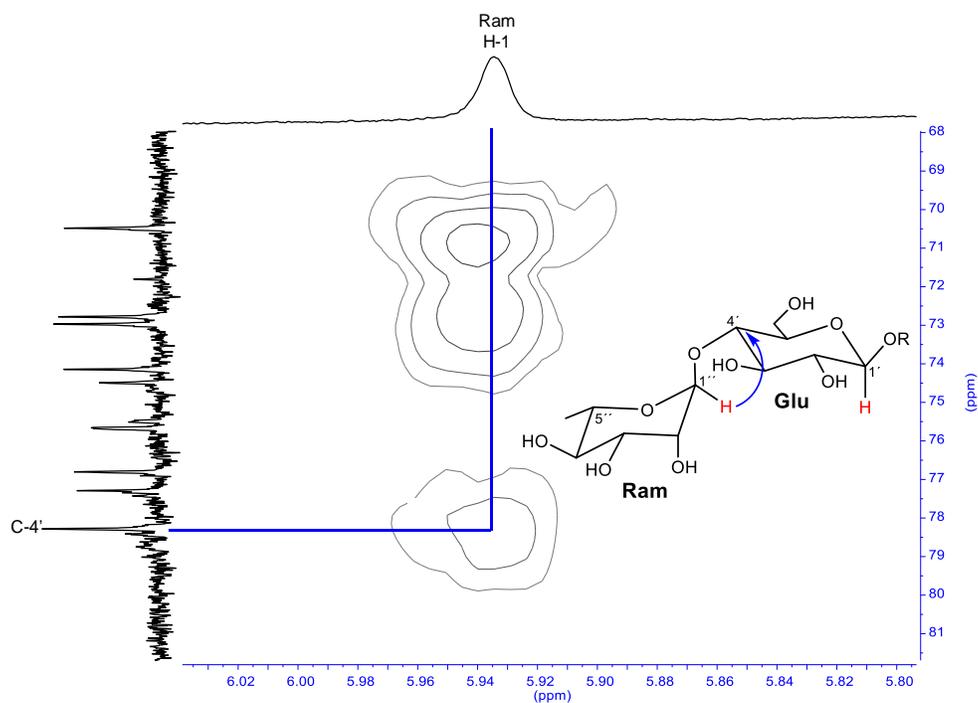


**Figura 29.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-18 y H-19 con carbonos del núcleo esteroidal.

Este experimento también permitió establecer los sitios de ramificación entre los monosacáridos que componen la cadena de azúcares y determinar el sitio de unión de ésta con la aglicona esteroidal. La unión de la aglicona con la cadena de azúcares se estableció de acuerdo con el acoplamiento del protón anomérico de la unidad de glucosa (H-1 Glu a  $\delta_H$  4.97) con el metino a  $\delta_C$  78.2 (C-3) del núcleo esteroidal (**Figura 30**). Finalmente, la unión entre los monosacáridos se estableció de acuerdo con la correlación del protón anomérico de la ramnosa (H-1 Ram a  $\delta_H$  5.94) con el metino a  $\delta_C$  78.3 (C-4') de la glucosa (**Figura 31**).

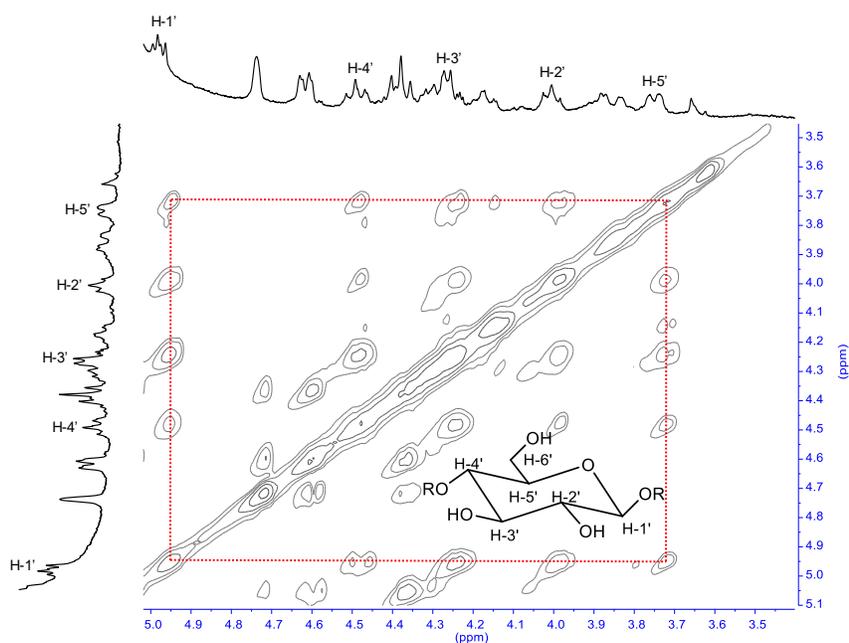


**Figura 30.** Sección del espectro HMBC donde se observa la correlación del protón anomérico de la glucosa con C-3.

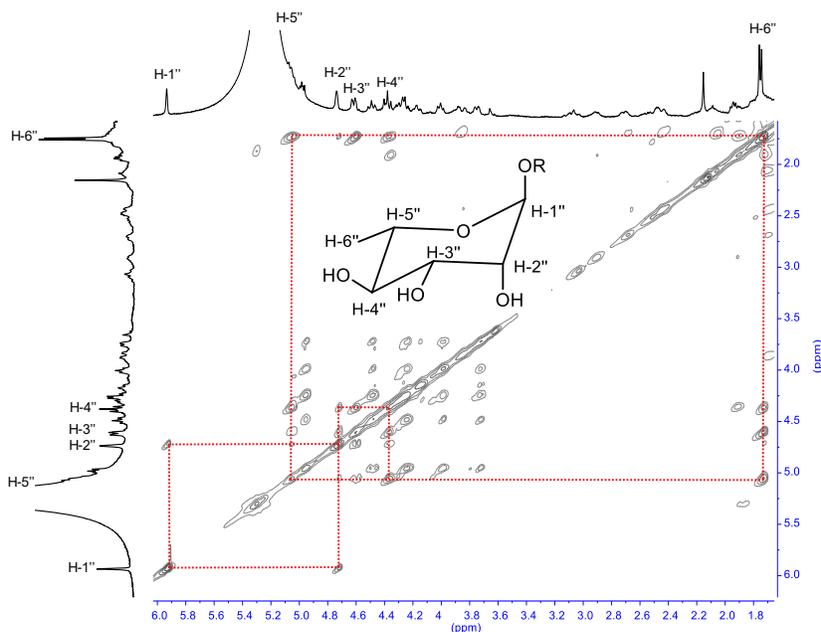


**Figura 31.** Sección del espectro HMBC donde se observa la correlación del protón anomérico de la ramnosa con el C-4' de la glucosa.

Mediante el experimento bidimensional de espectroscopia de correlación total (TOCSY-2D, por sus siglas en inglés), pudieron asignarse los protones para cada unidad de azúcar al observar los sistemas de espines para la glucosa (**Figura 32**) y ramnosa (**Figura 33**). La asignación de los protones de cada uno de los monosacáridos y sus respectivos carbonos se encuentra resumida en la **Tabla 3**.



**Figura 32.** Sección del espectro TOCSY-2D donde se observa el sistema de espín de la glucosa.



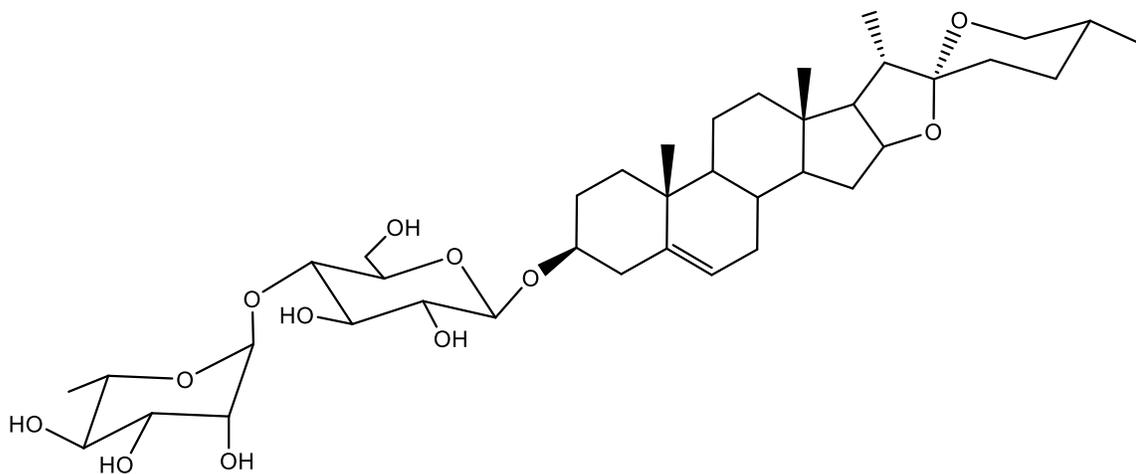
**Figura 33.** Sección del espectro TOCSY-2D donde se observa el sistema de espín de la ramnosa.

**Tabla 3.** Datos RMN para la cadena de azúcares del **compuesto I** en piridina-*d*<sub>5</sub>.

Posición	<sup>1</sup> H (δ en ppm, m, J en Hz) a 400 MHz	<sup>13</sup> C (δ en ppm) a 100 MHz	Yang <sup>8</sup> <sup>13</sup> C(δ en ppm) <sup>a</sup>
Glucosa (1→C-3)			
1	4.97 (d, 7.6)	102.6	102.9
2	3.99	75.6	76.0
3	4.25	76.8	77.1
4	4.50	78.3	78.7
5	3.74	77.2	77.6
6	4.16, 4.28	61.6	61.9
Ramnosa (1→C-4')			
1	5.94 (brs)	102.8	103.1
2	4.73	72.8	73.1
3	4.61	72.9	73.2
4	4.38	74.3	74.4
5	5.06	70.5	70.8
6	1.75 (d, 6.2)	18.8	19.0

<sup>a</sup> Medido en piridina-*d*<sub>5</sub>

Los datos anteriores y la revisión en la literatura permitieron identificar el **compuesto I** como prosapogenina B de la dioscina, también denominada progenina II (**Figura 34**), constituyendo así el primer reporte del aislamiento de este compuesto en el género *Solanum*.

**Figura 34.** Estructura química de la prosapogenina B de la dioscina (progenina II).

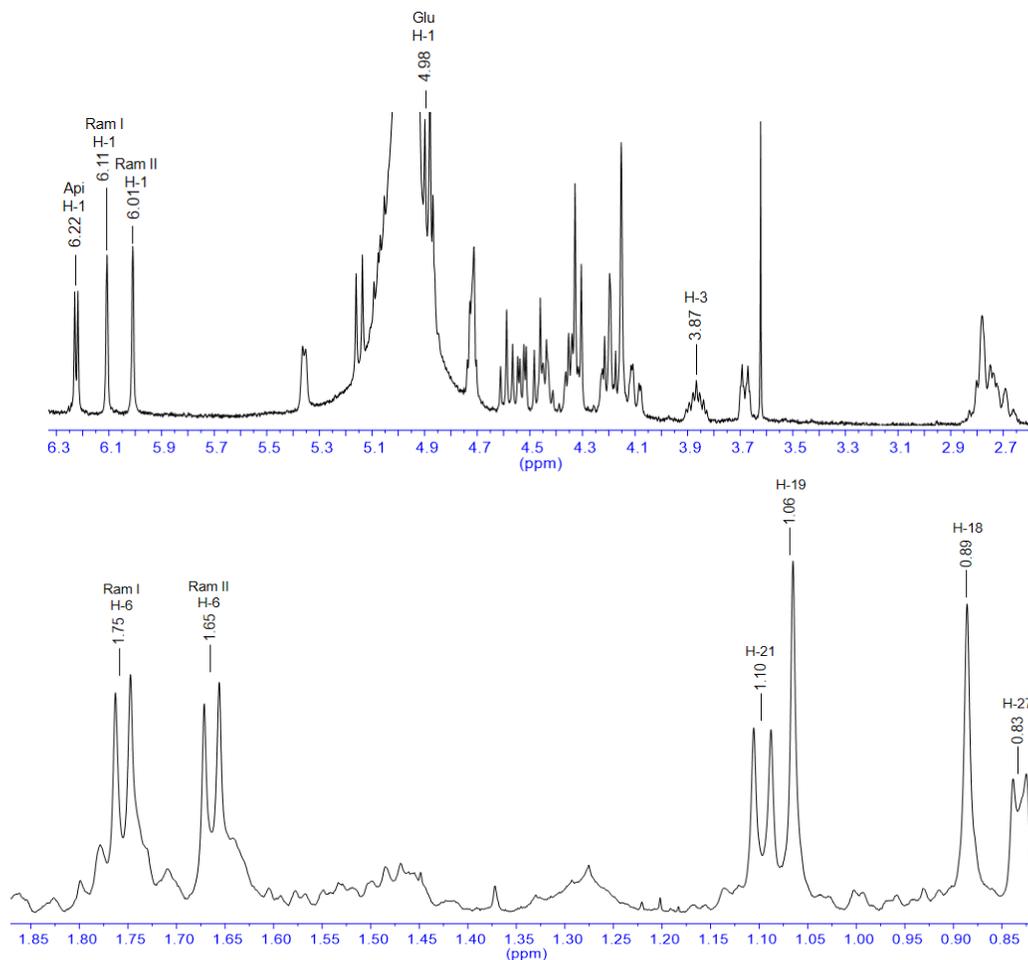
La prosapogenina B de la dioscina es un glicósido esteroidal aislado por primera vez en 1968 de la especie *Dioscorea tokoro*. Wang y col.<sup>47</sup> demostraron que este compuesto posee una mayor actividad anticancerígena que el agente quimioterapéutico cisplatino empleado como control positivo en el estudio. Se evaluó su actividad citotóxica frente a diversas líneas celulares de cáncer humano: A431 (carcinoma epidermoide humano), A2780 (adenocarcinoma ovárico humano), A549 (adenocarcinoma de pulmón humano), K562 (eritroleucemia humana) y HCT-15 (carcinoma colon humano).

Los resultados indican que la prosapogenina B de la dioscina o progenina II podría ser un buen candidato como agente quimioterapéutico para tratar el carcinoma de colon humano.

## Compuesto II

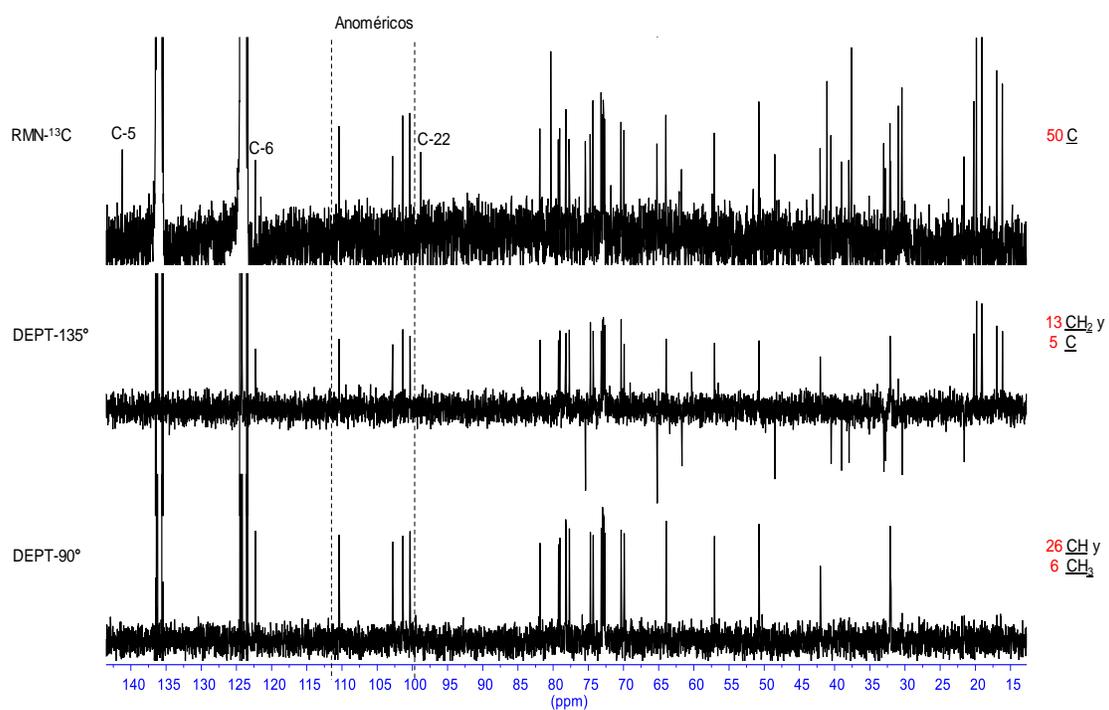
El **compuesto II** (4.6 mg) se obtuvo como un polvo blanco, con un rendimiento de 0.00092%. El **compuesto II** mostró un pico de ion molecular a 1000  $m/z$   $[M+H]^+$ .

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 35**), se pueden observar dos señales simples a  $\delta_H$  0.89 (H-18) y 1.06 (H-19), así como cuatro señales dobles a  $\delta_H$  0.83 (H-27,  $J = 5.5$  Hz), 1.10 (H-21,  $J = 7.1$  Hz), 1.65 (Ram II H-6,  $J = 6.2$  Hz) y 1.75 (Ram I H-6,  $J = 6.2$  Hz), las cuales corresponden a seis grupos metilo. También se observan diversas señales entre 3.60 y 5.20 ppm, las cuales se asignaron a metinos y metilenos propios de azúcares; igualmente, se observa una señal doble a  $\delta_H$  5.36 asignada a un protón olefínico. La señal múltiple a  $\delta_H$  4.89, así como las señales a  $\delta_H$  6.00, 6.10 y 6.22 fueron atribuidas a protones anoméricos de cuatro azúcares. Estos datos sugieren la presencia de un núcleo esteroidal que posee un doble enlace y está unido a cuatro unidades de azúcar.



**Figura 35.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del **compuesto II**, determinado a 400 MHz en piridina-*d*<sub>5</sub> donde se observan las señales características de un glicósido esteroidal.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se identificaron 50 señales de átomos de carbono. Mediante los experimentos DEPT 135° y DEPT 90° se determinó la presencia de 13 CH<sub>2</sub>, 26 CH, seis CH<sub>3</sub> y cinco carbonos cuaternarios (**Figura 36**). En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observan señales a  $\delta_c$  122.2 y 141.2, correspondientes a los átomos de carbono de un doble enlace ( $\Delta^5$ ). También se observaron señales a  $\delta_c$  100.3, 101.3, 102.8 y 110.4, pertenecientes a los carbonos anoméricos de los azúcares presentes. Finalmente, la señal a  $\delta_c$  98.8 se asignó al átomo de carbono espiro (C-22), este desplazamiento químico indica la posible presencia de un átomo de nitrógeno en el anillo F del núcleo esteroidal. El resto de las señales se resume en la **Tabla 4**.



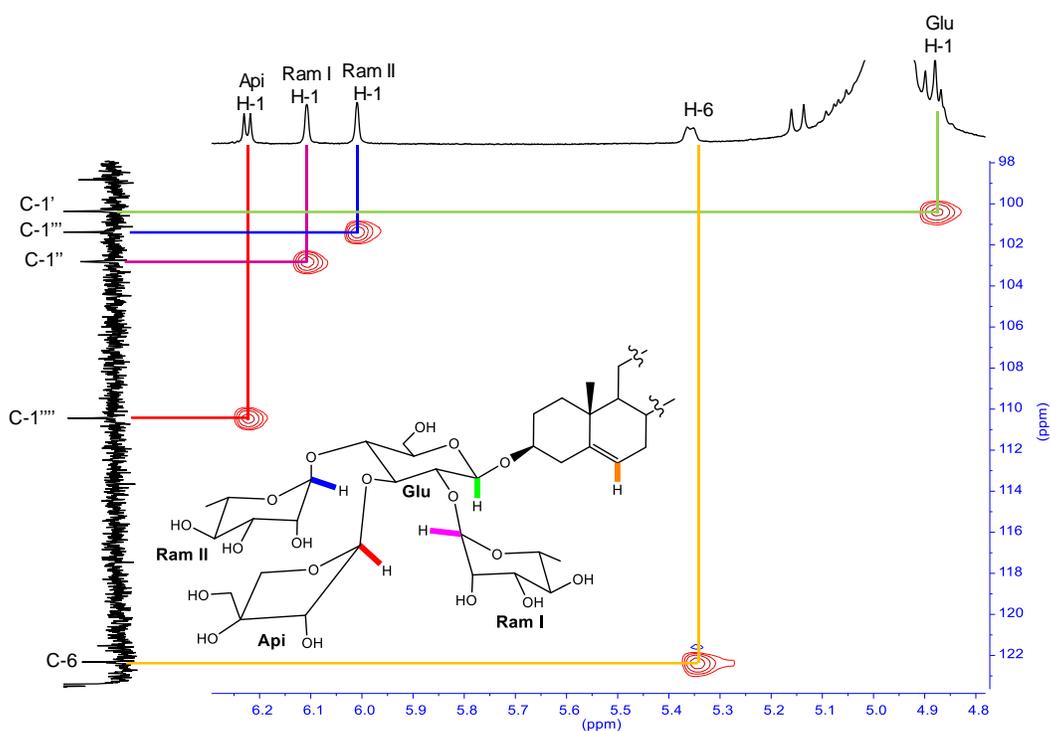
**Figura 36.** Espectro de RMN-<sup>13</sup>C, DEPT 135° y DEPT 90° del **compuesto II**.

**Tabla 4.** Datos de RMN de la aglicona del **compuesto II** en piridina-*d*<sub>5</sub>.

Posición	<sup>1</sup> H (δ en ppm, m, J en Hz) a 400 MHz	<sup>13</sup> C (δ en ppm) a 100 MHz
1	0.99, 1.75	37.9
2	1.85, 2.04	30.4
3	3.87	78.2
4	2.73	39.0
5	---	141.2
6	5.35	122.2
7	1.89	32.8
8	1.57	32.1
9	0.92	50.7
10	---	37.6
11	1.46	21.6
12	1.13, 1.72	40.5
13	---	41.0
14	1.10	57.1
15	1.50, 2.08	33.0
16	4.44	79.2
17	1.78	63.9
18	0.89 (s)	16.9
19	1.06 (s)	19.8
20	1.98	42.0
21	1.10 (d, 7)	16.1
22	---	98.8
23	1.73	35.2
24	1.26	30.4
25	1.65	32.0
26	2.79	48.5
27	0.83 (d, 5.5)	20.2

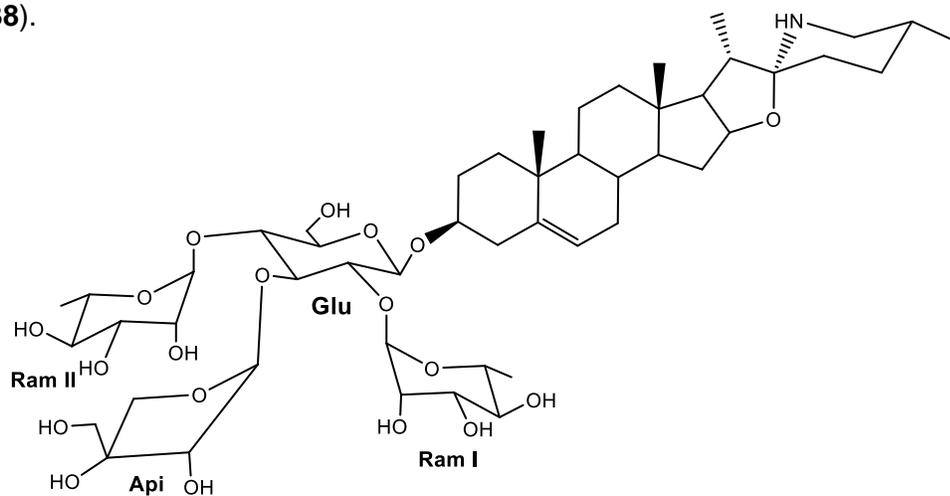
Por medio del experimento HSQC, se pudieron realizar las asignaciones de los carbonos anoméricos de los azúcares presentes, especialmente de la glucosa ya que en el espectro de RMN-<sup>1</sup>H, la señal correspondiente al protón anomérico se encontraba solapada con diversas señales.

Se determinó que los protones anoméricos a δ<sub>H</sub> 4.98 (Glu H-1), 6.01 (Ram II H-1), 6.11 (Ram I H-1) y 6.22 (Api H-1) se encuentran enlazados a los carbonos a δ<sub>C</sub> 100.3, 101.3, 102.8 y 110.4, respectivamente.<sup>48,49</sup> Este experimento también permitió realizar la asignación de la señal a δ<sub>H</sub> 5.35 atribuida al protón H-6 de la aglicona esteroideal (**Figura 37**).



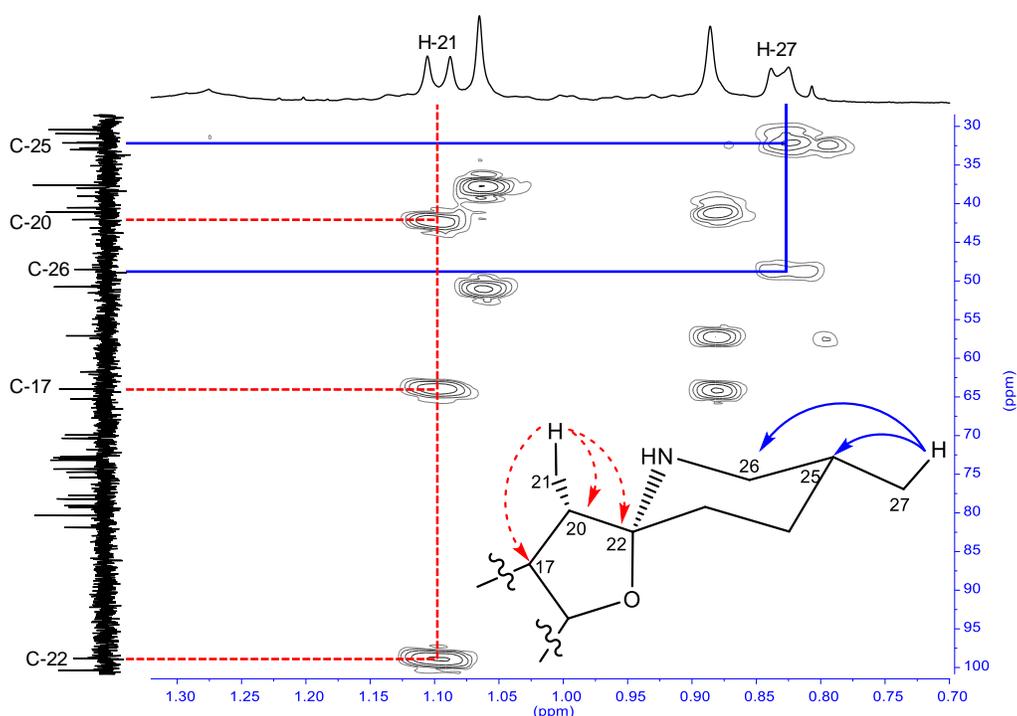
**Figura 37.** Sección de espectro HSQC del **compuesto II**, en el que se observa la correlación C-H de los protones anoméricos y el protón H-6.

Todo lo anterior sugiere que se trata de un glicoalcaloide esteroide de tipo espirosolano, el cual posee un doble enlace que, por su desplazamiento químico característico, se encuentra situado entre las posiciones cinco y seis ( $\Delta^5$  espirosolano). Además, de encontrarse unido a una cadena de azúcares conformada por cuatro monosacáridos (**Figura 38**).



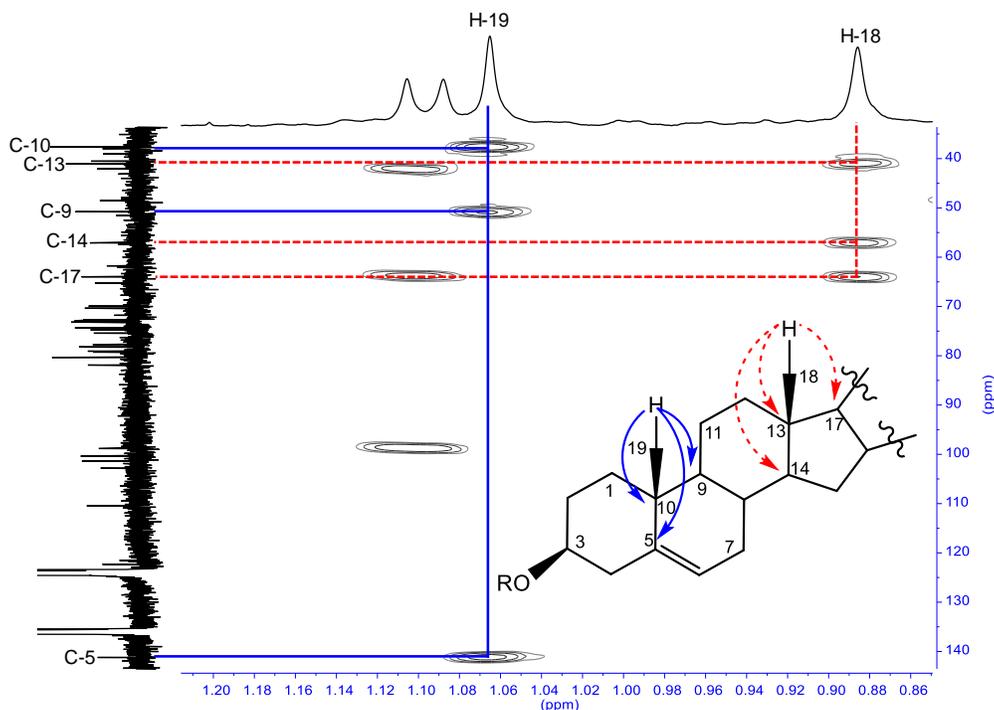
**Figura 38.** Glicoalcaloide esteroide que posee un doble enlace en posición  $\Delta^5$  y una cadena oligosacárida conformada por cuatro unidades de azúcar.

Para confirmar la posición de los diferentes grupos funcionales en la estructura se empleó el experimento bidimensional de HMBC, en el cual se observó que la señal doble a  $\delta_H$  0.83 (H-27,  $J = 5.5$  Hz) presenta correlación con el metino a  $\delta_C$  32.0 (C-25) y el metileno a  $\delta_C$  48.5 (C-26); de igual forma la señal doble a  $\delta_H$  1.10 (H-21,  $J = 7.1$  Hz) presentó correlación con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  98.8 (C-22) y los metinos a  $\delta_C$  63.9 (C-17) y 42.0 (C-20) (**Figura 39**).



**Figura 39.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-21 y H-27 con los carbonos del núcleo esteroidal.

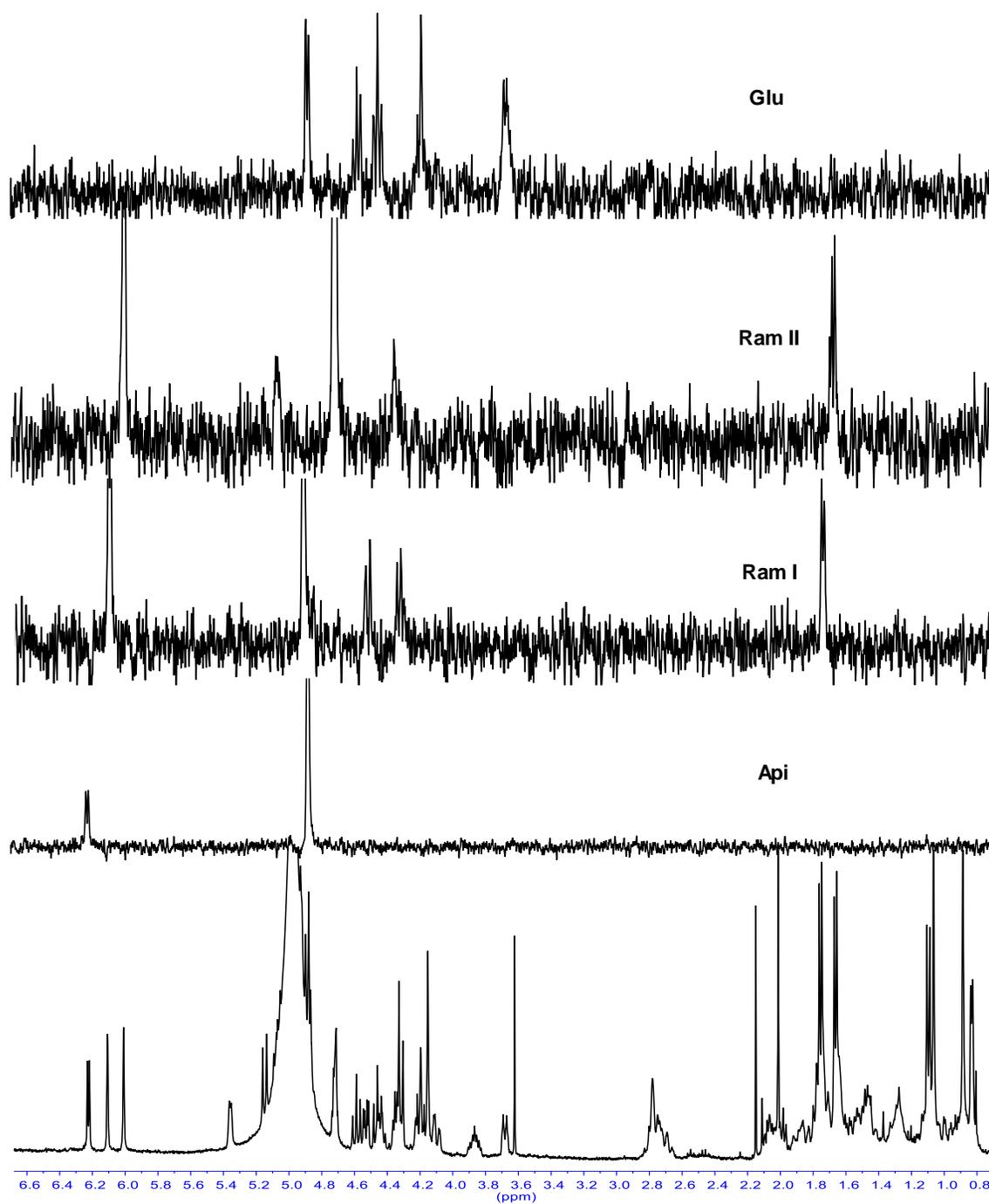
Por su parte, la señal simple a  $\delta_H$  0.89 (H-18) presentó correlación con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  41.0 (C-13) y con los metinos a  $\delta_C$  57.1 (C-14) y 63.9 (C-17); mientras que la señal simple a  $\delta_H$  1.06 (H-19) presentó correlaciones con los carbonos cuaternarios a  $\delta_C$  141.2 (C-5) y 37.6 (C-10), así como con el metino a  $\delta_C$  50.7 (C-9) (**Figura 40**).



**Figura 40.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-18 y H-19 con los carbonos del núcleo esteroidal.

Debido al solapamiento de las señales correspondientes a la cadena de azúcares en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , y ante la imposibilidad de poder asignar los protones de cada monosacárido mediante los experimentos bidimensionales convencionales, se empleó el experimento selectivo TOCSY-1D. El experimento consiste en irradiar la señal correspondiente a algún protón del sistema de espín de cada monosacárido, generalmente el protón anomérico. Posteriormente, se establece el tiempo de mezclado óptimo para la observación de todas y cada una de las señales que conforman el sistema de espines.

En el caso del **compuesto II**, se llevaron a cabo irradiaciones a los protones anoméricos de la apiosa y las ramnosas cuyas señales aparecen a  $\delta_{\text{H}}$  6.22 (Api, H-1), 6.11 (Ram I, H-1) y 6.01 (Ram II, H-1). En el caso de la glucosa, la señal correspondiente al protón anomérico se encontraba solapada, por lo que se irradió el H-5, cuya señal aparece a  $\delta_{\text{H}}$  3.67 (Glu, H-5). Para cada sistema de espín conformado por cada unidad monosacárida, se usaron tiempos de mezclado de 20, 40, 60, 80, 100, 120, 150, 180, 200, 250 y 300 milisegundos. Al finalizar este proceso, se obtuvo de manera individual cada sistema y la asignación inequívoca de los protones de cada uno de los monosacáridos presentes en el compuesto (**Figura 41**). La asignación de los protones de cada uno de los monosacáridos y sus respectivos carbonos se encuentra resumida en la **Tabla 5**.



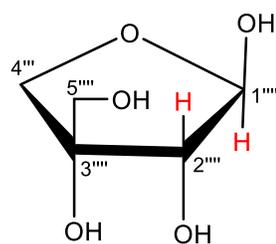
**Figura 41.** Subespectros obtenidos en el experimento TOCSY-1D de cada uno de los sistemas de espín correspondientes a los azúcares del **compuesto II**.

**Tabla 5.** Datos de RMN para la cadena de azúcares del **compuesto II** en piridina-*d*<sub>5</sub>.

Posición	<sup>1</sup> H (δ en ppm, m, J en Hz) a 400 MHz	<sup>13</sup> C (δ en ppm) a 100 MHz	Ghisalberti <sup>48</sup> Silva <sup>49</sup> <sup>13</sup> C(δ en ppm) <sup>a</sup>
Glucosa (1→C-3)			
1	4.89 (m)	100.3	100.5
2	4.19	79.0	79.5
3	4.45	81.8	80.7
4	4.58	72.8	73.4
5	3.67	78.1	77.7
6	4.09, 4.19	61.7	61.3
Ramnosa I (1→C2')			
1	6.11 (brs)	102.1	102.7
2	4.92	72.5	72.7
3	4.53	72.9	72.9
4	4.34	73.9	74.0
5	4.88	70.4	69.9
6	1.75 (d, 6.2)	18.6	18.7
Apiosa (1→C3')			
1	6.22 (d, 5)	110.4	110.5
2	4.89	77.7	77.3
3	---	80.3	79.9
4	4.32, 5.16	75.4	74.8
5	4.16	65.2	64.3
Ramnosa II (1→C4')			
1	6.01 (brs)	101.3	101.5
2	4.72	72.9	72.8
3	4.54	72.7	72.3
4	4.34	74.7	74.2
5	5.07	69.9	69.4
6	1.65 (d, 6.2)	19.0	18.7

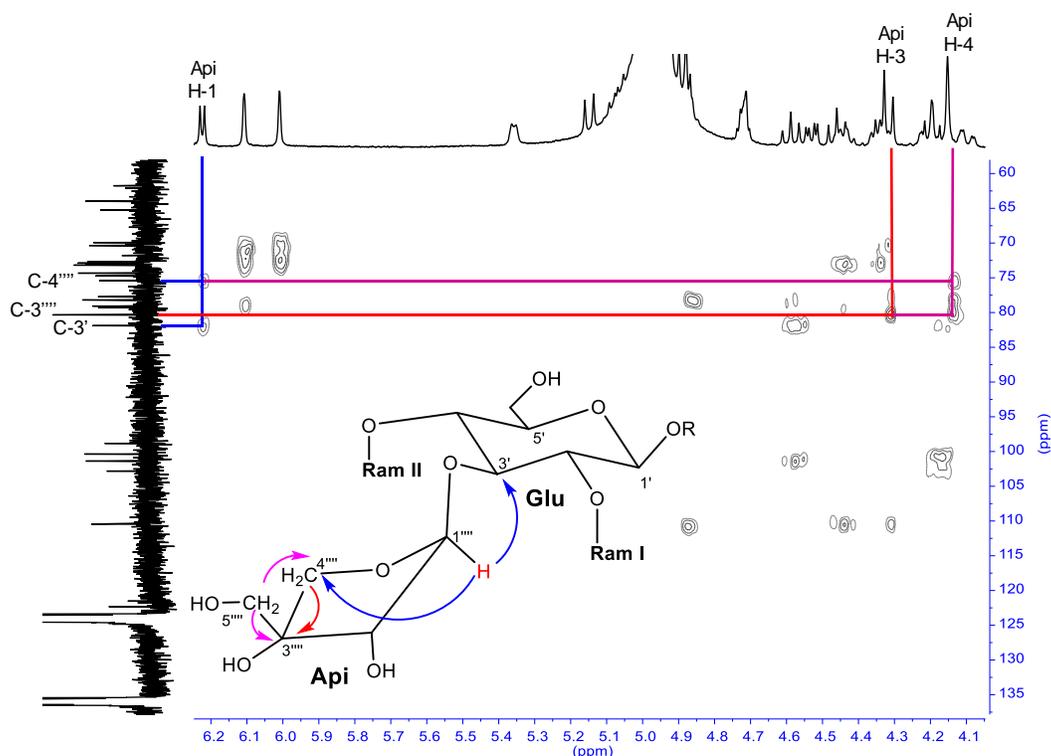
<sup>a</sup> Medido en piridina-*d*<sub>5</sub>

El subespectro TOCSY-1D para el azúcar apiosa (Api) muestra únicamente dos señales en el sistema de espines, lo que se esperaba para este monosacárido debido a que en su estructura posee únicamente dos grupos metino vecinales lo que permite la transferencia de la magnetización (H en rojo), caso contrario a los grupos metileno que no tienen otros protones vecinales para que ocurra esta transferencia (**Figura 42**).



**Figura 42.** Estructura química de la  $\beta$ -D-apiosa.

La posición de los demás átomos de carbono en la estructura de la apiosa se determinó con base en las correlaciones obtenidas en el experimento de HMBC. En este experimento se observó la correlación del protón anomérico a  $\delta_H$  6.22 (Api, H-1) con el metileno a  $\delta_C$  75.4 (C-4''') y el carbono tres de la glucosa a  $\delta_C$  81.8 (C-3'), de igual forma el protón a  $\delta_H$  4.16 (Api, H-4) correlaciona con los carbonos a  $\delta_C$  75.4 (C-4''') y 80.3 (C-3'''); por su parte el protón a  $\delta_H$  4.32 (Api, H-3) el carbono a  $\delta_C$  80.3 (C-3''') (**Figura 43**).

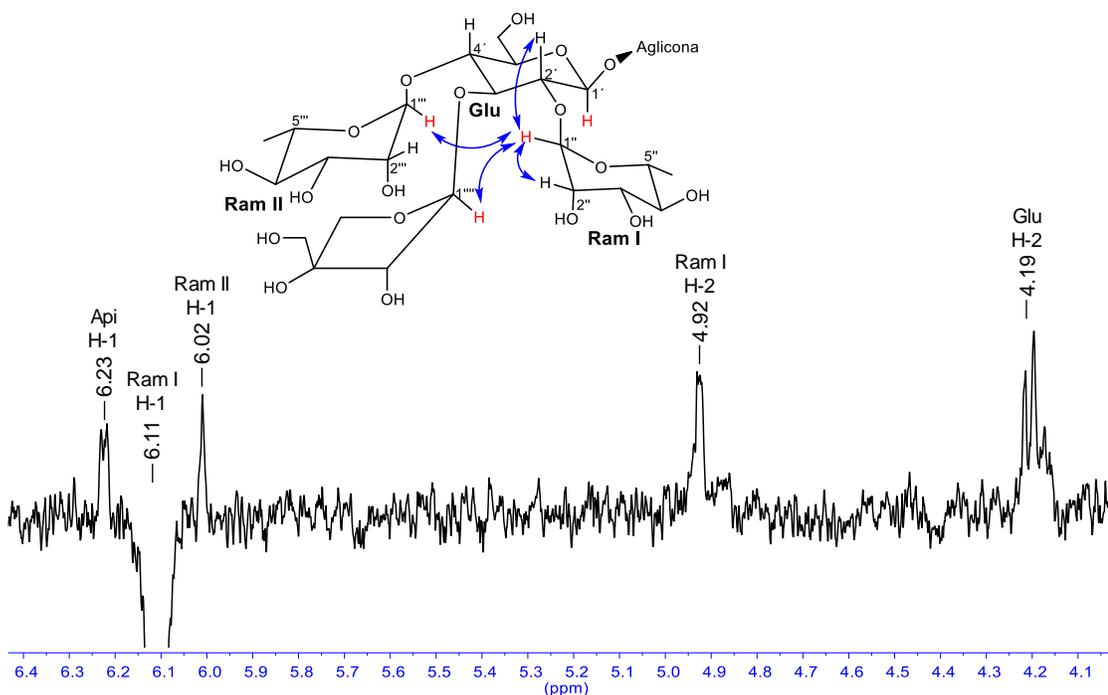


**Figura 43.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones protón-carbono en la unidad de  $\beta$ -D-apiosa.

El experimento de HMBC únicamente permitió establecer que el monosacárido apiosa se encuentra enlazado al carbono tres de la glucosa ya que se observó la correlación entre el protón anomérico de la apiosa a  $\delta_H$  6.22 (Api, H-1) con el carbono tres de la

glucosa a  $\delta_C$  81.8 (C-3') (**Figura 43**), indicando la presencia de un enlace glicosídico apiosa (1→C-3') con la glucosa. Sin embargo, debido a la sobreposición y complejidad en las señales no fue posible determinar el sitio de unión entre los azúcares restantes y la aglicona esteroidal. Para este fin se empleó el experimento selectivo de espectroscopia de efecto nuclear Overhauser de marco rotatorio (ROESY-1D, por sus siglas en inglés), el cual consiste en irradiar la señal correspondiente al protón anomérico de cada monosacárido y observar su efecto nuclear Overhauser (NOE, por sus siglas en inglés) con el protón de una segunda unidad glicosídica.

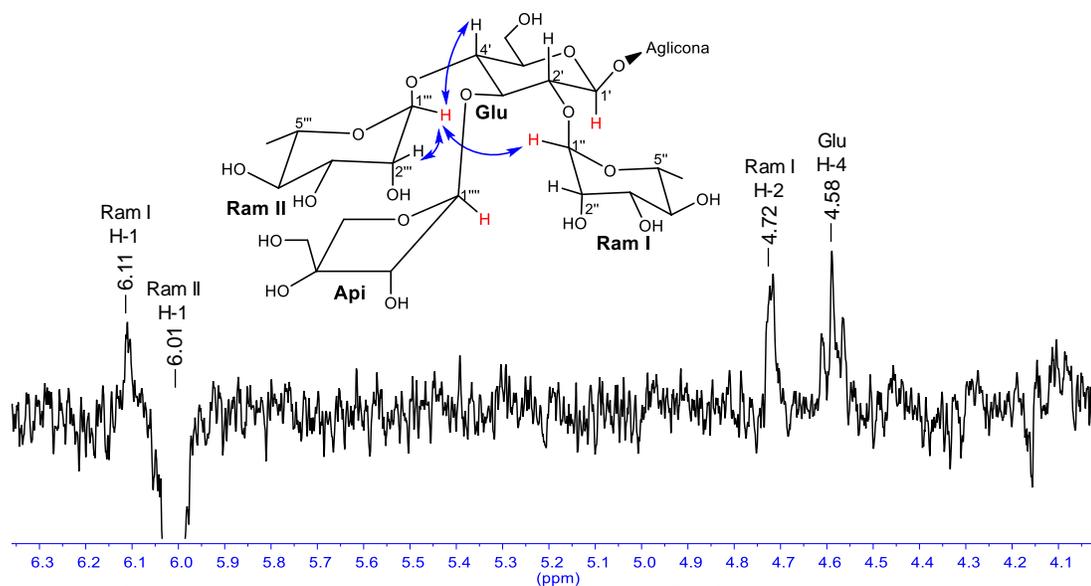
En el caso del **compuesto II**, se irradiaron las señales a  $\delta_H$  6.11 (Ram I, H-1), 6.01 (Ram II, H-1) y 3.87 (Aglicona, H-3). En el espectro ROESY-1D se observó que la señal a  $\delta_H$  6.11 tiene interacción espacial con los protones anoméricos a  $\delta_H$  6.01 (Ram II, H-1) y 6.22 (Api, H-1), con el protón dos de su sistema de espín a  $\delta_H$  4.92 (Ram I, H-2) y con el protón de la posición dos de la glucosa a  $\delta_H$  4.19 (Glu, H-2), indicando la presencia de un enlace glicosídico alfa 1→2 (**Figura 44**).



**Figura 44.** Subespectro obtenido en el experimento ROESY-1D donde se observa la interacción espacial entre el protón anomérico de Ram I y el H-2 de la glucosa.

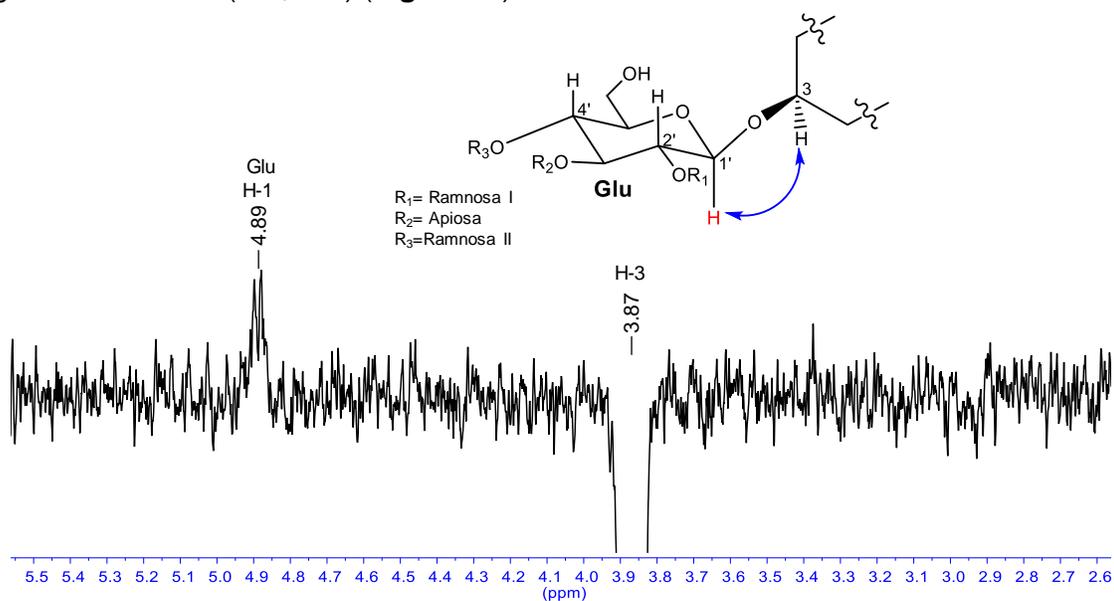
De igual forma, se observó la interacción espacial entre la señal a  $\delta_H$  6.01 y el protón anomérico de la ramnosa I a  $\delta_H$  6.11 (Ram I, H-1), así como con el protón dos de su sistema de espín a  $\delta_H$  4.72 (Ram II, H-2) y con el protón asignado a la posición cuatro

de la glucosa a  $\delta_H$  4.58 (Glu, H-4), lo que indica un enlace glicosídico alfa 1 $\rightarrow$ 4 (**Figura 45**).



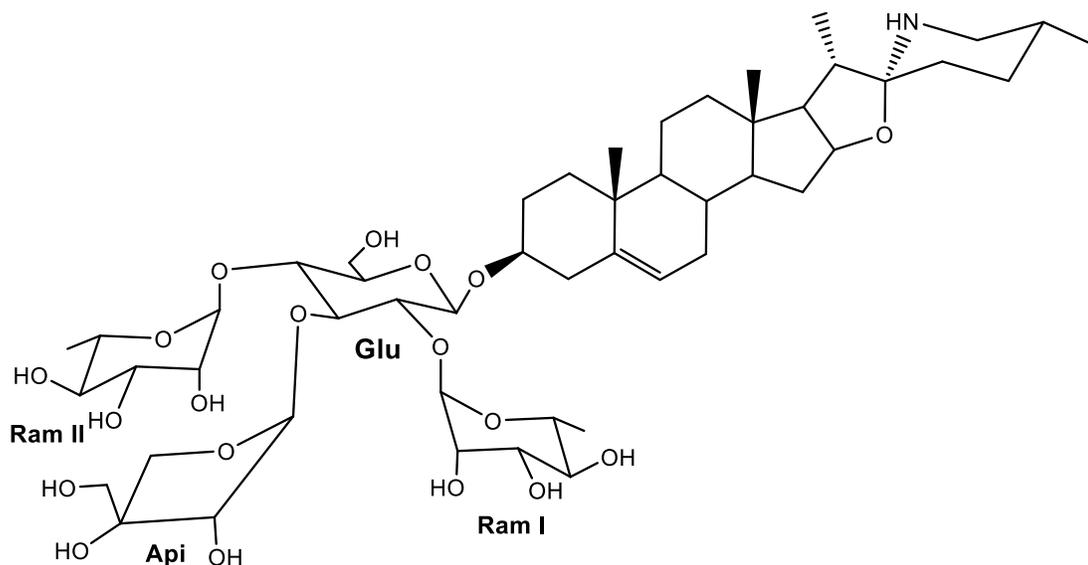
**Figura 45.** Subespectro obtenido en el experimento ROESY-1D donde se observa la interacción espacial entre el protón anomérico de Ram II y el H-4 de la glucosa.

Este experimento también permitió determinar el sitio de unión entre la cadena de azúcares y la aglicona esteroidal, ya que se observó la interacción entre el protón de la posición tres de la aglicona esteroidal a  $\delta_H$  3.87 (H-3) con el protón anomérico de la glucosa a  $\delta_H$  4.98 (Glu, H-1) (**Figura 46**).



**Figura 46.** Subespectro obtenido en el experimento ROESY-1D donde se observa la interacción espacial entre el protón anomérico de Glu y el H-3 de la aglicona esteroidal.

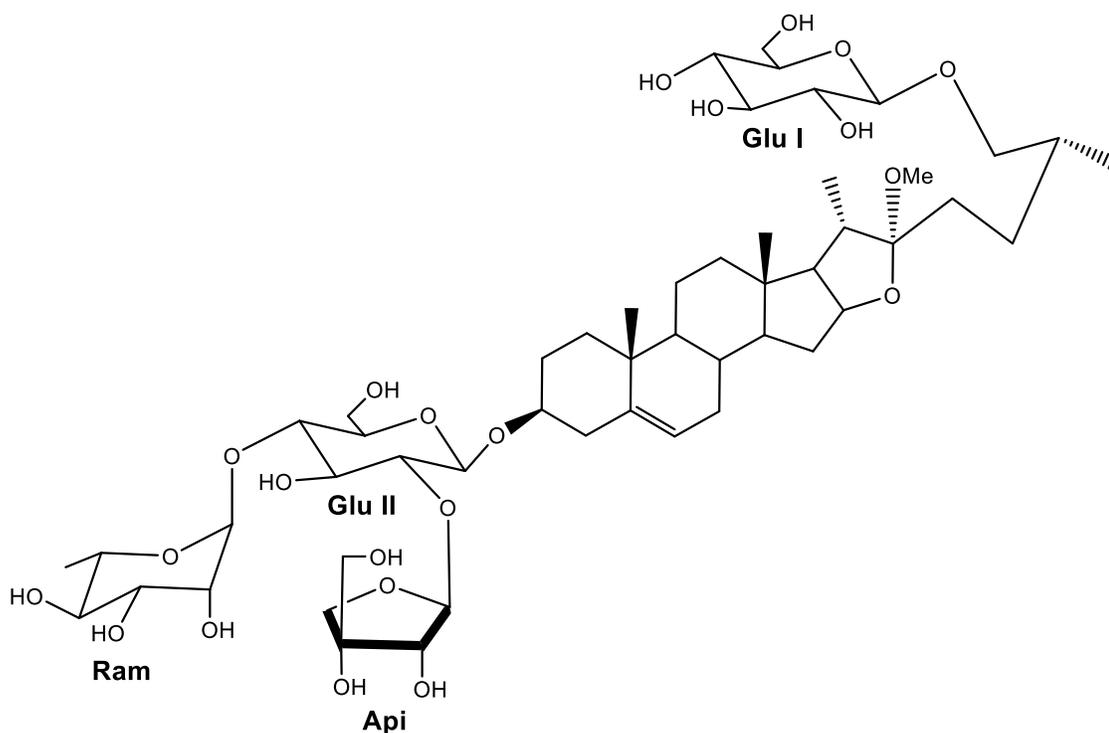
Los datos anteriores junto con la revisión de la literatura indican que el **compuesto II** corresponde a un nuevo glicoalcaloide esteroidal de tipo espirosolano. La estructura química del **compuesto II** fue establecida como (3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 25 $R$ )-espirosol-5-en-3-il O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranosido (**Figura 47**).



**Figura 47.** Estructura química del **compuesto II**.

Este compuesto posee en su estructura un residuo de apiosa en la cadena de azúcares, el cual es un monosacárido poco común en los glicósidos esteroidales aislados del género *Solanum*. Sin embargo, en otras especies vegetales se han reportado glicósidos esteroidales que poseen este monosacárido en su estructura, tal es el caso de la especie *Costus spicatus* también conocido como jengibre cabeza de indio o “Cana no brejo” en Brasil, esta especie vegetal perteneciente a la familia Costaceae se encuentra en los bosques costeros húmedos desde el sur de México, Yucatán y Costa Rica hasta el norte de Colombia y Brasil.

A partir del extracto metanólico de los rizomas de *C. spicatus* se aisló el (3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 25 $R$ )-26-( $\beta$ -D-glucopiranosiloxi)-22-metoxifurost-5-en-3-il-O-D-apio- $\beta$ -D-furanosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[6-desoxi- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranosido, un glicósidos esteroidal de tipo furostano (**Figura 48**). La caracterización estructural de este compuesto se realizó mediante experimentos de RMN mono y bidimensionales, así como espectrometría de masas.<sup>50</sup>

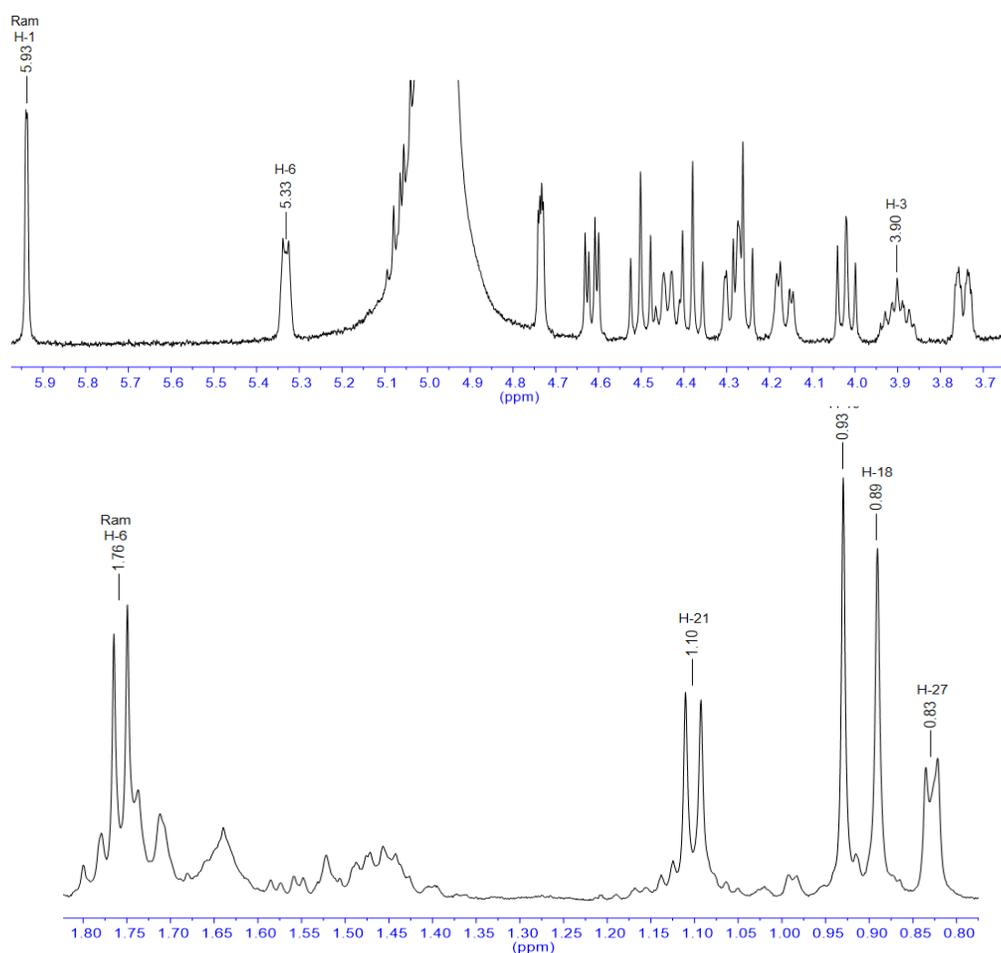


**Figura 48.** Glicósido esteroidal de tipo furostano aislado de *C. spicatus*.

### Compuesto III

El **compuesto III** (4.1 mg) se obtuvo como un polvo blanco, con un rendimiento de 0.00082%. Este compuesto mostró un pico de ion molecular a 722  $m/z$   $[M+H]^+$ .

En el espectro de RMN- $^1H$  (**Figura 49**), se observan dos señales simples a  $\delta_H$  0.89 (H-18) y 0.93 (H-19), así como dos señales dobles a  $\delta_H$  0.83 (H-27,  $J = 5.5$  Hz) y 1.10 (H-21,  $J = 7$  Hz) correspondientes a los metilos del núcleo esteroidal, adicionalmente se observa una señal doble a  $\delta_H$  1.76 con  $J = 6.2$  Hz atribuida al metilo del desoxiazúcar ramnosa. Asimismo, se observan señales múltiples entre  $\delta_H$  3.60 y 4.80, asignadas a metinos y metilenos propios de azúcares; igualmente, se observaron una señal múltiple ancha a  $\delta_H$  5.33 y una señal simple ancha a  $\delta_H$  5.93, que corresponden a un protón olefínico (H-6) y al protón anomérico del desoxiazúcar ramnosa, respectivamente.



**Figura 49.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del **compuesto III**, determinado a 400 MHz en piridina-*d*<sub>5</sub> donde se observan las señales características de un glicósido esteroidal.

En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se identificaron 39 señales de átomos de carbono. Mediante los experimentos DEPT 135° y DEPT 90° se determinó la presencia de 11 CH<sub>2</sub>, 19 CH, cinco CH<sub>3</sub> y cuatro carbonos cuaternarios (**Figura 50**). En el espectro de RMN-<sup>13</sup>C se observan señales a  $\delta_C$  121.6 y 140.7, correspondientes a los átomos de carbono de un doble enlace ( $\Delta^5$ ). También se observaron señales a  $\delta_C$  102.9 y 103.1, pertenecientes a los carbonos anoméricos de los azúcares presentes, glucosa y ramnosa, respectivamente. Finalmente, la señal a  $\delta_C$  98.2 se asignó al átomo de carbono espiro (C-22), este desplazamiento químico indica la posible presencia de un átomo de nitrógeno en el anillo F del núcleo esteroidal. El resto de las señales se resume en la **Tabla 6**.

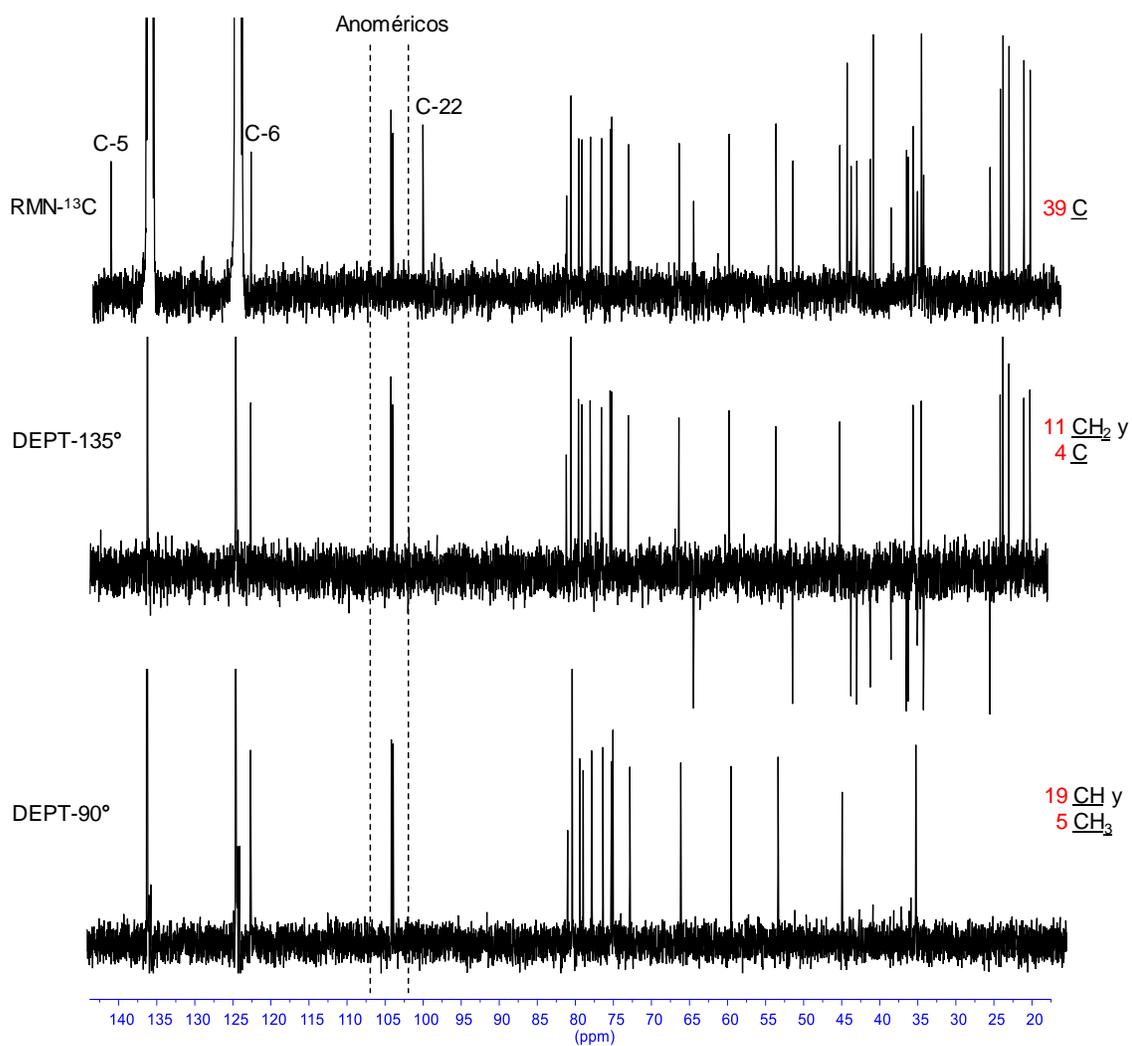


Figura 50. Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$ , DEPT 135° y DEPT 90° del compuesto III.

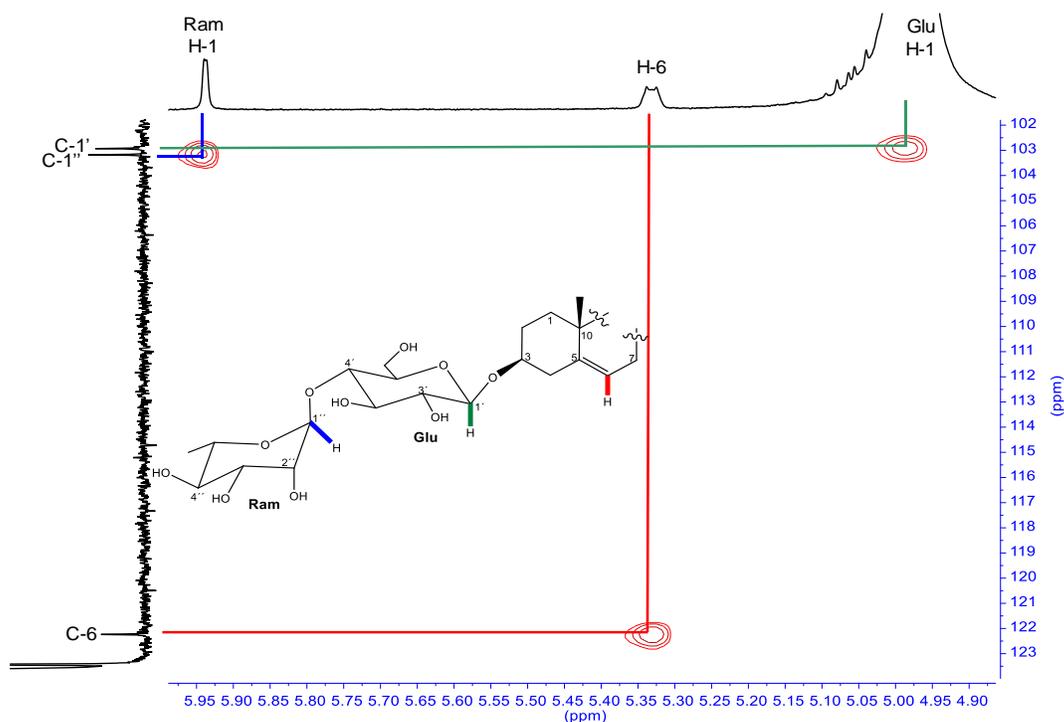
**Tabla 6.** Datos de RMN de la aglicona del **compuesto III** en piridina- $d_5$ .

Posición	$^1\text{H}$ ( $\delta$ en ppm, m, J en Hz) a	$^{13}\text{C}$ ( $\delta$ en ppm) a	Mahato <sup>51</sup> ( $\delta$ en ppm) <sup>a</sup>
	400 MHz	100 MHz	
1	0.98, 1.73	37.2	37.4
2	1.72, 2.10	30.0	30.2
3	3.90	78.0	78.3
4	2.47, 2.73	39.1	39.3
5	---	140.7	140.7
6	5.33	121.6	121.7
7	1.48, 1.87	32.1	32.3
8	1.56	31.4	32.5
9	0.91	50.1	50.3
10	---	36.9	37.0
11	1.45	21.0	21.2
12	1.13, 1.74	39.9	40.1
13	---	40.4	40.6
14	1.09	56.5	56.7
15	1.47, 2.05	30.8	31.6
16	4.44	78.7	78.7
17	1.78	63.3	63.5
18	0.89 (s)	16.3	16.5
19	0.93 (s)	19.2	19.4
20	1.99	41.4	41.6
21	1.10 (d, 7)	15.5	15.6
22	---	98.2	98.3
23	1.75	34.4	34.6
24	1.49, 2.06	32.3	31.1
25	1.66	31.4	31.6
26	2.79	47.8	48.0
27	0.83 (d, 5.5)	19.6	19.7

<sup>a</sup> Medido en piridina- $d_5$ 

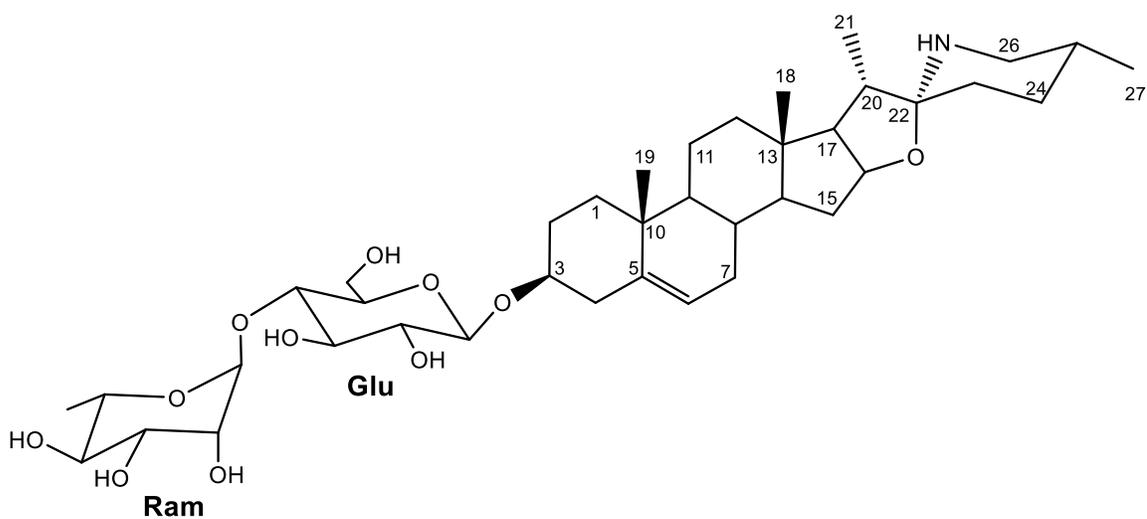
Por medio del experimento HSQC, se pudieron realizar las asignaciones de los carbonos anoméricos de los azúcares presentes, especialmente el de glucosa ya que en el espectro de RMN- $^1\text{H}$ , la señal correspondiente al protón anomérico se encontraba enmascarada por la señal del agua en el disolvente.

Se determinó que los protones anoméricos a  $\delta_{\text{H}}$  4.99 (Glu H-1) y 5.93 (Ram H-1) se encuentran enlazados a los carbonos a  $\delta_{\text{C}}$  102.9 (C-1') y 103.1 (C-1''), respectivamente. Este experimento también permitió realizar la asignación de la señal a  $\delta_{\text{H}}$  5.33 atribuida al protón H-6 de la aglicona esteroideal (**Figura 51**).



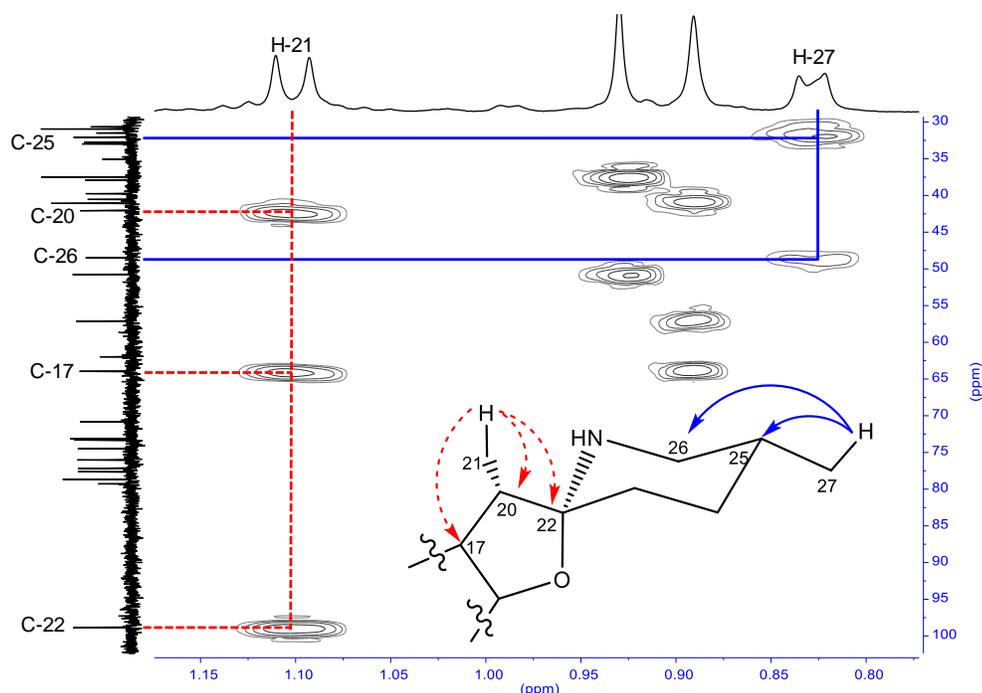
**Figura 51.** Sección de espectro HSQC del **compuesto III**, en el que se observa la correlación C-H de los protones anoméricos y el protón H-6.

Todo lo anterior sugiere que se trata de un glicoalcaloide esteroideal de tipo espirosolano, el cual posee un doble enlace que, por su desplazamiento químico característico, se encuentra situado entre las posiciones cinco y seis ( $\Delta^5$  espirosolano), además de encontrarse unido a una cadena de azúcares conformada por dos monosacáridos (**Figura 52**).



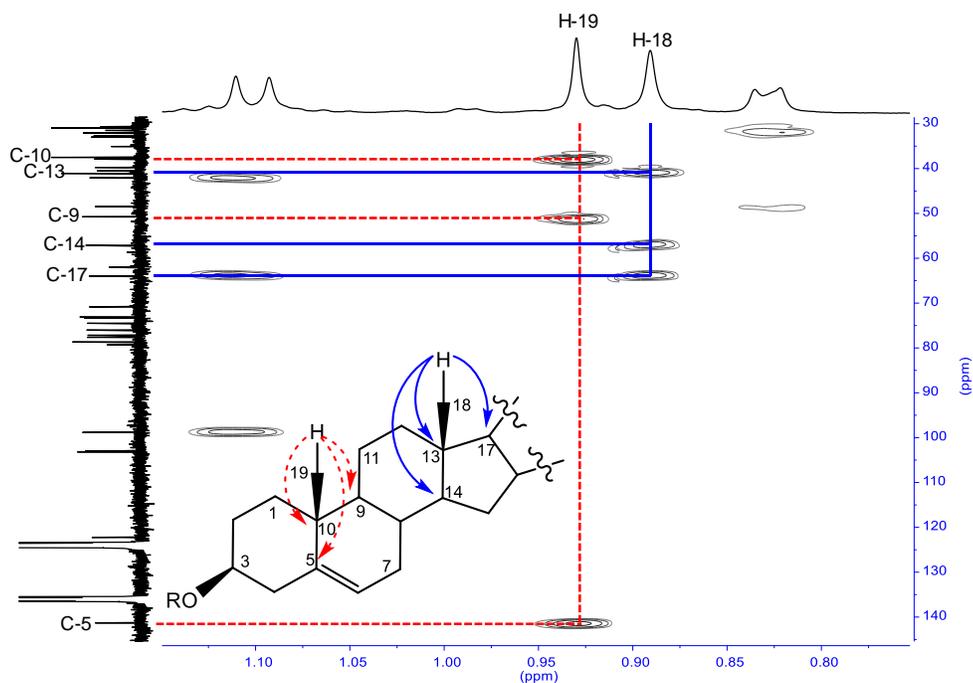
**Figura 52.** Glicoalcaloide esteroideal que posee un doble enlace en posición  $\Delta^5$  y una cadena conformada por dos unidades de azúcar.

Para confirmar la posición de los diferentes grupos funcionales en la estructura se empleó el experimento bidimensional de HMBC, en el cual se observó que la señal doble a  $\delta_H$  0.83 (H-27,  $J = 5.5$  Hz) presenta correlación con el metino a  $\delta_C$  31.4 (C-25) y el metileno a  $\delta_C$  47.8 (C-26); de igual forma la señal doble a  $\delta_H$  1.10 (H-21,  $J = 7$  Hz) presentó correlación con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  98.2 (C-22) y los metinos a  $\delta_C$  63.3 (C-17) y 41.4 (C-20) (**Figura 53**).



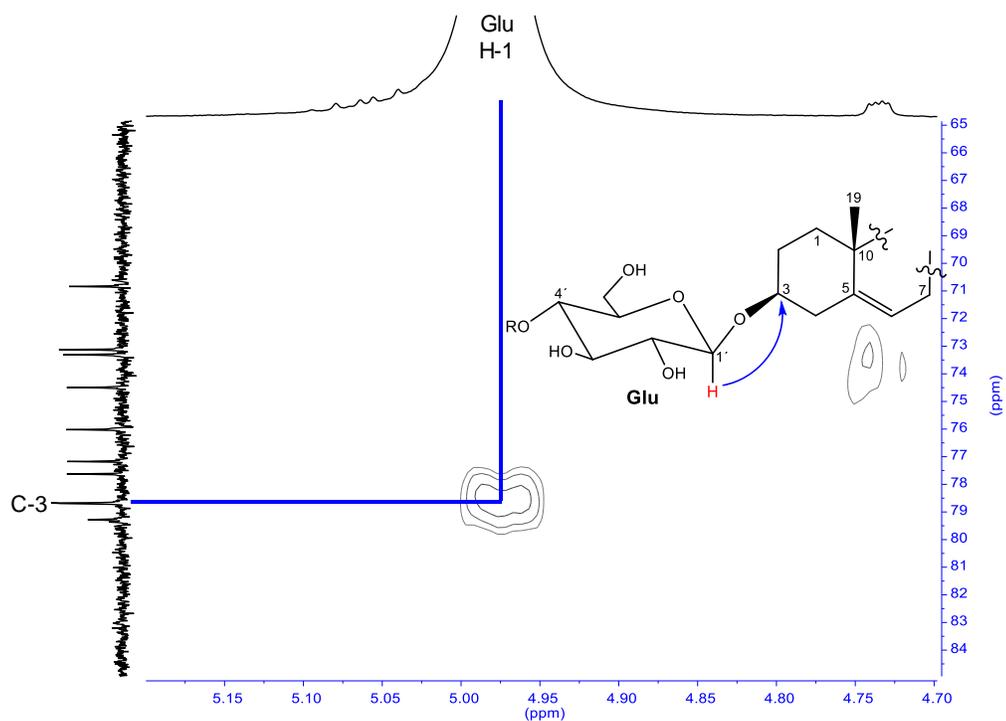
**Figura 53.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-21 y H-27 con los carbonos del núcleo esteroide.

Por su parte, la señal simple a  $\delta_H$  0.89 (H-18) presentó correlación con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  40.4 (C-13) y con los metinos a  $\delta_C$  56.5 (C-14) y 63.3 (C-17); mientras que la señal simple a  $\delta_H$  0.93 (H-19) presentó correlaciones con los carbonos cuaternarios a  $\delta_C$  140.7 (C-5) y 36.9 (C-10), así como con el metino a  $\delta_C$  50.1 (C-9) (**Figura 54**).

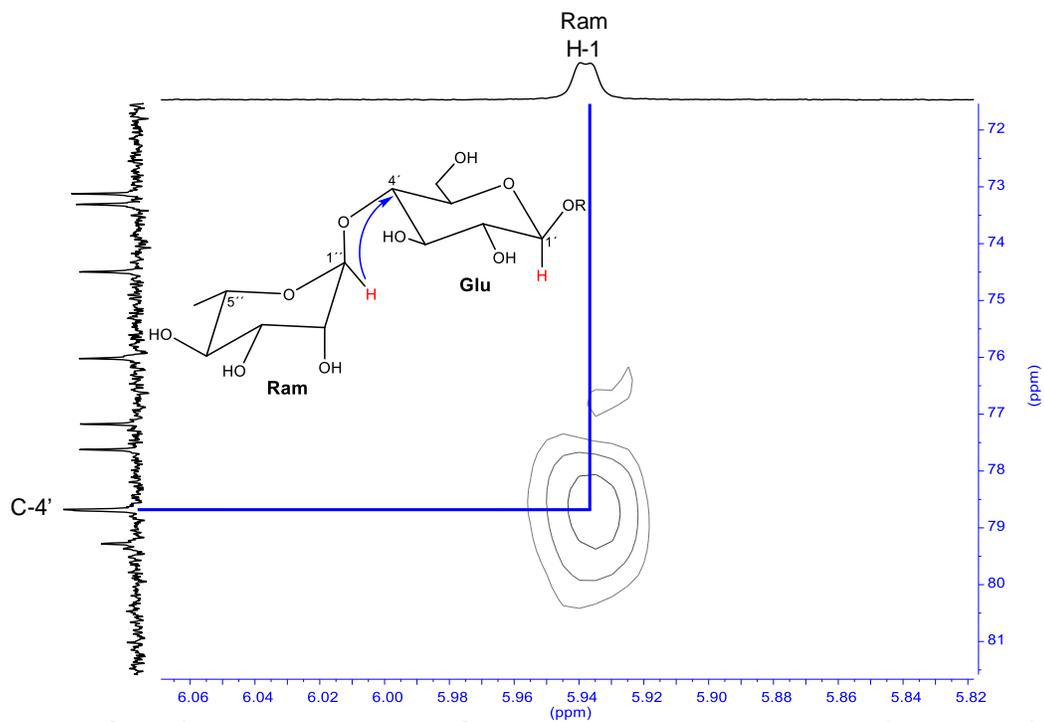


**Figura 54.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-18 y H-19 con los carbonos del núcleo esteroidal.

La unión de la aglicona con la cadena de azúcares se estableció de acuerdo con el acoplamiento del protón anomérico de la unidad de glucosa (H-1 Glu a  $\delta_H$  4.99) con el metino a  $\delta_C$  78.0 (C-3) del núcleo esteroidal, observado en el experimento HMBC (**Figura 55**). Finalmente, la unión entre los monosacáridos se estableció de acuerdo con la correlación del protón anomérico de la ramnosa (H-1 Ram a  $\delta_H$  5.93) con el metino a  $\delta_C$  78.6 (C-4') de la glucosa (**Figura 56**). La asignación de los protones de cada uno de los monosacáridos y sus respectivos carbonos se encuentra resumida en la **Tabla 7**.



**Figura 55.** Sección del espectro HMBC donde se observa la correlación del protón anomérico de la glucosa con C-3.



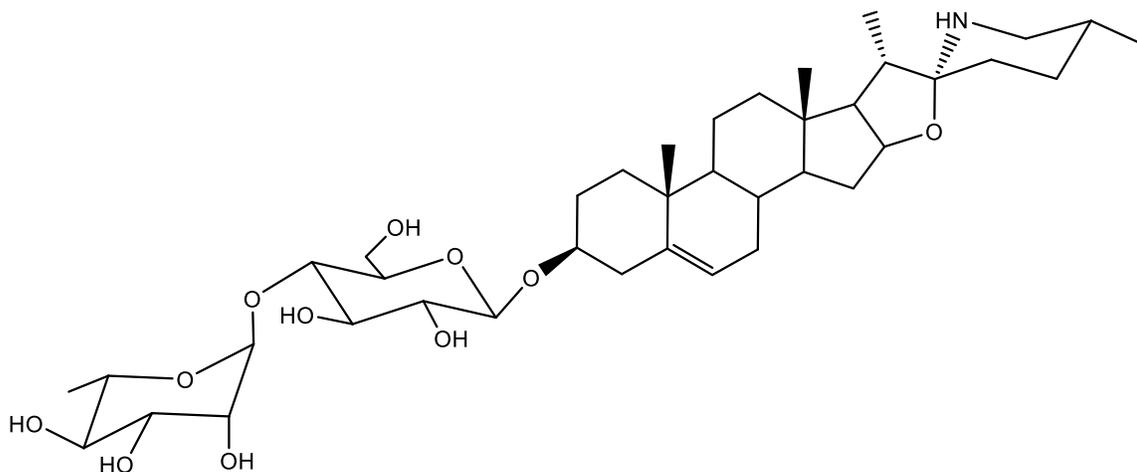
**Figura 56.** Sección del espectro HMBC donde se observa la correlación del protón anomérico de la ramnosa con el C-4' de la glucosa.

**Tabla 7.** Datos de RMN para la cadena de azúcares del **compuesto III** en piridina-*d*<sub>5</sub>.

Posición	<sup>1</sup> H (δ en ppm, m, J en Hz)	<sup>13</sup> C (δ en ppm)	Yang <sup>8</sup> <sup>1</sup> H (δ en ppm, m, J en Hz)	Yang <sup>8</sup> <sup>13</sup> C (δ en ppm) <sup>a</sup>
Glucosa (1→C-3)				
1	4.99 (d, 7.6)	102.9	4.94 (d, 7.7)	102.9
2	4.03	76.0	3.98	76.0
3	4.17	77.1	4.23	77.1
4	4.55	78.6	4.47	78.7
5	3.75	77.6	3.73	77.6
6	4.18, 4.29	61.9	4.13, 4.26	61.9
Ramnosa (1→C-4')				
1	5.93 (brs)	103.1	5.91 (brs)	103.1
2	4.74	73.1	4.71	73.1
3	4.63	73.3	4.58	73.2
4	4.39	74.4	4.35	74.4
5	5.07	70.8	5.05	70.8
6	1.76 (d, 6.2)	19.0	1.72 (d, 6.2)	19.0

<sup>a</sup> Medido en piridina-*d*<sub>5</sub>

Los datos anteriores junto a la revisión de la literatura permitieron identificar el **compuesto III** como kasianina (**Figura 57**), un glicoalcaloide esteroide aislado por primera vez en 1980 de la especie vegetal *Solanum khasianum*.<sup>51</sup>



**Figura 57.** Estructura química de la kasianina.

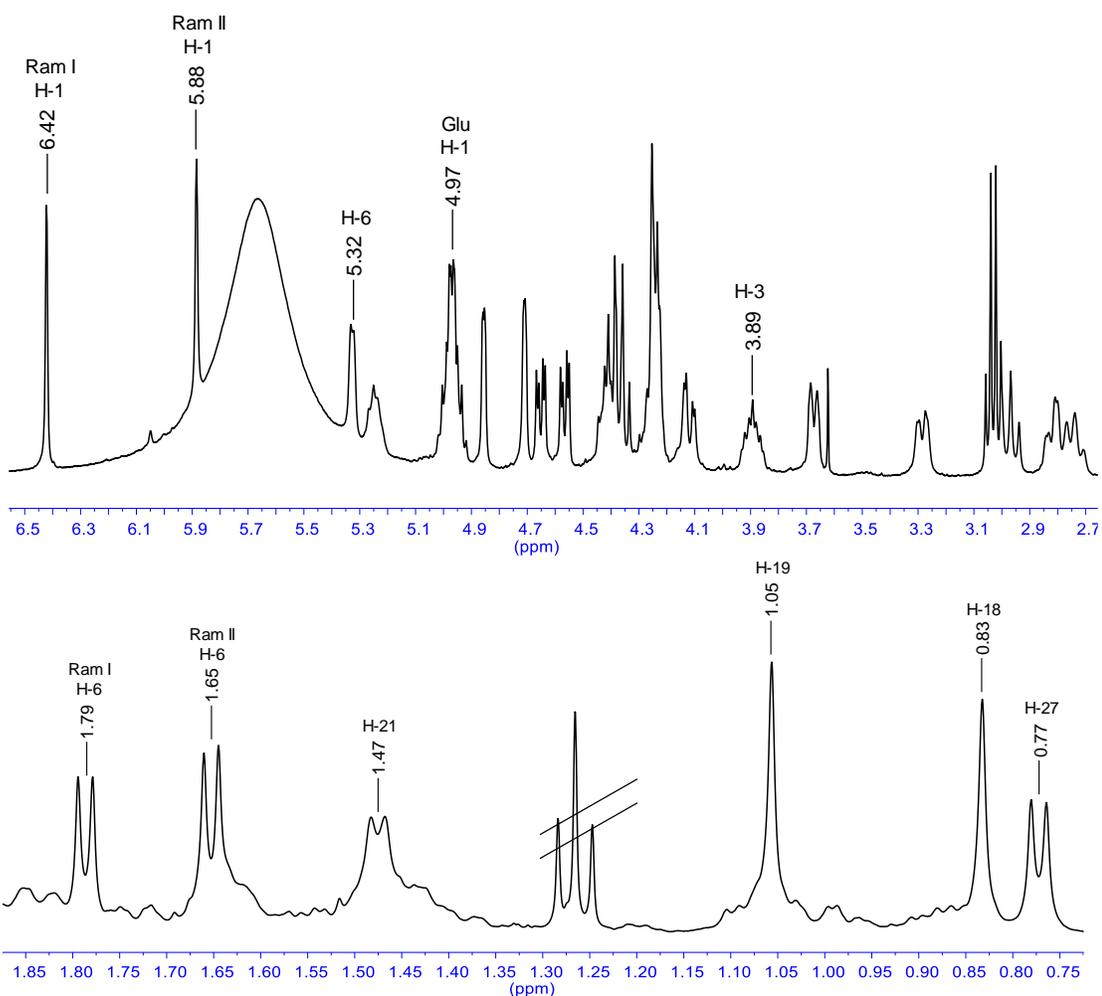
En 2015 Arker y col.<sup>52</sup> evaluaron la actividad citotóxica de la kasianina y otros alcaloides esteroidales frente a dos líneas celulares sanas (NIH3T3 y Vero) y cuatro de cáncer humano (AGS, HT-29, MCF-7 y MDA-MB-231).

Los resultados indican que la kasianina sólo muestra una débil actividad citotóxica sobre las células MCF-7 (19.89  $\mu$ M) en comparación con los demás glicoalcaloides evaluados, por tanto, la kasianina es un compuesto que presenta una muy baja actividad citotóxica, lo cual puede deberse a la cantidad de monosacáridos que componen la cadena de azúcares, ya que de acuerdo con Chang y col.<sup>53</sup>, la cantidad de azúcares presentes en los glicósidos esteroidales podría influir directamente en su capacidad para inducir la apoptosis celular, esto debido a que a mayor número de azúcares se modifican los ángulos diedros del enlace glicosídico, lo cual podría permitir una mayor interacción con los receptores esteroidales y consecuentemente activar la expresión de genes que induzcan la apoptosis.

#### Compuesto IV

El **compuesto IV** (15.5 mg) se obtuvo como un polvo blanco, con un rendimiento de 0.0031%. Este compuesto mostró un pico de ion molecular a 868  $m/z$   $[M+H]^+$ .

En el espectro de RMN-<sup>1</sup>H (**Figura 58**) se pueden observar dos señales simples a  $\delta_H$  0.83 (H-18) y 1.05 (H-19), así como cuatro señales dobles a  $\delta_H$  0.77 (H-27,  $J = 6.5$  Hz), 1.47 (H-21,  $J = 6.2$  Hz), 1.65 (Ram II H-6,  $J = 6.2$  Hz) y 1.79 (Ram I H-6,  $J = 6.1$  Hz), las cuales corresponden a seis grupos metilo. También se observan diversas señales entre  $\delta_H$  3.60 y 4.89, correspondientes a metinos y metilenos propios de azúcares; igualmente, se observa una señal doble a  $\delta_H$  5.32 asignada a un protón olefínico. La señal múltiple a  $\delta_H$  4.97, así como las señales simples a  $\delta_H$  5.88 y 6.42 fueron atribuidas a protones anoméricos de tres azúcares. Estos datos sugieren la presencia de un núcleo esteroideal que posee un doble enlace y está unido a tres unidades de azúcar.



**Figura 58.** Espectro de RMN-<sup>1</sup>H del **compuesto IV**, determinado a 400 MHz en piridina-*d*<sub>5</sub> donde se observan las señales características de un glicósido esteroidal.

Los experimentos de prueba de protones unidos (APT, por sus siglas en inglés) y DEPT 90° indicaron la presencia de 45 señales de átomos de carbono, de los cuales seis corresponden a metilos, 11 a metilenos, 24 a metinos y cuatro a carbonos cuaternarios (**Figura 59**). Las señales observadas a  $\delta_C$  121.7 y 140.8 se asignaron a los átomos de carbono de un doble enlace ( $\Delta^5$ ). Asimismo, las señales obtenidas a  $\delta_C$  100.3, 102.1 y 102.9 se atribuyeron a los carbonos anoméricos de los azúcares presentes. Finalmente, la señal a  $\delta_C$  98.6 se asignó al átomo de carbono espiro (C-22), este desplazamiento químico indica la posible presencia de un átomo de nitrógeno en el anillo F del núcleo esteroidal. El resto de las señales se resume en la **Tabla 8**.

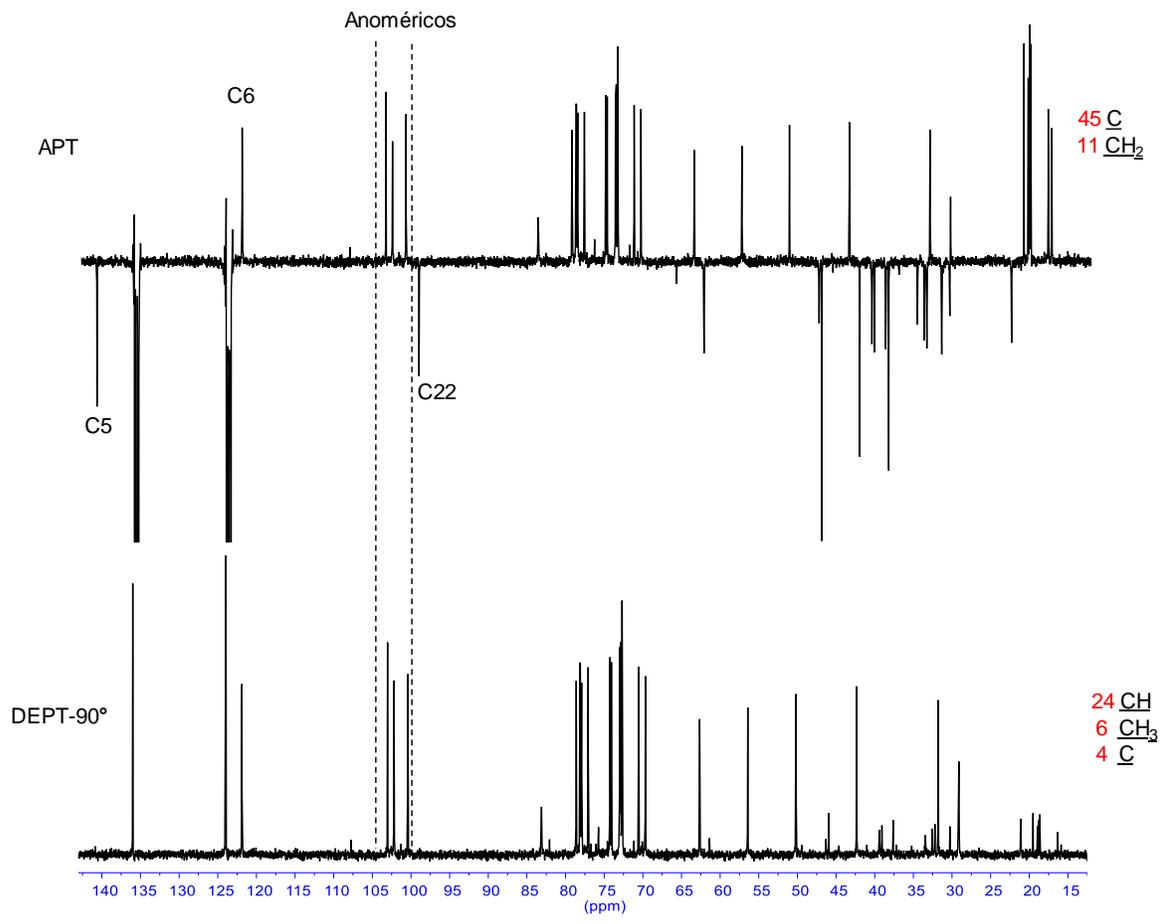


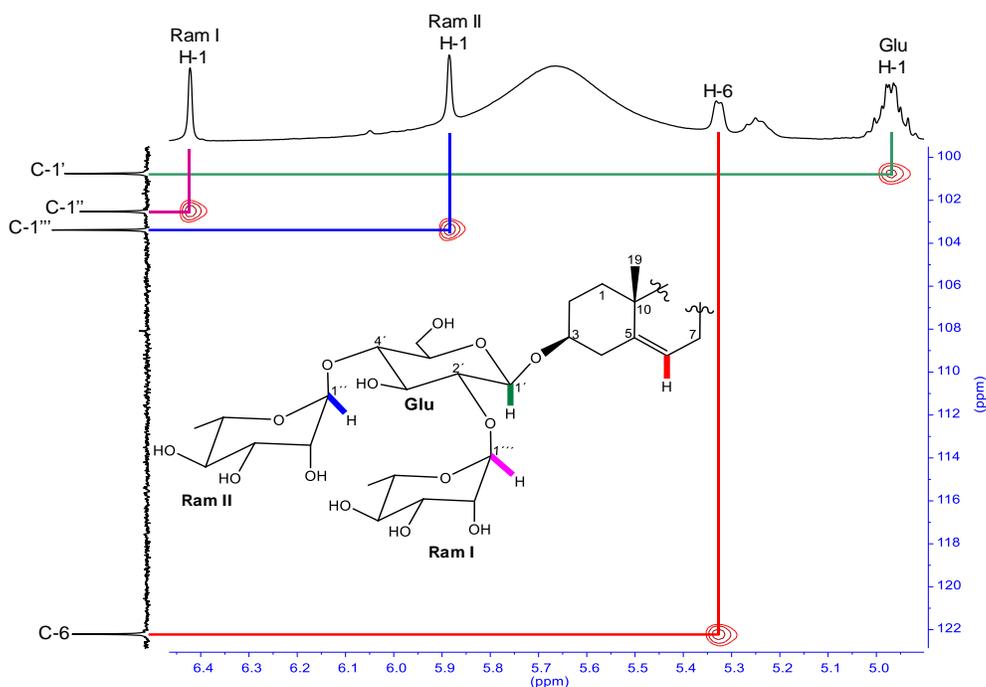
Figura 59. Espectros de APT y DEPT 90° del compuesto IV.

**Tabla 8.** Datos de RMN de la aglicona del **compuesto IV** en piridina-*d*<sub>5</sub>.

Posición	<sup>1</sup> H (δ en ppm, m, J en Hz) a 400 MHz	<sup>13</sup> C (δ en ppm) a 100 MHz	Ghisalberti <sup>48</sup> <sup>13</sup> C (δ en ppm) <sup>a</sup>
1	0.98, 1.72	37.5	37.5
2	1.86, 2.08	30.1	30.2
3	3.89	78.0	78.1
4	2.77	38.9	39.0
5	---	140.8	140.8
6	5.32	121.7	121.8
7	1.84	32.4	32.4
8	1.53	31.7	31.7
9	0.86	50.1	50.4
10	---	37.1	37.2
11	1.41	21.0	21.1
12	1.06, 1.64	39.3	40.1
13	---	40.9	40.6
14	1.06	56.3	56.7
15	1.45, 2.09	32.1	32.6
16	4.42	78.6	78.8
17	2.25	62.5	63.6
18	0.83 (s)	16.2	16.5
19	1.05 (s)	19.4	19.4
20	2.24	42.6	41.6
21	1.47 (d, 6)	15.7	15.7
22	---	99.0	98.3
23	1.83, 2.06	33.7	34.7
24	1.62	29.5	31.0
25	2.09	29.4	31.6
26	2.96, 3.28	46.6	48.1
27	0.77 (d, 6.6)	19.2	19.8

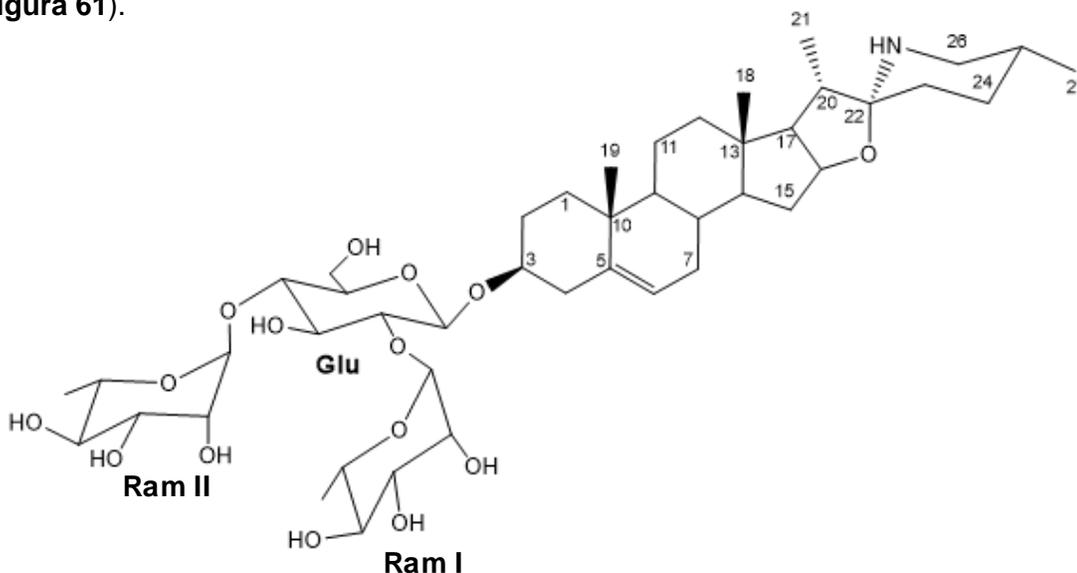
<sup>a</sup> Medido en piridina-*d*<sub>5</sub>

Por medio del experimento HSQC, se determinó que los protones anoméricos a δ<sub>H</sub> 4.97 (Glu H-1), 6.42 (Ram I H-1) y 5.88 (Ram II H-1) se encuentran enlazados a los carbonos a δ<sub>C</sub> 100.3 (C-1'), 102.1 (C-1'') y 102.9 (C-1''') respectivamente. Este experimento permitió determinar que el protón seis (H-6 a δ<sub>H</sub> 5.32) del núcleo esteroidal se encuentra directamente enlazado al carbono a δ<sub>C</sub> 121.7 (C-6) (**Figura 60**).



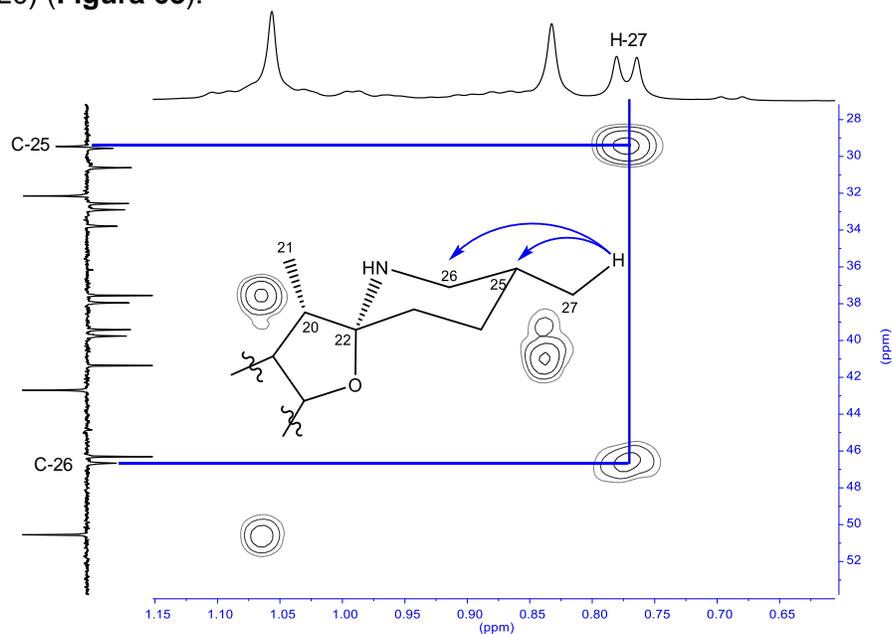
**Figura 60.** Sección de espectro HSQC del **compuesto IV**, en el que se observa la correlación C–H de los protones anoméricos y el protón H-6.

Todo lo anterior sugiere que se trata de un glicoalcaloide esteroideal de tipo espirosolano, el cual posee un doble enlace que, por su desplazamiento químico característico, se encuentra situado entre las posiciones cinco y seis ( $\Delta^5$  espirosolano), además de encontrarse unido a una cadena de azúcares conformada por tres monosacáridos (**Figura 61**).

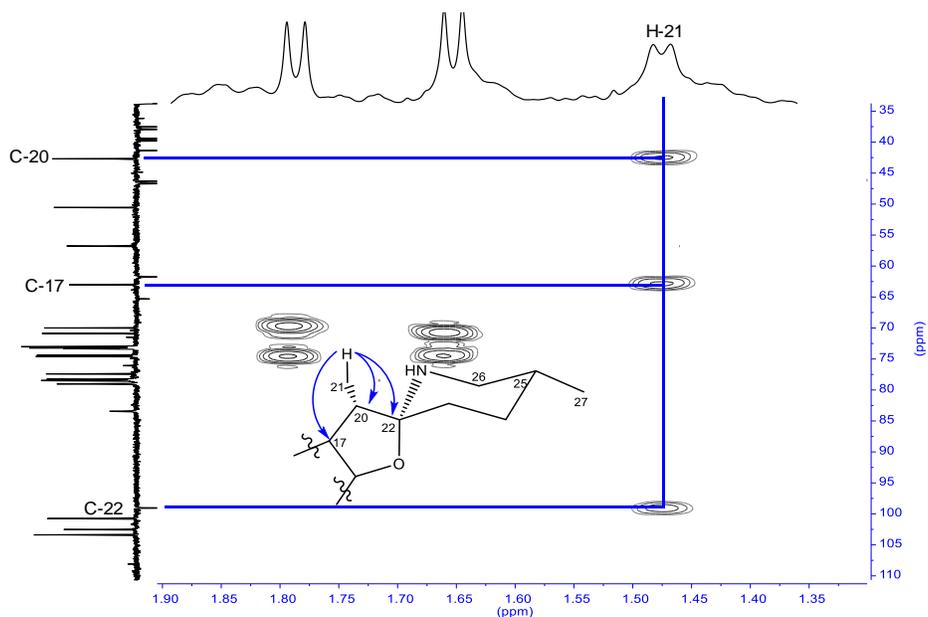


**Figura 61.** Glicoalcaloide esteroideal que posee un doble enlace en posición  $\Delta^5$  y una cadena oligosacárida conformada por tres azúcares.

Para confirmar la posición de los diferentes grupos funcionales en la estructura se empleó el experimento bidimensional de HMBC, en el cual se observó que la señal doble a  $\delta_H$  0.77 (H-27) presenta correlación con el metino a  $\delta_C$  29.1 (C-25) y el metileno a  $\delta_C$  46.2 (C-26) (**Figura 62**); de igual forma, la señal doble a  $\delta_H$  1.47 (H-21) presentó correlación con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  98.6 (C-22) y los metinos a  $\delta_C$  62.5 (C-17) y 42.2 (C-20) (**Figura 63**).

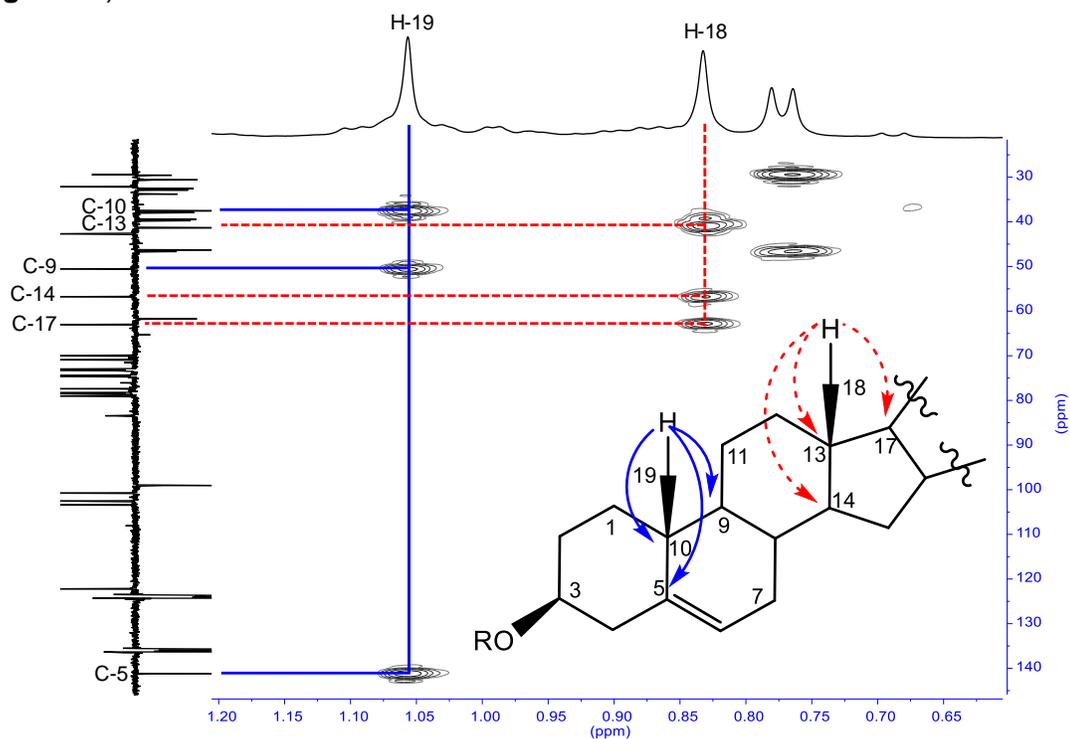


**Figura 62.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-27 con los carbonos C-25 y C-26.



**Figura 63.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-21 con los carbonos C-17, C-20 y C-22.

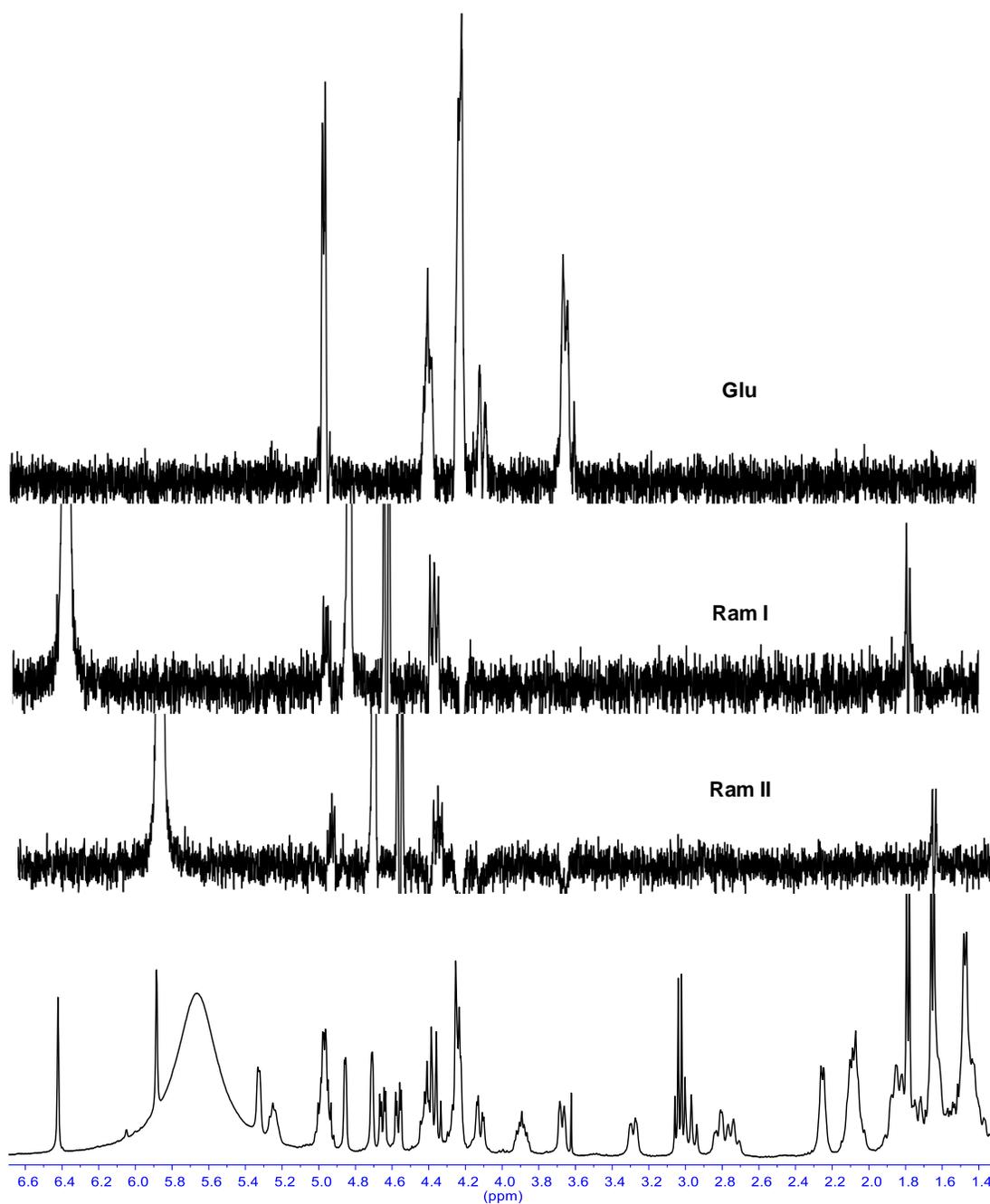
Por su parte, la señal simple a  $\delta_H$  0.83 (H-18) presentó correlación con el carbono cuaternario a  $\delta_C$  40.9 (C-13) y con los metinos a  $\delta_C$  56.3 (C-14) y 62.5 (C-17); mientras que la señal simple a  $\delta_H$  1.05 (H-19) presentó correlaciones con los carbonos cuaternarios a  $\delta_C$  140.8 (C-5) y 37.1 (C-10), así como con el metino a  $\delta_C$  50.1 (C-9) (Figura 64).



**Figura 64.** Sección del espectro HMBC donde se observan las correlaciones de H-18 y H-19 con los carbonos del núcleo esteroidal.

Nuevamente, debido al solapamiento de las señales correspondientes a la cadena de azúcares en el espectro de RMN- $^1H$  se empleó el experimento selectivo TOCSY-1D para la asignación de los protones de cada monosacárido de la cadena de azúcar. En el caso del **compuesto IV**, se llevaron a cabo irradiaciones a los protones anoméricos de cada unidad de ramnosa, siendo éstas a las señales a  $\delta_H$  6.42 (Ram I, H-1) y 5.88 (Ram II, H-1). En el caso de la glucosa, la señal correspondiente al protón anomérico se encontraba solapada, por lo que se irradió el protón de la posición cinco, cuya señal aparece a  $\delta_H$  3.67 (Glu, H-5).

Para cada sistema de espines conformado por cada unidad monosacárida, se usaron tiempos de mezclado de 20, 40, 60, 80, 100 y 120 milisegundos. Al finalizar este proceso, se obtuvo el sistema de espines para cada unidad de azúcar (Figura 65). La asignación de los protones de cada uno de los monosacáridos y sus respectivos carbonos se encuentra resumida en la **Tabla 9**.



**Figura 65.** Subespectros obtenidos en el experimento TOCSY-1D de cada uno de los sistemas de espín correspondientes a los azúcares del **compuesto IV**.

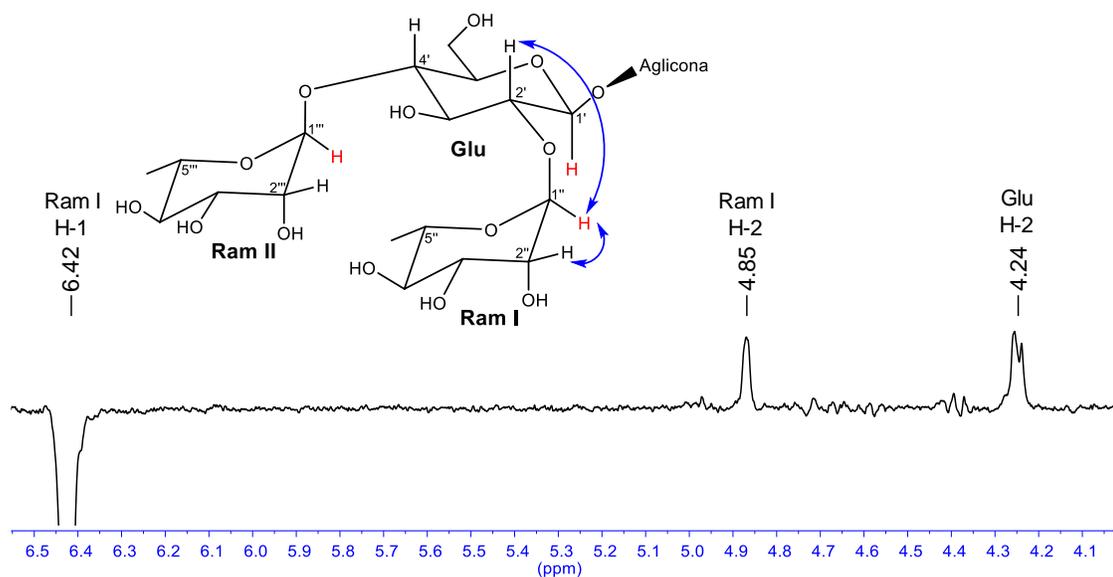
**Tabla 9.** Datos de RMN para la cadena de azúcares del **compuesto IV** en piridina-*d*<sub>5</sub>.

Posición	<sup>1</sup> H (δ en ppm, m, J en Hz) a 400 MHz	<sup>13</sup> C (δ en ppm) a 100 MHz	Yang <sup>8</sup> (δ en ppm, m, J en Hz)	Ghisalberti <sup>48</sup> <sup>13</sup> C (δ en ppm) <sup>a</sup>
Glucosa (1→C-3)				
1	4.97 (m)	100.3	4.90 (d, 7.1)	100.3
2	4.24	77.8	4.20	77.8
3	4.24	78.0	4.20	78.0
4	4.42	78.6	4.39	78.7
5	3.67	76.9	3.62	76.9
6	4.12, 4.23	61.3	4.13, 4.26	61.3
Ramnosa I (1→C2')				
1	6.42 (brs)	102.1	6.39 (brs)	102.0
2	4.85	72.5	4.82	72.5
3	4.65	72.9	4.61	72.7
4	4.37	73.9	4.32	73.9
5	4.95	70.4	4.94	69.5
6	1.79 (d, 6.2)	18.6	1.74 (d, 6.2)	18.6
Ramnosa II (1→C4')				
1	5.88 (brs)	102.9	5.85 (brs)	102.9
2	4.71	72.6	4.82	72.8
3	4.57	72.8	4.53	72.5
4	4.38	74.1	4.32	74.1
5	4.98	69.5	4.94	70.4
6	1.65 (d, 6.2)	18.5	1.62 (d, 6.2)	18.5

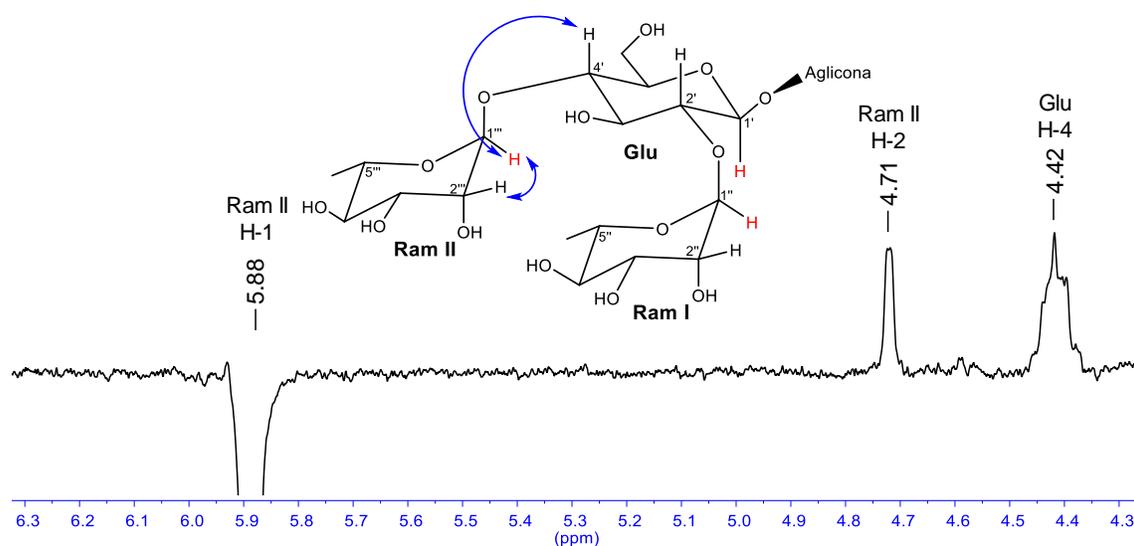
<sup>a</sup> Medido en piridina-*d*<sub>5</sub>

Los sitios de ramificación en la cadena de azúcares, así como su unión con la aglicona esteroideal, no pudieron determinarse mediante los experimentos bidimensionales convencionales, por lo que para este fin se empleó el experimento selectivo ROESY-1D.

En el caso del **compuesto IV**, se irradiaron las señales a δ<sub>H</sub> 6.42 (Ram I, H-1), 5.88 (Ram II, H-1) y 3.89 (H-3). En el espectro ROESY-1D se observó que la señal a δ<sub>H</sub> 6.42 tiene una interacción espacial con el protón dos de su sistema de espines a δ<sub>H</sub> 4.85 (Ram I, H-2) y con el protón de la posición dos de la glucosa a δ<sub>H</sub> 4.24 (Glu, H-2), lo que indica un enlace glicósido alfa 1→2 (**Figura 66**). De igual forma, se observó la interacción entre la señal a δ<sub>H</sub> 5.88 y el protón dos de su sistema de espines a δ<sub>H</sub> 4.71 (Ram II, H-2), así como con el protón asignado a la posición cuatro de la glucosa a δ<sub>H</sub> 4.42 (Glu, H-4), lo que indica un enlace glicósido alfa 1→4 (**Figura 67**).



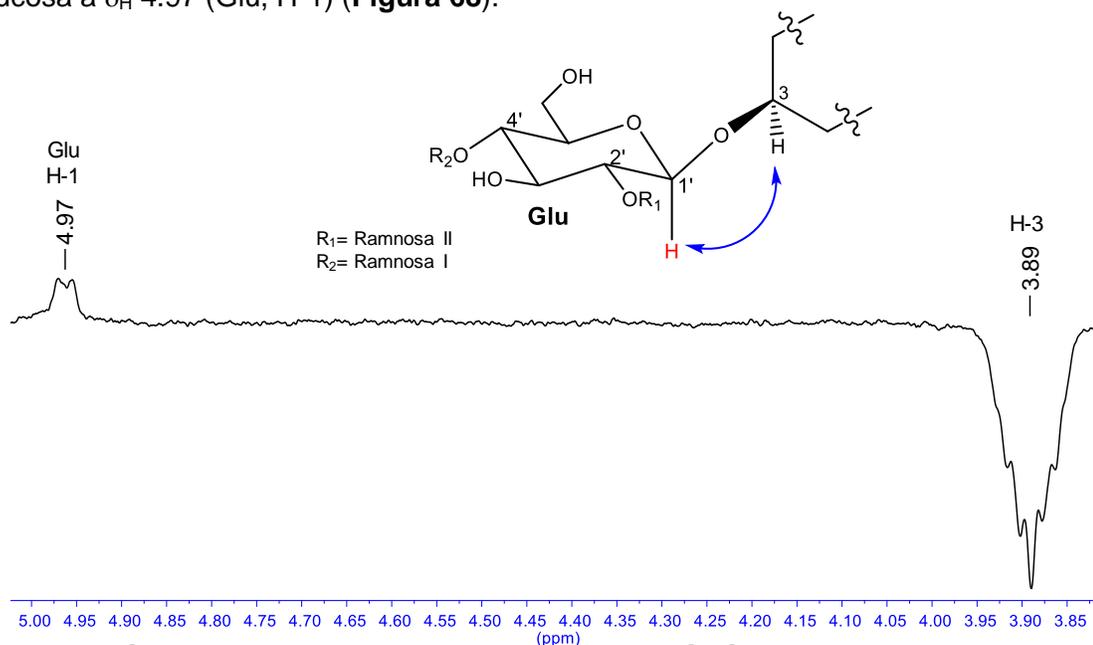
**Figura 66.** Subespectro obtenido en el experimento ROESY-1D donde se observa la interacción espacial entre el protón anomérico de Ram I y el H-2 de la glucosa.



**Figura 67.** Subespectro obtenido en el experimento ROESY-1D donde se observa la interacción espacial entre el protón anomérico de Ram II y el H-4 de la glucosa.

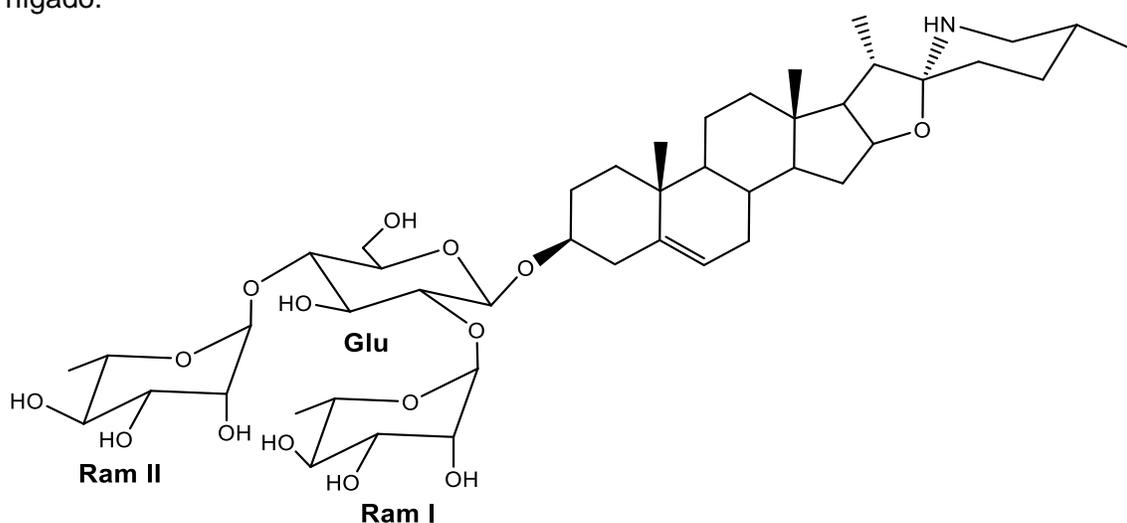
Este experimento también permitió determinar el sitio de unión entre la cadena de azúcares y la aglicona esteroidal, ya que se observó la interacción entre el protón de la

posición tres de la aglicona esterooidal a  $\delta_H$  3.89 (H-3) con el protón anomérico de la glucosa a  $\delta_H$  4.97 (Glu, H-1) (**Figura 68**).



**Figura 68.** Subespectro obtenido en el experimento ROESY-1D donde se observa la interacción espacial entre el protón anomérico de Ram II y el H-4 de la glucosa.

Los datos anteriores, además de la revisión de la literatura permitieron identificar el **compuesto IV** como solamargina (**Figura 69**), un glicoalcaloide esterooidal aislado por primera vez en 1952 de la especie vegetal *Solanum marginatum*.<sup>54</sup> Diversos estudios indican que la solamargina posee una gran actividad antiproliferativa sobre muchas células tumorales humanas tales como: células de colon, próstata, mama, pulmón e hígado.



**Figura 69.** Estructura química de la solamargina.

En 2007, Shiu y col.<sup>55</sup> evaluaron la actividad citotóxica de la solamargina y de cinco agentes quimioterapéuticos (cisplatino, metotrexato, 5-fluorouracilo, epirubicina y ciclofosfamida) frente a tres líneas celulares de cáncer de mama humano (HLB-100, ZR-75-1 y SK-BR-3). Los resultados demostraron que la solamargina posee una mayor actividad citotóxica en comparación con los agentes quimioterapéuticos. Las concentraciones inhibitorias medias ( $IC_{50}$ ) de solamargina que causan el 50% de muerte celular fueron 2.07, 3.00 y 2.15  $\mu\text{M}$  para las células HLB-100, ZR-75-1 y SK-BR-R, respectivamente. Por el contrario, la  $IC_{50}$  de los agentes quimioterapéuticos excede los 200  $\mu\text{M}$  para todas las líneas celulares.

Estos resultados indican que la solamargina podría constituir una alternativa terapéutica para el tratamiento del cáncer de mama, enfermedad que representa la segunda causa principal de muerte por cáncer en las mujeres y que según la Sociedad Americana del Cáncer para 2020 se diagnosticarán alrededor de 276,480 nuevos casos de cáncer de seno invasivo.<sup>56</sup>

## CONCLUSIONES

Se aislaron y purificaron las saponinas esteroidales presentes en las raíces de *Solanum erianthum* D. Don por cromatografía en columna y CLAE mediante el establecimiento de las condiciones cromatográficas óptimas para la separación de los compuestos.

Se establecieron de manera inequívoca las estructuras químicas de las saponinas esteroidales aisladas mediante experimentos de RMN monodimensionales (RMN-<sup>1</sup>H, RMN-<sup>13</sup>C, APT) y bidimensionales, tanto homonucleares (COSY, TOCSY) como heteronucleares (HSQC, HMBC, HSQC-TOCSY) y experimentos selectivos (TOCSY-1D, ROESY-1D), así como por espectrometría de masas.

Se obtuvieron dos glicoalcaloides esteroidales y un glicósido esteroideal, los cuales fueron identificados como kasianina, solamargina y prosapogenina B de la dioscina, respectivamente; los glicoalcaloides esteroidales han sido previamente reportados en la familia Solanaceae. Sin embargo, este estudio representa el primer reporte del aislamiento de la prosapogenina B de la dioscina en el género *Solanum*. Así mismo, se obtuvo un glicoalcaloide esteroideal no descrito en la literatura cuya estructura se estableció como (3 $\beta$ , 22 $\alpha$ , 25*R*)-espirosol-5-en-3-il-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil(1 $\rightarrow$ 2)-[ $\beta$ -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-O-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- $\beta$ -D-glucopiranosido.

El aislamiento de cuatro saponinas esteroidales de las raíces de *Solanum erianthum* D. Don confirma que estas son productoras de glicósidos y glicoalcaloides esteroidales.



## REFERENCIAS

1. Villarreal, M. L.; Cardoso, A.; Ortiz, A.; Sharma, A. Biotecnología Para Producir Medicinas de Plantas Mexicanas. *Rev. Digit. Univ.* **2014**, *15*, 8, 1–15.
2. Sánchez, A.; García, K.; May, F.; Peña, L. Evaluation of biological activity of crude extracts from plants used in yucatecan traditional medicine part I. Antioxidant, antimicrobial and beta-glucosidase inhibition activities. *Phytomedicine* **2001**, *8*, 2, 144-151.
3. Jain, R.; Sharma, A.; Gupta, S.; Sarethy, I. P.; Gabrani, R. *Solanum nigrum*: Current perspectives on therapeutic properties. *Altern. Med. Rev.* **2011**, *16*, 1, 78-85.
4. Yousaf, Z.; Wang, Y.; Baydoun, E. Phytochemistry and pharmacological studies on *Solanum torvum* Swartz. *J. Appl. Pharm. Sci.* **2013**, *3*, 4, 152-160.
5. Sahu, J.; Rathi, B.; Koul, S. *Solanum trilobatum* (Solanaceae)-An Overview. *J. Nat. Remedies* **2013**, *12*, 2, 76-80.
6. Yoong, C.; Karim, H.; Sulaiman, R. Extraction and quantification of saponins: A review. *Food Res. Int.* **2014**, *59*, 16-40.
7. Ghoson, S. Chemical detection of some active compounds in egg plant (*Solanum melongena*) callus as compared with fruit and root contents. *Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci.* **2015**, *4*, 5, 160-1658.
8. Yang, B.; Yin, X.; Liu, Y.; Zhao, D.; Kuang, H. New steroidal saponins from the roots of *Solanum melongena* L. *Fitoterapia* **2018**, *128*, 12-19.
9. Podolak, I.; Galanty, A.; Sobolewska, D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 425-474.
10. Centro de Investigación Científica de Yucatán. *Solanum erianthum*. [https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha\\_virtual.php?especie=2197](https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=2197) (Consultado agosto 2020).
11. Choudhary, A.; Naughton, L.; Montánchez, I.; Dobson, A.; Rai, D. Current status and future prospects of marine natural products (MNPs) as antimicrobials. *Mar. Drugs.* **2017**, *15*, 9, 1-42.
12. García, J.; Ramírez, B.; Robles, G.; Zañudo, J.; Salcedo, A. Conocimiento y uso de las plantas medicinales en la zona metropolitana de Guadalajara. *Desacatos* **2012**, *39*, 29-44.

13. Sudha, C.; Swamy, V.; Bilal, S.; Kumar, R. Wound healing activity of alcoholic extract of *Solanum erianthum* D. Don in excision and incision method. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* **2013**, 4, 1, 130-135.
14. Mahadev, R.; Ramakrishnaiah, H.; Krishna, V.; Deepalakshmi, A.; Naveen, N. Cytotoxic activity of methanolic extracts of *Solanum erianthum* D. Don. *Int. J. Pharm. Sci.* **2015**, 7, 2, 106-112.
15. Sierra, J.; Siqueiros, M.; Flores, E.; Moreno, O.; Arredondo, J. Riqueza y distribución de la familia Solanacea en el estado de Aguascalientes, México. *Bot. Sci.* **2015**, 93, 1, 97-117.
16. Orozco, C.; Beltrán, G.; Porras, N.; Nee, M. Listado de especies espinosas de *Solanum* L. (*Leptostemonum*, Solanaceae). *Biota Colombiana* **2008**, 9, 2, 239-249.
17. CONABIO. Biodiversidad Mexicana: Papas y chiles (Solanaceae). México, **2010**.
18. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Género *Solanum*. [https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/indice\\_tax\\_especies.php?genero=Solanum](https://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/indice_tax_especies.php?genero=Solanum) (Consultado agosto 2020).
19. Arrellano, J.; Flores, J.; Tun, J. Cruz, M. Etnoflora yucatenense: Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribución de las especies vegetales de la Península de Yucatán. Universidad Autónoma de Yucatán: Mérida, México, 2003.
20. Pérez, A. Actividad inhibitoria de *Solanum erianthum* D. Don sobre hongos fitopatógenos. Tesis Licenciatura. Universidad de Ciencias y Artes de Chiapas, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, octubre 2017.
21. Schmelzer, G.; Gurib, A. Plant Resources of Tropical Africa 11(1). Medicinal Plants 1. PROTA Foundation: Netherlands, 2008, vol. 2; pp 522-524.
22. Vincken, J.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry* **2007**, 68, 275-297.
23. Kuklinski, C. *Farmacognosia*, 1ª Ed.; Omega: España, 2003; pp 146-154.
24. Al, S.; Eltayeb, E. The esteroidal glycoalkaloids solamargine and solasonine in *Solanum* plants. *S. Afr. J. Bot.* **2017**, 112, 253-269.
25. Bakar, A.; Brunton, N. Food Glycoalkaloids: Distribution, structure, cytotoxicity, extraction and biological activity. En Alakloids-their importance in nature and human Life. *IntechOpen*; 2019; pp 1-15.
26. Mohamed, T.; Chetty, C.; Ramkanth, S.; Alagusundaram, M.; Rajan, T.; Angalaparameswari, S. *Solanum nigrum* Linn- A review. *Phcog. Rev.* **2009**, 3, 34, 342-345.

27. Sharma, S.; Chand, R.; Sati, O.; Sharma, K. Oligofurostanosides from *Solanum nigrum*. *Phytochemistry* **1983**, *22*, 5, 1241-1244.
28. Ikeda, T.; Tsumagari, H.; Nohara, T. Steroidal oligoglycosides from *Solanum nigrum*. *Chem. Pharm. Bull.* **2000**, *48*, 7, 1062-1064.
29. Gupta, A. K.; Ganguly, P.; Majumder, U. K.; Ghosal, S. Improvement of lipid and antioxidant status in hyperlipidaemic rats treated with steroidal saponins of *Solanum nigrum* and *Solanum xanthocarpum*. *Pharmacologyonline* **2009**, *1*, 1-14.
30. Dong, M.; Feng, X.; Wang, B.; Wu, L.; Ikejima, T. Two novel furostanol saponins from the rhizomes of *Dioscorea panthaica* Prain et Burkill and their cytotoxic activity. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 3-8.
31. Shvets, S.; Nedova, I.; Kintia, P.; Bassarello, C.; Pizza, C.; Piacente, S. Steroidal glycosides from the roots of *Solanum melongena* L. *Chem. J. Mold.* **2009**, *4*, 2, 72-77.
32. Ikeda, T.; Tsumagari, H.; Honbu, T.; Nohara, T. Cytotoxic activity of steroidal glycosides from *Solanum* plants. *Biol. Pharm. Bull.* **2003**, *26*, 8, 1198-1201.
33. Kannan, M.; Dheeba, B.; Gurudevi, S.; Ranjit, A.. Phytochemical, antibacterial and antioxidant studies on medicinal plant *Solanum torvum*. *J. Pharm. Res.* **2012**, *5*, 5, 2418-2421.
34. Jaiswal, B. *Solanum torvum*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Int. J. Pharm. Bio. Sci.* **2012**, *3*, 4, 104-111.
35. Yahara, S.; Yamashita, T.; Nozawa, N.; Nohara, T. Steroidal glycosides from *Solanum torvum*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 5, 1069-1074.
36. Lu, Y.; Luo, J.; Huang, X.; Kong, L. Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. *Steroids* **2009**, *74*, 95-101.
37. Malezas de México. CONABIO. *Solanum tridynamum* Dunal. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/solanum-tridynamum/fichas/ficha.htm> (Consultado en agosto 2020).
38. Yetman, D.; Van Devender, T. R. Mayo Ethnobotany: Land, History, and Traditional Knowledge in Northwest Mexico, 1a Ed.; University of California Press: Los Ángeles, 2002; 260-261.
39. Brito Loeza, W. F. Metabolitos secundarios aislados de las raíces de *Solanum tridynamum* Dunal. Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, marzo 1993.
40. Urs, R.; Lakshmidēvi, N. *Solanum erianthum*; analysis of phytochemical composition. *Eur. J. Pharm. Med. Res.* **2016**, *3*, 4, 290-293.

41. Alawode, T.; Lajide, L.; Owolabi, B.; Olaleye, M.; Ilesanmi, O. Phytochemical investigation, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory evaluation of leaf extracts of *Solanum erianthum*. *Curr. J. Appl. Sci. Technol.* **2017**, *24*, 5, 1-11.
42. Chou, S.; Huang, T.; Lin, E.; Huang, C.; Chou, C. Antihepatitis B virus constituents of *Solanum erianthum*. *Nat. Prod. Commun.* **2011**, *6*, 1-4.
43. Sottorff, I.; Aballay, A.; Hernández, V.; Roa, L.; Muñoz, L.; Silva, M.; Becerra, J.; Astuya, A. Characterization of bioactive molecules isolated from sea cucumber *Athyonidium chilensis*. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* **2013**, *48*, 23-35.
44. Maldonado, H.; Guzmán, H.; Márquez, S.; Tupayachi, A.; Albán, J. Estudio de saponinas esteroidales de especies peruanas del género *Dioscorea*. *Rev. Soc. Quím. Perú* **2012**, *78*, 3, 208-218.
45. De Vivar, A. Química de la flora mexicana: Investigaciones en el instituto de química de la UNAM, 1ª Ed.; Instituto de Química UNAM: México, 2006; 153.
46. Agrawal, P.; Jain, D.; Gupta, R.; Thakur, R. Carbon-13 MRN spectroscopy of steroidal saponins and steroidal saponins. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 11, 2479-2496.
47. Wang, S.; Cai, B.; Cui, C.; Liu, H.; Wu, C.; Yao, X. Diosgenin-3-O- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)- $\beta$ -D-glucopyranoside obtained as a new anticancer agent from *Dioscorea futschauensis* induces apoptosis on human colon carcinoma HCT-15 cell via mitochondria-controlled apoptotic pathway. *J. Asian Nat. Prod. Res.* **2004**, *6*, 2, 115-125.
48. Ghisalberti, E. Steroidal glycoalkaloids: Isolation, structure, analysis and biosynthesis. *Nat. Prod. Commun.* **2006**, *1*, 10, 859-884.
49. Da Silva, B.; Parente, J. New steroidal saponins from rhizomes of *Costus Spiralis*. *Z. Naturforsch* **2003**, *59*, 81-85.
50. Da Silva, B.; Roney, R.; Parente, J. A furostanol glycoside from rhizomes of *Costus spicatus*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 931-935.
51. Mahato, S.; Sahu, N.; Ganguly, A.; Kasai, R.; Tanaka, O. Steroidal alkaloids from *Solanum khasianum*: Application of <sup>13</sup>C NMR spectroscopy to their Structural elucidation. *Phytochemistry* **1980**, *19*, 9, 2017-2020.
52. Akter, R.; Uddin, S.; Tiralongo, J.; Darren, Grice.; Tiralongo, E. A new cytotoxic steroidal glycoalkaloid from the methanol extract of *Blumea lacera* leaves. *J. Pharm. Pharm. Sci.* **2015**, *18*, 4, 616-633.
53. Chang, L.; Tsai, T.; Wang, J.; Lin, C.; Kuo, K. The rhamnose moiety of solamargine plays a crucial role in triggering cell death by apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1998**, *242*, 1, 21-25.

54. Briggs, L.; Brooker, E.; Harvey, W.; Odell, A. Solamargine, a new alkaloid from *Solanum marginatum*. *Solanum Alkaloids. Part VII*. **1952**, 3587-3591.
55. Shiu, L.; Chang, L.; Liang, C.; Huang, Y.; Sheu, H.; Kuo, K. Solamargine induces apoptosis and sensitizes breast cancer cells to cisplatin. *Food Chem. Toxicol.* **2007**, *45*, 2155-2164..
56. Cáncer de mama. American Cancer Society. <https://www.cancer.org/es/cancer/cancer-de-seno/acerca/que-tan-comun-es-el-cancer-de-seno.html> (Consultado agosto 2020).



