



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

OBTENCIÓN DE GLICÓSIDOS ESTEROIDALES A
PARTIR DE RAÍCES DE *Solanum tridynamum*

TESIS

PRESENTADA POR

Marco Antonio Palacios Cornejo

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019



UADY

POSGRADO
INSTITUCIONAL
EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y
BIOQUÍMICAS

OBTENCIÓN DE GLICÓSIDOS ESTEROIDALES A
PARTIR DE RAÍCES DE *Solanum tridynamum*

TESIS

PRESENTADA POR

MARCO ANTONIO PALACIOS CORNEJO

EN OPCIÓN AL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
QUÍMICAS Y BIOQUÍMICAS**

MÉRIDA, YUCATÁN, MÉXICO

2019




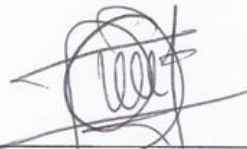
Mérida, Yuc., 17 de octubre de 2019
Oficio Num.: PICQB/193/2019

Asunto: Autorización de digitalización

La tesis "Obtención de glicósidos esteroidales a partir de raíces de *Solanum trydynamum*" presentada por Marco Antonio Palacios Cornejo, 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.

Directores de la tesis


M. en C. Wendy F. Brito Loeza


Dr. Gumersindo Mirón López

Sinodales

Dr. Gonzalo J. Mena Rejón


Dr. Leovigildo Quijano

Dr. Sergio Peraza Sánchez


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

A mis padres, por el apoyo brindado durante toda mi formación, gracias a quienes he podido llegar hasta este punto en mi desarrollo como profesional.

A mis amigos por el apoyo moral brindado en momentos difíciles y por todos los buenos momentos compartidos.

Al Dr. Gumersindo Mirón López y a la M. en C. Wendy Fanny Brito Loeza, por permitirme trabajar con ellos en este proyecto, así como por el tiempo y esfuerzo dedicado a este trabajo.

Al H. Síndico del Comité Revisor, Dr. Gonzalo J. Mena Rejón, Dr. Leovigildo Quijano y Dr. Sergio Rubén Peraza Sánchez, por el tiempo dedicado a la revisión y supervisión tanto del proyecto de investigación como del presente documento. Agradezco también sus observaciones y comentarios para la mejora de este trabajo.

Al M. en C. Manlio Joaquín Graniel Sabido por los consejos brindados durante la realización del proyecto, así como por la capacitación y asistencia para la operación de los equipos HPLC y por la ejecución de los experimentos de espectrometría de masas.

Al Q.F.B. Carlos Alfonso Pech Cauich y a la Br. Mónica Arteaga por la ejecución y la capacitación para realizar los experimentos de Resonancia Magnética Nuclear.

Al grupo de profesores y de estudiantes, tanto de Maestría como de Licenciatura, del laboratorio de Química Farmacéutica de la Facultad de Química de la UADY, por las observaciones y consejos brindados para la mejora de este proyecto de investigación.

Al Laboratorio de Cromatografía de la Facultad de Química de la UADY por permitir la realización de los métodos de cromatografía HPLC con sus instrumentos.

A las autoridades de la Facultad de Química de la UADY por permitir la realización de este proyecto de investigación en sus instalaciones.

Al Posgrado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme la oportunidad de desarrollarme como profesional por medio de la obtención de un posgrado, así como por gestionar el proceso para la obtención de la beca brindada durante este proyecto de investigación.

Este 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 la M. en C. Wendy Fanny Brito Loeza y formó parte del proyecto “Bioprospección de la diversidad química presente en especies de recursos naturales terrestres y marinos del estado de Yucatán” financiado con recursos propios de la Facultad de Química de la UADY con registro SISTPROY FQUI-2018-0004; además del apoyo de una beca concedida por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

RESUMEN

El presente proyecto de investigación tuvo como objetivo determinar la presencia de glicósidos esteroidales en las raíces de *Solanum tridynamum*, una planta escasamente estudiada y no explotada comercialmente. Las raíces de la planta fueron sometidas a maceración con metanol; el macerado metanólico fue sometido a extracción líquido - líquido con hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol; de este último extracto fueron aislados dos glicósidos esteroidales por medio de técnicas cromatográficas convencionales y por CLAE; los glicósidos fueron identificados por medio de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas como protodioscina y dioscina, con lo que se concluye que el metabolismo secundario de *Solanum tridynamum* se encuentra dirigido hacia la biosíntesis de glicósidos esteroidales.

ABSTRACT

The present work aimed to determine the presence of steroidal glycosides in roots of *Solanum tridynamum* Dunal, a Solanaceae species from Yucatan, state of Mexico. The grounded dry roots were macerated with methanol. The methanolic extract was partitioned with hexane, dichloromethane, ethyl acetate, and butanol. From the butanolic partition, two steroidal glycosides were isolated using conventional chromatographic methods as well as HPLC. The analysis of NMR and MS spectra of each isolated compound allowed to identify them as protodioscin and dioscin. It was concluded that the secondary metabolism of *Solanum tridynamum* Dunal is directed towards the biosynthesis of steroid glycosides.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	3
Glicósidos esteroidales: estructura, aplicaciones y caracterización estructural	3
Estudios fitoquímicos en el género <i>Solanum</i> y el subgénero <i>Leptostemonum</i>	9
<i>Solanum tridynamum</i> Dunal: características generales y estudios previos	18
HIPÓTESIS	21
JUSTIFICACIÓN	23
OBJETIVO GENERAL	25
Objetivos específicos	25
MATERIALES Y MÉTODOS	27
Obtención de los extractos	28
Aislamiento de los glicósidos esteroidales	28
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	31
Compuesto 1	31
Compuesto 2	46
CONCLUSIONES	55
REFERENCIAS	57

INTRODUCCIÓN

Los glicósidos esteroidales son compuestos obtenidos de fuentes naturales diversas. Pertenecen al grupo de las saponinas y están constituidos por un esqueleto esteroidal con una cadena lateral de tipo furostano o espirostando y con uniones glicosídicas como monóxidos, dióxidos, trióxidos, tetróxidos, etc. Estos compuestos han sido de interés por su amplia distribución tanto en plantas como animales marinos y la gran variedad de actividades biológicas que se les atribuyen; la literatura describe que los compuestos de este tipo poseen actividad hemolítica, citotóxica, antiprotozoaria, antifúngica, entre otras.¹ Entre las familias que se han reportado que contienen este tipo de compuestos se encuentran las solanáceas, una familia extensa de árboles y arbustos distribuidos en hábitats diversos, de la cual el género *Solanum* es el más numeroso con más del 50% de las especies en la familia. El género, incluye especies económicamente importantes como el tomate (*S. lycopersicum*), la papa (*S. tuberosum*) y la berenjena (*S. melongena*). Entre las especies estudiadas se encuentran *S. nigrum*, *S. aethiopicum* y *S. melongena* que contienen compuestos de tipo esteroidal, tanto glicosilados como no glicosilados, generalmente de tipo espirostando, por lo que el género *Solanum* ha sido determinado como una fuente potencial de compuestos de este tipo.²⁻⁴

Solanum tridynamum Dunal es una especie silvestre que no es cultivada ni explotada comercialmente, a pesar de haber sido reportada ampliamente en la medicina tradicional para tratar diferentes condiciones como la inflamación del oído o la diabetes. Así mismo, existen pocos estudios fitoquímicos acerca del contenido de metabolitos secundarios de esta especie y en aquellos que se han realizado se ha reportado el aislamiento de compuestos de tipo esteroidal.⁵⁻⁶ El presente trabajo de investigación pretende contribuir al conocimiento sobre el metabolismo secundario de *S. tridynamum* a través de un estudio fitoquímico con particular interés en los glicósidos esteroidales.

ANTECEDENTES

Glicósidos esteroidales: estructura, aplicaciones y caracterización estructural

Los glicósidos esteroidales son metabolitos secundarios pertenecientes al grupo de las saponinas, los cuales se caracterizan por presentar estructuras de tipo espirostanos (seis anillos) o furostanos (cinco anillos) con una o más uniones glicosídicas con monosacáridos y/o polisacáridos. (**Figura 1**). La hidrólisis en medio ácido de un glicósido esteroide o saponina produce la denominada sapogenina, aglicona o genina, además de los residuos de los monosacáridos libres. Las saponinas deben su nombre a la característica que tienen de generar espuma en solución acuosa.¹ Estos compuestos presentan una gran diversidad estructural, motivo por el cual han sido ampliamente estudiados, así como por su actividad biológica.

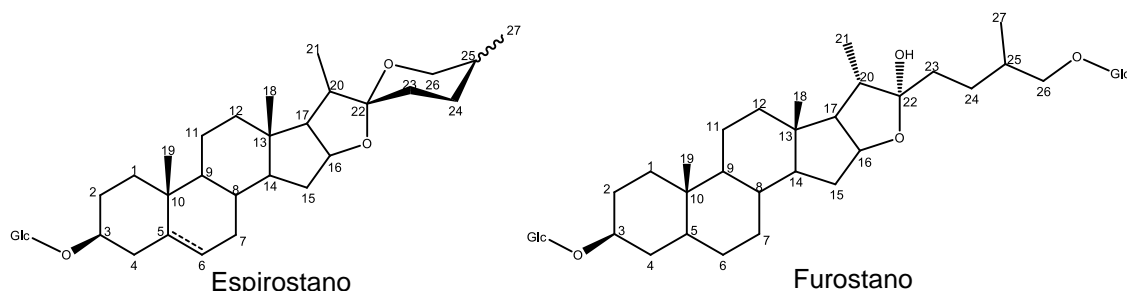


Figura 1. Tipos de esqueleto de agliconas en saponinas esteroidales.

Con respecto a las diferentes actividades biológicas que presentan los glicósidos esteroidales, por ejemplo, se ha evaluado la actividad citotóxica y antitumoral de la llamada “saponina de shi-mu” (**Figura 2 A**), que es una saponina aislada de *Anemarrhena asphodeloides*, encontrándose que redujo la producción de una proteína generada por células neoplásicas de hígado.⁷ Por otra parte, los glicósidos del (25*R*)-espirost-5-en-3β-ol (**Figura 2 B**) aislados de *Lilium longiflorum* y (25*R*)-27-*O*-[(*S*)-3-hidroxi-3-metilglutaril]-espirost-5-en-3β,27-diol-3-*O*-{*O*-α-*L*-ramnopiranosil-(1→2)-*O*-[β-*D*-glucopiranosil-(1→4)]-β-*D*-glucopiranosido (**Figura 2 C**), aislado de un híbrido *Lilium nobilissimum* × *L. speciosum* presentaron actividad anticancerosa en un estudio *in vitro*.^{8,9}

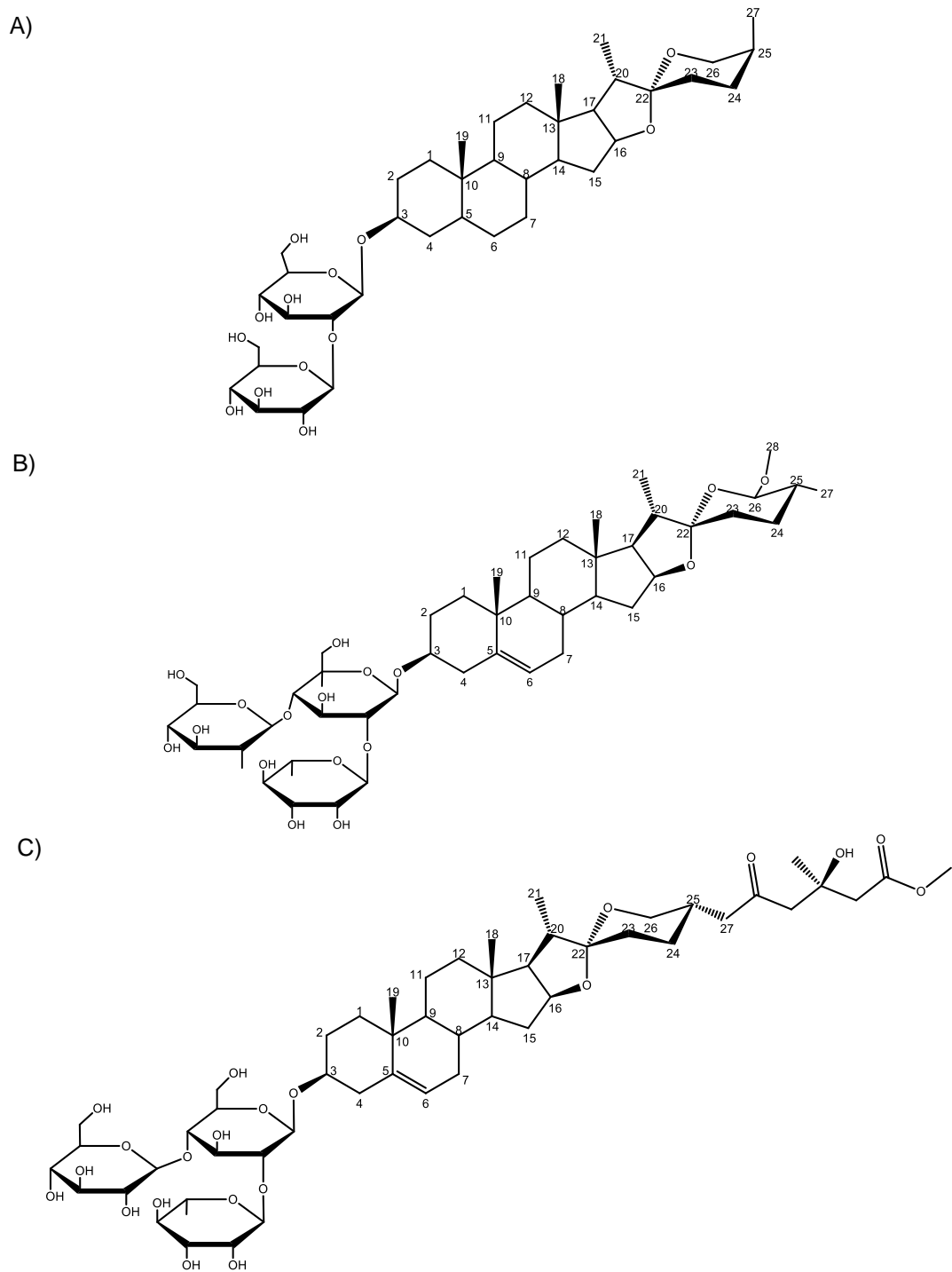


Figura 2. Saponinas aisladas de *Anemarrhena asphodeloides*, *Lilium longiflorum* y *Lilium nobilissimum* × *L. speciosum*.

De los rizomas de *Dioscorea collettii* se aisló la protoneodioscina (**Figura 3 A**), una saponina de tipo furostano, la cual mostró actividad contra líneas celulares de

leucemia, cáncer de colon, cáncer de sistema nervioso central, melanoma, cáncer de riñón, cáncer de próstata y cáncer de mama.¹⁰ El filiasparósido C (**Figura 3 B**), una saponina tipo espirostano aislada de *Asparagus filicinus*, mostró actividad contra una línea de células de cáncer de mama, con una IC₅₀ comparable al control empleado; por otra parte, la degalactotigonina (**Figura 3 C**), una saponina tipo espirostano mostró mayor actividad que el control empleado contra cuatro líneas celulares de cáncer.¹¹ En otro estudio de los bulbos de *Allium macleanii* y *A. senescens* se reportó que derivados de las saponinas (25R)-5 α -espirostan-2 α ,3 β ,5 α ,6 β -tetrol y (25R)-5 α -espirostan-2 α ,3 β ,6 β -triol mostraron actividad contra células HeLa por inhibición del metabolismo de fosfolípidos.¹² En otros estudios sobre la actividad antifúngica de estos compuestos, dos saponinas de la diosgenina (**Figura 4 A**) y penogenina (**Figura 4 B**) aisladas de *Trillium grandiflorum* mostraron actividad contra *Candida albicans* en un ensayo de difusión en agar, así como actividad *in vitro* contra especies de *Cryptococcus*, *Saccharomyces*, *Aspergillus* y *Trichophyton*;¹³ un triósido de tipo espirostano aislado de *Asparagus officinalis* mostró actividad contra especies de *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichophyton*, *Microsporium* y *Epidermophyton*;¹⁴ por último, un triósido de tipo furostano aislado de *Nicotiana tabacum* mostró actividad contra *Cladosporium cucumerinum* en placas de agar.¹⁵

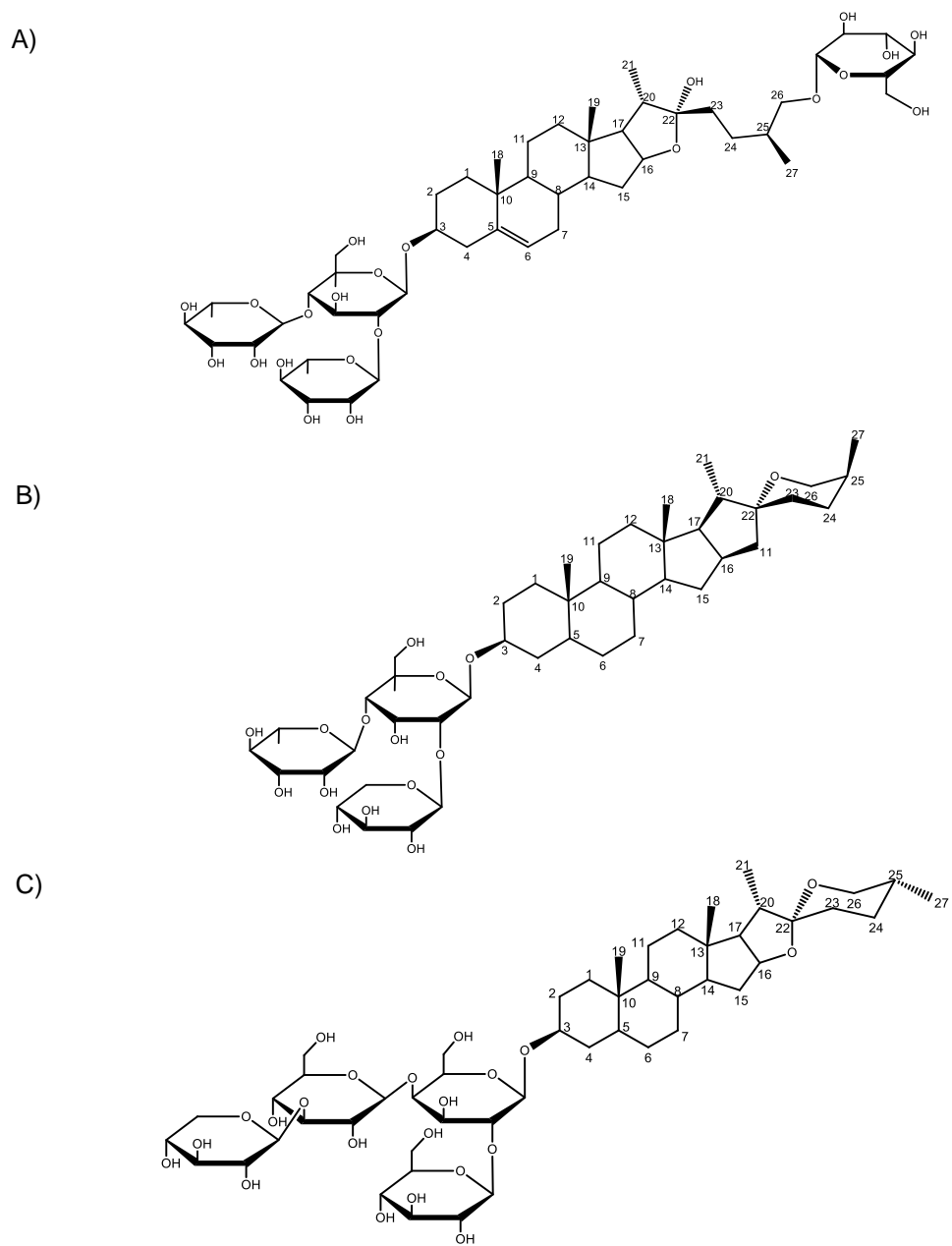


Figura 3. Saponinas aisladas de *Dioscorea collettii* y *Asparagus filicinus*.

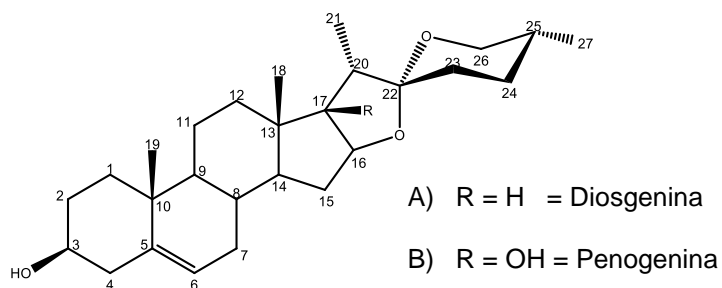


Figura 4. Agliconas de las saponinas aisladas de *Trillium grandiflorum*.

En otros estudios también se ha evaluado la actividad antiinflamatoria de estos compuestos. Por ejemplo, el dracósido (**Figura 5**), una saponina esteroidea de tipo espirostano, fue aislado de las raíces de *Helleborus purpurascens* y se le atribuyó la actividad antirreumática de las raíces de esta planta.¹⁶

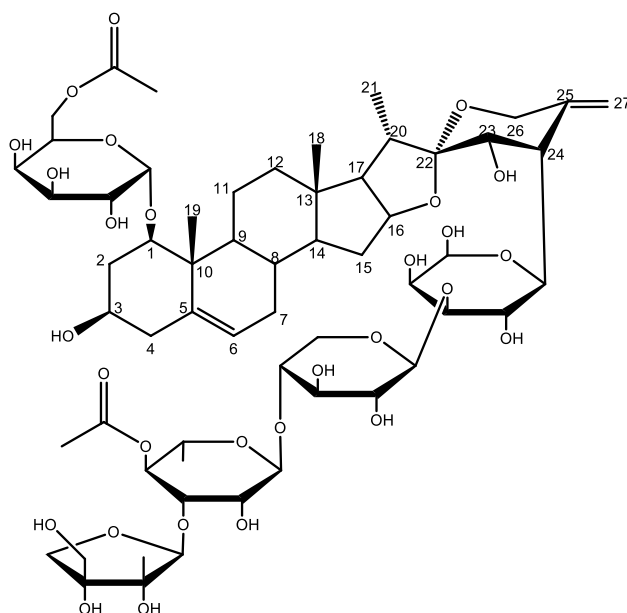


Figura 5. Glicósido esteroidea aislado de *Helleborus pumurascens*.

Además de las actividades biológicas reportadas para los glicósidos esteroidales, estos suelen ser empleados como fuente de compuestos de naturaleza esteroidea en la industria farmacéutica para la producción de medicamentos con este tipo de estructuras, por ejemplo en la fabricación de anticonceptivos hormonales o antiinflamatorios esteroides como los corticosteroides, esto debido a que la cadena de azúcares localizada generalmente en la posición tres del esqueleto esteroidea puede ser hidrolizada para obtener la sapogenina; en el caso de las saponinas esteroidales se obtiene el compuesto furostano o espirostano. En algunas especies vegetales se acumulan más saponinas esteroidales que las agliconas de las mismas, y la obtención de las agliconas por hidrólisis de las saponinas se vuelve una opción viable para la

obtención a escala industrial de esqueletos esteroidales para su modificación estructural. Un ejemplo de este proceso es la diosgenina (**Figura 4**), una aglicona tipo espirostano que se encuentra como saponinas en diferentes especies del género *Dioscorea*; se estima que alrededor del 60% del total de fármacos esteroidales se derivan de este compuesto.¹⁷

En el reino Plantae, los glicósidos esteroidales se distribuyen en especies de familias como Agavaceae, Amaryllidaceae, Asparagaceae, Dioscoreaceae, Liliaceae, Smiliaceae, Solanaceae y Trilliaceae. Para la extracción de estos compuestos es común realizar extracciones por maceración o con equipos de extracción Soxhlet, aunque métodos más recientes de extracción para estos compuestos incluyen la extracción asistida por microondas o por ultrasonido. Respecto al disolvente de elección, disolventes como metanol, etanol o mezclas etanol-agua son empleados para la extracción, con la opción de someter el material vegetal a una extracción previa con hexano para remover sustancias lipofílicas. Para la obtención de los glicósidos el extracto crudo se resuspende en agua para ser sometido a extracción líquido-líquido con butanol, disolvente con el que se extraen la mayoría de los glicósidos. El proceso de purificación se puede llevar a cabo por medio de cromatografía en columna, empleando fase estacionaria reversa para la primera separación y fase estacionaria normal para la purificación posterior, empleando cromatografía en capa delgada para la comparación y reunión de fracciones similares; sin embargo, en ocasiones es necesario emplear métodos de alta resolución como cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) para lograr una mejor purificación de estos compuestos, en columnas con fase estacionaria reversa (ej. C-18) y sistemas de metanol-agua como fase móvil.¹⁸

La caracterización de glicósidos esteroidales puede presentar algunas complicaciones, debido a la complejidad y a la diversidad de estructuras en este grupo. Herramientas como la espectroscopía por resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM) son particularmente útiles para la caracterización de saponinas. La caracterización se suele dividir en dos partes: la caracterización de la sapogenina y la caracterización del oligosacárido. Para la caracterización de la sapogenina, los experimentos de RMN-¹H y RMN-¹³C mono- (1D) y bidimensionales (2D) son particularmente útiles en la identificación del esqueleto base y posteriormente apoyada en la comparación de los datos obtenidos con los reportados previamente en la literatura; si se observan desplazamientos de las señales con respecto a lo reportado por la influencia de sustituyentes, los experimentos en 2D como HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) que indica las conectividades protón-carbono a un enlace y HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) las conectividades protón-carbono a dos o tres enlaces, proporcionan información adicional sobre la localización de dichos grupos.¹⁹

Por otra parte, la caracterización de la cadena de azúcares suele ser más complicada: con los experimentos en 1-D como RMN-¹H se puede determinar el número de uniones glicosídicas a partir del número de las señales de los protones anoméricos; sin embargo, las señales de estos suelen tener desplazamientos químicos muy similares por lo que, la asignación de cada uno de los monosacáridos en un diósido puede dificultarse y más aún en trióxidos o tetrósidos. En estos casos los experimentos de RMN 2D: COSY, HSQC, TOCSY y HMBC pueden ser muy útiles en la asignación de las señales de los protones y carbonos de cada azúcar. El experimento TOCSY (TOtal Correlation SpectroscopY) es útil en la asignación de las señales de los protones pertenecientes a un mismo sistema de espines (cada monosacárido consiste en un sistema de espines), mientras que el experimento HSQC determina la correlación entre las señales de protón observadas con las señales de carbono; este último experimento puede acoplarse con el TOCSY (HSQC-TOCSY) para evitar las complicaciones por superposición de las señales en el experimento TOCSY individual. Con estos experimentos se determina no sólo la secuencia, sino los sitios de ramificación de la cadena de azúcares. Por último, el experimento NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) es empleado para determinar las interacciones espaciales de los protones de la molécula. La información arrojada por todos estos experimentos permite proponer una posible estructura de la saponina.¹⁹

Por último, la espectrometría de masas, empleando preferentemente ionización por electronebulización (ESI, por sus siglas en inglés) permite corroborar la estructura propuesta por medio de la detección de los iones moleculares observados en el espectro; si se emplea espectrometría de masas en tándem (MS/MS) los patrones de fragmentación observados permiten reconocer el esqueleto base por comparación con los fragmentos reportados para cada uno de los esqueletos esteroidales; por otra parte, la detección de los iones correspondientes a la pérdida de una o más unidades de la cadena de azúcares permiten confirmar la identidad y conectividad de los residuos de monosacáridos de la molécula.¹⁹

Estudios fitoquímicos en el género *Solanum* y el subgénero *Leptostemonum*

La familia Solanaceae es una familia de plantas compuesta por aproximadamente 90 géneros que agrupan más de 3000 especies; a diferencia de otras familias, los miembros de esta familia son de hábito, hábitat y distribución variada. A esta familia pertenecen varias especies empleadas por el ser humano como fuente de alimento, de sustancias biológicamente activas y como plantas ornamentales. El género *Solanum* comprende más de la mitad de las especies de la familia, además de que a este género pertenecen especies económicamente importantes, como el tomate (*S. lycopersicum*), la berenjena (*S. melongena*) y la papa (*S. tuberosum*).²⁰

Existen varios antecedentes sobre estudios químicos de especies de este género. En este aspecto, en un estudio de *S. nigrum* y *S. xanthocarpum*, se reportó la presencia de glicósidos de la diosgenina (**Figura 4**), sarsasapogenina y tigogenina como

agliconas (**Figura 6**), que fueron aisladas a partir del extracto metanólico de las partes aéreas de ambas especies, por medio de cromatografía en columna de sílica gel 60 y HPLC utilizando una columna de C₁₈.³

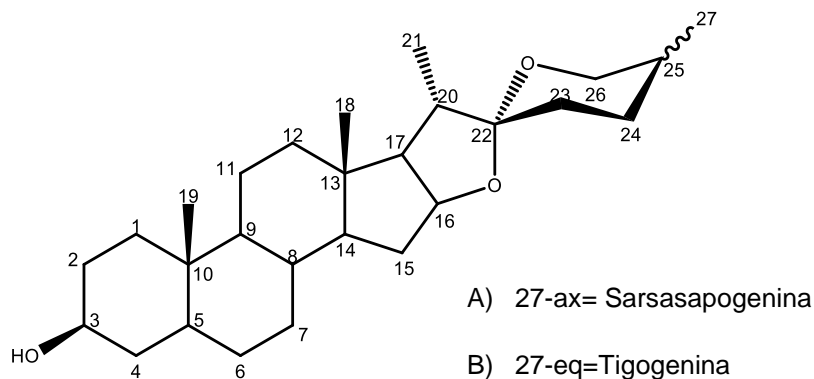


Figura 6. Agliconas de glicósidos esteroidales aislados a partir de *S. nigrum* y *S. xanthocarpum*.

Del extracto diclorometánico de las hojas de *S. arboreum* se aisló diosgenona (**Figura 7**), la cual también fue aislada de los extractos hexánico, diclorometánico y de acetato de etilo de las hojas de *S. ovalifolium*.²¹

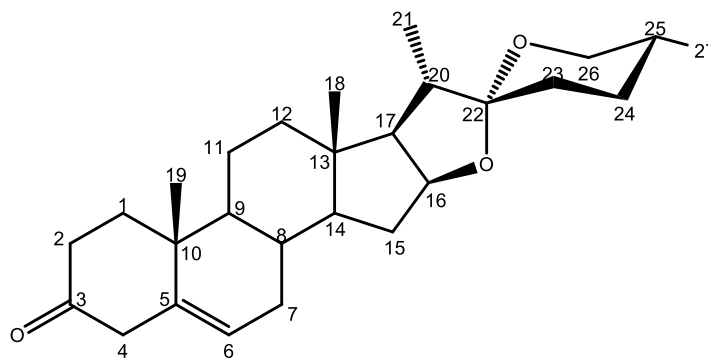


Figura 7. Compuesto esteroidal aislado de *Solanum arboreum*.

En otro estudio se reportó el aislamiento de tres alcaloides esteroidales, caavuranamida, 4-tomatiden-3-ona y 5 α -tomatidan-3-ona (**Figura 8**), a partir del extracto etanólico de frutos maduros de *S. caavurana*, los cuales fueron caracterizados por RMN-¹H, RMN-¹³C, y por espectrometría de masas de alta resolución empleando ionización por electronebulización.²²

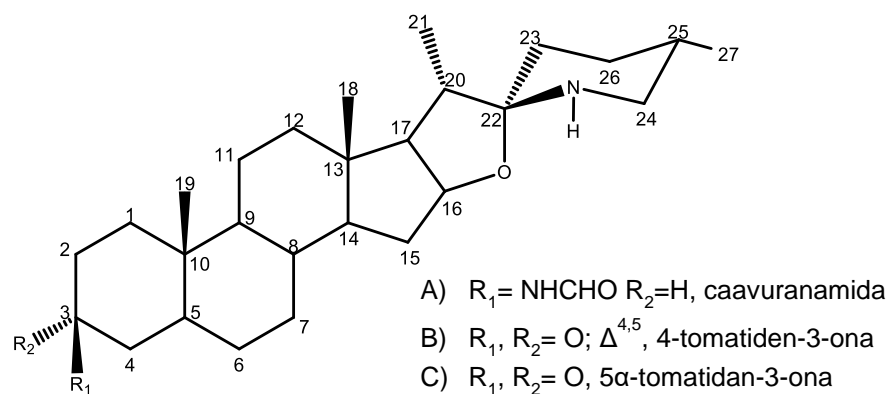


Figura 8. Alcaloides esteroidales aislados a partir de *S. caavurana*.

Del extracto etanólico de hojas de *S. campaniforme* se aislaron ocho alcaloides con esqueleto de tipo solanidano (**Figura 9**);²³ así mismo, once compuestos, incluyendo diosgenina (**Figura 4**), tigogenina (**Figura 6**) y β -sitosterol (**Figura 10**) fueron aislados de la fracción de CHCl_3 de la partición del extracto etanólico de las raíces, frutos y partes aéreas de *S. lyratum* por medio de cromatografía en columna empleando C_{18} y Sephadex LH-20 como fases estacionarias, así como cromatografía en capa delgada preparativa para la purificación.²⁴

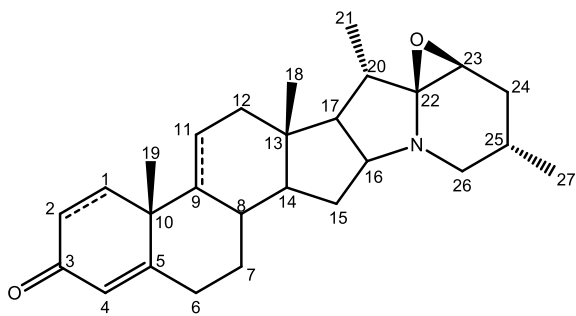


Figura 9. Esqueleto base de los alcaloides esteroidales aislados de *S. campaniforme*.

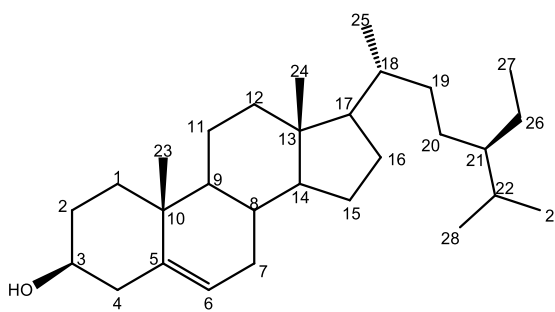


Figura 10. Esteroide (β -sitosterol) aislado a partir de *S. lyratum*.

Un estudio determinó la presencia de los glicoalcaloides α -chaconina y α -solanina (**Figura 11**) en los frutos de *S. tuberosum*, mientras que en las partes aéreas de la planta encontraron ambos glicoalcaloides y los glicósidos esteroidales aculeatísidos A y B; finalmente, de los tubérculos de la planta se reportó el aislamiento de los mismos glicoalcaloides y el glicósido esteroideal protodioscina.²⁵

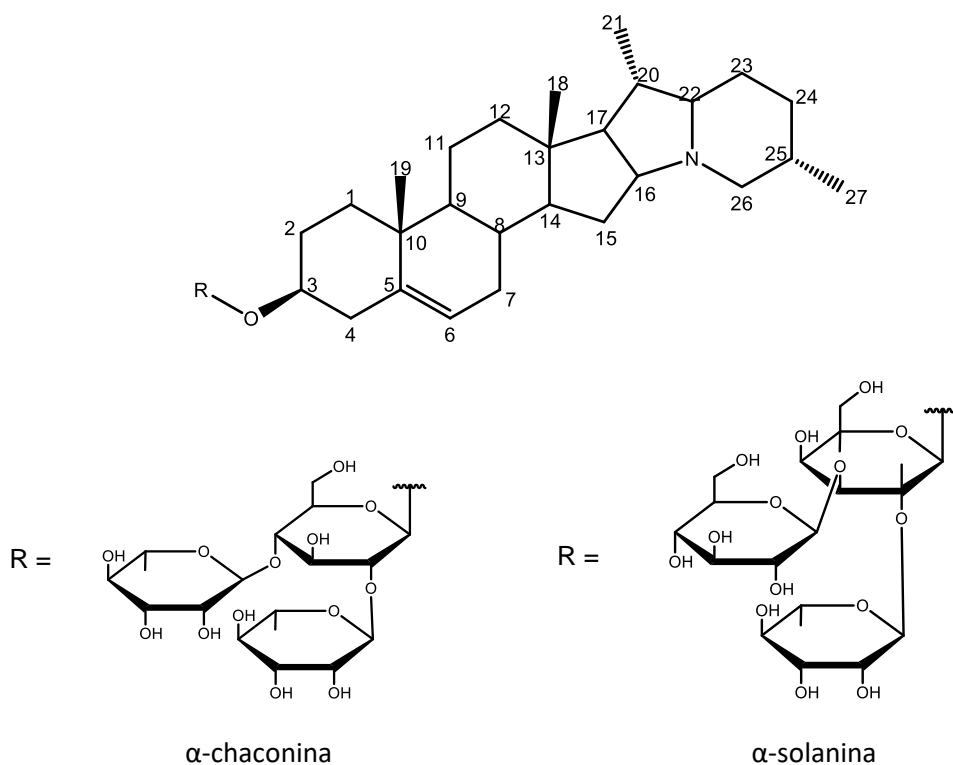


Figura 11. Glicoalcaloides esteroidales de *S. tuberosum*.

Del extracto metanólico de los frutos de *S. lycopersicum* fueron aislados, entre otros compuestos, los glicoalcaloides esteroidales licoperósidos F (**Figura 12 A**), G (**Figura 12 B**) y H (**Figura 12 C**)²⁶. Una sapogenina esteroidal de tipo espirostanos denominada chamagenina (**Figura 13**) fue aislada de hojas y tallos de *S. chamaeacanthum*²⁷, mientras que en un estudio realizado sobre *S. glabratum* fueron aislados tres glicósidos esteroidales a partir de la partición con butanol del extracto metanólico de partes aéreas.²⁸

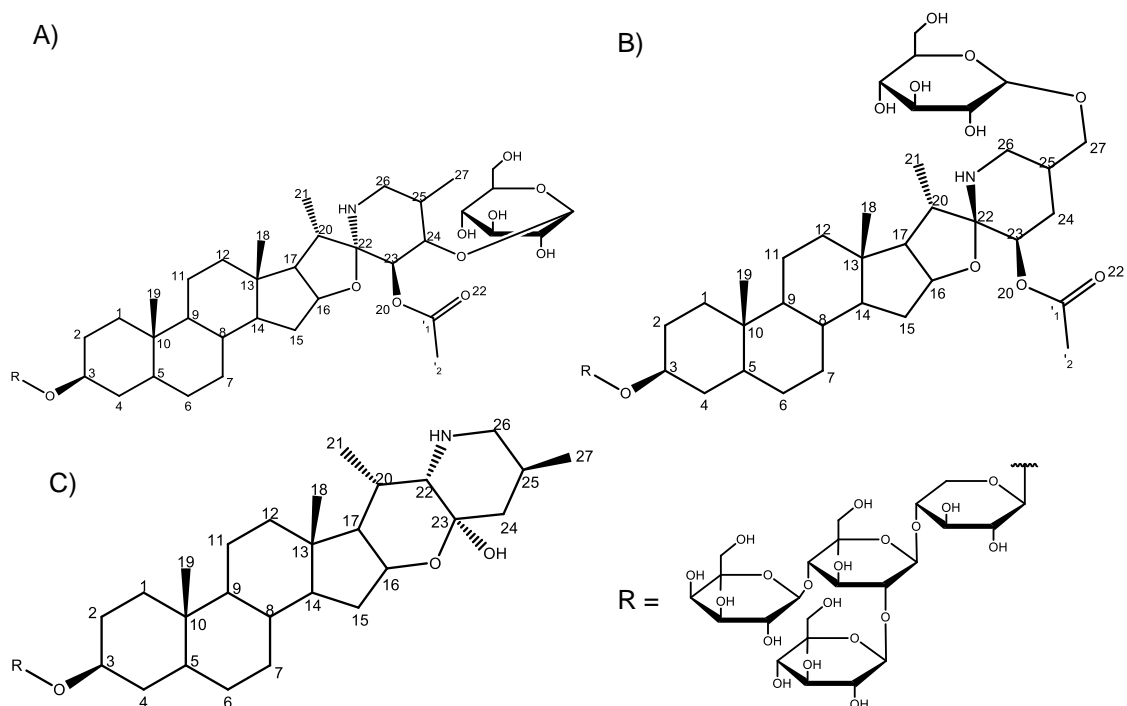


Figura 12. Glicoalcaloides esteroidales aislados de *S. lycopersicum*.

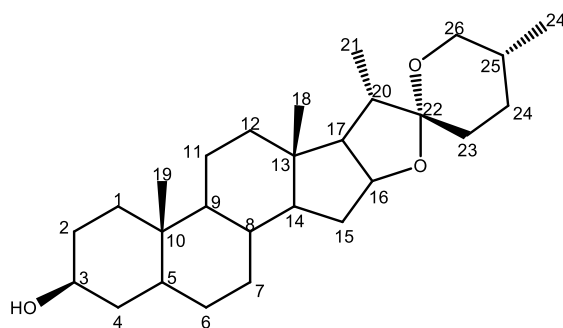


Figura 13. Compuesto esteroidal aislado de *S. chamaecanthum*.

Del extracto metanólico de los frutos de *S. intrusum* fueron aislados los glicósidos protodioscina y pseudoprotodioscina (**Figura 14**);²⁹ en el extracto etanólico de partes aéreas de *S. laxum* fueron identificados dos glicósidos esteroidales denominados laxuminas A y B (**Figura 15**).³⁰

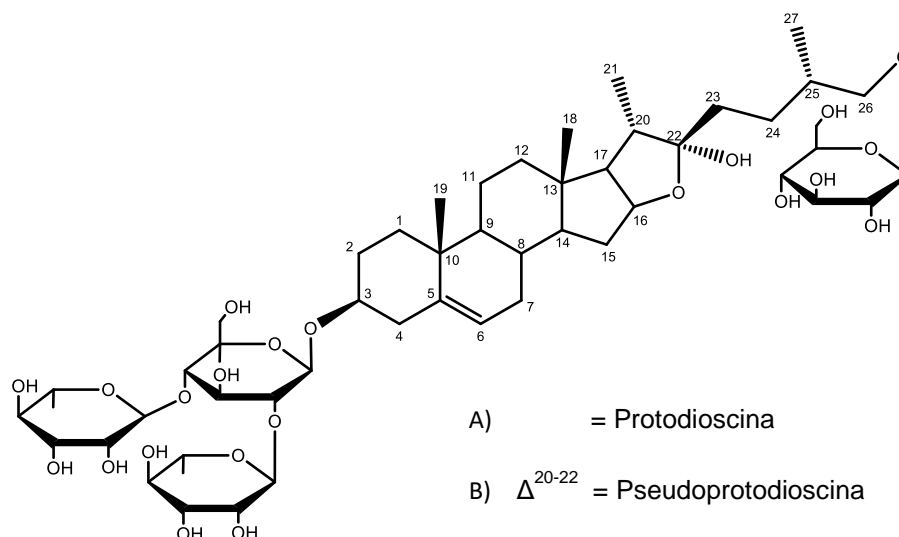


Figura 14. Glicósidos esteroidales aislados de *S. intrusum*.

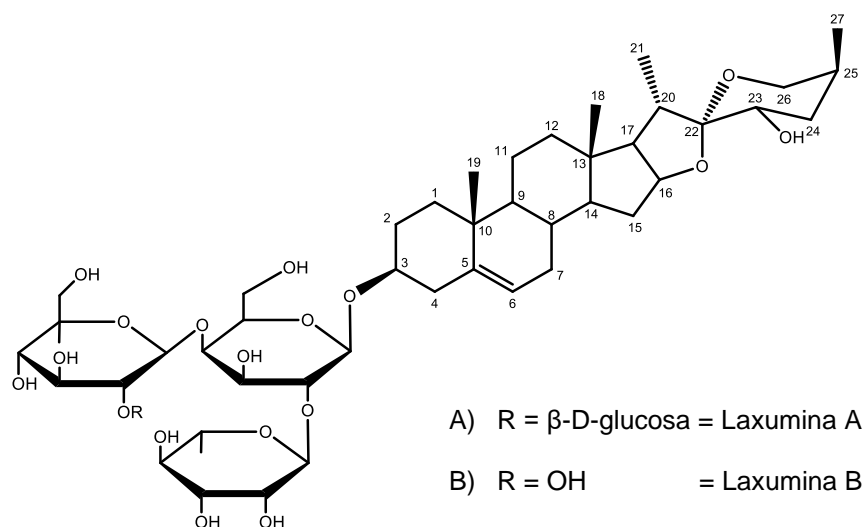


Figura 15. Glicósidos esteroidales aislados de *S. laxum*.

En un estudio preliminar del contenido químico de frutos y hojas de *S. mauritanum* se determinaron como componentes principales alcaloides y polifenoles;³¹ por otro lado, en la fase acuosa de la extracción líquido-líquido del extracto metanólico de *S. procumbens* fueron identificados tres glicósidos esteroidales, incluyendo los torvósidos J y K (**Figura 16**).³² Así mismo, del extracto hidroalcohólico de partes aéreas de *S. surratense* fueron identificados varias saponinas esteroidales y un glicoalcaloide esteroideal;³³ mientras que en un estudio realizado a *S. unguiculatum* se aislaron siete saponinas esteroidales a partir de la fracción butanólica obtenida después de efectuar una extracción líquido-líquido al extracto metanólico de los frutos.³⁴

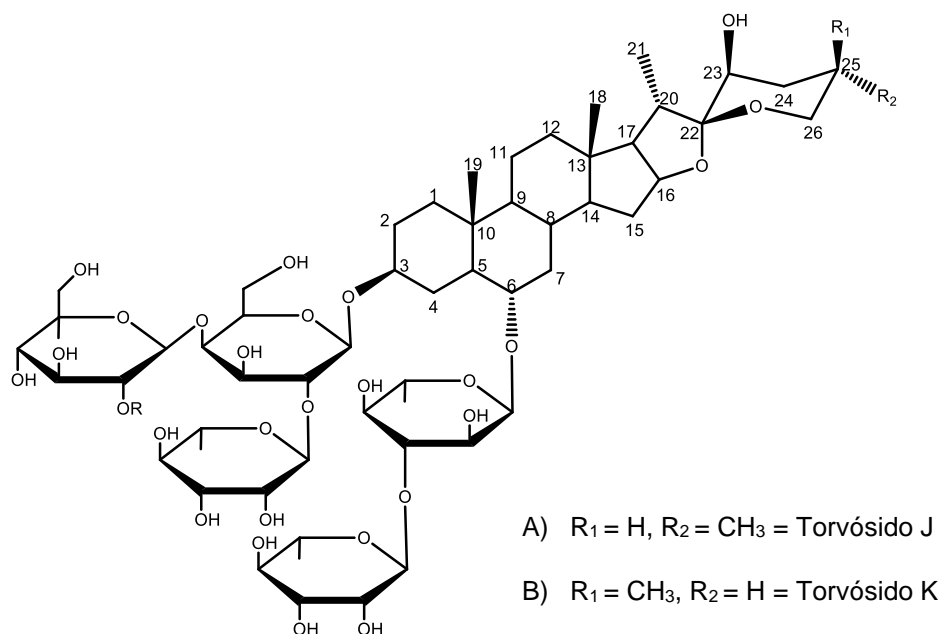


Figura 16. Glicósidos esteroidales obtenidos de *S. procumbens*.

Dentro del género *Solanum*, el subgénero *Leptostemonum* es el más extenso, contando con 350-450 especies,³⁵ por lo que varios de los estudios fitoquímicos realizados dentro del género *Solanum* recaen sobre especies pertenecientes a este subgénero. Como ejemplo, en un estudio del extracto *n*-butanólico de los pedúnculos florales de *Solanum aethiopicum* fue posible identificar y aislar quercetina por medio de HPLC empleando una columna de C_{18} .⁴ También se ha reportado la presencia de tres saponinas esteroidales, los melongósidos N, O y P (**Figura 17**), que fueron aisladas del extracto metanólico de las semillas de *S. melongena*;² mientras que de la fracción de acetato de etilo del proceso de partición del extracto etanólico de las raíces de esta misma planta se han aislado dieciséis compuestos de tipo amida fenilpropanoide.³⁶

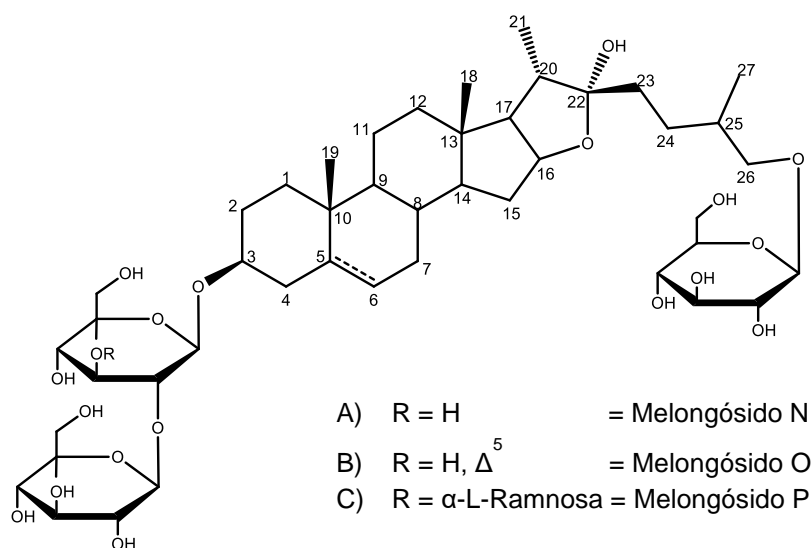


Figura 17. Glicósidos esteroidales obtenidos de *S. melongena*.

De los frutos de *S. crinitum* se aislaron cuatro flavonoides, ácido 4-hidroxibenzoico, cuatro derivados del ácido cumárico y los alcaloides glicosídicos esteroidales solamargina y 20-*epi*-solamargina (**Figura 18**) por medio de cromatografía en columna empleando fases estacionarias como gel de sílice, Sephadex LH-20 y C₁₈, así como HPLC, mientras que la caracterización se llevó a cabo por experimentos unidimensionales y bidimensionales de RMN, así como espectrometría de masas de alta resolución empleando ionización por electronebulización.³⁷ Los ésteres de ácidos caféicos como ácido rosmarínico, ácido clorogénico y el propio ácido caféico fueron aislados en un estudio en el que se evaluó el potencial antioxidante de las hojas de *S. guaraniticum*.³⁸

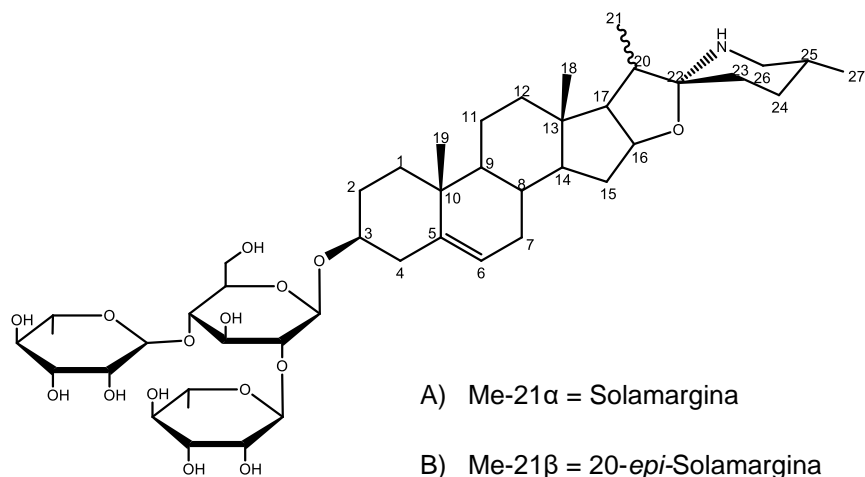


Figura 18. Glicoalcaloides esteroidales aislados de *S. crinitum*.

Un glicósido esteroide de tipo espirostan denominado solakhasósido (**Figura 19**) fue aislado a partir del extracto metanólico de frutos de *S. khasianum*,³⁹ por otra parte, en un estudio se confirmó la sinonimia de *S. incanum* y *S. heteracanthum* por medio del aislamiento de cuatro glicósidos esteroidales y un glicoalcaloide esteroide a partir del extracto hidroalcohólico de las raíces de ambas plantas.⁴⁰

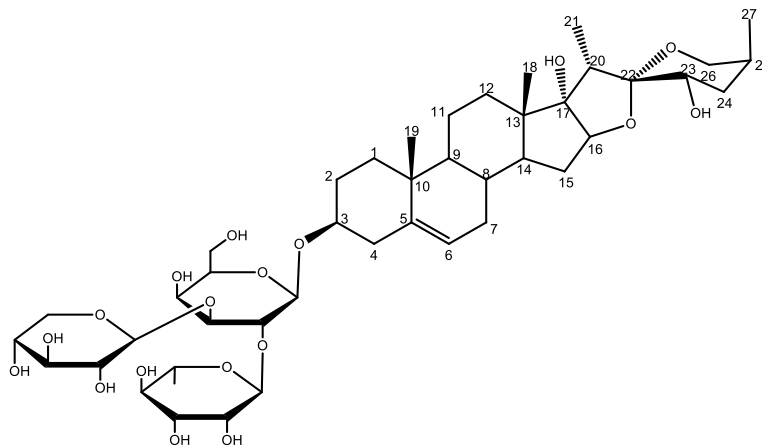


Figura 19. Glicósido esteroide aislado de *S. khasianum*.

Se reportó el aislamiento de los indiósidos A y B a partir del extracto metanólico de los frutos de *Solanum indicum*, así como los indiósidos C, D y E a partir del extracto metanólico de las raíces de esta planta.⁴¹ Por otro lado, en un estudio fitoquímico preliminar realizado sobre *S. macrocarpon* se determinó la presencia de alcaloides, taninos, saponinas, cumarinas y compuestos reductores en los frutos y hojas de esta planta.⁴² En otro estudio realizado para determinar la efectividad de los extractos de *S. paniculatum* contra úlceras se reportó el aislamiento de dos glicósidos esteroidales a partir del extracto etanólico de hojas y tallos de esta planta.⁴³ Por último, en un estudio de las raíces de *S. sisymbriifolium* se reportó el aislamiento de un triósido de isonutiagenina (**Figura 20**)⁴⁴; así mismo, del extracto metanólico de frutos de *Solanum torvum* se reportó el aislamiento de siete saponinas esteroidales.⁴⁵

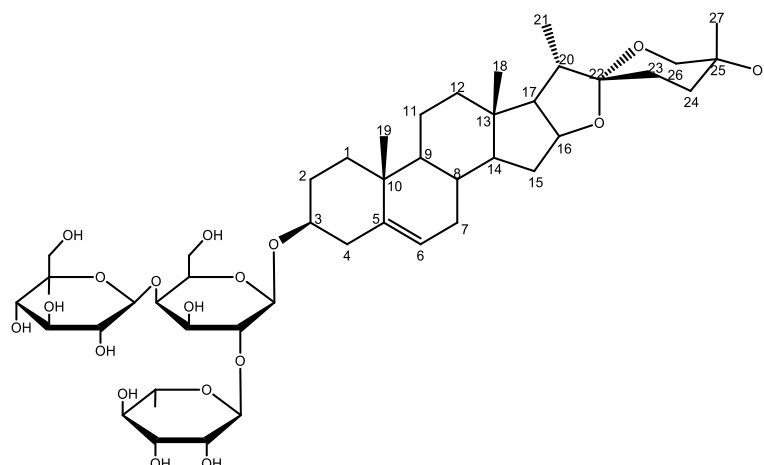


Figura 20. Glicósido esterooidal obtenido de *S. sisymbriifolium*.

***Solanum tridynamum* Dunal: características generales y estudios previos**

Reino: Plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Solanales

Familia: Solanaceae

Género: *Solanum*

Subgénero: *Leptostemonum*

Especie: *Solanum tridynamum* Dunal.⁴⁶⁻⁴⁸

Solanum tridynamum Dunal, mejor conocida como berenjena espinosa, necachane, diente de burro, sacramanteca, *kóon ya'ax iik*, *p'aak' kaan* o *puut balam*, por mencionar algunos nombres populares, es una planta perteneciente a la familia de las solanáceas, endémica de México. Es un arbusto (**Figura 21**) cuya altura oscila entre 0.2 y 2 m; las hojas de esta planta son ovadas, de 5-10 cm de largo y 2.5-5 cm de ancho; el tallo llega a medir hasta 4 cm de diámetro y se encuentra recubierto de pelos púrpura con algunas espinas de 5-10 mm de longitud; las inflorescencias son simples, extra-axilares, de 4 a 15 cm de largo, con hasta 65 flores (**Figura 22**); éstas son de color morado oscuro, algunas albinas, con cáliz de entre 8-12 mm y corolas de 5 × 3 cm y florecen durante todo el año, especialmente durante los meses de marzo hasta septiembre; los frutos son bayas globosas verdes o pardas de hasta 5 cm de diámetro, los cuales siguen creciendo dentro del cáliz de la flor; las semillas son negras o pardas de hasta 4 mm de diámetro. La especie se distribuye en los estados de Nayarit,

Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana Roo, Sinaloa, Tamaulipas, Veracruz y Yucatán (**Figura 23**), en selvas bajas caducifolias a alturas hasta los 1,050 m sobre el nivel del mar. No es una planta explotada comercialmente, pero se reporta que en la medicina tradicional sus 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.⁴⁶⁻⁵³



Figura 21. *Solanum tridynamum* Dunal. **Figura 22.** Flor de *S. tridynamum* Dunal.



Figura 23. Distribución geográfica de *S. tridynamum* Dunal.⁴⁶

En un estudio previo, los extractos metanólicos de varias especies vegetales que crecen en el estado de Yucatán, incluyendo a *S. tridynamum*, presentaron actividad acaricida contra garrapatas bovinas (*Rhipicephalus microplus*).⁵⁴ En estudios fitoquímicos previos realizados con las raíces de *S. tridynamum* se reportaron la presencia de cuatro saponinas esteroidales: diosgenina (**Figura 4**), yucagenina, clorogenina y neoclorogenina (**Figura 24**), obtenidas por hidrólisis del crudo de saponinas. De las hojas de esta especie se ha reportado el aislamiento del alcaloide esteroidal solasodina (**Figura 24**) y ácido vainílico (**Figura 25**), así como del acetato

de diosgenina,⁵ mientras que de los frutos se ha obtenido la diosgenina, una mezcla de ésta con otras sapogeninas esteroidales, así como trazas de la solasodina.⁶

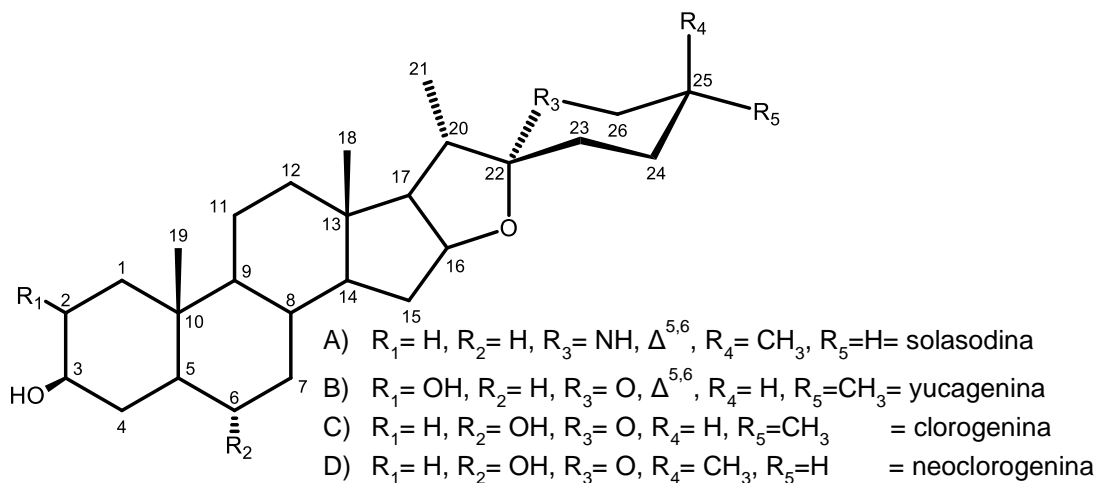


Figura 24. Compuestos esteroidales aislados a partir de *S. tridynamum*.

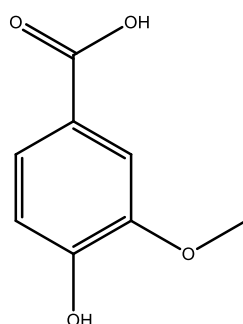


Figura 25. Compuesto no esteroideal (ácido vainílico) aislado de *S. tridynamum*.

HIPÓTESIS

Es posible el aislamiento de glicósidos esteroidales a partir de los extractos orgánicos de las raíces de *Solanum tridynamum* Dunal, como ocurre en otros miembros del género *Solanum*.

JUSTIFICACIÓN

Muchos glicósidos esteroidales han sido sometidos a estudios de actividad biológica y se han presentado como compuestos prometedores para el desarrollo de nuevos fármacos. Existen estudios que reportan su actividad citotóxica, antifúngica, antiinflamatoria, entre otras. La búsqueda de fuentes naturales potenciales de compuestos de este tipo ofrece una base para estudios posteriores en la búsqueda de alternativas más eficaces contra enfermedades tan importantes como el cáncer, la diabetes y las infestaciones por parásitos.

En estudios previos de otros miembros del género *Solanum* se observó la presencia de glicósidos esteroidales o de otros compuestos esteroidales, por lo que se asume que las especies pertenecientes a este género son ricas en compuestos de este tipo.

En la península de Yucatán se ha documentado la existencia de 24 especies del género *Solanum*, muchas de las cuales se encuentran reportadas como medicinales, entre las que destaca el empleo de *Solanum tridynamum* Dunal, principalmente para la curación de llagas y heridas, y para aliviar inflamación del oído.

El estudio de esta especie que crece de forma silvestre y que a diferencia de otros miembros de su género, no es cultivada sistemáticamente ni explotada a nivel comercial, pretende contribuir al conocimiento de los metabolitos que produce la especie ya que existen escasos estudios de la misma, y conocer su potencial como fuente de compuestos biológicamente activos, para lo cual se propone el estudio químico de los extractos orgánicos de esta especie, y el aislamiento de saponinas esteroidales y otros posibles componentes con potencial biológico, sea para realizar estudios de actividad biológica o como fuente de materia prima para la semisíntesis de compuestos con estructura esteroideal.

OBJETIVO GENERAL

Contribuir al conocimiento químico del género *Solanum*, mediante la obtención de compuestos de tipo glicósido esteroidal a partir de *Solanum tridynamum* Dunal.

Objetivos específicos

1. Aislar y purificar los glicósidos esteroidales de los extractos orgánicos de las raíces de *Solanum tridynamum* Dunal por medio de técnicas cromatográficas.
2. Caracterizar e identificar estructuralmente los glicósidos esteroidales obtenidos de *Solanum tridynamum* Dunal por resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas empleando ionización por electronebulización.
3. Determinar la estructura molecular de los compuestos nuevos aislados mediante RMN, haciendo uso de técnicas mono- (^1H , ^{13}C , DEPT 135°, DEPT 90°, TOCSY selectivo) y bidimensionales, homo- y heteronucleares (COSY, ROESY, TOCSY, HSQC, HMBC).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

El material vegetal (raíces de *Solanum tridynamum*) fue recolectado a la altura del km 9 de la carretera Dzemul-Xtampú, obteniéndose un total de 2.4 kg. Dicho material fue llevado a sequedad por medio de un desecador de herbario y posteriormente molido en un molino industrial con número de tamiz 10, obteniéndose un total de 1.7 kg.

Material de laboratorio

Los disolventes para la obtención de extractos, así como los procedimientos de cromatografía en columna y cromatografía en capa delgada fueron de grado industrial, destilados en el laboratorio previamente a su uso.

Para los procedimientos de cromatografía en columna (CC) se emplearon columnas de vidrio empacadas con gel de sílice para cromatografía en columna con un tamaño de partícula 70-230 μm marca Merck.

Los análisis por cromatografía en capa fina (CCD), así como las purificaciones por cromatografía en capa fina preparativa (CCDP), fueron realizados en cromatofolios de aluminio marca Merck de 20 x 20 cm con fase estacionaria de gel de sílice 60 con marcador de fluorescencia F₂₅₄ y grosor de fase estacionaria 175-225 μm , empleando como agentes reveladores luz ultravioleta a longitudes de onda de 254 nm y 365 nm, así como una mezcla de ácido acético glacial, agua y ácido sulfúrico en proporción 20:4:1 (óleum) y una disolución de ácido acético glacial-ácido sulfúrico-*p*-anisaldehído en proporción 100:2:1 como reveladores químicos con posterior calentamiento.

Para los procedimientos de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) se empleó metanol y acetonitrilo grado HPLC de la marca J. T. Baker.

Equipo de laboratorio

Los experimentos de resonancia magnética nuclear fueron realizados en un equipo marca Bruker modelo Ultrashield Avance 400 con una sonda BBO de 5 mm, empleando como disolvente piridina deuterada y como referencia la señal del disolvente residual (δ 8.74 para ¹H y δ 150.3 para ¹³C).

Las separaciones por HPLC fueron realizadas en un equipo marca Agilent modelo 1200 series con automuestreador, recolector automático de fracciones y detector de arreglo de diodos (DAD); se trabajó con longitudes de onda de 210 nm y 254 nm para la detección.

Obtención de los extractos

El material seco y molido fue sometido a extracción por maceración con metanol (10 L) a temperatura ambiente (25° C) por tres días, repitiéndose el proceso cinco veces; los extractos obtenidos fueron reunidos y llevados a sequedad a presión reducida; posteriormente el extracto metanólico de las raíces fue resuspendido en una mezcla de metanol-agua (1:3) (1 L) y sometido a extracción líquido-líquido consecutiva con hexano, diclorometano, acetato de etilo y butanol, empleando 1 L en cada extracción y realizando cinco extracciones por disolvente; todas las extracciones de cada disolvente fueron reunidas y llevadas a sequedad a presión reducida. De los extractos obtenidos, el butanólico fue sometido a una prueba preliminar de formación de espuma disolviendo una parte del extracto en agua y agitando vigorosamente para observar la formación de una espuma estable por más de 10 minutos.

Aislamiento de los glicósidos esteroidales

Una vez obtenidos los extractos orgánicos por medio de extracción líquido-líquido, 30 g del extracto butanólico fueron sometidos a cromatografía en columna empleando gel de sílice 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria y como fase móvil mezclas de cloroformo-metanol (90:10, 80:20, 70:30, 1:1, 30:70). Se recolectaron 120 eluatos, los cuales fueron reunidos en 17 fracciones etiquetadas como Bu-A a Bu-P, de acuerdo con su similitud en cromatografía en capa delgada. Estas fracciones fueron sometidas a pruebas preliminares de detección de saponinas por medio de formación de espuma.

Se decidió trabajar con la fracción denominada Bu-L (10 g) al dar resultados positivos a las pruebas cualitativas para la determinación de saponinas. Esta fracción fue sometida a cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para la separación de sus componentes, debido a que en los procesos de cromatografía por medios convencionales no fueron satisfactorios para la resolución de los componentes de la mezcla. Para ello se empleó una columna semipreparativa de fase reversa de la marca Agilent, modelo Zorbax Stablebond-C18, de 9.4 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud y tamaño de partícula de 5 µm. Se realizaron pruebas para la determinación de las condiciones óptimas en cual al volumen de inyección, flujo y fase móvil para la mejor separación de los componentes.

Se optó por trabajar con un flujo de 3 mL/minuto empleando una mezcla de acetonitrilo-metanol-agua 1:1:1 y recolectar la fracción con tiempo de retención (t_R) de 4.4 minutos, tal como se señala en la **Figura 26**; la fracción fue llevada a sequedad a presión reducida y etiquetada **Compuesto 1**, obteniéndose 60 mg.

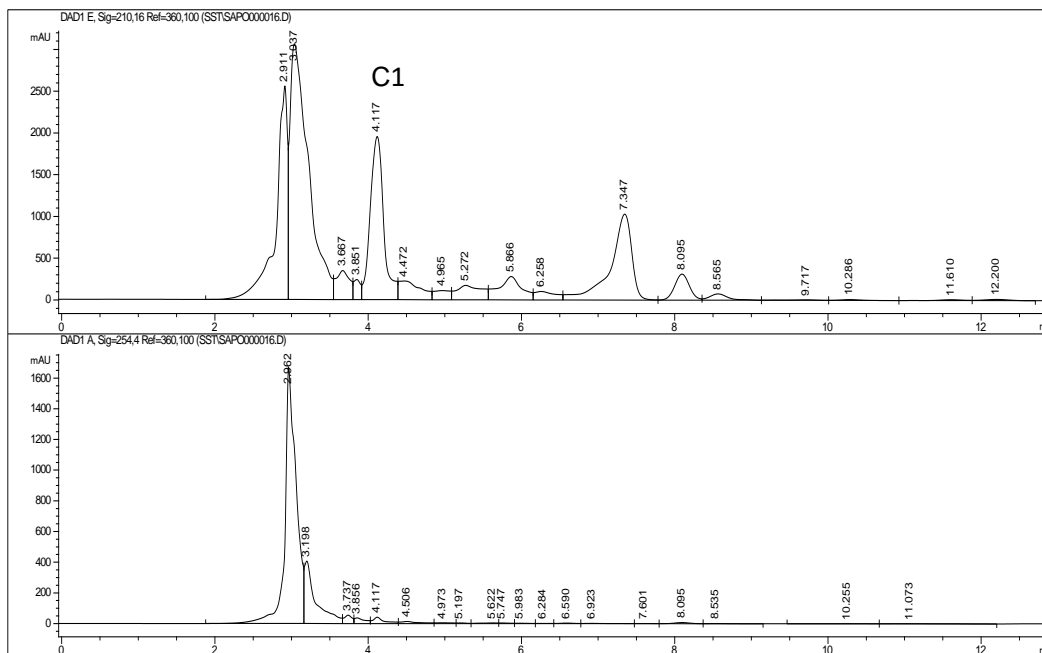


Figura 26. Cromatograma de la fracción Bu-L; fase móvil acetonitrilo-metanol-agua 1:1:1 con flujo de 3 mL/min.

Se realizó una segunda columna con 10 g del extracto butanólico empleando gel de sílice 60 (70-230 mesh) como fase estacionaria, y mezclas de acetato de etilo-metanol (90:10, 80:20, 70:30, 60:40, 50:50) en vez de cloroformo-metanol como fase móvil. Se recolectaron un total de 96 fracciones las cuales fueron comparadas por CCD y reunidas de acuerdo con su similitud en 10 fracciones etiquetadas como Bu2-A hasta Bu2-J. La fracción etiquetada como Bu2-B se obtuvieron cristalizó espontáneamente en forma de agujas que fueron filtradas, lavadas, pesadas y etiquetadas como **Compuesto 2**, del cual se obtuvieron 20 mg.

Los compuestos 1 y 2 fueron sometidos a experimentos de RMN y espectrometría de masas para su caracterización. La metodología de este trabajo se encuentra resumida en la **Figura 27**.

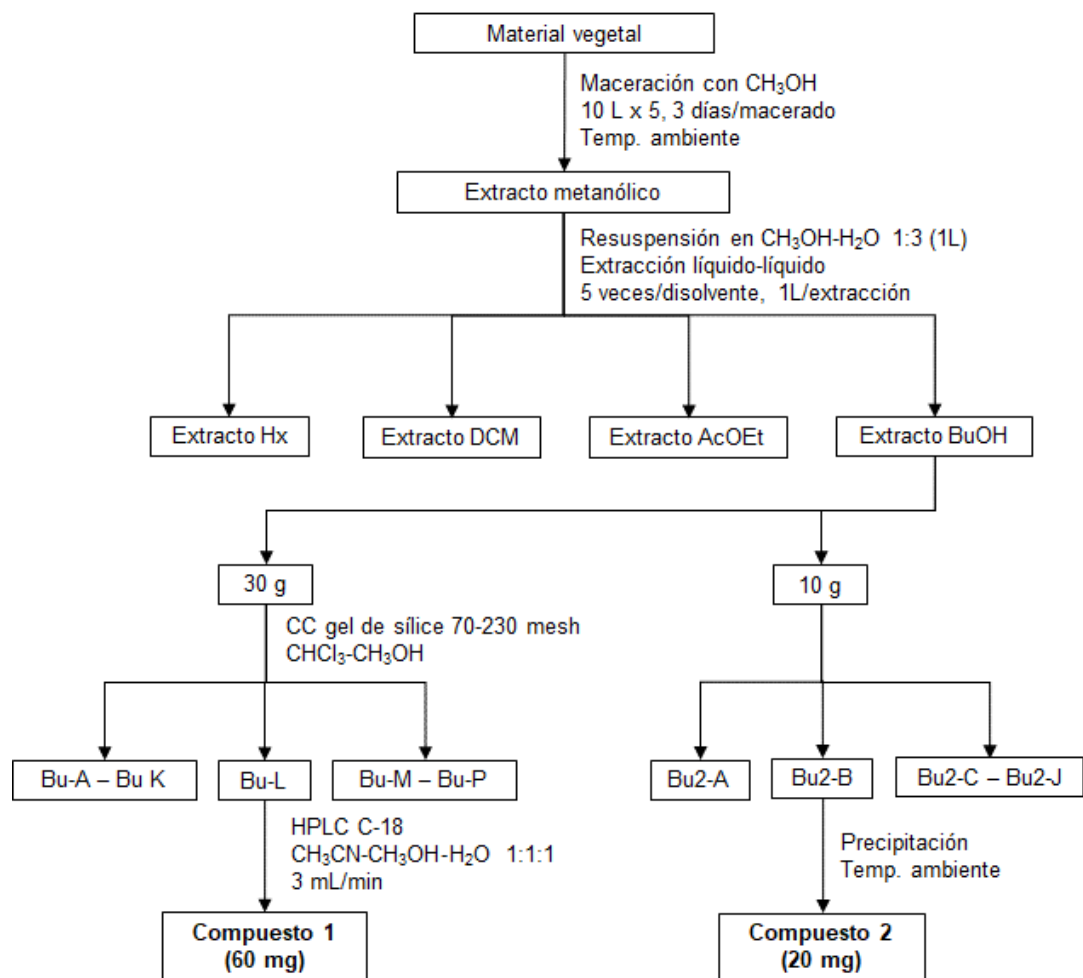


Figura 27. Esquema general del procedimiento de obtención de los compuestos 1 y 2.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuesto 1

El compuesto **1** (60 mg) se obtuvo como sólido amorfo blanco el cual, en su espectro de protón (**Figura 28**) se observan señales correspondientes a seis metilos, dos de ellos como señales simples (δ 0.91 y 1.07) y cuatro como señales dobles (δ 1.00, $J = 6.49$ Hz; 1.35, $J = 6.76$ Hz; 1.64, $J = 6.09$ Hz; 1.78, $J = 5.97$ Hz); las señales a δ 0.91, y 1.07 son señales características de los metilos C18 y C19 de un sistema esteroidal, mientras que las señales dobles a δ 1.00 y 1.35 indican la presencia de dos metilos C27 y C21 adicionales al núcleo esteroidal base, esto permite descartar la posibilidad de un esqueleto esteroidal de tipo colestano, que posee cinco metilos, y considerar que el esqueleto esteroidal es un furostano o espirostano, con cuatro metilos; por otro lado, se observa un grupo de señales entre 3.5 y 5.0 ppm, lo que indicia la presencia de protones (metinos y/o metilenos) unidos a carbonos soportando funciones oxigenadas asignables a metinos de monosacáridos; además de una señal de un protón unido a un carbono con hibridación sp^2 (5.33 ppm) característico del hidrógeno olefínico de C6 en la serie Δ^5 de esqueletos esteroidales; así como dos señales simples anchas (5.86 y 6.40 ppm) que se ha reportado son características de hidrógenos anoméricos de 6-desoxihexosas. Los datos anteriores sugieren que se trata de un glicósido esteroidal; adicionalmente, la multiplicidad y el desplazamiento químico de las señales dobles a 1.64 y 1.78 ppm, ambas señales asignables a los metilos C6 de las 6-desoxihexosas sugieren la presencia de dos 6-desoxihexosas en la estructura del compuesto.

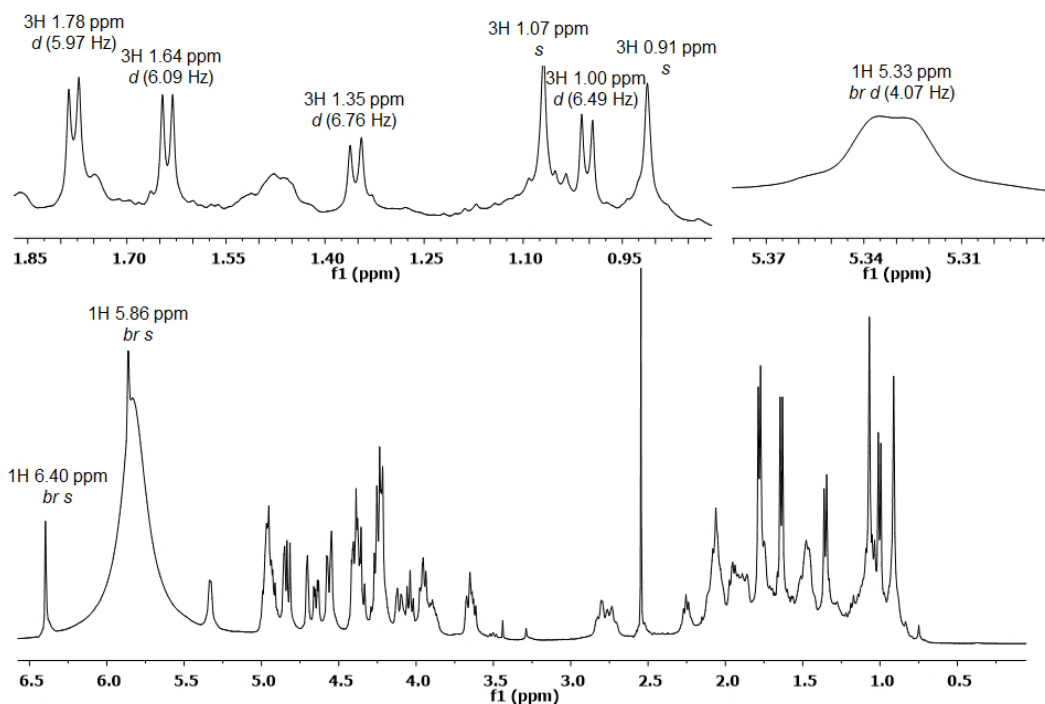


Figura 28. Espectro de RMN- ^1H del compuesto **1**.

En el espectro de RMN-APT del compuesto **1** (**Figura 29**) se observan 51 señales, 35 de ellas en fase positiva y 16 en fase negativa. Destacan las señales a 141.3, 122.2, 111.1, cuatro entre 100 y 110 y seis entre 15 y 20 ppm. En el espectro DEPT 135° (**Figura 30**) se observan únicamente 12 señales en fase negativa correspondientes a igual número de metilenos en la molécula; en el espectro DEPT 90° se observan 29 señales que corresponden a igual número de metinos. Los experimentos APT y DEPT indican que el compuesto **1** posee 51 carbonos en su estructura: seis metilos, 12 metilenos, 29 metinos y 4 carbonos cuaternarios (δ 141.3, 37.7, 41.3 y 111.1). Estos datos sugieren que se trata de una saponina esteroideal (C27) con cuatro unidades glicosídicas (C6) en su estructura. Las señales de carbonos cuaternarios a δ 141.3, 37.7, 41.3 y 111.1, son características de los carbonos C5, C10, C13 y C22 de glicósidos esteroideales Δ^5 , de tipo furostano, respectivamente. La presencia de señales para cuatro metinos entre 100 y 110 ppm, características de carbonos anoméricos de azúcares confirma la presencia de cuatro unidades de monosacáridos en el compuesto **1**. Por último, la señal del metino olefínico a δ 122.2 junto con el carbono cuaternario a δ 141.2 confirma la presencia del enlace doble C5=C6 del núcleo esteroideal.

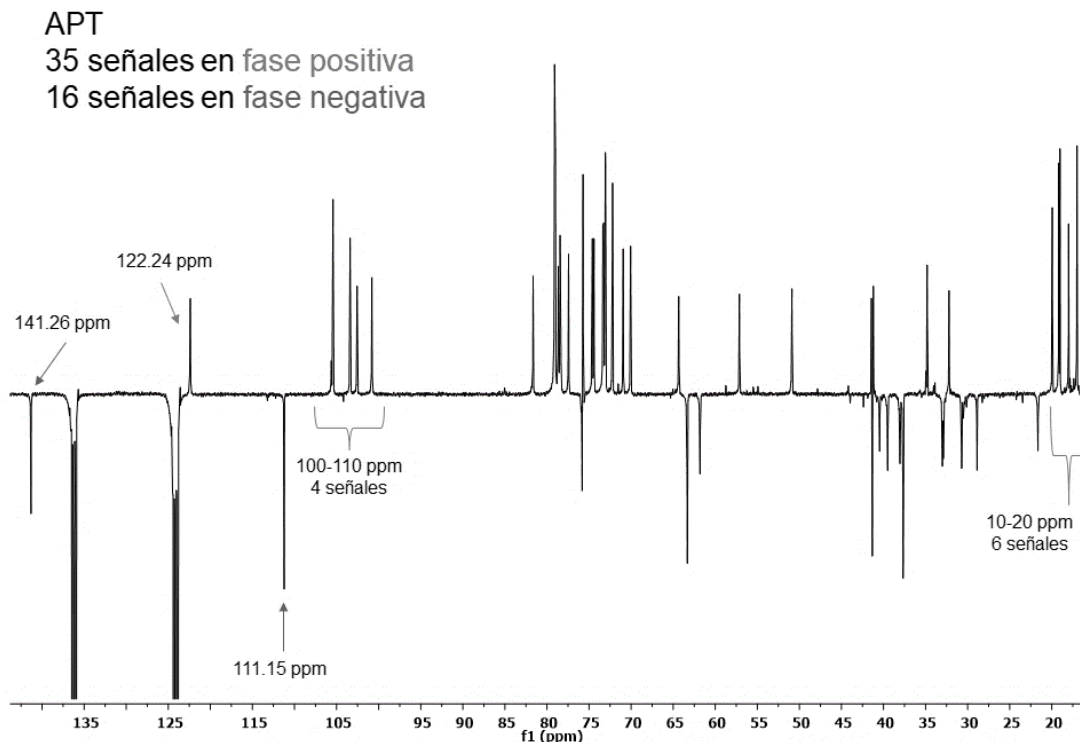


Figura 29. Experimento RMN-APT del compuesto **1**.

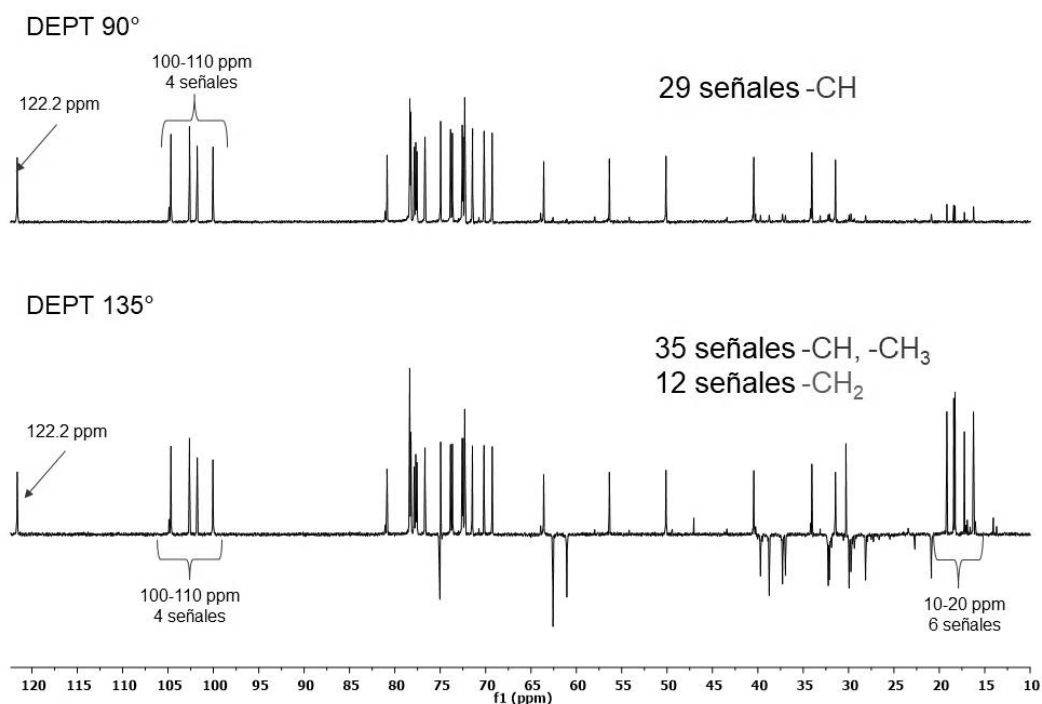


Figura 30. Espectros DEPT 90° y 135° del compuesto 1.

El espectro HSQC (**Figura 31**), confirma el número de carbonos protonados (CH_3 , CH_2 y CH) en la molécula ya que se observan acoplamiento carbono/hidrógeno a un enlace ($\delta\text{C}/\delta\text{H}$), así mismo permitieron asignar los desplazamientos químicos del hidrógeno olefínico 122.2/5.33 ppm y los hidrógenos anoméricos 100.4/4.96, 102.2/6.40, 103.0/5.86, 105.04/4.82; sin embargo, mientras que las señales de los protones a δ 6.40 y 5.86 se encuentran bien resueltas, las señales de los protones anoméricos en 4.96 ppm y 4.82 ppm se encuentran superpuestas, lo que dificultó el análisis de sus multiplicidades. El desplazamiento químico de estas dos señales (δ 4.82 y 4.96) es característico de hidrógenos anoméricos de β -glucopiranosas, mientras que los hidrógenos anoméricos más desplazados (δ 5.86 y 6.40), en conjunto con los dos metilos desplazados a más de 1.50 ppm en el espectro $\text{RMN-}^1\text{H}$ confirman la presencia de dos unidades de 6-desoxihexosas en la estructura del compuesto. Así mismo se confirman los acoplamiento carbono/hidrógeno de los metilos (**Figura 32**), cuyas señales entre 0.91 y 1.78 ppm correlacionan con las seis señales de carbono observadas entre 15 y 20 ppm. Por último, se observa el acoplamiento δ 75.8/3.63, 3.96, correspondiente a un metileno soportando una función oxigenada.

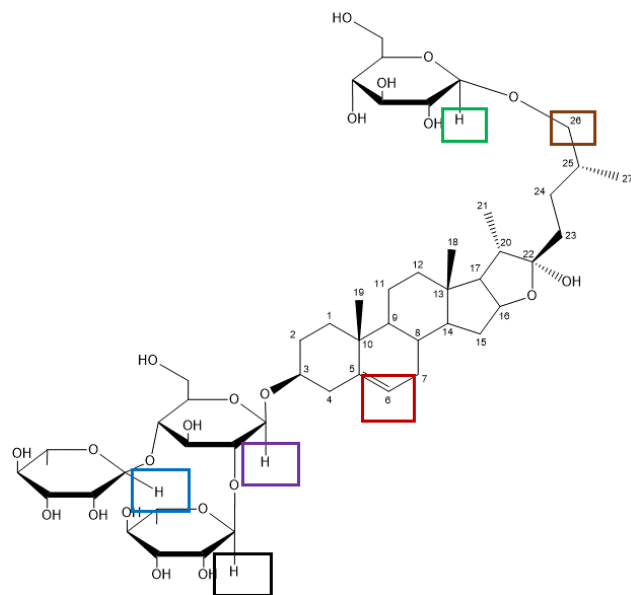
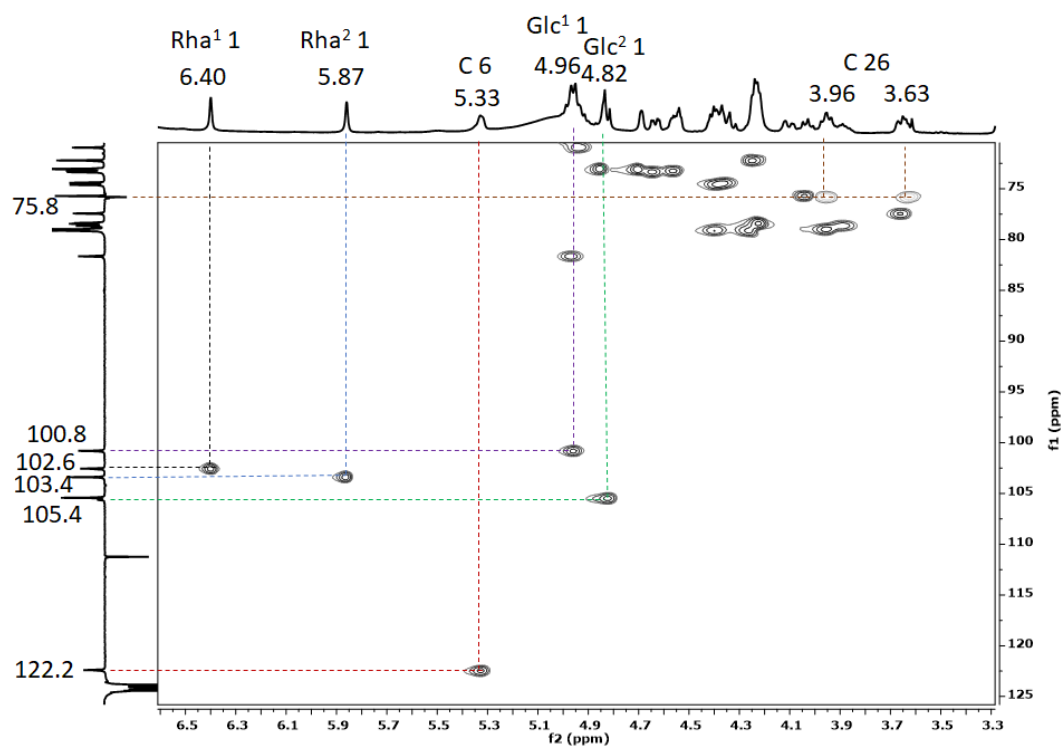


Figura 31. Espectro HSQC del compuesto **1** y figura en la que se resaltan las posiciones señaladas, en donde se observan las correlaciones de carbonos y protones anoméricos. En el eje vertical del espectro HSQC se observa el espectro APT.

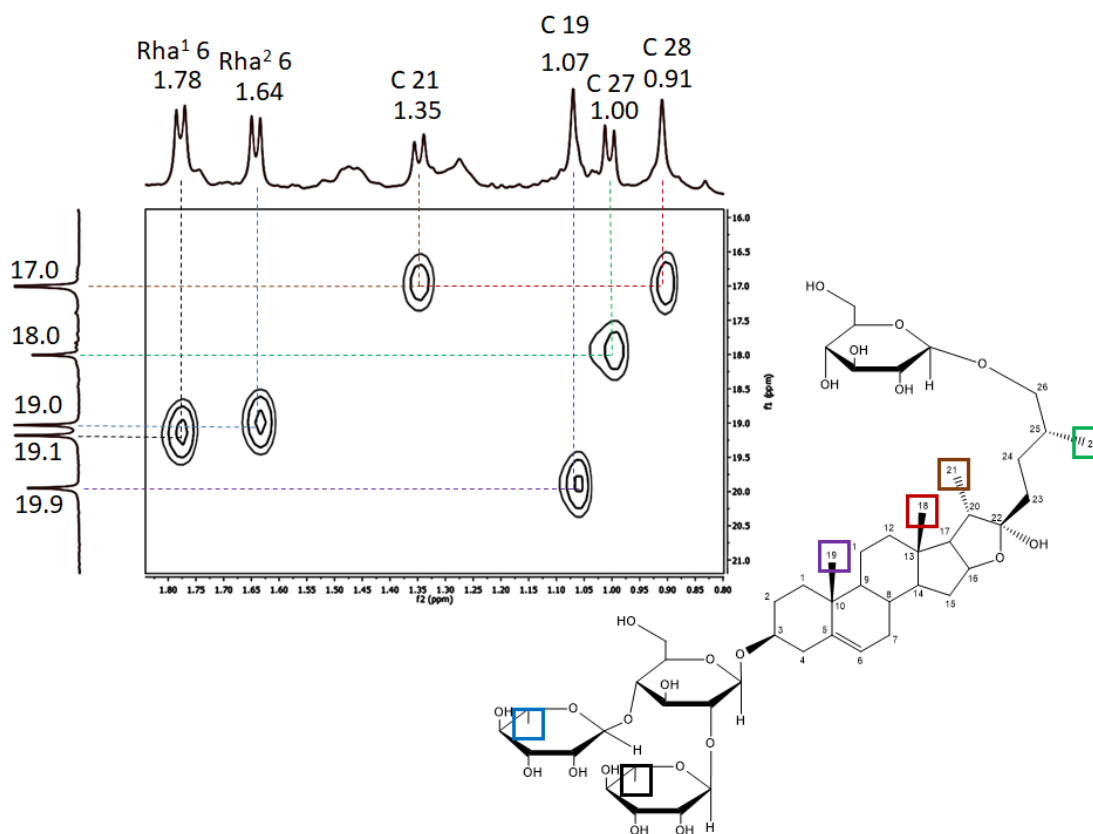


Figura 32. Ampliación del espectro HSQC del compuesto **1**. Se observa la región entre δ 0.00 a 2.00(RMN- 1 H) / δ 0.0 a 25.0 (RMN- 13 C).

Un experimento HSQC-TOCSY (**Figura 33**) del compuesto **1** permitió asignar las señales de protón correspondientes a cada monosacárido al observar la correlación con su respectivo carbono anomérico (**Figura 34**). De esta forma, se pudo determinar el sistema de espines para las dos glucosas que forman parte de la estructura del compuesto **1**, mientras que de las desoxihexosas sólo se pudieron observar los carbonos adyacentes a los anoméricos. Una vez obtenida esta información, y habiendo determinado los sistemas de espines principales se procedió a realizar los experimentos de correlación a más de un enlace para determinar las uniones interglucosídicas.

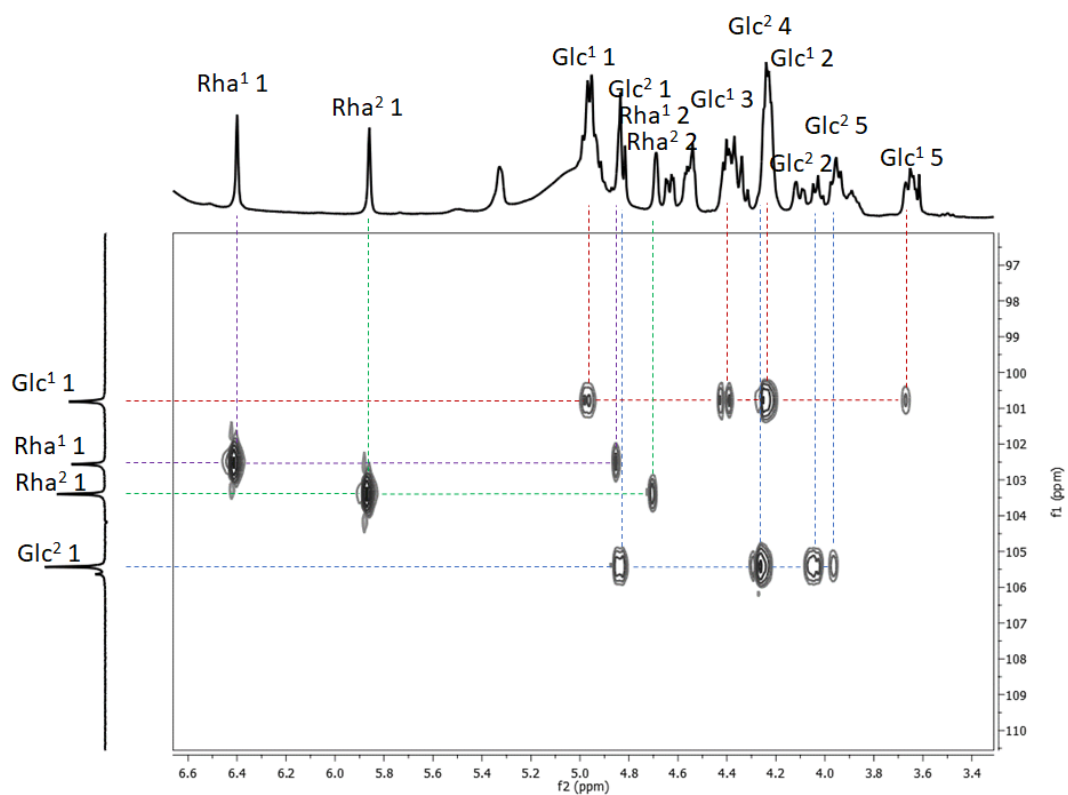


Figura 33. Ampliación del espectro HSQC-TOCSY, enfocado en los sistemas de espines de los carbonos anoméricos.

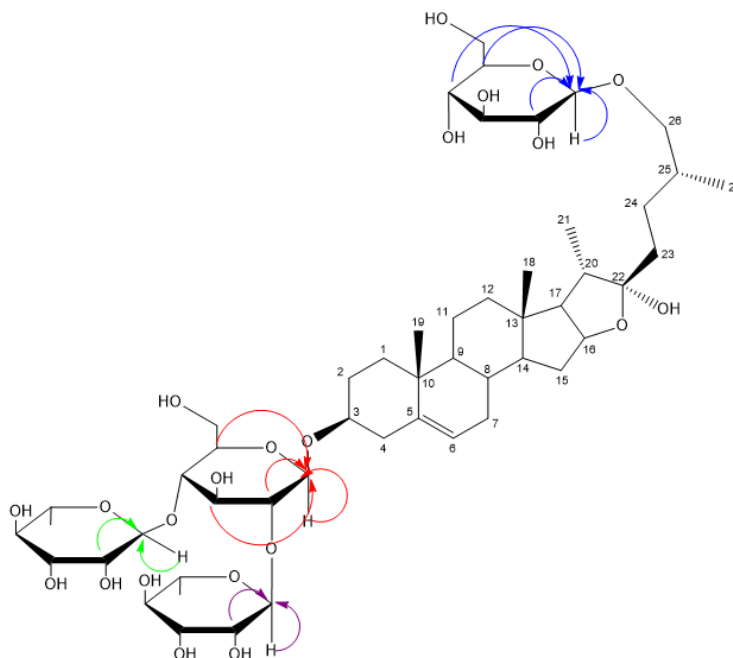


Figura 34. Correlaciones observadas en el espectro HSQC-TOCSY del compuesto 1.

En el espectro HMBC (**Figura 35**) se observa que la señal doble de hidrógeno en 1.00 ppm correlaciona con los metilenos en δ 28.8 y 75.8, así como con el metino en δ 34.8, lo que permite asignar a esta señal de hidrógeno sobre el C-27, por lo que se identificó a cada una de las señales de carbono como C-24, C-26 y C-25, respectivamente. Otra correlación importante es la observada entre la señal doble a 1.35 ppm con el carbono cuaternario característico de los esqueletos de tipo espirostanos y furostanos a 111.1 ppm permitió identificar al metilo C-21 del esqueleto esteroidal. Por último, se observa la correlación entre los protones del metileno a δ 3.63 y 3.96 correspondientes a C-26 con el carbono anomérico en δ 105.4; la presencia de la correlación entre los hidrógenos en C-26 y el carbono anomérico de un azúcar en vez del carbono C-22 sugiere que la estructura esteroidal carece del anillo F de los espirostanos, por tanto, se determinó que el núcleo esteroidal corresponde a un furostano.

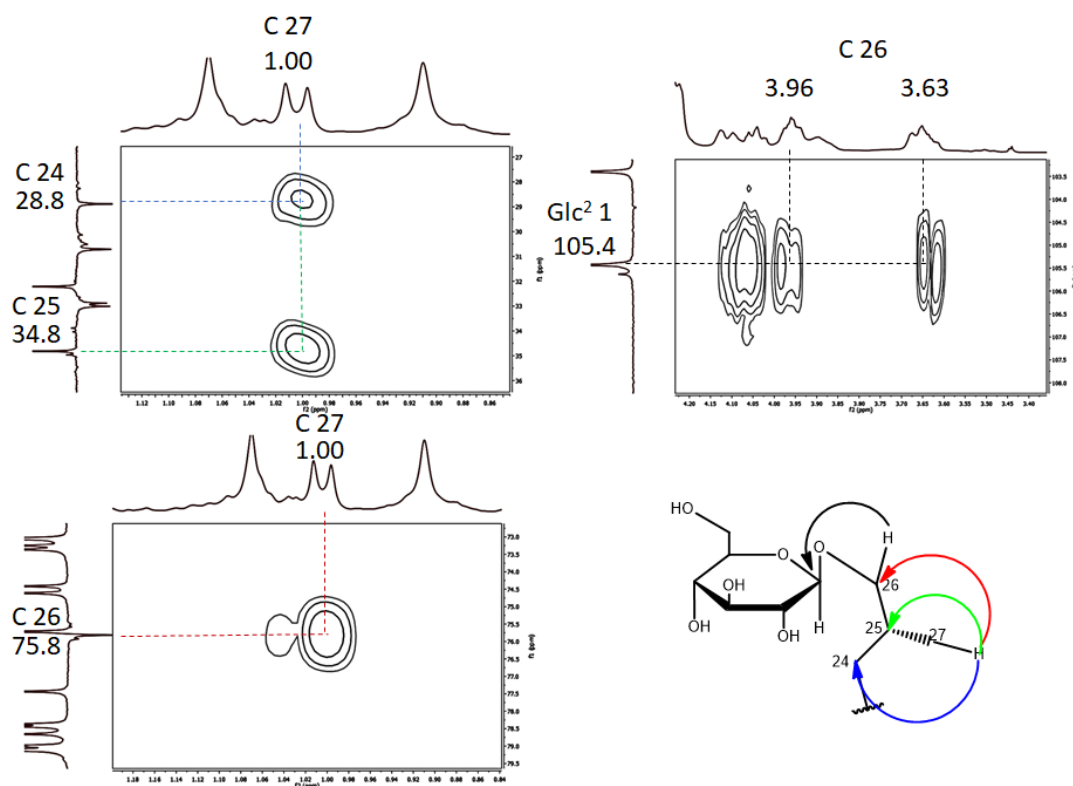


Figura 35. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **1**. Se observan los acoplamientos a larga distancia entre hidrógenos y carbonos de la cadena hidrocarbonada sobre C-22.

En el mismo espectro HMBC se confirma la localización de un enlace doble entre C5 y C6 de la estructura esteroidal, esto debido a la correlación entre la señal del carbono cuaternario a δ 141.2 con los hidrógenos del metilo C19 (1.06 ppm). De igual forma se observa un acoplamiento entre δ 111.1 (C22) y el metilo δ 1.35, por lo que se identificó a este metilo como C21 (**Figura 36**).

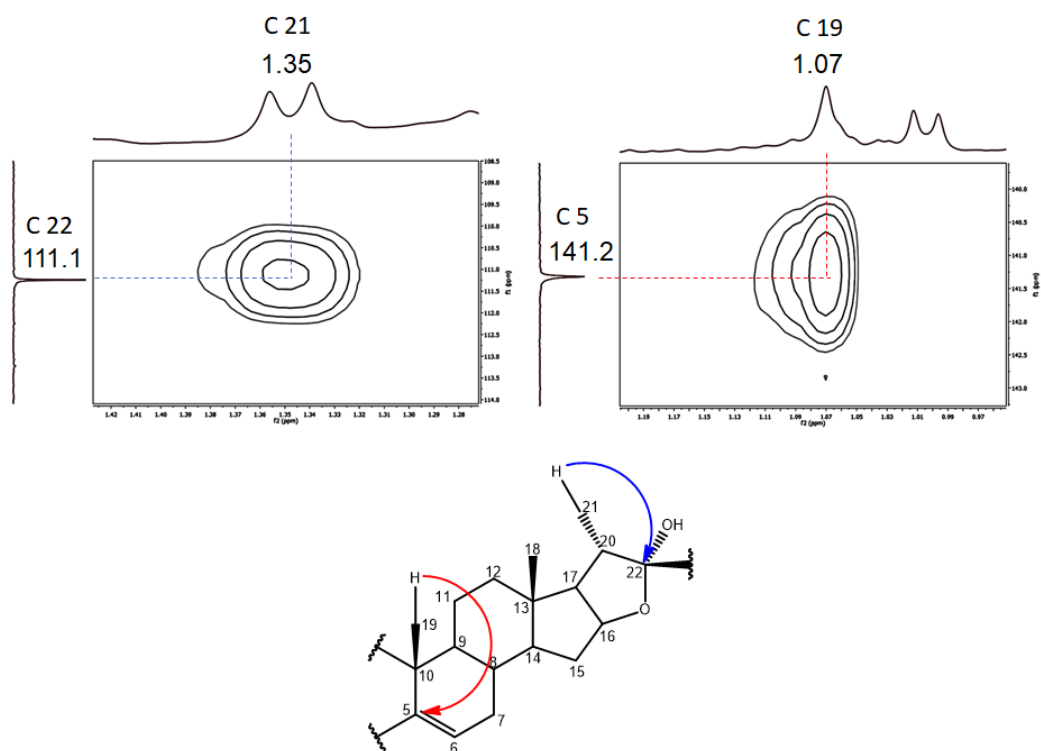


Figura 36. Ampliaciones del espectro HMBC del compuesto **1**. Estas ampliaciones corresponden a señales características en los anillos A y E del esqueleto esteroidal.

En otra región del espectro HMBC (**Figura 37**) se observan los acoplamientos de los metilos a δ 1.64 y 1.78 con carbonos desplazados en la región entre 70 y 80 ppm, perteneciente a carbonos con funciones oxigenadas. Esta información sugiere que estos metilos no se encuentran en la aglicona esteroidal, sino que pertenecen a los residuos de monosacáridos; por tanto, se corroboró la presencia de dos 6-desoxihexosas en la molécula. Así mismo, se observaron los acoplamientos entre el hidrógeno anomérico a δ 6.40 con tres señales de carbono: δ 70.0, 73.3 y 78.3; las primeras dos señales corresponden a carbonos del mismo sistema de espines que δ 6.40, mientras que el carbono a 78.3 ppm (C2 de glucosa) corresponde a un sistema de espines distinto, por lo que se determinó este acoplamiento corresponde a un enlace interglucosídico. De igual forma, se observan los acoplamientos entre el hidrógeno anomérico a δ 5.87 y los carbonos en δ 70.9, 73.2 y 79.1; al igual que en el caso anterior, se determinó que las primeras dos señales corresponden al mismo sistema de espines, pero el carbono a 79.1 ppm (C4 de glucosa) pertenece a un sistema de espines diferente, lo que indica que este carbono soporta un segundo enlace interglucosídico. Estos datos nos permitieron concluir que la cadena de azúcares se encuentra ramificada en C2 y C4 de la glucosa.

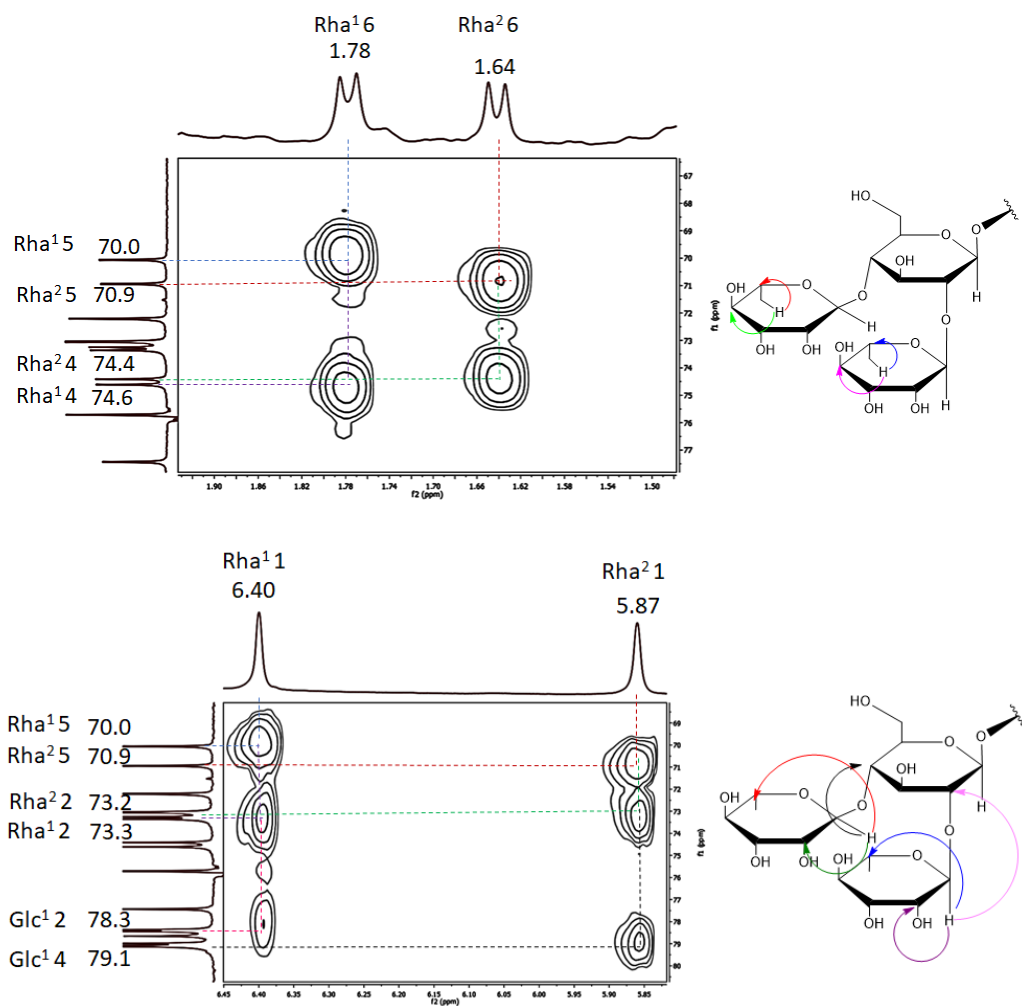


Figura 37. Ampliación del espectro HMBC del compuesto 1. Se observan acoplamientos correspondientes a los carbonos de los monosacáridos de la cadena.

Por último, en otra región del espectro HMBC (**Figura 38**) se observa una correlación entre el carbono anomérico en δ 100.8, asignado a la glucosa en la cual se encuentran las dos 6-desoxihexosas, con el protón en δ 3.89, asignado a la posición 3 del esqueleto esteroideal. Esto confirma que el enlace glicosídico entre la cadena de azúcares y el esteroide se encuentra en la posición 3 como es frecuente en este tipo de compuestos. La proximidad del protón anomérico de esta glucosa con el protón C3 del esqueleto base es corroborada también en el experimento NOESY del compuesto (**Figura 39**).

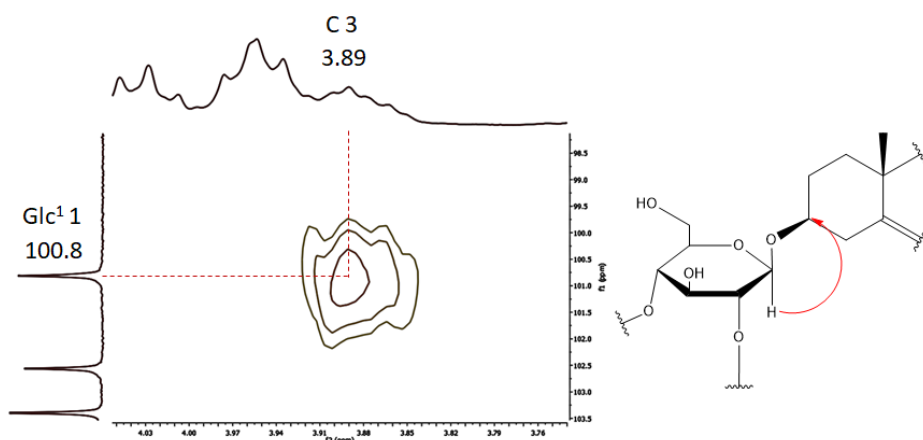


Figura 38. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **1**. Se observa el acoplamiento del enlace glicosídico entre la cadena de azúcares y el esqueleto esteroidal.

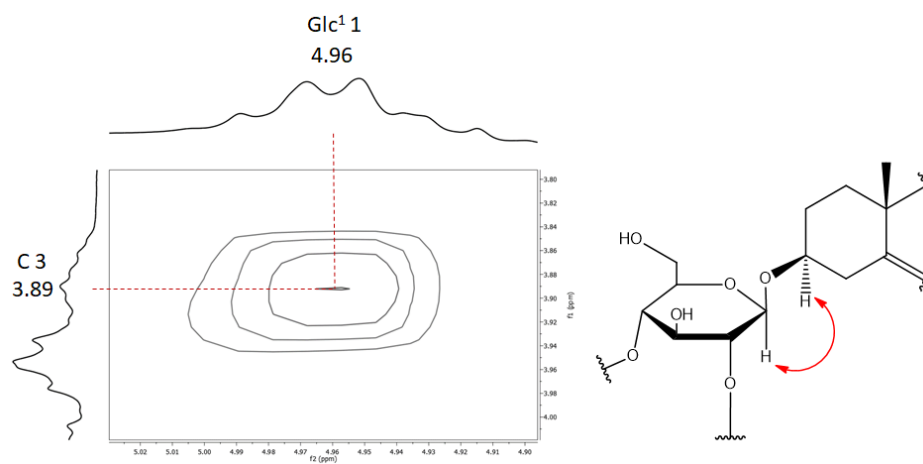


Figura 39. Ampliación del espectro NOESY del compuesto **1**.

A partir de la información obtenida de los espectros de RMN se propuso que el compuesto **1** es un bidesmósido esteroidal de tipo furostano con cadenas glicosídicas en C3 y C26; la cadena glicosídica sobre C3 corresponde a un triósido ramificado, compuesto por una unidad de glucosa que soporta dos unidades de ramnosa, una de ellas en C2 y la otra en C4; la cadena glicosídica en C26 del esqueleto esteroidal corresponde a un monósido, identificado como una unidad de glucosa.

En el espectro de masas del compuesto **1** (**Figura 40**) se observa un pico de $m/z = 1071.5$ que está de acuerdo para el ión molecular sodiado $[M+Na]^+$ que correspondería a una saponina esteroidal con dos hexosas y dos desoxihexosas en su estructura. El pico base de $m/z = 1031.6$ que puede asignarse a la pérdida de una molécula de agua y la adición de un protón, lo que sugiere la presencia de un grupo OH en la molécula.

Mediante espectrometría de masas de alta resolución en modalidad FAB+ se observa un ión molecular en $m/z = 1048.546$, lo que corrobora la fórmula molecular $C_{51}H_{84}O_{22}$.

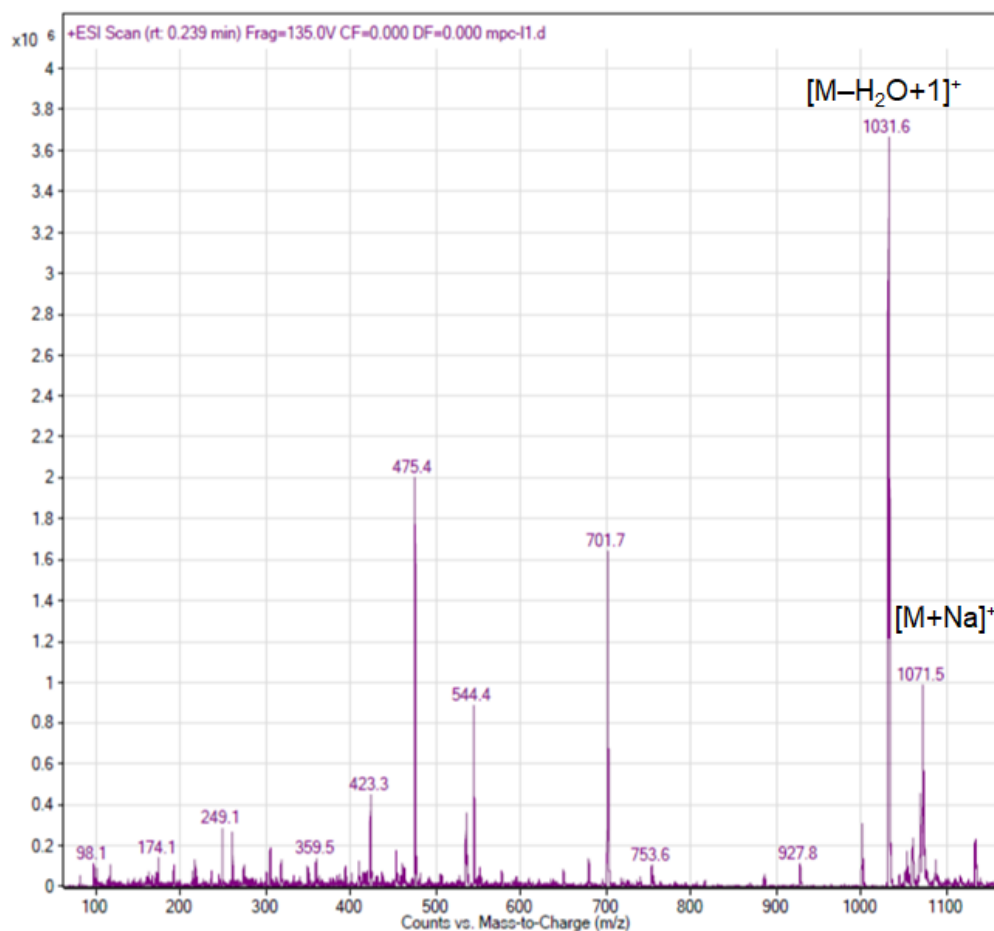


Figura 40. Espectro de masas (ESI+) del compuesto 1.

El espectro de MS/MS del pico correspondiente a $[M-H_2O+H]^+$ (**Figura 41**) muestra los picos de $m/z = 869.5$, 723.5 , 577.1 y 415.3 , asignables a las pérdidas sucesivas de una hexosa, una desoxihexosa, una segunda desoxihexosa y una segunda hexosa, respectivamente. El pico de $m/z = 415.3$ corresponde al núcleo esteroide sin residuos de monosacáridos y pérdida de una molécula de agua.

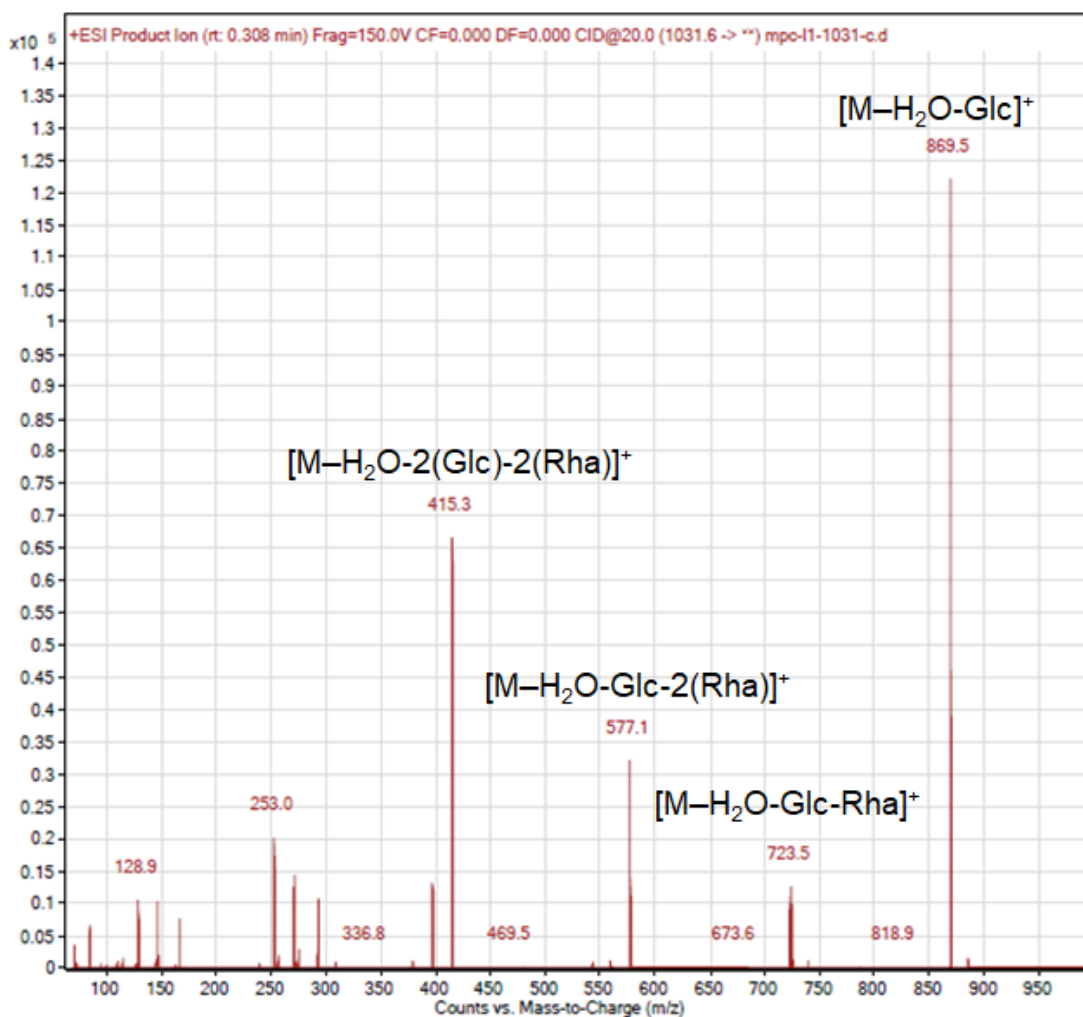


Figura 41. Espectro de ESI MS/MS del pico $m/z = 1031.6$ del compuesto 1.

Los datos obtenidos están de acuerdo con los reportados en la literatura⁵⁵⁻⁵⁶ para la protodioscina (**Figura 42**), un glicósido esteroidal de tipo furostano con una cadena ramificada de glucosa y dos residuos de ramnosa en la posición 3 y una glucosa en la posición 26; este compuesto fue aislado e identificado por primera vez en el extracto metanólico de los rizomas de *Dioscorea gracillima* como un análogo de tipo furostano de dioscina.⁵⁷ Este trabajo es el primero en reportar el aislamiento de protodioscina de la especie *Solanum tridynamum*; así mismo, este es el primer reporte de un compuesto esteroidal de tipo furostano aislado de esta planta, ya que los estudios fitoquímicos previos sólo reportaron la presencia de compuestos esteroidales de tipo espiroetano. Los datos espectroscópicos obtenidos se encuentran en la **Tabla 1**.

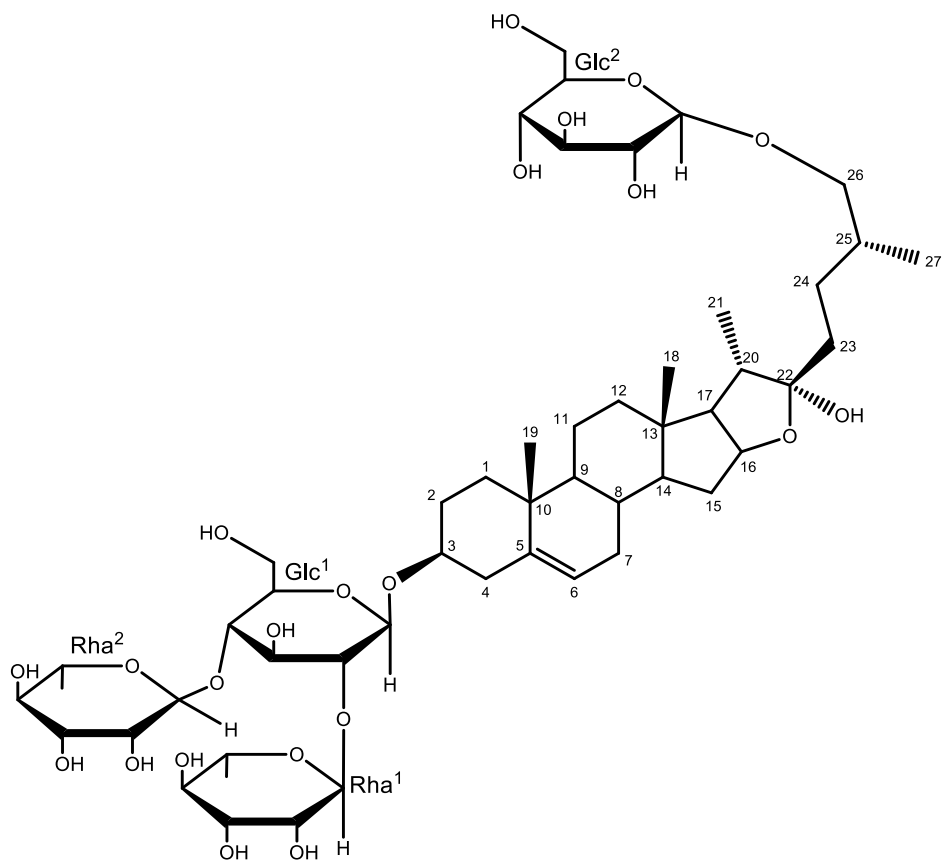


Figura 42. Estructura del compuesto 1, protodioscina.

Tabla 1. Datos de RMN del compuesto 1.

Posición	δ ¹ H (ppm, J en Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H referencia (ppm) ⁵⁵⁻⁵⁶	δ ¹³ C referencia (ppm) ⁵⁵⁻⁵⁶
1	0.99, 1.75	38.0		37.1
2	1.86, 2.10	30.7		30.1
3	3.89	78.4		78.4
4	2.77	39.5		38.9
5	N/A	141.2		140.7
6	5.33	122.2	5.34 (<i>da</i> , 4.2)	121.7
7	1.88	32.9		32.1
8	1.57	32.2		31.6
9	0.91	50.9		50.3
10	N/A	37.7		37.5
11	1.47	21.6		21.0
12	1.13, 1.76	40.5		39.7
13	N/A	41.3		40.7
14	1.07	57.1		56.5
15	2.06	37.7		32.3
16	4.96	81.6		81.3
17	1.95	64.3		64.1
18	0.91 (<i>s</i>)	17.0	0.82 (<i>s</i>)	16.3
19	1.07 (<i>s</i>)	19.9	1.05 (<i>s</i>)	19.4
20	2.25	41.2		40.3
21	1.35 (<i>d</i> , 6.79)	17.0	1.20 (<i>d</i> , 6.60)	16.2
22	N/A	111.1		112.6
23	1.48, 2.06	33.0		30.8
24	1.70, 2.06	28.9		28.1
25	1.94	34.8		34.0
26	3.63, 3.96	75.8		79.0
27	1.00 (<i>d</i> , 6.54)	18.0	1.01 (<i>d</i> , 6.00)	17.1
	Glucosa ¹ (1→C-3)			
1	4.96	100.8	4.96 (<i>d</i> , 6.60)	100.2
2	4.23	78.3		78.0
3	4.38	79.0		76.9
4	4.26	79.1		78.5
5	3.65	77.4		77.8
6	4.11, 4.23	61.8		61.2

Tabla 2. Continuación.

Ramnosa ¹ (1→Glc ¹⁻²)				
1	6.40 (sa)	102.6	6.41 (sa)	102.0
2	4.84	73.0		72.5
3	4.65	73.3		72.7
4	4.39	74.6		73.9
5	4.96	70.0		69.5
6	1.78 (d, 5.75)	19.1	1.77 (d, 6.60)	18.6
Ramnosa ² (1→Glc ¹⁻⁴)				
1	5.87 (sa)	103.4	5.87 (sa)	102.8
2	4.71	73.0		72.5
3	4.57	73.2		72.8
4	4.36	74.4		74.1
5	4.94	70.9		70.4
6	1.64 (d, 6.24)	19.0	1.64 (d, 6.00)	18.5
1	4.82	105.4	4.87 (sa)	104.9
Glucosa ² (1→C-26)				
2	4.03	75.7		75.1
3	4.24	72.2		77.9
4	4.26	79.1		71.4
5	3.95	78.6		78.5
6	4.40, 4.57	63.3		62.8

s = señal simple; d = señal doble; sa = señal simple ancha; da = señal doble ancha; m = señal múltiple; N/A = no aplicable, empleado debido a la ausencia de señales de protón sobre carbonos cuaternarios

Compuesto 2

El compuesto **2** (20 mg) se obtuvo como un sólido cristalino en forma de agujas translúcidas; en su espectro de RMN de protón (**Figura 43**) presentó un perfil similar al del compuesto **1**; en él se observan seis metilos, dos señales simples (δ 0.85 y 1.07 ppm) y cuatro señales dobles (δ 0.71, $J = 5.44$ Hz; 1.16, $J = 7.11$ Hz; 1.65, $J = 6.10$ Hz; 1.78, $J = 6.31$ Hz); las señales a 0.85 y 1.07 ppm son señales características de los metilos C18 y C19 de un sistema esteroide; la presencia de las señales dobles a δ 0.71 y 1.16 son asignables a los metilos terciarios C27 y C21 presentes en esqueletos de tipo furostano y espirostando; por otro lado, se observa un grupo de señales entre 3.5 y 5.0 ppm, lo que indicia la presencia de protones unidos a carbonos unidos a funciones oxigenadas, asignables a los hidrógenos de azúcares; una señal de un protón unido a un carbono con hibridación sp^2 (5.33 ppm) identificado como C6 de los compuestos esteroidales pertenecientes a la serie Δ^5 ; por último, dos señales simples anchas (5.87 y 6.41 ppm), asignables a los hidrógenos anoméricos de unidades de 6-desoxihexosas. Los datos anteriores sugieren que se trata de un glicósido esteroide; adicionalmente, la multiplicidad y el desplazamiento químico de las señales a 1.65 y 1.78 ppm (metilos C6 de residuos de 6-desoxihexosas) sugieren la presencia de dos 6-desoxihexosas en la estructura del compuesto.

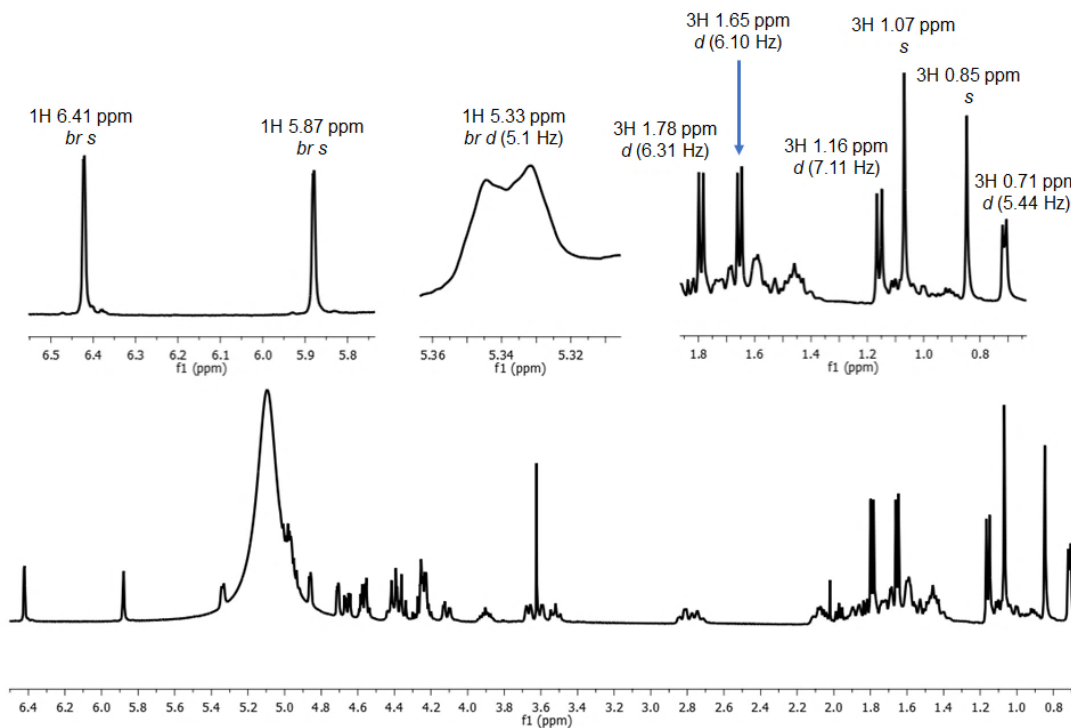


Figura 43. Espectro RMN- ^1H del compuesto **2**.

En el espectro de RMN-¹³C del compuesto **2** (Figura 44) se observan 45 señales, seis menos que en el compuesto **1**. Destacan las señales a δ 141.2, 122.3, 109.7, tres entre 100 y 110 y seis entre 15 y 20 ppm. En el espectro DEPT 135° se observan únicamente 11 señales en fase negativa correspondientes a igual número de metilenos en la molécula; en el espectro DEPT 90° se observan 24 señales que corresponden a igual número de metinos. Los experimentos DEPT indican que el compuesto **2** posee 45 carbonos en su estructura: seis metilos, 11 metilenos, 24 metinos y cuatro carbonos cuaternarios. Estos datos sugieren que se trata de una saponina esteroidal (C27) con tres unidades glicosídicas (C6) en su estructura. Las señales de carbonos cuaternarios a δ 141.2, 37.6, 40.9 y 109.7 son características de los carbonos C5, C10, C13 y C22 de glicósidos esteroidales Δ^5 de tipo espiroetano, respectivamente. La presencia de señales para tres metinos entre 100 y 110 ppm, características de carbonos anoméricos de azúcares confirma la presencia de tres unidades de monosacáridos en el compuesto **2**. sugiere que el glicósido esteroidal posee tres unidades de azúcares al observarse estas tres señales características correspondientes a carbonos anoméricos de azúcar. Por último, la señal del metino olefínico a δ 122.3 junto con el carbono cuaternario a δ 141.2 confirma la presencia del enlace doble C5=C6 del núcleo esteroidal.

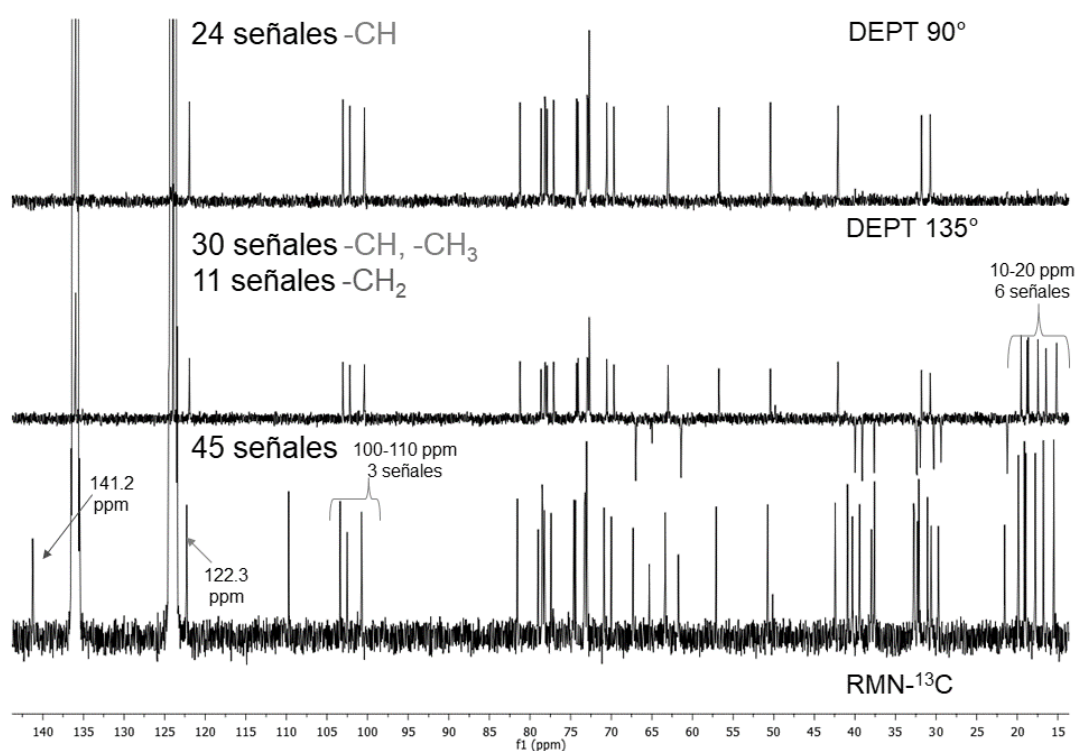


Figura 44. Espectros de RMN-¹³C, DEPT 90° y 135° del compuesto **2**.

El espectro HSQC (**Figura 45**) confirma el número de carbonos protonados (CH_3 , CH_2 y CH s) en la molécula ya que se observan acoplamientos carbono/hidrógeno a un enlace ($\delta_{\text{C}}/\delta_{\text{H}}$), así mismo permitieron asignar los desplazamientos químicos del hidrógeno olefínico 122.2/5.32 ppm y los tres hidrógenos anoméricos 100.7/4.99, 102.5/6.42, 103.4/5.88; al igual que en el compuesto **1**, la señal del protón en 4.99 ppm se encuentra superpuesta, lo que dificultó el análisis de su multiplicidad; sin embargo, el desplazamiento químico de esta señal es característico del hidrógeno anomérico de β -glucopiranososa. Se observan los acoplamientos carbono/hidrógeno de los metilos (**Figura 46**), cuyas señales entre 0.70 y 1.80 ppm correlacionan con las seis señales de carbono observadas entre 15 y 20 ppm. A diferencia del compuesto **1**, en el espectro del compuesto **2** no se observa el metileno unido a funciones oxigenadas δ 75.8/3.63, 3.96 .

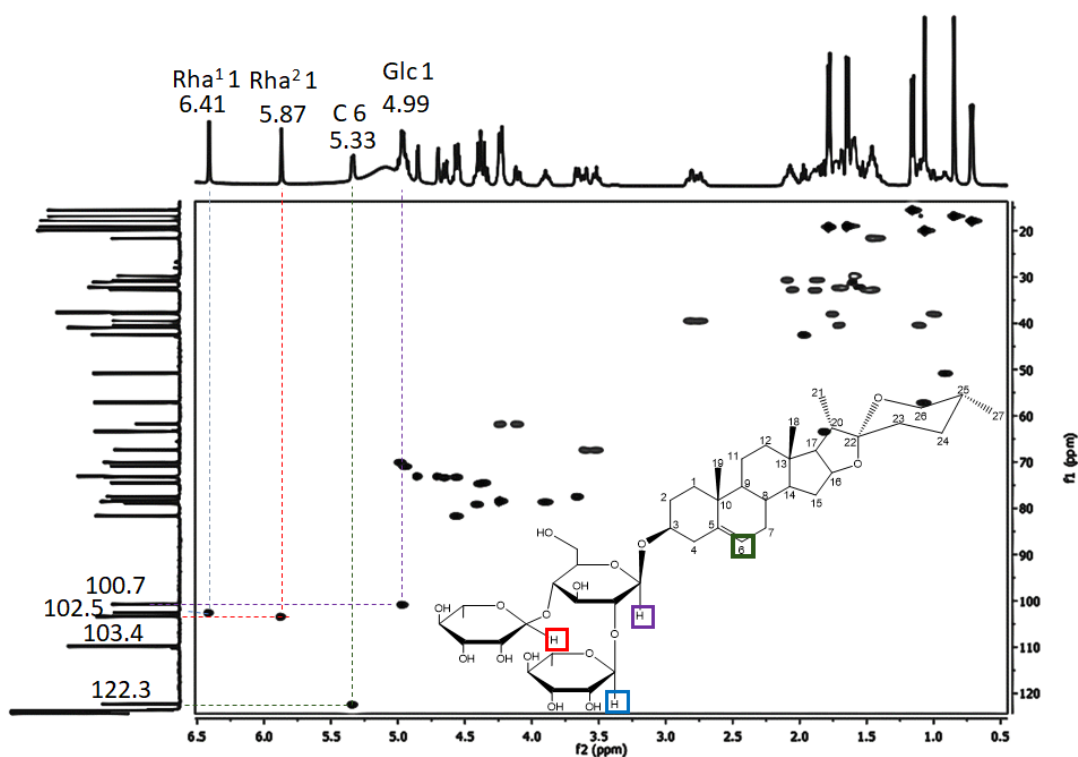


Figura 45. Espectro HSQC del compuesto **2**.

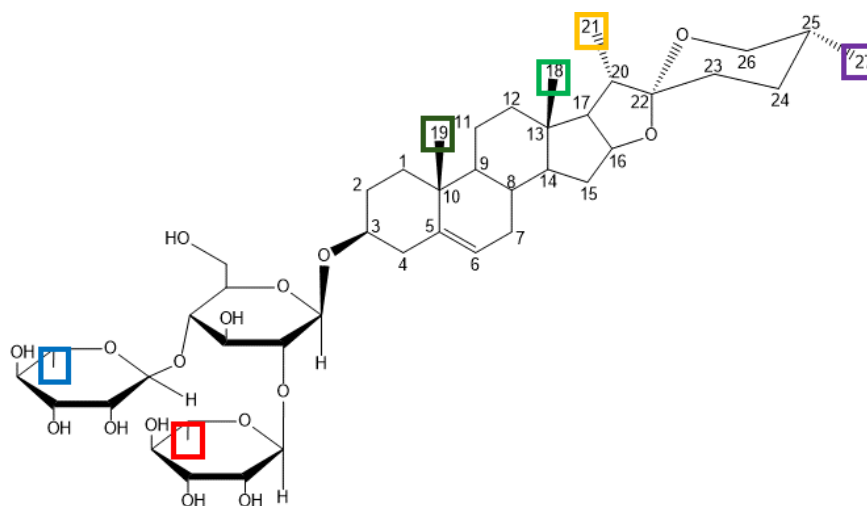
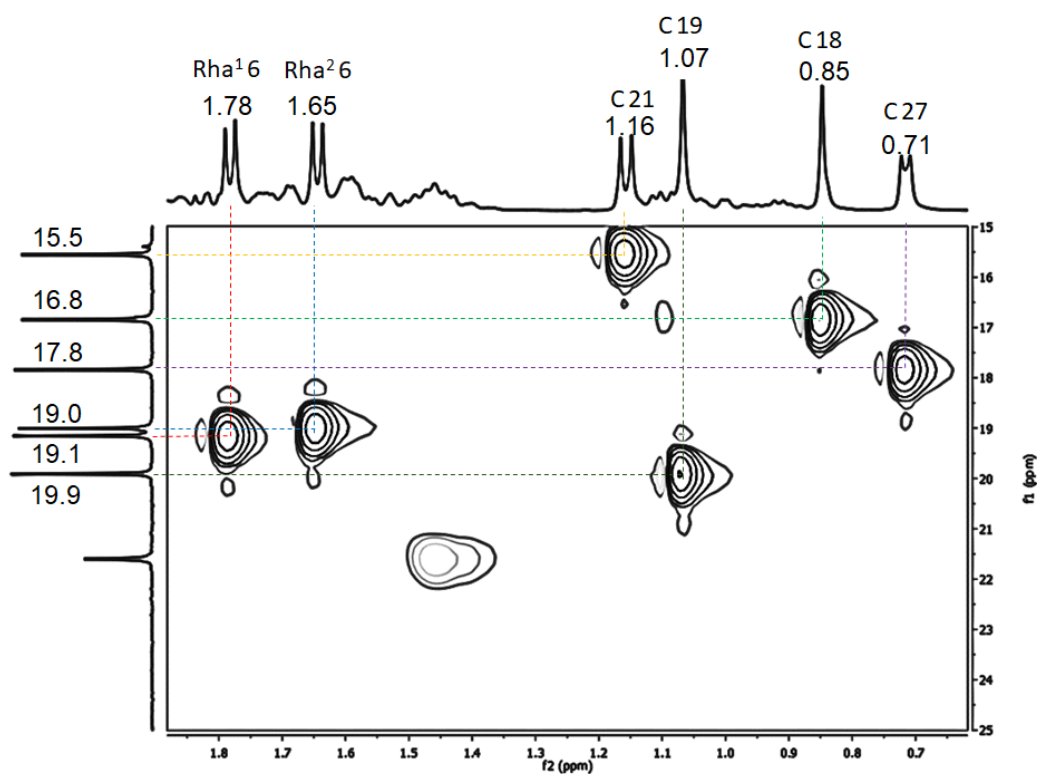


Figura 46. Ampliación del espectro HSQC del compuesto **2**. Se observan los acoplamientos en la región de los metilos de la molécula.

En el espectro HMBC (**Figura 47**) se observa el acoplamiento a larga distancia del metilo doble a 0.71 ppm con el metileno en δ 67.3 (C26) del esqueleto esteroidal, corroborando que el metilo es C27. En la misma región del espectro se observa el acoplamiento de los hidrógenos del metilo a 0.85 ppm con las señales en δ 57.0 (C14) y 63.3 (C17), ubicándolo como C18 entre los anillos C y D del núcleo esteroidal. En

esta misma región se observa que los hidrógenos del metilo a 1.16 ppm también acoplan con 63.3 ppm (C17), lo que permite asignarlo como el metilo C21 del núcleo esteroidal. Sin embargo, el acoplamiento más importante es el observado entre el hidrógeno a 3.59 ppm (hidrógeno de C26) con el carbono cuaternario a 109.7 ppm (C22) característico de los esqueletos espirostanos y furostanos; el acoplamiento a larga distancia entre los hidrógenos del metileno -26 y el carbono cuaternario C22 confirma que este carbono se encuentra soportando a dos ciclos, confirmando la identidad de la estructura esteroidal como un esqueleto de tipo espirostano.

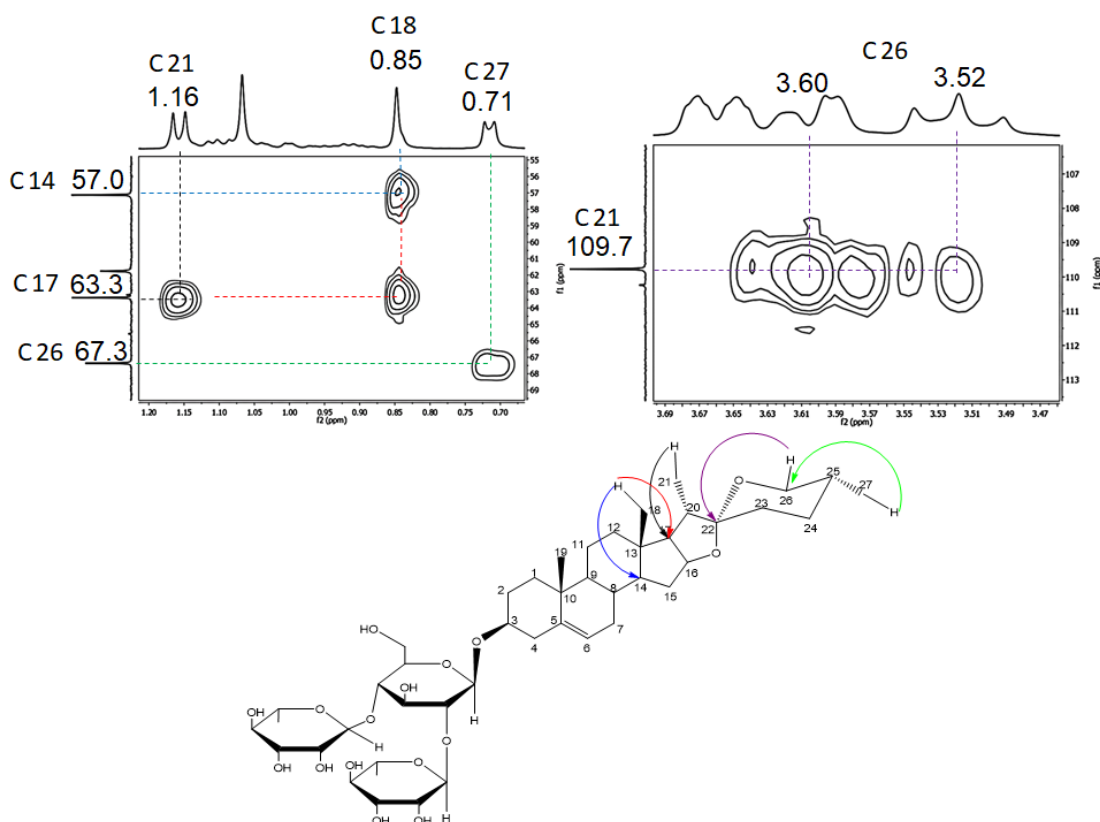


Figura 47. Ampliación del espectro HMBC del compuesto 2.

En otra región del espectro HMBC (**Figura 48**) se observa el acoplamiento entre el hidrógeno de C3 del esqueleto esteroidal (3.90 ppm) con el carbono anomérico en 100.7 ppm, confirmando que la cadena de sacáridos se encuentra enlazada al esqueleto esteroidal en la posición 3 como es común en las saponinas esteroidales. De igual forma se observa acoplamiento de este carbono anomérico con el protón a 3.66 ppm, posteriormente identificado como C5 de su mismo sistema de espines. Por otra parte, se observan los acoplamientos de los protones anoméricos δ 6.41 y 5.87 con tres señales de carbono cada uno: δ 6.41/70.0, 73.3, 78.2 y 5.87/70.9, 73.2, 79.0. En ambos casos se determinó que las últimas señales de carbono de cada grupo (78.2 y 79.0) correspondían a un sistema de espines diferente al de los anoméricos con los

cuales acoplaron, siendo identificados dentro del sistema de espines del carbono anomérico δ 4.99/100.7. Estos datos sugieren que la cadena de tres residuos se encuentra ramificada y no es lineal; para ser precisos, las ramificaciones se encuentran en C2 y C4 del primer monosacárido de la cadena.

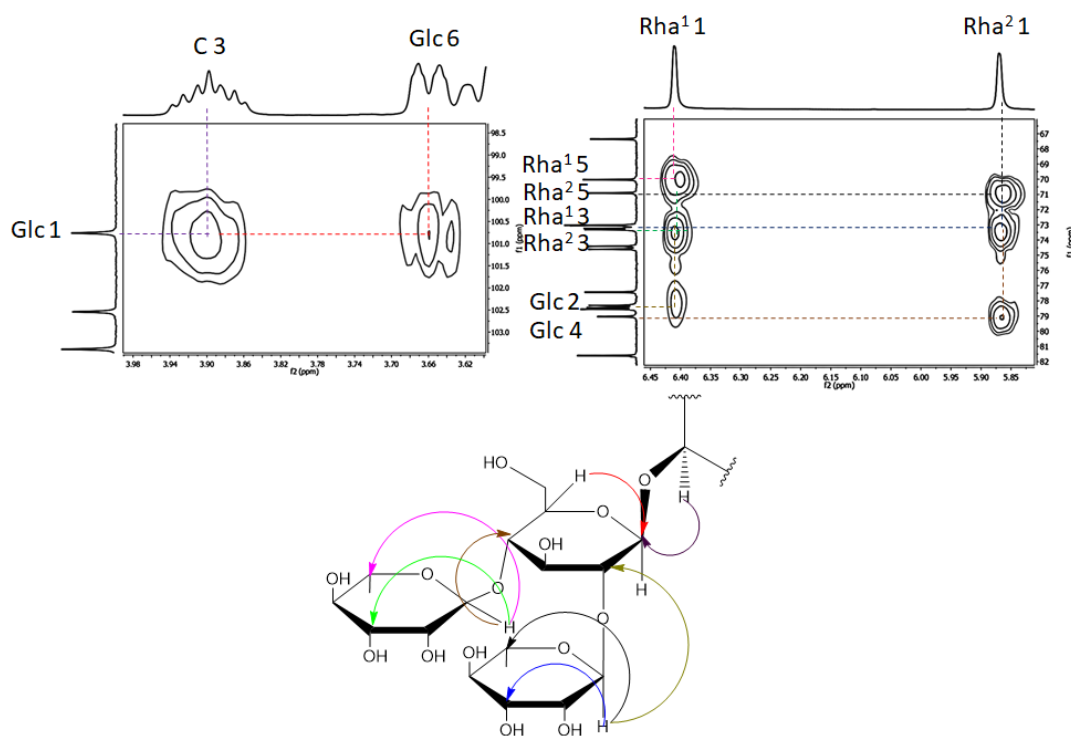


Figura 48. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **2**

A partir de los datos obtenidos de los espectros RMN del compuesto **2** se propuso que la estructura consta de un monodesmósido esteroidal de tipo espirostando, en donde la cadena de azúcares sobre C3 es un triósido ramificado, compuesto por una unidad de glucosa que soporta dos unidades de ramnosa en C2 y C4. Mediante espectrometría de masas de alta resolución en modalidad FAB+ se observa un ión molecular en $m/z = 868.48158$, que corresponde a la fórmula molecular $C_{45}H_{72}O_{16}$.

Los datos obtenidos están de acuerdo con los reportados en la literatura⁵⁸ para la dioscina (**Figura 49**), un glicósido esteroidal de tipo espirostando con una cadena ramificada de glucosa y dos residuos de ramnosa en la posición 3. El hallazgo de este compuesto, tipo espirostando, es congruente con lo previamente reportado para *Solanum tridynamum*, ya que entre las agliconas reportadas en un estudio previo se encuentra la diosgenina, la cual es el esqueleto base de la dioscina; este es el primer reporte del aislamiento de la saponina en *S. tridynamum*. Esta saponina es ampliamente distribuida en las plantas en las que se han aislado saponinas esteroidales, en especial de la familia Dioscoreaceae, y ha sido empleada como base para la obtención de diosgenina desde 1940, cuando este compuesto se obtuvo de

Dioscorea tokoro.⁵⁹ Los datos espectroscópicos del compuesto **2** se reportan en la **Tabla 2**.

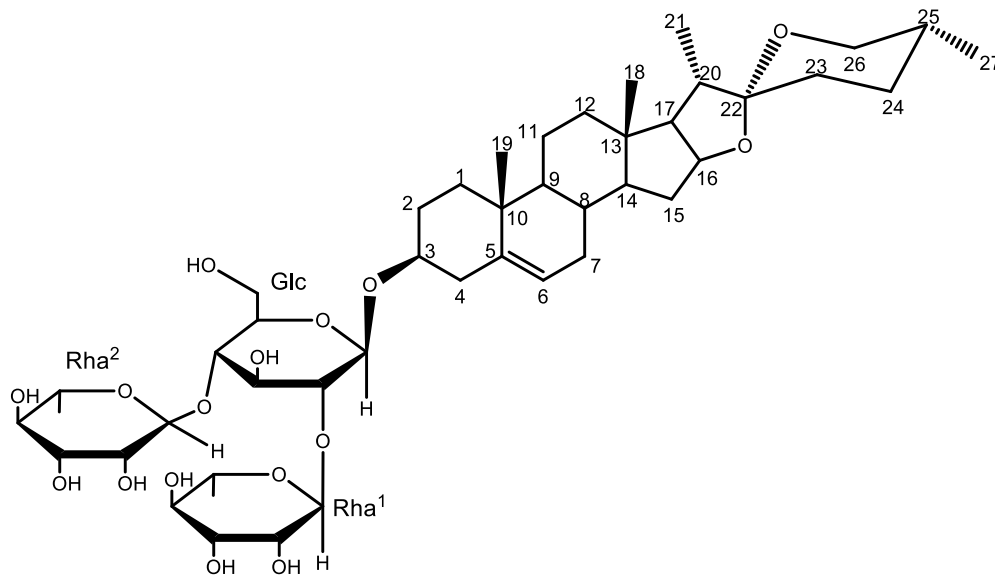


Figura 49. Estructura del compuesto **2**, dioscina.

Tabla 2. Datos de RMN del compuesto **2**.

Posición	δ ¹ H (ppm, J en Hz)	δ ¹³ C (ppm)	δ ¹ H referencia ⁵⁸ (ppm)	δ ¹³ C referencia ⁵⁸ (ppm)
1	1.00, 1.76	38.0	0.95, 1.71	37.3
2	1.87, 2.09	30.6	1.77, 2.02	30.0
3	3.90 (<i>m</i>)	78.5	3.82	77.8
4	2.78	39.4	2.64, 2.73	38.9
5	N/A	141.2	N/A	140.8
6	5.33 (<i>da</i> , 5.1)	122.3	5.29	121.6
7	1.46, 1.88	32.8	1.84	32.2
8	1.55	32.1	1.45	31.6
9	0.91	50.8	0.85	50.3
10	N/A	37.6	N/A	37.0
11	1.44	21.5	1.42,	21.0
12	1.10, 1.70	40.3	1.09, 1.67	39.8
13	N/A	40.9	N/A	40.4
14	1.06	57	1.04	56.6
15	2.05	32.7	1.42, 2.01	32.1
16	4.57	81.6	4.50	81.0
17	1.80	63.3	1.76	62.8
18	0.85(<i>s</i>)	16.8	0.80 (<i>s</i>)	16.2
19	1.07 (<i>s</i>)	19.9	1.02 (<i>s</i>)	19.3
20	1.96	42.4	1.92	41.9
21	1.16 (<i>d</i> , 7.11)	15.5	1.11 (<i>d</i> , 6.9)	14.9
22	N/A	109.7	N/A	109.1
23	1.69	32.3	1.68, 1.61	31.6
24	1.59	29.7	1.55,	29.2
25	1.59	31.0	1.54	30.5
26	3.53, 3.60	67.3	3.46, 3.54	66.8
27	0.71 (<i>d</i> , 5.44)	17.8	0.68 (<i>d</i> , 5.8)	17.2
Glucosa (1→C-3)				
1	4.99	100.7	4.86	100.2
2	4.23	78.4	4.15	78.9
3	4.23	78.2	4.15	76.6
4	4.40	79.0	4.31	78.1
5	3.66	77.4	3.57	77.7
6	4.12, 4.24	61.7	4.03, 4.17	61.3

Tabla 2. Continuación

Ramnosa ¹ (1→Glc-2)				
1	6.42 (<i>sa</i>)	102.5	6.31	101.8
2	4.85	73.0	4.76	72.5
3	4.64	73.3	4.54	72.2
4	4.37	74.6	4.27	73.7
5	4.97	70.0	4.89	69.3
6	1.78 (<i>d</i> , 6.31)	19.1	1.75	18.5
Ramnosa ² (1→C-4)				
1	5.87 (<i>sa</i>)	103.4	5.77	102.7
2	4.70	73.0	4.61	72.6
3	4.56	73.2	4.46	72.2
4	4.34	74.4	4.25	73.9
5	4.94	70.9	4.84	70.3
6	1.65 (<i>d</i> , 6.10)	19.0	1.55 (<i>d</i> , 6.2)	18.3

s = señal simple; *d* = señal doble; *sa* = señal simple ancha; *da* = señal doble ancha; *m* = señal múltiple; N/A = no aplicable, empleado debido a la ausencia de señales de protón sobre carbonos cuaternarios

CONCLUSIONES

Se logró el aislamiento y caracterización estructural de dioscina y protodioscina, esta información confirmó que *Solanum tridynamum* Dunal es una especie productora de glicósidos esteroidales de tipo furostano y espirostano.

Es indispensable el uso de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) en fase reversa para el aislamiento y purificación de glicósidos esteroidales.

Este trabajo constituye el primer reporte de glicósidos esteroidales de tipo furostano en *Solanum tridynamum* Dunal.

Es probable que la proporción de tipos de glicósidos esteroidales presentes en las raíces de *Solanum tridynamum* Dunal sea inversa (Furostanos > Espirostanos) a la que presentan otras especies del mismo género.

REFERENCIAS

1. Podolak, I.; Galanty, A.; Sobolewska, D. Saponins as cytotoxic agents: a review. *Phytochem. Rev.* **2010**, *9*, 425-474.
2. Kintia, P. K.; Shvets, S. A. Melongosides N, O and P: steroidal saponins from seeds of *Solanum melongena*. *Phytochemistry* **1985**, *24*, 1567-1569.
3. 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.
4. Kouassi, K. C.; Mamyrbekova-Bekro, J. A.; Boua, B. B.; Bekro, Y. A. HPLC phytochemical analysis and antiproliferative activity of *n*-butanol fraction of *Solanum aethiopicum* L. (Solanaceae) from Côte d'Ivoire. *Res. J. Recent Sci.* **2015**, *4*, 81-87.
5. 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.
6. Novelo Caballero, N. P. Detección e identificación de los componentes mayoritarios de las partes aéreas de *Solanum tridynamum* Dunal. Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, México, agosto 1994.
7. Li, P. M.; Zhong, J. L.; Chen, R. Q.; Zhang, X. K.; Ho, K. L.; Chiu, J. E.; Huang, D. P. Zhi-mu saponin inhibits α -fetoprotein gene expression in developing rat liver. *Int. J. Biochem.* **1989**, *21*, 15-22.
8. Mimaki, Y.; Nakamura, O.; Sashida, Y.; Satomi, Y.; Nishino, A.; Nishino, H. Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium longiflorum* and their antitumour-promoter activity. *Phytochemistry* **1994**, *37*, 227-232.
9. Nakamura, O.; Mimaki, Y.; Nishino, H.; Sashida, Y. Steroidal saponins from the bulbs of *Lilium speciosum* x *L. nobilissimum* "star gazer" and their antitumour-promoter activity. *Phytochemistry* **1994**, *36*, 463-467.
10. Hu, K.; Yao, X. The cytotoxicity of protoneodioscin (NSC-698789), a furostanol saponin from the rhizomes of *Dioscorea collettii* var. *hypoglauca*, against human cancer cells in vitro. *Phytomedicine* **2002**, *9*, 560-565.
11. Zhou, L.B.; Chen, T. H.; Bastow, K. F.; Shibano, M.; Lee, K. H.; Chen, D. F. Filiasparosides A-D, cytotoxic steroidal saponins from the roots of *Asparagus filicinus*. *J. Nat. Prod.* **2007**, *70*, 1263-1267.
12. Inoue, T.; Mimaki, Y.; Sashida, Y.; Nishino, A.; Satomi, Y.; Nishino, H. Steroidal glycosides from *Allium macleanii* and *A. senescens*, and their inhibitory activity on tumour promoted-induced phospholipid metabolism of HeLa cells. *Phytochemistry* **1995**, *40*, 521-525.
13. Hufford, C. D.; Liu, S.; Clark, A. M. Antifungal activity of *Trillium grandiflorum* constituents. *J. Nat. Prod.* **1988**, *51*, 94-98.

14. Shimoyamada, M.; Suzuki, M.; Sonta, H.; Maruyama, M.; Okubo, K. Antifungal activity of the saponin fraction obtained from *Asparagus officinalis* L. and its active principle. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 2553-2557.
15. Grünweller, S.; Schröder, E.; Kesselmeier, J. Biological activities of furostanol saponins from *Nicotiana tabacum*. *Phytochemistry* **1990**, *29*, 2485-2490.
16. Dirsch, V.; Lacaille-Dubois, M. A.; Wagner, H. Dracoside, a new steroidal saponin from *Helleborus purpurascens*. *Nat. Prod. Lett.* **1994**, *4*, 29-33.
17. Dewick, P. M. *Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach*, 3a ed; WILEY: Wiltshire, 2009; 262.
18. Majinda, R. R. T. Extraction and isolation of saponins. In *Methods in molecular biology*. [En línea] **2012**, 415-425.
19. Scognamiglio, M.; Severino, V.; D'Abrosca, B.; Chambery, A.; Fiorentino, A. Structural Elucidation of Saponins: A combined approach based on high-resolution spectroscopic techniques. In *Studies in Natural Products Chemistry*; Rhamman, A., Ed; Elsevier: 2015; 89-96.
20. Knapp, S.; Bohs, L.; Nee, M.; Spooner, D. M. Solanaceae- a model for linking genomics with biodiversity. *Comp. Funct. Genom.* **2004**, *5*, 285-291.
21. Londoño, F.; Cardona, W.; Alzate, F.; Cardona, F.; Vélez, I. D.; Upegui, Y.; Ospina, V.; Muñoz, J. A.; Robledo, S. M. Antiprotozoal activity and cytotoxicity of extracts from *Solanum arboreum* and *S. ovalifolium*. *J. Med. Plants Res.* **2016**, *10*, 100-107.
22. Pacheco Vaz, M.; Costa, E. V.; Santos, E. L.; Bos Mikich, S.; Marques, F. A.; Braga, R. M.; Delarmelina, C.; Duarte, M. C. T.; Ruiz, A. L. T. G.; Souza, V. H. S.; De Carvalho, J. E.; Sales Maia, B. H. L. N. Caavuranamide, a novel steroidal alkaloid from the ripe fruits of *Solanum caavurana* Vell. (Solanaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2012**, *23*, 361-366.
23. Torres, M. C. M.; Jorhe, R. J. B.; Ximenes, R. M.; Alves, N. T. Q.; Santos, J. V. A.; Marinho, A. D.; Monteiro, H. S. A.; Toyama, M. H.; Braz Filho, R.; Silveira, E. R.; Pessoa, O. D. L. Solanidane and iminosolanidane alkaloids from *Solanum campaniforme*. *Phytochemistry* **2013**, *96*, 457-464.
24. Ren, Y.; Zhang, D. W.; Dai, S. J. Chemical constituents from *Solanum lyratum*. *Chin. J. Nat. Med.* **2009**, *7*, 203-205.
25. Devkota, H. P.; Joshi, K. R.; Ozasa, T.; Fukunaga, S.; Yoshida, N.; Yahara, S. Steroidal glycosides from the fruits, aerial parts and tubers of potato (*Solanum tuberosum*). *J. Pharmacogn. Phytochem.* **2015**, *3*, 252-255.
26. Yahara, S.; Uda, N.; Yoshio, E.; Yae, E. Steroidal alkaloid glycosides from tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J. Nat. Prod.* **2004**, *67*, 500-502.
27. Bastarrachea Rey, M. J.; Ferrer Hernández, A.; Calzadilla González, M.; Navarro Frómata, A. E.; Pérez, C. Componentes esteroidales del *Solanum chamaeacanthum* Griseb. Parte II. Chamagenina, una nueva sapogenina esteroidal. *Cienc. Ergo-Sum.* **2000**, *7*, 266-268.
28. Abdel-Sattar, E.; Farag, M. A.; Mahrous, E. A. Chemical constituents from *Solanum glabratum* Dunal var. *sepicula*. *Rec. Nat. Prod.* **2015**, *9*, 94-104.

29. Abdel-Sattar, E.; Shabana, M. M.; El-Mekkawy, S. Protodioscin and pseudoprotodioscin from *Solanum intrusum*. *Res. J. Phytochem.* **2008**, *2*, 100-105.
30. Ferreira, F.; Soulé, S.; Vázquez, A.; Moyna, P.; Kenne, L. Steroid saponins from *Solanum laxum*. *Phytochemistry* **1996**, *42*, 1409-1416.
31. Jajakumar, K.; Murugan, K. Evaluation of major phytochemicals in the leaves and fruits of *Solanum mauritianum* Scop.: a potential herbal drug. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* **2016**, *7*, 58-60.
32. Hoang Le, T. A. Steroidal saponins from *Solanum procumbens* growing in Vietnam. *J. Multidiscip. Eng. Sci. Technol.* **2017**, *4*, 8222-8225.
33. Lu, Y.; Luo, J.; Kong, L. Steroidal alkaloid saponins and steroidal saponins from *Solanum surratense*. *Phytochemistry* **2011**, *72*, 668-673.
34. Abbas, F. A. Steroidal saponins from *Solanum unguiculatum* (A.) Rich. *Sci. Pharm.* **2001**, *69*, 219-234.
35. Orozco, C. I.; Beltrán, C. D.; Porras, N.; Nee, M. Listado de especies espinosas de *Solanum* L. (Leptostemonum, Solanaceae). *Biota Colombiana* **2008**, *9*, 239-249.
36. Sun, J.; Huo, H. X.; Zhang, J.; Huang, Z.; Zheng, J.; Zhang, Q.; Zhao, Y. F.; Li, J.; Tu, P. F. Phenylpropanoid amides from the roots of *Solanum melongena* L. (Solanaceae). *Biochem. Syst. Ecol.* **2015**, *58*, 265-269.
37. Cornelius, M. T. F.; Carvalho, M. G.; Silva, T. M. S.; Alves, C. C. F.; Siston, A. P. N.; Alves, K. Z.; Sant'Anna, C. M. R.; Neto, M. B.; Eberlin, M. N.; Braz Filho, R. Other chemical constituents isolated from *Solanum crinitum* Lam. (Solanaceae). *J. Braz. Chem. Soc.* **2010**, *21*, 2211-2219.
38. Zadra, M.; Piana, M.; Brum, T. F.; Boligon, A. A.; Freitas, R. B.; Machado, M. M.; Stefanello, S. T.; Antunes Soares, F. A.; Athayde, M. L. Antioxidant activity and phytochemical composition of the leaves of *Solanum guaraniticum* A. St.-Hil. *Molecules* **2012**, *17*, 12560-12574.
39. Putalun, W.; Xuan, L. J.; Tanaka, H.; Shoyama, Y. Solakhasoside, a novel steroidal saponin from *Solanum khasianum*. *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 181-183.
40. Manase, M. J.; Mitaine-Offer, A. C.; Pertuit, D.; Miyamoto, T.; Tanaka, C.; Delemasure, S.; Dutartre, P.; Mirjolet, J. F.; Duchamp, O.; Lacaille-Dubois, M. A. *Solanum incanum* and *Solanum heteracanthum* as sources of biologically active steroid glycosides: confirmation of their synonymy. *Fitoterapia* **2012**, *83*, 1115-1119.
41. Yahara, S.; Nakamura, T.; Someya, Y.; Matsumoto, T.; Yamashita, T.; Nohara, T. Steroidal glycosides, indiosides A-E, from *Solanum indicum*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 1319-1323.
42. Dougnon, T. V.; Bankolé, H. S.; Johnson, R. C.; Klotoé, J. R.; Dougnon, G.; Gbaguidi, F.; Assogba, F.; Gbénou, J.; Sahidou, S.; Atègbo, J. M.; Rihn, B. H.; Loko, F.; Boko, M.; Edoth, A. P. Phytochemical screening, nutritional and toxicological analyses of leaves and fruits of *Solanum macrocarpon* Linn (Solanaceae) in Cotonou (Benin). *Food Nutr. Sci.* **2012**, *3*, 1595-1603.

43. Vieira Jr., G. M.; Quintino da Rocha, C.; De Souza Rodrigues, T.; Hiruma-Lima, C. A.; Vilegas, W. New steroidal saponins and antiulcer activity from *Solanum paniculatum* L. *Food Chem.* **2015**, *186*, 160-167.
44. Ferro, E. A.; Alvarenga, N. L.; Ibarrola, D. A.; Helli6n-Ibarrola, M. C.; Ravelo, A. G. A new steroidal saponin from *Solanum sisymbriifolium* roots. *Fitoterapia* **2005**, *76*, 577-579.
45. P6rez Colmenares, A.; Rojas, L. B.; Mitaine-Offer, A. C.; Pouys6gu, L.; Quideau, S.; Miyamoto, T.; Tanaka, C.; Paululat, T.; Usubillaga, A.; Lacaille-Dubois, M. A. Steroidal saponins from the fruits of *Solanum torvum*. *Phytochemistry* **2013**, *86*, 137-143.
46. Malezas de M6xico. CONABIO. *Solanum tridynamum* Dunal. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/solanaceae/solanum-tridynamum/fichas/ficha.htm> (consultado en septiembre 2017).
47. Berenjena. Naturalista. <http://www.naturalista.mx/taxa/281010-Solanum-tridynamum> (consultado en septiembre 2017).
48. Flora de la pen6nsula de Yucat6n. *Solanum tridynamum*. http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=2210 (consultado en septiembre 2017).
49. Yetman, D.; Van Devender, T. R. *Mayo Ethnobotany: Land, History, and Traditional Knowledge in Northwest Mexico*, 1a ed.; University of California Press: Los 6ngeles, 2002; 260-261.
50. Yetman, D. *The Guarijos of the Sierra Madre: hidden people of northwestern Mexico*, 1a ed.; UNM Press: Albuquerque, 2002; 226.
51. Arellano Rodr6guez, J. A.; Flores Guido, J. S.; Tun Garrido, J.; Cruz Boj6rquez, M. M. *Etnoflora Yucatanense. Fasc6culo 20. Nomenclatura, forma de vida, uso, manejo y distribuci6n de las especies de la Pen6nsula de Yucat6n*; Editorial de la Universidad Aut6noma de Yucat6n: M6rida, 2003; 571.
52. BADEPY, Banco de Datos Etnobot6nicos de la Pen6nsula de Yucat6n; Instituto Nacional de Investigaciones sobre Recursos Bi6ticos: M6xico, 1987 en Mena Rej6n, G. M. Estudio sobre algunas plantas reportadas en la medicina tradicional maya, como antidiab6ticas. Tesis de licenciatura, Universidad Aut6noma de Yucat6n, M6rida, M6xico, octubre 1989.
53. Cuevas, B. *Plantas medicinales de Yucat6n*; Imprenta y Linotipia de la Universidad de Yucat6n: M6xico, 1913 en Mena Rej6n, G. M. Estudio sobre algunas plantas reportadas en la medicina tradicional maya, como antidiab6ticas. Tesis de licenciatura, Universidad Aut6noma de Yucat6n, M6rida, M6xico, octubre 1989.
54. Rosado Aguilar, J. A.; Aguilar Caballero, A. J.; Rodr6guez Vivas, R. I.; Borges Arg6ez, R.; Garc6a V6zquez, Z.; M6ndez Gonz6lez, M. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae) by larval immersion test. *Trop. Subtrop. Agroecosyst.* **2010**, *12*, 417-422.

55. Oyama, M.; Tokiwano, T.; Kawaii, S.; Yoshida, Y.; Mizuno, K.; Oh, K.; Yoshizawa, Y. Protodioscin, isolated from the rhizome of *Dioscorea tokoro* collected in northern Japan is the major antiproliferative compound to HL-60 leukemic cells. *Curr. Bioact. Compd.* **2017**, *13*, 170-174.
56. Wang, M.; Tadmor, Y.; Wu, Q.; Chin, C.; Garrison, S. A.; Simon, J. E. *J. Agric. Food Chem.* **2003**, *51*, 6132-6136.
57. Kawasaki, T.; Komori T.; Miyahara, K.; Nohara, T.; Hosokawa, I.; Mihashi, K. M., *Chem. Pharm. Bull.* **1974**, *22*, 2164-2175.
58. Ahmad, V. U.; Basha, A. *Spectroscopic Data of Steroid Glycosides: Stigmastanes, Spirostanes, Bufanolides, Cardenolides. Volume 3*; 2006; 1411.
59. Marker, R. E.; T. Tsukamoto, T.; Turner, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* **1940**, *62*, 2525-2532.

the fact that the \mathbb{Z}_2 -action is not free, and that the quotient space is not a manifold. The quotient space is a orbifold, and the orbifold structure is essential for the definition of the orbifold fundamental group.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.

Let X be a topological space, and let G be a group. The G -action on X is called a G -space. The quotient space X/G is called the orbit space. The orbit space X/G is a topological space, and the quotient map $\pi: X \rightarrow X/G$ is a continuous map.