

ESTUDIO DE LOS COMPONENTES ESTEROIDALES MAYORITARIOS PRESENTES EN CALLOS DE *SOLANUM MAMMOSUM*

R. Orozco, I. Pérez, K. Agüero y T. Romay

Departamento de Metabolitos Secundarios, Centro Nacional de Investigaciones Científicas, Ciudad de La Habana, Cuba

Recibido: 12 de septiembre de 1986

ABSTRACT. From *Solanum mammosum* callus five compounds were isolated. They were identified as stigmasterol, campesterol, beta sitosterol, diosgenin and solasodine.

RESUMEN. De los callos de *Solanum mammosum* se aislaron cinco compuestos esteroideos, los que fueron identificados como: estigmasterol, campesterol, beta-sitosterol, diosgenina y solasodina.

INTRODUCCIÓN

Los esteroides constituyen un grupo de sustancias estructuralmente afines que se encuentran ampliamente distribuidos en animales y plantas¹. En el reino vegetal los esteroides más comunes son los fitosteroles, las sapogeninas esteroideas, los glicósidos cardiotónicos y los alcaloides esteroideos.

La diosgenina (una sapogenina esteroideal) ha sido el compuesto de partida por excelencia para la obtención de drogas esteroideas de uso médico.

Debido a las crecientes demandas de la industria farmacéutica se han buscado nuevas fuentes de precursores esteroideos que puedan ser transformados en compuestos de interés médico, de ahí, el inicio del estudio de plantas pertenecientes a la familia *Solanaceae* con el fin de obtener, fundamentalmente, la solasodina. Este alcaloide de tipo esteroideal puede servir de material de partida para la obtención de diversas hormonas esteroideas².

Si bien, las plantas constituyen la fuente más rica de sustancias medicinales, en los últimos años se han desarrollado las técnicas de cultivo de tejidos basadas en la factibilidad de cultivar *in vitro* las células vegetales. Es así como se informa en la literatura acerca de la biosíntesis de la diosgenina y solasodina mediante el cultivo de tejidos de especies de *Solanum*^{3,4}.

El objetivo del presente trabajo consistió en realzar la caracterización química de los componentes esteroideos mayoritarios presentes en callos de *Solanum mammosum*. Esta planta crece en Cuba así como, en otros países. (Puerto Rico, Jamaica, Santo Domingo y en la América Tropical Continental)⁷.

El estudio fitoquímico de las hojas de esta especie culminó con el aislamiento de la solasodina⁸. De los frutos se aislaron e identificaron: diosgenina, solasodina y 16-dehidropregnenolona¹⁰.

En la literatura sólo aparece un artículo referente

a la producción de solasodina por cultivo de células "in vitro" de *Solanum mammosum*¹¹.

PARTE EXPERIMENTAL

Iniciación y condiciones de cultivo. El material vegetal utilizado en este estudio se obtuvo mediante germinación *in vitro* de semillas de *Solanum mammosum*, las cuales fueron germinadas en algodón húmedo empleando placas petri y condiciones asépticas. La incubación se realizó a 25 °C, con una intensidad luminosa de aproximadamente 500 lx y un fotoperíodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad. Las plántulas obtenidas se despojaron de sus raíces y se colocaron en un medio que contenía las sales y vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog)¹² suplementado con agua de coco al 10 %. Al cabo de 30 d bajo estas condiciones, las plantas fueron analizadas y observado su estado. Las ya vigorosas y nuevamente enraizadas que contenían gran número de yemas y de hojas, fueron cortadas en segmentos de aproximadamente 4 cm de longitud que contenían de 1 a 3 yemas.

Las yemas se cultivaron en el medio antes mencionado hasta desarrollar plantas. A los 30 d se cortaron las hojas para ser utilizadas en la iniciación de los callos empleando el medio descrito en la Tabla I y condiciones de cultivo de oscuridad total y a 25 °C. Los callos fueron cultivados durante tres meses, se efectuaron pases a medio fresco cada 30 d. Al finalizar el periodo de cultivo éstos fueron cosechados y procesados químicamente para determinar su contenido en compuestos esteroideos.

Análisis químico

Cromatografía de gas-líquido. Se utilizó un cromatógrafo Chrom 5 de fabricación checoslovaca con un detector FID y una columna de vidrio de 2 m empacada con OV-17 al 3 % sobre Chromosorb G AW-DMCS 80 a 100 mesh. Se empleó un flujo de argón

de 30 mL/min; la temperatura del inyector fue de 260 °C y la del detector 280 °C. Se empleó el programa siguiente: 210 a 250 °C (3 °C/min) y 250 a 285 °C (5 °C/min).

TABLA I
Composición del medio de cultivo

Compuesto	Concentración (mg/L)	Compuesto	Concentración (mg/L)
NH ₄ NO ₃	600,3	ácido nicotínico	3,693 3
KNO ₃	1 263,8	piridoxina HCl	0,925 3
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	195,01	tiamina HCl	7,083 0
KCl	141,64	biotina	0,146 5
CaCl ₂ ·2H ₂ O	220,53	ácido fólico	0,602 1
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246,47	pentotenato de calcio	1,429 5
H ₃ BO ₃	1,85	riboflavina	2,070 0
MnSO ₄ ·4H ₂ O	6,581 8	ácido ascórbico	0,968 6
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	4,313	cloruro de colina	0,767 8
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,013 7	cisteína HCl	14,186
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,013 3	glicina	2,064 4
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,071 3	sacarosa	35 000,0
KI	0,249 0	2,4 D	2,5
FeSO ₄ ·7H ₂ O	8,340 9	kinetina	0,3
NaEDTA·2H ₂ O	11,167 5		
inositol	81,072 0		

El pH del medio fue ajustado a 5,8 con NaOH 1 mol/L

Extracción. Los callos se secaron en una estufa con ventilación de aire a 60 °C durante 48 h. El material vegetal seco (25,86 g) se extrajo con EtOH a reflujo durante 90 min por dos veces. Las soluciones etanólicas se unieron y evaporaron al vacío; el residuo obtenido (4,7 g) fue sometido a un proceso de hidrólisis (EtOH:HCl 3 mol/L; 1:1) durante 2½ h; se empleó una relación de 30 mL de reactivo de hidrólisis por gramo de crudo total. Una vez concluido este proceso se añadió igual volumen de agua helada, se alcalinizó con NH₄OH (pH 8 a 9), se extrajo con CHCl₃:MeOH 95:5, se evaporó al vacío y se obtuvo un crudo de 0,420 g.

Aislamiento y purificación. El extracto crudo (0,420 g) se purificó mediante cromatografía de columna empleando SiO₂ como adsorbente y como solvente de evolución éter de petróleo con concentraciones crecientes de AcEt. Se colectaron fracciones de 15 mL que fueron agrupadas acorde a su composición.

Las fracciones (10 a 25) que fueron eluidas con éter de petróleo: AcEt; 9:1 se agruparon y constituyeron la fracción A (0,090 g). Las fracciones (36 a 51) que fueron eluidas con éter de petróleo: AcEt; 8:2 se reunieron y se denominaron fracción B (0,070 g).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Análisis de la fracción A. La cromatografía de capa delgada (CCD) al emplear como sistema de evolución C₆H₆:Et₂O; 8:2 (Rf 0,33) reveló la presencia de una mancha que presentó similar Rf al de una muestra

compuesta por estigmasterol, campesterol y beta sitosterol. Al ser analizada esta fracción por cromatografía de gases se observó la presencia de tres compuestos que presentaron un tiempo de retención similar al de muestras auténticas de campesterol, estigmasterol y beta sitosterol. Se realizaron curvas de calibración de estos compuestos por separado con vistas a realizar el análisis cuantitativo.

Análisis de la fracción B. La CCD empleando como sistema de evolución éter de petróleo: C₆H₆; 7:3 (primera corrida) y C₆H₆:Et₂O; 2:3 (segunda corrida) mostró la presencia de dos compuestos mayoritarios que fueron separados por cromatografía de capa preparativa (CCP) utilizando como sistema de evolución el descrito para la CCD. Las capas preparativas mostraron dos zonas mayoritarias. La extracción de la banda de mayor Rf rindió 5,1 mg de un compuesto que presentó un p.f. = 204 a 205 °C, similar al de una muestra auténtica de diosgenina. El espectro de masas de esta sustancia presentó el ion molecular a m/z 414 y picos intensos a m/z 399; 396; 355; 345; 342; 300; 285; 282; 271; 267; 235 y 115. Al comparar este espectro con el de una muestra auténtica de diosgenina se observó coincidencia entre ambos.

La elución de la banda de menor Rf rindió un compuesto puro (10,3 mg) que cristalizó de metanol y que presentó un punto de fusión (200 a 201 °C) similar al de la solasodina. Su espectro de masas con el ion molecular a m/z 413 y picos intensos a m/z 138; 125; 114 y 113 resultó similar al de una muestra auténtica de solasodina lo que evidenció la presencia de este compuesto en los callos de *Solanum mammosum*.

Como se aprecia los callos de *Solanum mammosum* son capaces de producir diosgenina y solasodina. En estas experiencias no se detectó la presencia de la 16-dehidropregnenolona. Si bien los rendimientos de estos compuestos son inferiores a los obtenidos a partir de los frutos¹⁰, en cambio, son comparables a los obtenidos por cultivo de tejidos a partir de otras especies de *Solanum*^{4, 5, 13}.

En la Tabla II se presentan los compuestos aislados e identificados en los callos de *Solanum mammosum* y el rendimiento de estos compuestos referidos a peso de callo seco.

TABLA II

Compuestos identificados en callos de *Solanum mammosum*

Compuesto	Peso obtenido (mg)	Rendimiento (mg/g)
beta sitosterol	35,4	1,36
campesterol	28,1	1,08
estigmasterol	15,2	0,58
diosgenina	5,1	0,19
solasodina	10,3	0,39

Los rendimientos se refieren a peso de callo seco

CONCLUSIONES

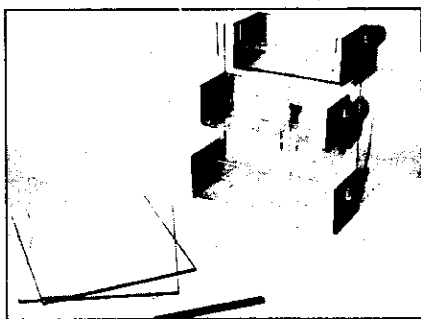
Mediante el cultivo de tejidos de la especie *Solanum mammosum* se obtuvieron diversos compuestos esteroideos: beta sitosterol, campesterol, estigmasterol, diosgenina y solasodina.

Se informa por primera vez la producción de diosgenina por cultivo de tejidos de la especie *Solanum mammosum*.

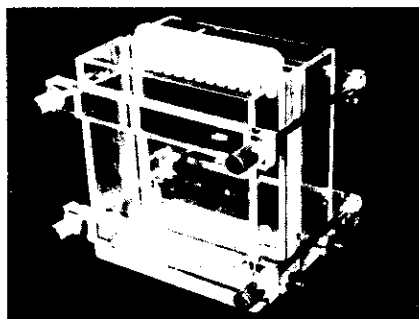
BIBLIOGRAFÍA

1. Finar I. L. Química Orgánica II. Editorial Alhambra S. A., España, 508, 1970.
2. Ripperger H. and Schreiber K. The Alkaloids, Vol. XIX, 82, Academic Press, New York-London, 1981.
3. Khanna P., Uddin A., Sharma G., Manot S. and Rathore A. *Indian of Experimental Biology*, XIX, 694, 1976.
4. Hosada N., Ico H. and Yatazawa M. *Agric Biol. Chem.* 43, 1745, 1979.
5. Chandler S. and Dodds J. *Plant Cell. Report* 2, 69, 1983.
6. Jain S. C. and Sahoo S. L. *Agric Biol. Chem.*, 45, 2909, 1981.
7. Roig J. T. Plantas Medicinales Aromáticas y Venenosas de Cuba. 30 Editorial Ciencia y Técnica 2da Ed., La Habana, 1974.
8. Bite P., Shabana M. M., Jokay L. and Pangracz-Sterk L. *Acta Chim. Acad. Sci. Hung.* 63, 343, 1970.
9. Sulcorp C. *Arch. Pharm. Ber. Dtsh. Pharm.*, 301, 111, 1968.
10. Palomino Z. Tesis de Diploma, Universidad de La Habana, 1977.
11. Soria E. L., Espinoza N. y Zapata A. J. *Bol. Soc. Quim. Perú* 44, 30, 1978.
12. Murashige T. and Skoog F. *Physiol. Plantarum* 15, 473, 1962.
13. Heble M. R., Narayanaswam S. and Chadh M. *S. Science* 161, 1145, 1968.

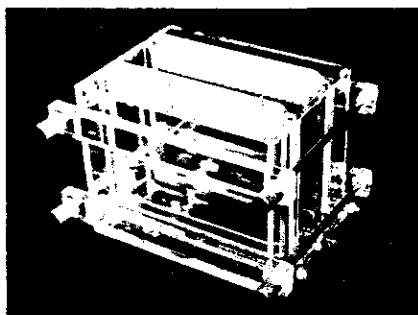
para Electroforesis for Electrophoresis



1. 1SV MODELO DE STUDIER



2. 2SV CUBETA SIMPLE



3. 3SV CUBETA DOBLE

SISTEMA
DE ELECTROFORESIS
VERTICAL

EXPORTADO POR: *mediCuba*
EXPORTED BY:

PRODUCIDO POR:
PRODUCED BY:

