

Extracción y cuantificación del alcaloide esteroideal solasodina, de los frutos del *Solanum wrightii* Benth y el *Solanum pseudocapsicum* L

Extraction and quantification of steroidal alkaloid solasodine from fruits of *Solanum wrightii* Benth and *Solanum pseudocapsicum*

COLCIENCIAS TIPO 1. ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA Y TECNOLÓGICA

RECIBIDO: AGOSTO 21, 2012; ACEPTADO: SEPTIEMBRE 16, 2012

Jorge E. Castillo

jorgcjeca@hotmail.com

Isabel C. Hurtado

Isabelhurtado84@yahoo.com

Alexander Chamorro

alexcham83@yahoo.com

Universidad Santiago de Cali

Resumen

Se recolectaron frutos del *Solanum wrightii* Benth y el *Solanum pseudocapsicum* L con el fin de implementar un proceso para la extracción, purificación, identificación y cuantificación de la solasodina presente en ellos. El proceso inicial se basó en la publicación de Sanabria (1980), con un proceso de secado, molienda y desengrase, seguido de una extracción sólido-líquido con etanol al 95%, en reflujo. Se continuó con el procedimiento descrito por Mola, de Araujo y de Magalhães (1997); los extractos recuperados se concentraron a presión reducida, obteniendo una pasta semisólida que fue disuelta en una solución de HCL 0.5 M, seguido de una precipitación de los glucoalcaloides mediante la adición de solución de NaOH 6.0 M; estos se sometieron a hidrólisis ácida en una mezcla de etanol al 95% y HCl 3.0 M, durante cuatro horas. Se precipitó un sólido grisáceo que se separó por centrifugación y se purificó en cromatografía de columna (CC), según el procedimiento descrito por Pinell, Sauvain y Cuevas (1998); se logró separar un compuesto con punto de fusión de 202°C, que corresponde al de la solasodina estándar. Para confirmar el compuesto se realizaron pruebas de identificación de alcaloides, cromatografía de capa fina (CCF), cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) e identificación por espectroscopia infrarroja. La cuantificación de la solasodina se realizó por HPLC, por el método de patrón externo mediante una curva de calibración con patrones desde 15 ppm hasta 50 ppm. La solasodina obtenida presentó una coloración amarilla y un rendimiento de 0.074% en base seca. El procedimiento se repitió para los frutos del *S. pseudocapsicum* L. Sin embargo, en la etapa de purificación por CC no se logró una separación óptima de los compuestos alcaloidales presentes y no fue posible obtener solasodina.

Palabras Clave

Solanáceas; *Solanum wrightii* Benth; *Solanum pseudocapsicum* L; Solasodina; glucoalcaloides; alcaloide esteroideal.

Abstract

Solanaceae family of the genus *Solanum*, found the species *Solanum wrightii* Benth and *Solanum pseudocapsicum* L, which are the subject of this investigation, in order to implement a process for the extraction, purification, identification and quantification of solasodine present in the fruits of these plants. The fruits of *Solanum wrightii* Benth and *Solanum pseudocapsicum* L were collected in the Santiago de Cali and Popayan Cities respectively. The initial part of the extraction process, was based a Sanabria (1980) publication, to drying process, grinding and degreasing followed by a solid-liquid extraction with 95% ethanol under reflux. Subsequently continued the procedure described by Mola, de Araujo y de Magalhães (1997), where the recovered extracts were concentrated under reduced pressure, obtaining a paste semisolid, which was dissolved in a solution of 0.5 M HCL, followed by precipitation of glycoalkaloids by adding 6.0 M NaOH solution, they were subjected to acid hydrolysis in a mixture of 95% ethanol and 3.0 M HCl for 4 hours. A gray solid was precipitated which was separated by centrifugation and was purified on column chromatography according to the procedure described by Pinell, Sauvain y Cuevas (1998), is able to separate a compound with melting point of 202°C, corresponding to the melting point of standard solasodine. For confirmation of the compound was carried out identification tests for alkaloids, thin layer chromatography (CC), liquid high efficiency chromatography (HPLC) and identification by infrared spectroscopy (IR). Quantification of solasodine was performed by HPLC by the external standard method using a calibration curve with patterns from 15 ppm to 50 ppm. The solasodine obtained showed a yellow and a yield of 0.074% on dry basis. The procedure for extraction and purification of solasodine was repeated for the fruits of *S. pseudocapsicum* L. however, it was not possible to obtain solasodine as in the purification step by column chromatography, was not achieved an optimum separation of the compounds alkaloids present.

Keywords

Solanaceae, *Solanum wrightii* Benth, *Solanum pseudocapsicum* L, Solasodine, glycoalkaloids, Steroidal alkaloid.

I. INTRODUCCIÓN

Las plantas son una fuente inagotable de compuestos químicos y complejas sustancias activas. Esto es algo conocido y explotado por el hombre desde hace muchos años. Gracias a la importante biodiversidad del planeta, el aprovechamiento de estos recursos cada vez adquiere mayor protagonismo y divulgación. La biodiversidad es un tema importante y complejo que abarca desde la variabilidad genética de especies, poblaciones, comunidades y ecosistemas, hasta el conocimiento de las relaciones que se establecen entre los seres humanos y la naturaleza. El desconocimiento taxonómico, es uno de los principales obstáculos para su conservación y utilización sostenible (Chaparro, 2010).

Esta investigación identificó y cuantificó el alcaloide esterooidal solasodina de los frutos de las plantas *Solanum wrightii* Benth y *Solanum pseudocapsicum* L. perteneciente a la familia *Solanaceae*. A esta familia pertenecen numerosas plantas útiles como la papa (*Solanum tuberosum*), el tomate (*Lycopersicon esculentum*), el tabaco (*Nicotiana tabacum*), el ají (*Capsicum* spp.), el tomate de árbol (*Cyphomandra betacea*), la berenjena (*Solanum melongena*) y el lulo (*Solanum quitoense*). Por su contenido de alcaloides se destacan la belladona, el estramonio, el beleño y la mandrágora, entre otras.

La importancia de las plantas pertenecientes a este género radica en los alcaloides esteroideos que se pueden aislar, que son sustancias que sirven de materia prima para la síntesis de diferentes tipos de hormonas y compuestos esteroideos, como: la progesterona, la testosterona, la hidrocortisona, la cortisona, los andrógenos y estrógenos, la prednisona y la prednisolona (Indrayanto, Syahrani, Sondakh, & Santosa, 1996).

Actualmente, el consumo anual a nivel mundial de esteroides, como diosgenina, es de varios miles de toneladas; su demanda se encuentra en continuo crecimiento y no logra ser satisfecha.

II. METODOLOGÍA

A. Tratamiento del material vegetal

Los frutos de *S. wrightii* Benth se colectan en el departamento del Valle del Cauca, en el municipio de Santiago de Cali, a una altura de 699.3 msnm; los frutos del *S. pseudocapsicum* L se colectan en el departamento del Cauca, en el municipio de Popayán, a una altura de 1737 msnm.

La clasificación taxonómica de las plantas se realiza en el Herbario CUVC de la *Universidad del Valle* donde se encuentran los ejemplares No. COL: 26796 de *Solanum pseudocapsicum* L. y No. COL: 12382 de *Solanum wrightii* Benth.

Los frutos colectados se cortan, se secan en un horno a una temperatura de 55°C durante 72 horas, se pesan y se someten a un proceso de molienda en un molino de discos, hasta alcanzar una granulometría homogénea. El material seco y molido se desengrasa durante siete horas, utilizando éter de petróleo en un extractor tipo *Soxhlet* con capacidad de 250 g.

B. Extracción etanólica de glucoalcaloides

Se realiza una extracción sólido-líquido utilizando 50 g de material seco, molido y desengrasado, con 600 mL de etanol al 95% (Sanabria, 1980). La extracción se realiza en un sistema de reflujo, durante seis horas, con agitación constante y a temperatura de ebullición (78°C). Posteriormente, se filtra la muestra en caliente y se repite el proceso de extracción dos veces más, realizando la prueba de *Dragendorff y Mayer* a cada uno de los extractos obtenidos; se mezclan los extractos y se filtran nuevamente al vacío. El extracto hidroalcohólico obtenido se concentra por destilación al vacío a una temperatura de ebullición de 58°C, hasta obtener un extracto concentrado semisólido.

C. Hidrólisis de glucoalcaloides

Se adiciona un volumen de 66 mL de HCl 0.5 M; luego se realiza una etapa de desengrase, adicionando 15 mL de tolueno y colocando en reflujo a 65 °C, durante 30 minutos; se repite el procedimiento dos veces más, descartando las porciones de tolueno. Se adiciona a la mezcla resultante, una solución de NaOH 6.0 M hasta alcanzar un pH de 10.0 y se lleva a refrigeración hasta alcanzar 15 °C, dejando la muestra en reposo durante 60 minutos.

Los glucoalcaloides crudos se separan por centrifugación a 10.000 rpm durante diez minutos y se secan en horno a 65°C, durante tres horas. Posteriormente se pesa el sólido obtenido y se realizan pruebas de *Dragendorff y Mayer*.

Para la hidrólisis de los glucoalcaloides se adiciona 15 mL de etanol al 95% y 15 mL de solución de HCl 3.0 M por cada 1.0 g de glucósidos crudos y se lleva a reflujo a una temperatura de 79°C durante cuatro horas.

Posteriormente, se adiciona suficiente cantidad de solución de NaOH 6.0 M hasta ajustar el pH a 10.0 y se lleva nuevamente a reflujo durante treinta minutos. Se refrigera a una temperatura de 10 °C y se deja reposar 24 horas.

Se separa el precipitado por centrifugación a 10.000rpm durante diez minutos y se seca en horno a 65°C durante tres horas. El precipitado se pesa y se recristaliza en tolueno, (10 mL de tolueno por cada 1.0 g de alcaloides crudos), se coloca en reflujo durante veinte minutos y se refrigera a 1.0 °C durante dos horas. Posteriormente se centrifuga a 10.000 rpm durante diez minutos, se filtra al vacío, se pesa y se mide el punto de fusión.

Las etapas descritas en la Figura 1 para la extracción y purificación de los glucoalcaloides se repiten utilizando los frutos del *S. pseudocapsicum* L. El sólido obtenido al final del proceso, se pesa, y se mide su punto de fusión.

D. Purificación de la solasodina por cromatografía de columna (CC)

Para la purificación de la solasodina se realiza cromatografía de columna al compuesto aislado de los frutos de *Solanum wrightii* Benth y *Solanum pseudocapsicum* L, utilizando sílica gel (MERCK 60), como fase estacionaria, la cual se empaca utilizando como eluyente una mezcla de CHCl₃:MeOH (19:1), según la metodología descrita por Pinell, Sauvain y Cuevas (1998). Se deben separar todas las fracciones mediante seguimiento con cromatografía de capa fina, agrupando aquellas fracciones que presenten igual R_f. Se evapora el solvente, se pesa la muestra obtenida y se mide el punto de fusión.

E. Identificación por cromatografía de capa fina (CCF)

Para la identificación de la solasodina en los compuestos aislados, se realiza cromatografía de capa fina, utilizando una placa en sílica gel (MERCK 60), con eluyente CHCl₃:MeOH (4:1), revelado con H₂SO₄ 50% a 90°C por tres minutos (Pinell et al., 1998). Con el mismo método se realiza cromatografía de capa fina a la solasodina estándar del Laboratorio Santa Cruz Biotechnology, para determinar su R_f y compararlo con los R_f obtenidos de los compuestos aislados.

F. Identificación por infrarrojo

Los espectros infrarrojo del estándar de solasodina de Santa Cruz Biotechnology y de la muestra extraída de los frutos del *Solanum wrightii* Benth, se realizan en pastillas de KBr, en un espectrofotómetro Affinity de Shimadzu Ftir.

G. Identificación y cuantificación por HPLC

En la identificación y cuantificación de la Solasodina por HPLC se utiliza un equipo Waters 1525 Binary HPLC Pump provisto del Software Breeze versión 2. Las condiciones cromatográficas para la evaluación son las siguientes: Columna μ -Bondapak C 18 de 10 μ m 125A, 150 x 3.9 mm, eluyente Isopropanol:Metanol (70:30), flujo de 1.0 mL/min, utilizando un detector Waters 2489 UV / Visible a 205 nm, con un volumen de inyección de 25 μ L para cada muestra y utilizando un filtro de 0.45 μ m. Las muestras aisladas se preparan a una concentración de 40 ppm y los patrones de solasodina se preparan a concentraciones de 15, 20, 30, 40, 50 ppm utilizando etanol al 98%, realizando inyecciones por triplicado. La cuantificación de solasodina se lleva a cabo por el método de patrón externo, mediante una curva de calibración; luego se inyecta una muestra de 40 ppm procedente de los frutos del *Solanum wrightii* Benth y se interpolan la áreas para determinar la pureza de la solasodina. En las Figuras 1 y 2 se observa la metodología propuesta.

Figura 1. Proceso de obtención de glucoalcaloides crudos a partir de los frutos del *S. wrightii* y el *S. pseudocapsicum* L

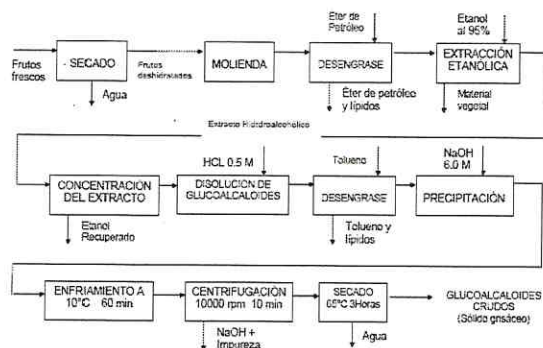
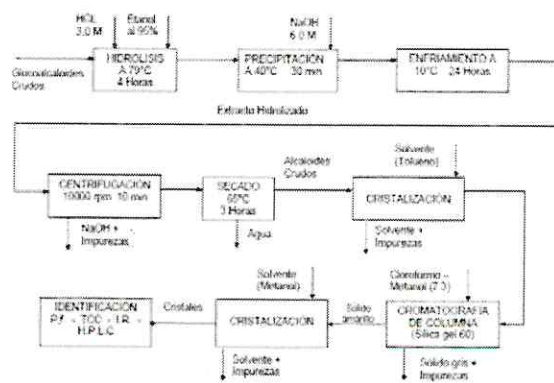


Figura 2. Proceso de obtención de solasodina a partir de los glucoalcaloides crudos de los frutos de *S. wrightii* y del *S. pseudocapsicum*



III. RESULTADOS Y ANÁLISIS

Se realizaron diferentes ensayos para la extracción e hidrólisis de los glucoalcaloides presentes en los frutos del *Solanum wrightii* Benth, hasta obtener el método exitoso y replicarlo con los frutos del *Solanum pseudocapsicum* L.

Después de realizar el procedimiento de extracción de glucoalcaloides descrito en la Figura 1, se obtuvieron dos compuestos de coloración gris provenientes de los frutos del *Solanum wrightii* Benth y *Solanum pseudocapsicum* L, los cuales fueron sometidos a una etapa de hidrólisis ácida, para romper el enlace glucosídico y obtener así los alcaloides en su estado puro (Figura 2).

Después de la hidrólisis se recuperaron dos compuestos sólidos que conservaron la coloración grisácea; se observó una disminución de 35°C en el punto de fusión para el compuesto hidrolizado de los frutos del *Solanum wrightii* Benth; para el compuesto hidrolizado de los frutos del *S.pseudocapsicum* L, el punto de fusión disminuyó en 8°C.

Para la purificación de la solasodina presente en los compuestos hidrolizados se realizó cromatografía de columna con seguimiento en cromatografía de capa fina, según el método propuesto por Pinell et al. (1998). En el compuesto hidrolizado de los frutos del *Solanum wrightii* Benth, se logró separar dos fracciones a las cuales se les evaporó el solvente, quedando un compuesto de color gris y otro compuesto de color amarillo; a estos se les midió su punto de fusión, y se observó que el compuesto de color amarillo presentó un punto de fusión igual al reportado en la literatura para la solasodina (Tabla 1).

Al realizar cromatografía de capa fina al compuesto de coloración gris, se observaron cuatro manchas que no se separaron satisfactoriamente –impidiendo la lectura de sus Rf–; este compuesto se descarta como impureza. Al realizar cromatografía de capa fina al compuesto de color amarillo, se presentó una gran mancha de color rosado con Rf de 0.52 y una pequeña mancha con Rf de 0.68. Este compuesto fue sometido a una segunda cristalización en metanol, para retirar las impurezas restantes. Finalmente se recuperó 0.048 g de cristales purificados del alcaloide proveniente de los frutos del *Solanum wrightii* Benth.

La purificación de la solasodina presente en el compuesto hidrolizado de los frutos de *S. pseudocapsicum* L, se realizó con el mismo método de cromatografía de columna, pero no se logró una separación óptima de los compuestos alcaloidales presentes, ya que se produjeron múltiples fracciones que, al ser sometidas a cromatografía

de capa fina, revelaban diferentes manchas que eran arrastradas por el eluyente, impidiendo la determinación de sus Rf, indicando que los frutos del *S. pseudocapsicum* L tienen un alto contenido de alcaloides, pero que no se pueden separar ni purificar con el método propuesto.

En la Tabla 1 se observan los resultados de las pruebas cualitativas realizadas al compuesto aislado de los frutos del *Solanum wrightii* Benth y a la solasodina estándar del laboratorio Santa Cruz, que coinciden en el punto de fusión y en el Rf.

Tabla 1. Pruebas cualitativas de identificación de solasodina

Prueba	Compuesto	Alcaloide purificado	Solasodina estándar
Cromatografía capa fina (Rf)		0,52/0.68	0,52
Punto de fusión (°C)		202	202

A. Pruebas espectroscópicas de identificación de la solasodina

El compuesto obtenido se sometió a análisis por infrarrojo; al comparar los espectros del estándar de solasodina y la muestra, se observaron las absorciones en las frecuencias esperadas de acuerdo a lo reportado en la literatura presentada por Conley (1992). Sin embargo, las bandas características en el espectro de la muestra obtenida (Figura 4), presentan una mayor intensidad y son más agudas que las bandas presentadas en el espectro del estándar (Figura 3).

Figura 3. Espectro IR de la solasodina estándar Laboratorio Santa Cruz

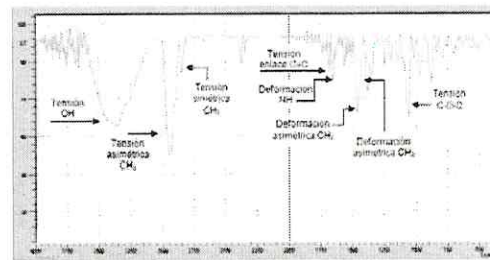
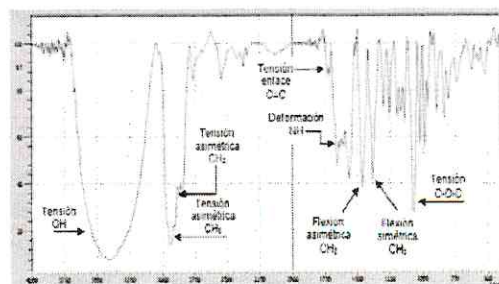


Figura 4. Espectro IR de la solasodina extraída de los frutos del *Solanum wrightii* Benth



B. Análisis cromatográfico y cuantificación por HPLC de la solasodina

El compuesto fue analizado por cromatografía de HPLC, obteniendo una separación óptima de los compuestos; además, se obtuvo un pico bien definido con un tiempo de retención (TR) de 2.701 minutos (Figura 5), similar al tiempo de retención obtenido de la muestra estándar de solasodina, que presentó un TR de 2.743 (Figura 6).

Figura 5. Cromatograma solasodina extraída de los frutos del *Solanum wrightii* Benth

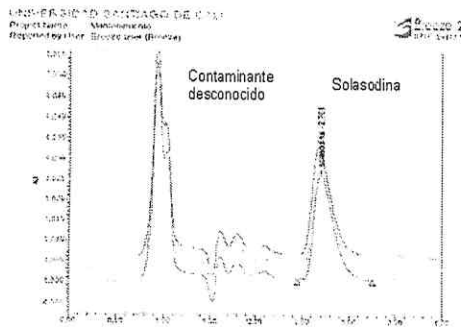
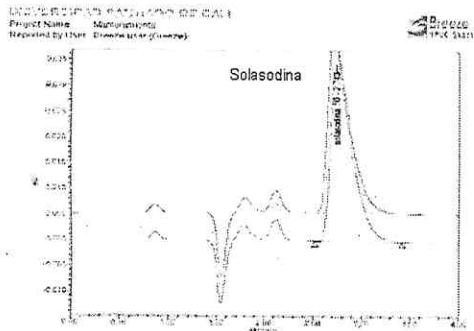


Figura 6. Cromatograma de la solasodina estándar Laboratorio Santa Cruz

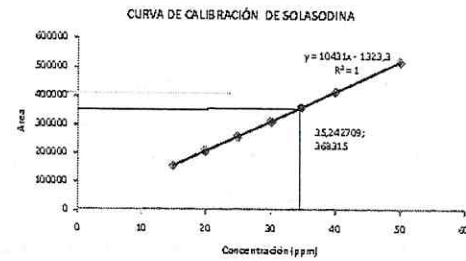


Para la cuantificación de la pureza del alcaloide obtenido, se realizó una curva de calibración por el método de patrón externo (Figura 7), el cual presentó un factor de correlación de 0.9998. La Tabla 2 presentan los resultados de las áreas obtenidas en la lectura de los patrones de solasodina utilizados en la curva de calibración.

Tabla 2. Datos de la curva de calibración de solasodina

Concentración (ppm)	Área
15	154502
20	208938
25	260232
30	309635
40	415105
50	521150

Figura 7. Curva de calibración de solasodina por el método de patrón externo



Se realizó la cuantificación de solasodina en la muestra aislada de los frutos de *Solanum wrightii* Benth, utilizando la curva de calibración realizada con patrones de solasodina estándar, calculando así una pureza de solasodina del 88.1% (Tabla 3).

Tabla 3. Datos de cuantificación de solasodina en la muestra aislada de los frutos del *Solanum wrightii* Benth

Concentración muestra (ppm)	Área	Concentración solasodina (ppm)	% pureza
40	15	35,24	88,1

IV. CONCLUSIONES

Se recolectaron e identificaron taxonómicamente los frutos de las plantas *Solanum pseudocapsicum* L y *Solanum wrightii* Benth, para llevar a cabo la extracción, purificación, identificación y cuantificación del alcaloide esteroideal solasodina.

Mediante el proceso de extracción, hidrólisis, purificación e identificación de cromatografía de capa fina, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) y por espectrometría infrarrojo, se logró aislar, identificar y cuantificar el alcaloide esteroideal Solasodina de los frutos de la planta *Solanum wrightii* Benth, recolectados en Santiago de Cali.

Al realizar la cromatografía de columna para la purificación de la Solasodina de los frutos del *S. pseudocapsicum* L, no se logró obtener un compuesto puro con las características fisicoquímicas del alcaloide esteroideal, debido a que no hubo separación cromatográfica de los compuestos con el método utilizado. Este resultado respalda las investigaciones realizadas por Barbosa-F., Agra, Oliveira, Paulo, Trolin, Cunha, Ataide, y Bhattacharyya (1991) en Brasil y por Aliero, Grierson y Afolayan (2005) en África, donde reportan que el porcentaje de solasodina presente en los frutos de esta planta es 0%.

Para el compuesto aislado de los frutos del *Solanum wrightii* Benth, se obtuvo un punto de fusión de 202°C, valor que coincide con el reportado por el Sigma Aldrich 1996 para la solasodina estándar.

En relación al peso de los frutos secos y molidos del *Solanum wrightii* Benth, el rendimiento del compuesto obtenido fue de 0.084%, mientras que el rendimiento de la solasodina pura aislada fue de 0.074%.

Al comparar el espectro infrarrojo de la muestra aislada de los frutos del *Solanum wrightii* Benth, con el espectro infrarrojo de la solasodina estándar del Laboratorio Santa Cruz, se observaron coincidencias en las bandas características, lo que permite concluir que el compuesto aislado pertenece al alcaloide esteroideal solasodina.

En los cromatogramas de HPLC realizados al compuesto aislado de los frutos del *Solanum wrightii* Benth y a la solasodina estándar de Laboratorios Santa Cruz, se observó una separación óptima de la solasodina con el método utilizado, en el cual se observó un tiempo de retención TR de 2.700 minutos aproximadamente, lo que permite concluir que el compuesto aislado pertenece al alcaloide esteroideal solasodina.

V. REFERENCIAS

- Aliero, A.A., Grierson, D.S., & Afolayan, A.J. (2005). Chemical and nutrient characterization of *Solanum pseudocapsicum* berries. *African Journal of Biotechnology*, 4(11), 1300-1303. Disponible en <http://www.ajol.info/index.php/ajb/article/viewFile/71376/60325>
- Barbosa-Filho, J.M, Agra, M.F., Oliveira, R.A., Paulo, M.Q., Trolin, G., Cunha, E.V., Ataide, J.R., & Bhattacharyya, J. (1991). Chemical and pharmacological investigation of *Solanum* species of Brazil: a search for solasodine and other potentially useful therapeutic agents. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86(2), 189-191. Disponible en [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v86s2/vol86\(fsop2\)_178-180.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v86s2/vol86(fsop2)_178-180.pdf)
- Chaparro, A. (2010). *Aislamiento e identificación de metabolitos producidos por la cepa nativa SPG 321 de Mucor circinelloides y evaluación de su actividad microbiana* [tesis de maestría]. Pontificia Universidad Javeriana: Bogotá, Colombia. Recuperado de <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis389.pdf>
- Conley, R.T. (1992). M. Figueroa (Trad.), *Espectroscopia Infrarroja*. Madrid, España: Alhambra.
- Indrayanto, G., Syahrani, A., Sondakh, R., & Santosa, M. (1996). Solasodine. En *Analytical profiles of drug substances and excipients*, (pp.487-522). New Jersey, NJ: Academic Press
- Mola, J., de Araujo, E., & de Magalhães, G. (1997). Solasodina em espécies de *solanum* do cerrado do distrito federal. *Química Nova*, 20(5), 460-462. Disponible en <http://www.scielo.br/pdf/qn/v20n5/4884.pdf>
- Pinell, S., Sauvain, M., & Cuevas, H. (1998). Producción de solasodina a través del cultivo in vitro de tejidos de la especie *Solanum marginatum*. *Biofarbo*, 6, 43-47. Disponible en <http://www.ops.org.bo/textocompleto/rnbiofa98060607.pdf>
- Sanabria, A. (1980). Alcaloides del *Solanum marginatum* II. Extracción directa de solasodina y contenido de la misma en tres estados de madurez de los frutos. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 3(4), 29-35. Disponible en <http://www.ciencias.unal.edu.co/unciencias/data-file/farmacia/revista/V3N4P29-35.pdf>