



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO QUIMICO DE *Solanum torvum* Sw. (Solanaceae). CUANTIFICACION DE ALCALOIDES Y SEPARACION DE COMPUESTOS TERPENICOS Y ESTEROIDALES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A :

JOSE MARTIN GARCIA CASTAÑEDA



DIRECTORA DE TESIS DRA. MARIA CRISTINA PEREZ AMADOR



1996

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

78
29



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:
Estudio químico de Solanum torvum Sw. (Solanaceae).
Cuantificación de alcaloides y separación de compuestos terpénicos y esteroidales.

realizado por José Martín García Castañeda

con número de cuenta 7937852-3 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario Dra. María Cristina Pérez Amador

Propietario M. en C. Aida Nelly García Argáez

Propietario Biol. Josefina Herrera Santoyo

Suplente Dra. Patricia Guevara Fefer

Suplente Biol. José Luis Regino Contreras Jiménez

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Consejo Departamental de Biología



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la **Dra. Cristina Pérez Amador** la aceptación y dirección del presente trabajo, así como la paciencia y confianza que me brindó, a mi maestra **Aida García A.** por la asesoría técnica, el apoyo incondicional y su confianza, a la bióloga **Josefina Herrera S.** por la cooperación en la parte experimental y su compañerismo, a la **Dra. Patricia Guevara** y al biólogo **José Luis Contreras** por la revisión del escrito, a la maestra **Alma González Esquinca** quien me ayudó en el inicio de esta tesis, a los biólogos **Gema Oseguera** y **Enrique Morales** por su colaboración en la redacción y el formato del presente, a mis compañeros de laboratorio les doy las gracias. Agradezco infinitamente a mi maestro y amigo Q.F.B. **José Luis Velázquez Espinosa** por el apoyo tan grande que me ha dado, ya que gracias a su impulso ha progresado en mi profesión.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, a quien debo mi formación académica.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis y todo mi esfuerzo a mis hijos **Astrid** y **Yéred** quienes son la clave y motor de mi existencia.

A mi esposa **Gema**, por su amor, comprensión y apoyo en todos los aspectos de mi vida.

A mi madre, **Sra. María Elena Castañeda Rodríguez**, que con su cariño me enseñó los principios que me rigen.

A mis hermanos.

INDICE

I	INTRODUCCIÓN.	1
II	ANTECEDENTES.	3
III	DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE.	6
IV	MATERIAL, METODOLOGÍA Y RESULTADOS.	9
	1. Diagrama general de la metodología.	10
	2. Preparación del material biológico.	11
	3. Sondeo fitoquímico preliminar de hoja, tallo, flor y raíz.	13
	3.1 Extracciones hexánicas y metanólicas.	13
	3.2 Rendimiento de los extractos.	15
	3.3 Análisis de la Distribución de los compuestos en los órganos.	16
	3.3.1 Perfiles cromatográficos.	16
	3.4 Presencia de grupos de metabolitos secundarios.	17
	3.4.1 Pruebas cromogénicas y de precipitación.	17
	3.4.2 Resultados de las pruebas.	19
	4. Contenido total de alcaloides e Identificación de solasodina.	20
	4.1 Determinación del contenido total de alcaloides.	20
	4.2 Identificación de solasodina.	21
	5. Cuantificación de glicoalcaloides.	22
	5.1 Diagrama metodológico.	22
	5.2 Extracción de glicoalcaloides según Lewis.	23
	5.3 Determinación de la presencia de solasonina y solamargina.	24
	5.4 Separación de glicoalcaloides.	25
	5.5 Preparación de la curva patrón de glicoalcaloides.	28
	5.6 Medición espectrofotométrica de glicoalcaloides del extracto alcalóidico.	28
	6. Separación y determinación de compuestos del extracto hexánico de hoja.	29
	6.1 Diagrama metodológico.	29
	6.2 Extracción hexánica.	30
	6.3 Separación cromatográfica de compuestos.	30
	6.4 Identificación de los compuestos B, H y K.	33
V	DISCUSIÓN DE RESULTADOS.	34
VI	CONCLUSIONES.	37
VII	LITERATURA CITADA.	38

I INTRODUCCION

La Solanaceae es una familia moderadamente grande con aproximadamente 80 géneros y 3000 especies (de las cuales más de la mitad pertenecen al género *Solanum*). Se distribuye en todo el mundo con el mayor número de especies en las regiones tropicales o subtropicales y especialmente concentradas en el Nuevo Mundo, sobre todo en Sudamérica

La familia es notable por los alcaloides tóxicos comunmente encontrados tanto en los órganos vegetativos como en los frutos. La nicotina (de *Nicotiana tabacum*) es muy venenosa, aunque su adicción a pequeñas dosis diarias es común a nivel mundial (Nee, 1993). La droga atropina se obtiene de la belladona (*Atropa belladonna*), se usa como un antídoto para el envenenamiento por fosfatos orgánicos de pesticidas y gas nervioso. El beleño (*Hyoscyamus niger*), el toloache (*Datura stramonium*), la yerba mora (*Solanum niger*) y la mandragora (*Mandragora* spp.) también contienen alcaloides poderosos (Jones, 1987). Otros compuestos químicos como los glicoalcaloides, son sujeto de investigación activa para usarlos como precursores de hormonas (Nee, 1993).

A su vez de esta familia se obtienen algunas de las plantas económicamente más importantes a nivel mundial. La papa (*Solanum tuberosum*) es un alimento básico, signficante en diversas partes del mundo: sin el jitomate (*Lycopersicon esculentum*), el tomate verde (*Physalis* spp.) y los chiles (*Capsicum* spp.), la cocina mexicana sufriría una gran pérdida. El número de plantas ornamentales tampoco es insignificante, entre otras *Petunia*, *Solanandra*, *Nyctanthera*, *Salpiglossis* y *Schizanthus*.

El género *Solanum* es uno de los más grandes de las Angiospermas con más de 1500 especies. Es de distribución mundial con la mayor concentración de especies en el trópico y subtropico. Hay muchas especies en Australia, África y Asia, pero América es más rica en especies y diversidad.

México es un centro secundario de diversidad en el mundo; hay aproximadamente 150 especies en el país.

El género es notable por algunas plantas alimenticias importantes como la papa (*S. tuberosum*) y diversas papas silvestres tales como *S. bulbocastanum*, *S. demissum*, *S. lopotalum*, *S. oxycarpum*, *S. morelliforme* y *S. verrucosum* y otras menores como la berenjena (*S. melongena*). La mayoría de estas plantas producen tubérculos y son indispensables para los programas futuros de mejoramiento genético de la papa, porque son resistentes a temperaturas bajas, insectos, virus y hongos; la mitad de las variedades de papa cultivadas en algunos países de Europa ahora contienen germoplasma de la papa silvestre mexicana *S. demissum* (Nee, 1993). También en el género encontramos especies venenosas o que aparecen como malizas.

OBJETIVOS

En esta tesis dentro del programa " Estudio de la Flora de Chiapas ", se hizo un análisis fitoquímico de *Solanum torvum*, como una contribución a dicho programa.

Objetivo general

Realizar un análisis fitoquímico de la planta de *Solanum torvum* que incluya lo siguiente.

Objetivos particulares

- Análisis de la distribución de compuestos en hoja, tallo, raíz y flor.
- Determinación de la presencia de metabolitos secundarios.
- Cuantificación de alcaloides totales y glicoalcaloides.
- Separación de compuestos del extracto hexánico por cromatografía en columna.

II ANTECEDENTES

Descripción botánica de la familia.

Las Solanaceas son hierbas, arbustos, árboles y algunas veces enredaderas, herbáceas o leñosas, sus hojas son alternas simples sin estípulas; inflorescencias cimosas con flores actinomorfas pentámeras, ovario bilocular; el fruto es una baya o una cápsula; semillas varias a numerosas, prismáticas a comprimidas y el endospermo camoso.

Acerca del género.

Hierbas, arbustos o trepadoras, leñosas o herbáceas, inermes o armados con espinas, glabros o pubescentes con pelos simples. Hojas alternas solitarias, frecuentemente desiguales. Inflorescencias en cimas simples, axilares; corola subrotada blanca, amarilla o púrpura, profundamente lobada con abundante tejido entre los pétalos. Fruto una baya, globosa y carnosa, ovoides o elipsoide, raramente seca y como una cápsula cuando madura; semillas numerosas comprimidas.

Antecedentes químicos

Para el género se ha reportado la presencia de alcaloides en varias especies, los estudios fitoquímicos más sobresalientes para el género *Solanum* son los siguientes.

En *S. avicularum* se aisló solasonina y solasodina, en *S. sodomaeum* solasonina en frutos, en *S. xanthocarpum* y *S. auriculatum* solasonina (Rönsch, 1966). En *S. dulcamara* solamarina, para *S. chacoense* cicloartenol y lanosterol, en *S. pseudocapsicum* solanidina, tomatidina y solanocapsina (Ripperger, 1971). En un estudio comparativo Lewis (1970) reporta para *S. aviculare*, *S. capsiforme*, *S. lacinatedum*, *S. linearifolium*, *S. simile*, *S. symonii* y *S. vescum* la presencia de solasonina y solamargina. A su vez Verbist (1977) registra la presencia de solasodina y tomatidenol en *S. nigrum*.

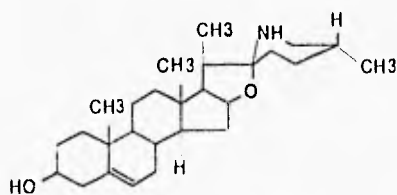
Para *Solanum torvum* se tiene registro de los siguientes compuestos.

Solasonina y clorogenina (Fayez, 1967), los glicoalcaloides jurubina, neoclorogenina y paniculogenina (Schreiber, 1968), sisalagenona y torvogenina (Morales, 1970), solasodina, torvogenina, neoclorogenina y clorogenina (Doepke, 1975), triacantanol, 3-triacantanon, ácido tetra-triacantanolco, sitosterol, stigmasterol, campesterol (Mahmood, 1983a), neosolaspigenina, solaspigenina y neoclorogenina (Mahmood, 1983b). También Mahmood (1985) reporta varios esprostanos y derivados de hidrocarburos alifáticos y la saponina esteroidal nombrada torvonina A.

Maitl (1979) hace un estudio de alcaloides totales y la presencia de solasodina comparando sus rendimientos entre 31 especies de *Solanum*, incluyendo *S. torvum*, en la tabla 9 se muestran sus resultados, así como la confrontación de los registrados en el presente estudio.

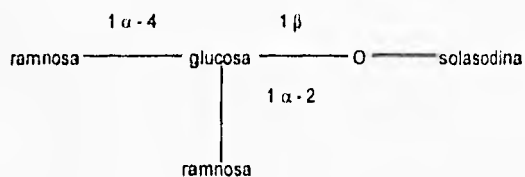
A continuación se detalla la estructura de 3 compuestos básicos en la realización del presente trabajo (solasodina, solamargina y solasonina), ya que sirvieron de marco de referencia y se lograron elistar o determinar su presencia.

La solasodina se encuentra en forma de glicósido en las plantas. El glicósido está compuesto por una cadena de azúcares unida al esteroide alcaloidal o aglicona.



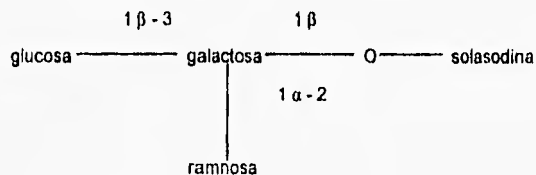
SOLASODINA

La solamargina es un glicoalcaloide que presenta una triosa, formada por dos moléculas de ramnosa y una de glucosa. siendo la aglicona la solasodina.



SOLAMARGINA

La solasonina es una molécula formada por una solatriosa que presenta una molécula de glucosa, una de galactosa y una de ramnosa, su aglicona es la solasodina (Galindo, 1986).



SOLASONINA

III DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE

UBICACIÓN TAXONÓMICA (Cronquist, 1981)

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase : Asteridae

Orden : Solanales

Familia : Solanaceae

Género : *Solanum*

Especie : *Solanum torvum* Sw., Prodr. Veg. Ind. Occ. 47. 1788.

Sinonimia : *Solanum nayanum* Lundell, Contr. Univ. Michigan Herb. 8:85. 1942.

Nombres comunes¹ : "berenjena" (Tabasco, Chiapas, Veracruz y Oaxaca), "sosa" (Chiapas), "mano de león" (Morelos), "ts'ay ooch" (Q. Roo), "y dzoioch" (Q. Roo), "ya shal tujkuilum" (Chiapas), "lavaplatos" (Oaxaca y Chiapas), "tomatillo" (Michoacán), en Veracruz su nombre totonaco es "lish to: chat".

Usos : En la India una cocción de los frutos se usa para aliviar la tos y es considerada de amplio uso en casos de inflamación de hígado y bazo. La planta es diurética y digestiva y las hojas son usadas como un homeostático en Camerún (Mahmood, 1983).

En México su uso varía de acuerdo a la región, a veces sirve como lavaplatos en Oaxaca, además de utilizarla en el tratamiento de hemorragias y espinillas, también se usa en el tratamiento de mordedura de algunas víboras, su aplicación es local, se considera su uso para atenuar la fiebre y el dolor de cabeza; en Chiapas se usa en heridas, realizando un dorado de hojas y aplicando localmente; en Tabasco y Chiapas se cree que cura tumores cancerosos.¹

¹ Datos tomados de las fichas de colecta de ejemplares del Herbario del Instituto de Biología UNAM (MEXU)

Aplicaciones : Con el uso creciente de drogas esteroidales para el tratamiento del asma, desórdenes inflamatorios, tumores, desequilibrio de hormonas sexuales y como anticonceptivos orales y el descubrimiento que la solasodina puede ser fácilmente convertida a acetato de 16-dehidropregnenolona, una ruta intermedia en la síntesis de drogas esteroidales y por consiguiente útil en la producción de dichas drogas (Maili, 1979).

Descripción botánica : Arbustos de 1-2.5 m de altura; ramas jóvenes tomentosas con pelos estrellados porrectos, sésiles o estipitados, glabrescentes; ramas fértiles inermes o con espinas gruesas esparcidas, rectas o recurvadas de 1 cm de largo. Hojas en pares, la lámina de las hojas mayores ampliamente ovaria de 10-20 cm de largo, 6-15 cm de ancho, finamente pubescente en el haz con pelos estrellados porrectos diminutos, más tomentosa en los nervios principales, más densamente tomentosa en el envés con algunas espinas aciculares hasta de 1 cm de largo en los nervios principales, el ápice agudo o acuminado, la base asimétrica, redondeada a cuneada; peciolo de 2.5-4 cm de largo a menudo armado con pelos aciculares. Inflorescencias laterales, extra-axilares simples o con 2-4 cimas racemosas, de 3-6 cm de largo; pedúnculo ausente o hasta de 2 cm de largo; cáliz de 4-5 mm de largo; corola blanca 2.5 cm de ancho, finamente tomentosa; filamentos de 1-1.5 mm de largo; ovario glabro o con unas cuantas glándulas, el estilo de 10-12 mm de largo. Fruto una baya verde, globosa, de 1.2-1.4 cm de diámetro, semillas numerosas, de 2.5 mm de largo.

Distribución : En Asia (Malasia, China, Filipinas, India excepto en el área desértica del oeste), en África, América tropical (Guatemala hasta Panamá y parte norte de Sudamérica), en México se localiza en la parte sur de Veracruz, Chiapas, Tabasco, Campeche, Yucatán, Q. Roo, Oaxaca, Michoacán y Morelos.

Altitud : Generalmente desde el nivel del mar hasta los 250 m.

Vegetación : Predominantemente selva alta perennifolia, secundaria.

Floración : Probablemente todo el año.

Solanum torvum Sw.

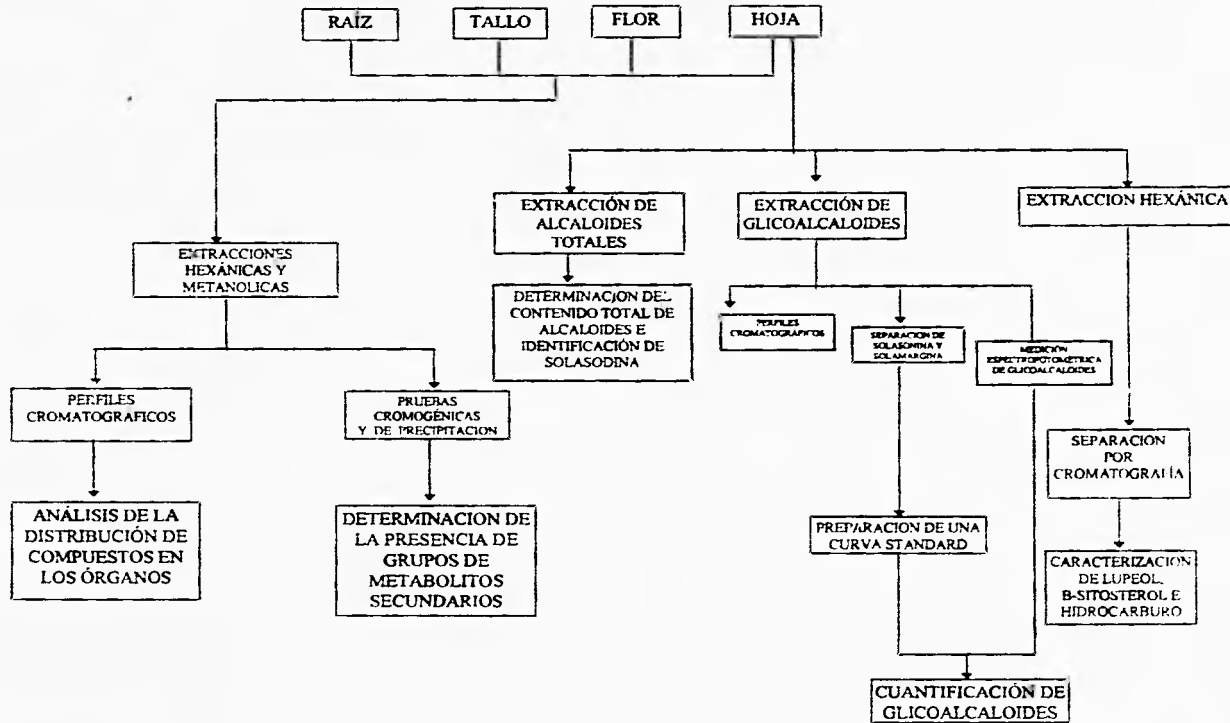


Delapl. Camé Oreguera

IV MATERIAL, METODOLOGÍA Y RESULTADOS

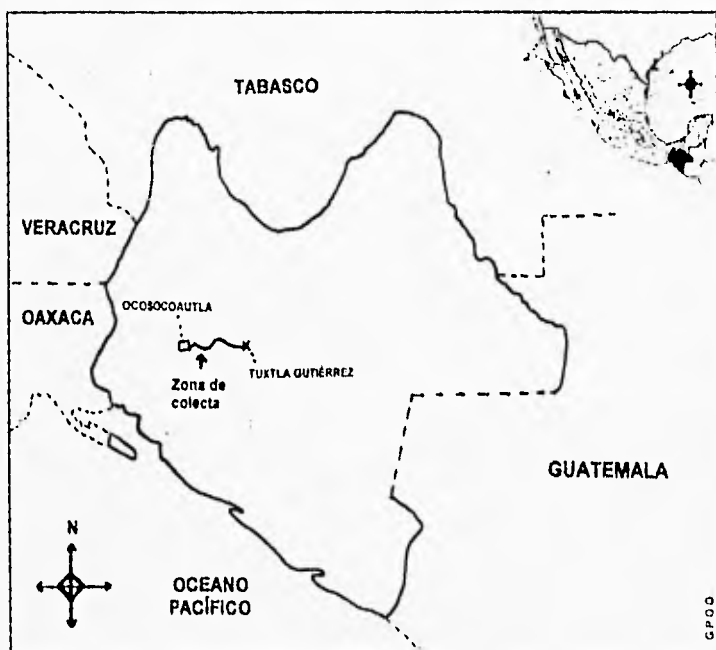
1.0 DIAGRAMA GENERAL DE LA METODOLOGÍA

Colecta de *Solanum torvum*



2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO

El material se colectó a la altura del Km 20 de la carretera Tuxtla Gutiérrez-Ocosocoautla, Chiapas, a un lado del camino, en febrero de 1991.



Mapa de la zona de colecta

Las plantas colectadas se secaron a temperatura ambiente, sin separar sus partes (tallo, hojas, flor, y raíces).

Posteriormente se separaron las partes aéreas de la planta de la siguiente manera.

- Las hojas, junto con las espigas se separaron manualmente, quedando el tallo.
- Los frutos se separaron de los pétalos.

PESO DEL MATERIAL

- Las hojas se pesaron junto con sus espinas y se pulverizaron en un mortero.
- El tallo se pasó tres veces por el molino manual y una vez pulverizado se pesó.
- Las flores se pulverizaron en mortero y se pesaron.
- Las raíces se pulverizaron en el molino manual antes de pesartas.

TABLA DE PESOS DEL MATERIAL COLECTADO

ÓRGANO	CANTIDAD (g)
HOJA	544.7
TALLO	80.1
RAÍZ	45.0
FLOR	4.8

Tabla 1

3. SONDEO FITOQUÍMICO PRELIMINAR DE HOJA, TALLO, RAÍZ Y FLOR

3.1 Extracciones hexánicas y metanólicas

Una vez pesado el material de colecta se consideraron las cantidades de cada parte anatómica (hoja, tallo, raíz, flor y fruto) para su estudio. La cantidad colectada de hoja, tallo, flores y raíces fue suficiente.

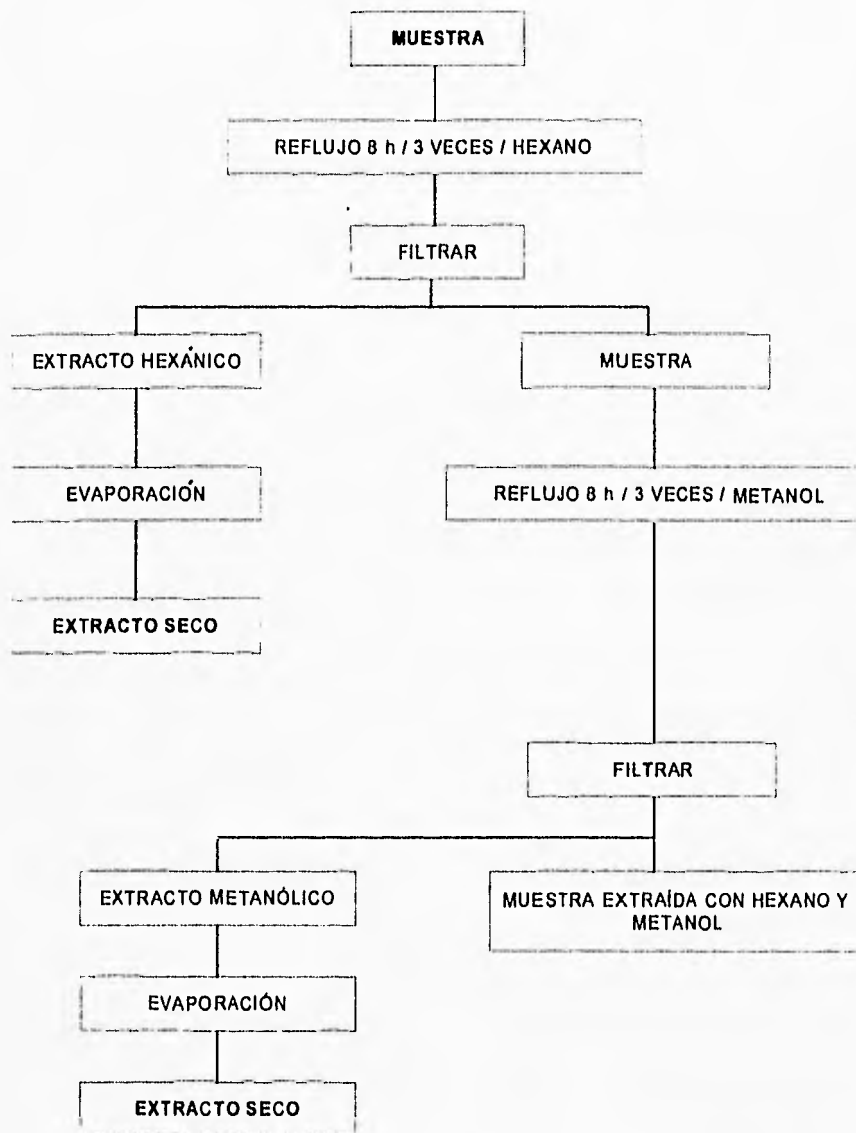
Elección de disolventes

Para realizar las extracciones, los disolventes usados fueron el hexano y el metanol. Se utilizaron muestras de 10 g de cada parte de la planta, excepto de las flores, en donde se usaron 4.8 g de muestra por no contar con más. Esta cantidad se consideró al calcular el rendimiento y al realizar pruebas donde la concentración era importante, se hicieron los ajustes de proporción necesarios.

Primero se realizó la extracción hexánica de la siguiente manera: La muestra de 10 g es sometida a reflujo durante 8 horas, el disolvente empleado es hexano, concluido el tiempo se filtra. El filtrado obtenido se pasa a un matraz bola, se evapora el disolvente en un rotavapor y el extracto se coloca en un frasco previamente tarado, la muestra vuelve a refluarse por un tiempo igual y el extracto se reúne en el mismo frasco, este procedimiento se repite, completando así tres periodos de reflujo, colocando los extractos en el mismo frasco.

Para realizar la extracción metanólica se usó la muestra extraída con hexano, se procedió de la misma manera y el tiempo de reflujo fue el mismo, reuniendo los extractos en otro frasco previamente tarado.

DIAGRAMA GENERAL DE LAS EXTRACCIONES



3.2 Rendimiento de los extractos

EXTRACTOS HEXÁNICOS

ÓRGANO	CANTIDAD DE MUESTRA (g)	CANTIDAD DE EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO (%)
HOJA	10	0.2232	2.2
TALLO	10	0.0802	0.8
RAÍZ	10	0.0354	0.4
FLOR	4.8	0.1646	3.4

Tabla 2

EXTRACTOS METANÓLICOS

ÓRGANO	CANTIDAD DE MUESTRA (g)	CANTIDAD DE EXTRACTO (g)	RENDIMIENTO (%)
HOJA	10	2.9060	29
TALLO	10	1.4338	14
RAÍZ	10	1.4258	14
FLOR	4.8	0.9927	20.7

Tabla 3

3.3 Análisis de la distribución de compuestos en los órganos

3.3.1 Perfiles cromatográficos.

Los perfiles cromatográficos se determinaron usando soluciones con concentración de 5 mg/ml de cada uno de los extractos.

Para su realización se utilizaron placas delgadas de gel de sílice MERCK-60 sin activar. El primer revelado se hizo con luz ultravioleta, marcando las manchas observadas con línea punteada, después se revelaron con sulfato cérico y se calentaron, las manchas evidentes por este proceso se marcaron con línea continua.

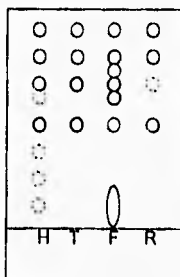
Los eluyentes usados para los extractos hexánicos fueron hexano y acetato de etilo, se realizaron pruebas con diferentes proporciones de éstos. A continuación se presenta la proporción más adecuada y su placa correspondiente.

Eluyente: Hexano-acetato de etilo 75:25

Revelador: Sulfato cérico (línea continua)

luz uv (línea punteada).

H = hoja T = tallo F = flor R = raíz



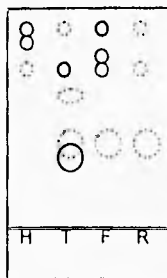
Para los extracto metanólicos se usaron como eluyentes acetato de etilo y metanol, se ensayó con diferentes proporciones de éstos y la proporción más adecuada, así como su placa correspondiente se exhiben abajo.

Eluyente : - Metanol-acetato de etilo 60 : 40

Revelador : Sulfato cérico (línea continua)

luz uv (línea punteada).

H = hoja T = tallo F = flor R = raíz



3.4 Presencia de grupos de metabolitos secundarios

3.4.1 Pruebas cromogénicas y de precipitación

Un análisis químico de tipo cualitativo para conocer los grupos de compuestos, que contiene cada muestra, es el de las pruebas cromogénicas y de precipitación (Dominguez, 1979); la descripción de la metodología empleada es la siguiente.

1. Se pesaron 50 mg de cada muestra (hoja, tallo, flor y raíz), de ambos extractos, en total 8.
2. Cada muestra se colocó en un tubo de ensaye y se les agregó 10 ml del disolvente con el que fue extraído, resultando una concentración de 5 mg/ml, incluso el extracto hexánico de raíz quedó a la misma concentración, ya que sólo se le agregaron 7 ml de disolvente.
3. Luego de preparar las soluciones, se valoró si eran viables para realizar las pruebas, esto es, si el color que presentaban no enmascararía a alguno de los colores esperados en las pruebas, o bien, si por ser tan oscuras no se observaría algún viraje o precipitación causado por las propias pruebas. Se encontró que había 3 soluciones que presentarían incertidumbre en este análisis, dichas soluciones fueron ambos extractos de hoja y el extracto hexánico de tallo.
4. A las soluciones mencionadas en el paso anterior se les decoloró de la siguiente manera : Se agregó una pequeña cantidad de carbón activado, luego se calentaron en baño de vapor, llevando a ebullición durante 5 minutos. Una vez que el carbón activado adsorbió pigmentos y la solución se decoloró, se filtró al vacío para separar el carbón.

5. Las pruebas para las soluciones hexánicas son las siguientes:

PRUEBA DE LIEBERMANN - BURCHARD PARA TERPENOS Y ESTEROIDES

PRUEBA DE SHINODA PARA FLAVONOIDES

6. Pruebas realizadas a las soluciones metanólicas:

PRUEBA DE LIEBERMANN - BURCHARD PARA TERPENOS Y ESTEROIDES

PRUEBA DE SHINODA PARA FLAVONOIDES

PRUEBA DE ALCALOIDES CON EL REACTIVO DE DRAGENDORFF

PRUEBA DE ALCALOIDES CON EL REACTIVO DEL ÁCIDO SILICOTÚNGSTICO

PRUEBA DE SAPONINAS (PRUEBA DE ESPUMA)

PRUEBA DE MÖLISCH PARA GLICÓSIDOS.

3.4.2 RESULTADOS DE LA PRUEBAS

EXTRACTOS HEXÁNICOS

MUESTRA	TERPENOS - ESTEROIDES REACTIVO LIEBERMANN - BURCHARD	FLAVONOIDES REACTIVO SHINODA
HOJA	+++ VERDE	++ VERDE
TALLO	++ VERDE	-
FLOR	+ VERDE	-
RAÍZ	++ VERDE	-

Tabla 4

EXTRACTOS METANÓLICOS

MUESTRA	TERP.-EST. REACTIVO LIEB.-BUR.	FLAVONOIDES REACTIVO SHINODA	A L C A L O I D E S REACTIVO DRAGEND.	REACTIVO SILICOT.	SAPONINAS PRUEBA CON ESPUMA	GLICOSIDOS PRUEBA DE MÖLISCH
HOJA	-	++ ROSA	+	-	+	+
TALLO	+ ROSA	+ VERDE	-	-	-	++
FLOR	+ ROSA	+++ ROSA	L +	-	+	++
RAÍZ	+ ROSA	-	++	++	-	+++

Tabla 5

4. CONTENIDO TOTAL DE ALCALOIDES E IDENTIFICACIÓN DE SOLASODINA

4.1 Determinación del contenido total de alcaloides

Para calcular el contenido total de alcaloides y la presencia de solasodina en las hojas se procedió según la metodología reportada por Maili (1979) y explicada a continuación.

Se pulverizaron 5 g de hojas, y se extrajeron a reflujo con etanol (100 ml) durante 10 minutos, se filtró y al filtrado se le agregaron 20 ml de ácido clorhídrico. Esta muestra se reflujo durante 2 horas, luego se agregó agua v / v y el alcohol se eliminó por destilación en el rotavapor. La solución ácida se extrajo con éter por 3 veces para separar los constituyentes no alcaloides. La fase acuosa se alcalinizó lentamente con hidróxido de amonio concentrado hasta obtener un pH = 9. A esta solución se le realizó otra extracción con éter por tres veces, desechando la fase acuosa. A la solución etérea se le agregó sulfato de sodio anhidro con el objeto de eliminar el agua residual del proceso anterior. El éter se eliminó por evaporación y el residuo se pesó para determinar su rendimiento.

Aquí se presenta dicho rendimiento:

MUESTRA	EXTRACTO	RENDIMIENTO
5 g	5.8 mg	0.12 %

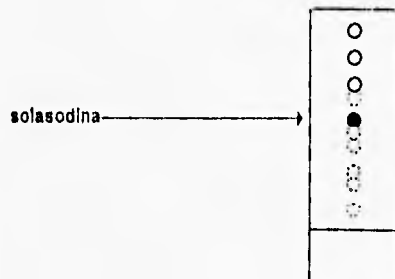
4.2 Identificación de solasodina

Con el extracto obtenido conteniendo una mezcla de alcaloides, se realizó una placa cromatográfica. Para la aplicación se disolvió el extracto en cloroformo (1.1 ml), obteniendo una concentración de 5 mg/ml, el eluyente usado fue cloroformo-metanol 95:5, se reveló con luz ultravioleta y las manchas observadas así, se marcaron con línea punteada, luego se roció con revelador de resorcinol (10 mg) en 50 ml de una mezcla de ácido acético glacial y ácido sulfúrico (1:1, v/v), calentando la placa, la solasodina se observó como una mancha rosa con $R_f = 2.3$ (Stahl, 1965), que viró paulatinamente al azul y se marcó con línea continua.

La placa obtenida por este procedimiento es la siguiente.

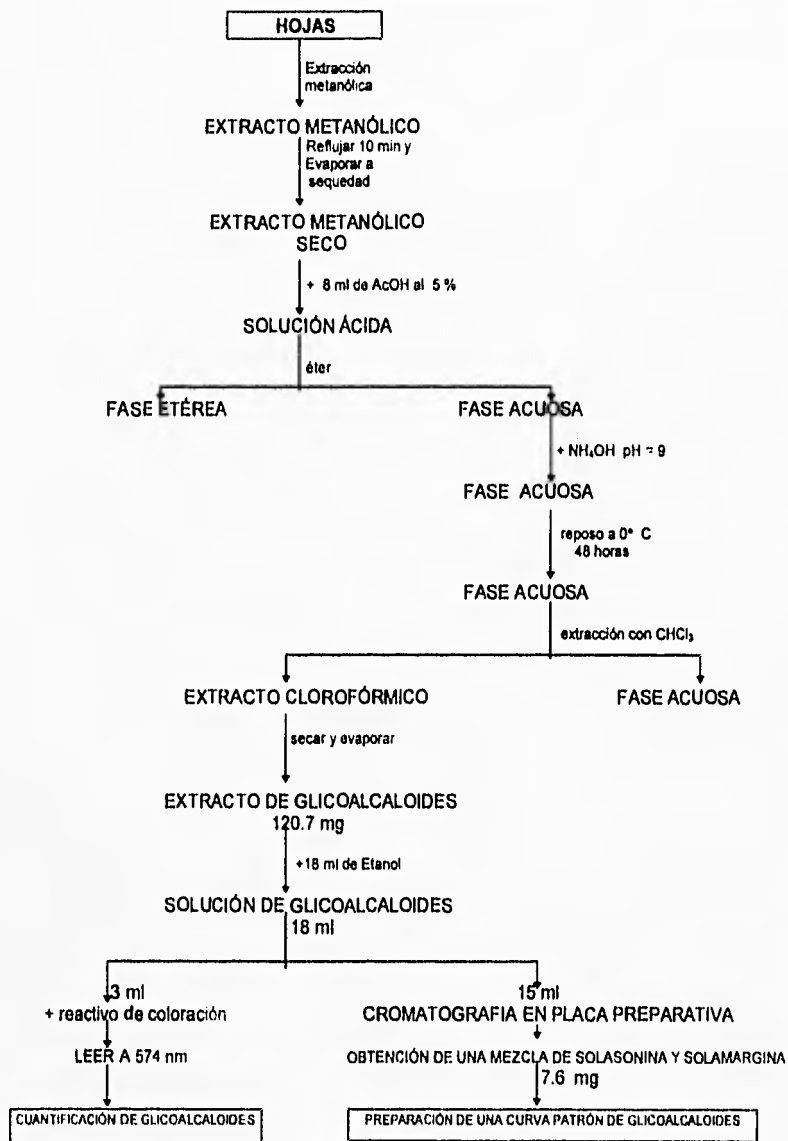
Eluyente : Cloroformo-metanol 95 : 5

Revelador : Resorcinol



5. CUANTIFICACIÓN DE GLICOALCALOIDES

5.1 Diagrama metodológico



5.2 Extracción de glicoalcaloides según Lewis

Para la extracción de glicoalcaloides, se modificó la metodología reportada por Lewis (1970).

Se pesaron 10 g de hojas y se maceraron con metanol (30 ml) en un mortero. El extracto se filtró y se colocó en un matraz, este proceso se repitió 2 veces más reuniendo los extractos en el mismo matraz. El residuo se lavó con metanol caliente y éste se incorporó al extracto reunido. La solución metanólica se sometió a reflujo durante 10 minutos. El metanol se evaporó en el rotavapor y el extracto se llevó a sequedad. Una vez seco el extracto se redisolvió usando 8 ml de AcOH al 5%. Luego se extrajo con éter por 6 veces, 20 ml por vez. La fase acuosa se alcalinizó lentamente con NH_4OH hasta $\text{pH} = 9$, después se refrigeró durante 2 días. A esta fase se le realizó una extracción clorofórmica v/v, una vez extraída, la solución clorofórmica se sometió a un proceso de secado con sulfato de sodio anhidro. El cloroformo se evaporó en el rotavapor a temperatura mínima. Una vez seco el extracto se pesó.

El resultado es el siguiente:

MUESTRA	EXTRACTO	RENDIMIENTO
10 g	120.7 mg	1.2 %

Una vez pesado el extracto se redisolvió en etanol (18 ml).

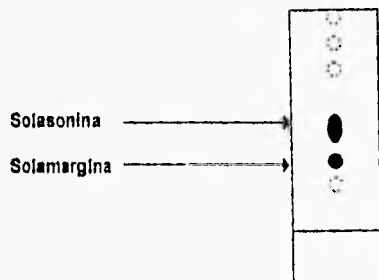
5.3 Determinación de la presencia de solasonina y solamargina

Se hicieron placas cromatográficas para determinar la presencia de solamargina y solasonina. Teniendo la muestra en solución etanólica, se aplicó en placas delgadas de gel de sílice usando como eluyente el sistema Butanol-dietilamina-metanol (85:10:2). Las placas se revelaron con luz ultravioleta, marcándolas con línea punteada, luego se revelaron con revelador de resorcinol observando el color de las manchas (rosa) y marcándolas con línea continua. Se calculó su R_f (solasonina = 2.8 y solamargina = 4), que estuvo de acuerdo con lo reportado por Lewis (1970).

La placa se muestra a continuación.

Eluyente : Butanol-dietilamina-metanol 85 : 10 : 2

Revelador : Resorcinol (línea continua), luz uv (línea punteada)

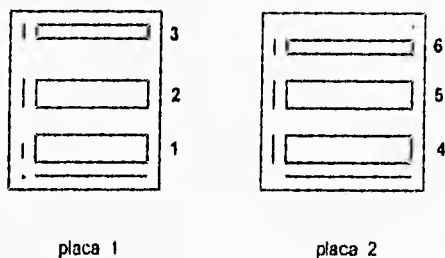


5.4 Separación de glicoalcaloides

Habiendo detectado la presencia de solasodina y solamargina en la solución de glicoalcaloides, se procedió a aislar ambos compuestos, con la finalidad de que sirvieran de referencia para hacer una curva patrón y a través de ésta conocer la cantidad de glicoalcaloides presentes en hoja.

Se partió de los 15 ml restantes de la solución etanólica de glicoalcaloides (100 mg). ésta se distribuyó a partes iguales sobre dos placas gruesas de gel de sílice (2 mm), dejando un punto de aplicación del lado izquierdo de cada placa, el extracto se aplicó en bandas a 2 cm de la base, luego se eluyeron en el sistema: Butanol-dietilamina-metanol 85:10:2.

Los puntos del lado izquierdo de ambas placas se revelaron cubriendo el resto con placas de vidrio, usando revelador de resorcinol, luego se determinó la altura de las distintas manchas, para marcar las 3 bandas interés.



Las bandas de cada placa se rasparon por separado, se colocaron en un matraz (6 en total), y se extrajeron con acetato de etilo, usando agitación magnética durante 30 minutos, 3 veces por banda, y filtrando al vacío por separado. Se tomó una alícuota de cada matraz (5 ml), se concentró en el baño de vapor hasta 1 ml, y se aplicó en una placa cromatográfica; el eluyente usado fue butanol-dietilamina-metanol 85:10:2 y el revelador resorcinol. Esta placa se corrió para localizar los 2 alcaloides buscados.

Los extractos se reunieron en parejas en matraces de 250 ml así :1y4. 2y5 y 3y6 ya que dichas bandas se correspondían en altura y se consideran iguales.

Las soluciones se evaporaron y se pesaron, obteniendo los siguientes datos.

BANDAS	PESO (mg)
1 y 4	1.3
2 y 5	3.0
3 y 6	4.6

Tabla 6

La placa mostró la presencia de los glicoalcaloides en las bandas: 2-5 y 3-6. Debido a la poca cantidad obtenida de cada uno, sus extractos se reunieron dando un peso total de 7.6 mg, los que se emplearon para la curva patrón.

6.5 Preparación de la curva patrón de glicoalcaloides

Para realizar la curva patrón de glicoalcaloides se hizo lo siguiente:

Los 7.6 mg obtenidos en el procedimiento anterior se disolvieron en 5 ml de una solución de H_3PO_4 (88%, 3 ml) y $HCOOH$ (0.5 %, 1.5 ml), teniendo una concentración de 1.52 mg/ml.

Se marcaron 5 tubos para espectrofotómetro con números del 1 al 5. En el tubo 1 se colocó la solución original y en los siguientes se fueron colocando diluciones sucesivas al 50 %, posteriormente se calentaron los tubos a 50 °C durante 15 minutos para desarrollar color y se hicieron las lecturas en el espectrofotómetro a 574 nm.

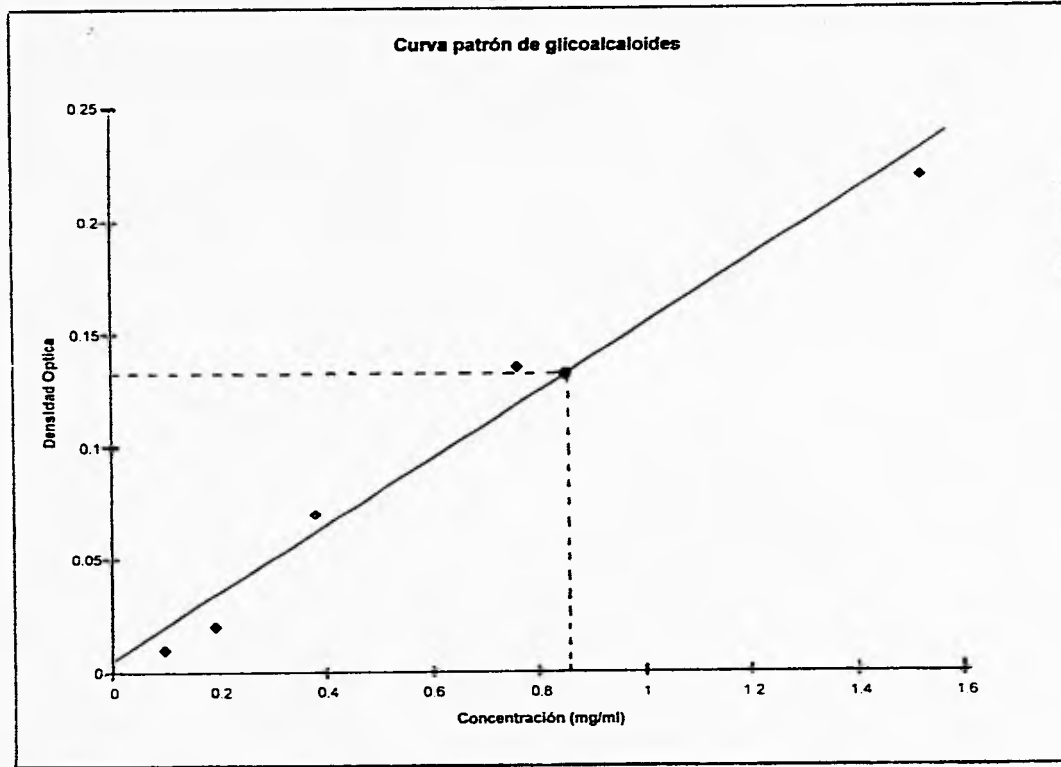
La tabla siguiente muestra las concentraciones de cada tubo y las absorbancias.

Tubo	Concentración mg/ml	Absorbancia
1	1.52	0.22
2	0.78	0.135
3	0.38	0.07
4	0.19	0.02
5	0.095	0.01

Tabla 7

Los datos de concentración y densidad óptica (absorbancia), se graficaron y se hizo el ajuste de la recta por regresión lineal (gráfica No. 1).

Gráfica 1



5.6 Medición espectrofotométrica de glicoalcaloides presentes en el extracto alcalóidico original

Después de obtener la muestra de alcaloides de referencia y la curva patrón de glicoalcaloides, el siguiente paso fue partir de la misma solución etanólica, de 18 ml conteniendo 120.7 mg de glicoalcaloides de la cual 15 ml se utilizaron para la placa preparativa, y con los 3 ml restantes (20.1 mg) se hizo lo siguiente.

La solución se mezcló con H_3PO_4 (88%, 3 ml) y $HCOOH$ (0.5%, 1.5 ml), calentando a 50 °C (15 min). Como la solución se encontraba turbia se filtró, y luego se leyó en el espectrofotómetro a 574 nm, con el resultado siguiente.

absorbancia : 0.13

Esta absorbancia, por interpolación en la curva patrón, corresponde a una concentración de glicoalcaloides de 0.85 mg/ml, como lo muestra la gráfica No. 1.

Esta concentración refleja.

Primero, que en el extracto de glicoalcaloides éstos representan el 12.7 % de su peso (en la solución de 18 ml (120.7 mg) es de 15.3 mg (0.85 mg X 18 ml)).

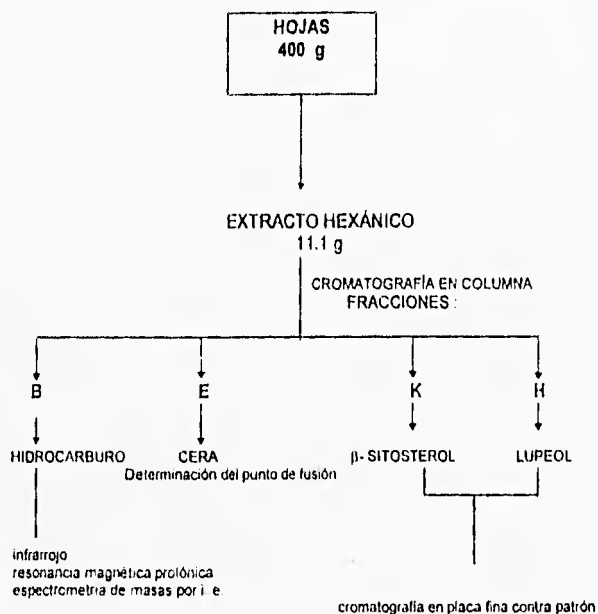
Segundo, que el porcentaje relacionado a peso seco de la hoja es:

peso de la hoja	peso de glicoalcaloides	rendimiento
10 g	0.0153 g	0.153 %

6. SEPARACIÓN Y DETERMINACIÓN DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO HEXÁNICO DE HOJA

Con el propósito de realizar una separación cromatográfica en columna del extracto de hojas, se hizo lo siguiente.

6.1 Diagrama metodológico para la separación de compuestos



6.2 Extracción hexánica

Se pesaron 400 g de hojas, molidas en mortero. Esta muestra se extrajo con hexano en un matraz bola de 5 l, sometiéndola a reflujo por 8 horas, 3 veces. El disolvente se eliminó y el obtenido se pesó.

La cantidad de extracto, así como su rendimiento se muestran en esta tabla:

MUESTRA	EXTRACTO	RENDIMIENTO
400 g	11.1 g	2.8 %

6.3 Separación cromatográfica de compuestos

Se cromatografiaron 5 g del extracto hexánico de hojas. Se fijó una columna (90 cm de largo y 4.8 cm de diámetro) en un soporte universal; en la base de la columna se colocó un disco de algodón, a manera de filtro y soporte, sobre el algodón se colocó una capa de arena. Sobre este sistema de soporte y filtración se agregó una papilla de gel de sílice (400 g, activado a 110 °C, una hora), formada con hexano. Se esperó a que se sedimentara la sílice y una vez empacada se agregó un poco de arena (0.3 cm). La altura de la columna fue de 58.5 cm.

Sobre la arena se agregó el extracto disuelto en hexano. Desde este momento, por goteo constante, se empezaron a coleccionar fracciones de 50 ml, en matraces Erlenmeyer.

Se colectaron 367 fracciones, los eluyentes usados fueron hexano y acetato de etilo, en distintas proporciones de éstos, comenzando con hexano 100 % y aumentando la proporción de acetato de etilo, de tal manera que las últimas fracciones se colectaron agregando acetato de etilo 100 %.

El tratamiento que se le dio a las fracciones fue el siguiente: Una vez colectada la fracción se trasvasaba del matraz Erlenmeyer a un matraz bola, luego se evaporaba el disolvente en el rotavapor hasta tener un volumen pequeño y se pasaba a un frasco de 5 ml el cual se tapaba y se marcaba con el número de la fracción correspondiente.

El control de las fracciones se hizo mediante cromatografía en placa delgada, con la finalidad de reunir las similares en grupos. Se corrieron 20 placas de 5 x 5 cm, aplicando en cada una 9 fracciones de los tubos con número impar. Se empleó como eluyente el hexano o hexano-acetato de etilo en distintas proporciones. El revelado se llevó a cabo primero con luz ultra violeta y posteriormente con sulfato cérico, las manchas se marcaron de manera convencional. En seguida se procedió a dividir las 367 fracciones en grupos de afinidad, reuniendo aquellas que tuvieron placa de control igual. Se formaron así 20 fracciones, las cuales se rotularon con letras de la A a la T.

La tabla 9 resume lo anterior

FRACCION	ELUYENTE	COLOR O APARIENCIA	No. DE MANCHAS	IDENTIFICACION
1 a 11	Hexano	Transparente	1	A
12 a 20	"	Blanco parafina	1	B
21 y 22	"	Blanco	1	C
23 a 45	"	"	2	"
46 a 53	Hex-Acetato 95 : 5	Amarillo	3	D
54 y 55	"	"	2	"
55 a 77	"	Cera amarilla : p.f. : 57-60"	1	E
78 a 80	"	Anaranjado	2	F
81 y 82	"	"	4	"
83	"	Anaranjado precipitado	4	"
84 a 89	"	Anaranjado	4	"
90 a 109	"	Amarillo	3	"
110 a 119	Hex-Acetato 90:10	"	5	"
120 a 122	"	"	4	"
123	"	"	3	"
124 y 125	"	"	2	"
126 y 127	"	"	4	"
128 a 130	"	Verde	7	"
131 a 136	Hex-Acetato 85:15	"	7	"
139 y 140	"	"	4	"
141	"	"	3	"
142 a 149	"	Amarillo	2	"
150 a 159	"	"	6	"
160 a 163	"	"	3	"
164 a 167	"	"	5	"
168 a 175	"	"	4	G
176 a 181	"	"	2	"
182 a 186	"	"	3	"
187 a 211	Hex-Acetato 75:25	"	3	"
212 a 217	"	"	2	"
218 a 224	"	"	1	H
225	"	"	2	I
228 a 236	"	"	3	J
238 a 256	Hex-Acetato 85:35	Amarillo-verdoso	1	K
257 a 266	Hex-Acetato 65:45	"	2	L
267 a 269	"	"	4	M
270 a 274	Hex-Acetato 45:55	"	4	"
275 a 284	"	"	3	N
285	"	"	1	O
286 a 289	"	"	2	"
290 y 291	"	"	3	P
292 a 294	"	"	2	Q
295	Hex-Acetato 35:65	"	2	"
296 a 298	"	"	2	"
299 a 314	"	"	1	R
315 a 321	Hex-Acetato 25:75	"	1	"
323 a 333	"	"	2	S
334 a 352	Hex-Acetato 15:85	"	2	"
353 a 355	Acetato de etilo	"	2	"
356 a 367	"	"	1	T

Tabla 9 Características de las fracciones.

6.4 Identificación de los compuestos B, H y K

Las fracciones B, H y K mostraron una sola mancha en la placa de control, por lo que se procedió a su caracterización. A la fracción B se le realizaron los siguientes análisis espectroscópicos:

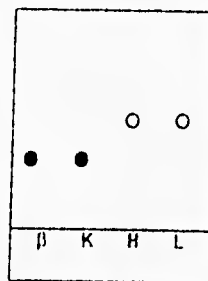
- Espectrometría de masas por impacto electrónico.
- Resonancia magnética protónica.
- Infrarrojo.

Las fracciones H y K se eluyeron con hexano-acetato de etilo 80:20 lo que hizo suponer que fueron los terpenos o esteroides más comunes por lo que se corrieron en placa con β -sitosterol y Lupeol, como marcadores. Efectivamente se observó una clara correspondencia entre la muestra K y el β -sitosterol, así como una correlación entre el Lupeol y la muestra H. La evidencia de esto se muestra a continuación.

Eluyente : Hexano-acetato de etilo 80:20

Revelador : Sulfato cérico

β : β - sitosterol , K : muestra K , H : muestra H . L : lupeol



V DISCUSION DE RESULTADOS

PERFILES CROMATOGRÁFICOS

El análisis de los perfiles cromatográficos de las distintas partes de la planta tuvo por objeto ver la distribución de los compuestos en éstas.

Los perfiles del extracto hexánico muestran similitud en tallo, flor y raíz, en tanto que en hoja se encuentran 3 manchas en la zona de mayor polaridad.

Del extracto metanólico los perfiles de hoja y flor fueron similares, los de tallo y raíz resultaron diferentes.

GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

Las pruebas para metabolitos secundarios del extracto hexánico fueron positivas para terpenos y esteroides en todos los órganos analizados; para los flavonoides, solamente en hoja (tabla 4).

Para el extracto metanólico se determinaron 5 grupos (tabla 5). No se encontraron terpenos en hoja, el tallo no presentó ni alcaloides ni saponinas, en la flor se encontraron los 5 grupos de metabolitos secundarios y en la raíz estuvieron ausentes: flavonoides y saponinas.

CONTENIDO TOTAL DE ALCALOIDES

Para la cantidad de alcaloides, por ser un análisis comparado con los resultados obtenidos en plantas de otras regiones, se eligió la hoja, que es el órgano sobre el que trabajó Maili (1979). Se determinó el contenido total de alcaloides y el de glicoalcaloides, para los alcaloides totales se siguió la técnica de Maiti (1979) y se obtuvo un rendimiento de 0.12 %, este valor se comparó con los datos reportados por el autor y que incluyen 31 especies de *Solanum*, el valor reportado para *Solanum torvum* concuerda con el obtenido en este trabajo así como la presencia de solasodina (tabla 10).

Para la determinación de glicoalcaloides, se siguió el método espectrofotométrico de Lewis (1970), para la obtención de la curva patrón se hizo una separación en placa preparativa de la solasonina y de la solamargina, las cuales se usaron como patrón de referencia. La cantidad de glicoalcaloides que tuvo la hoja fue de 0.153 %.

SEPARACION DE COMPUESTOS POR CROMATOGRAFÍA EN COLUMNA

El último estudio que se hizo de la especie fue el del extracto hexánico de hoja, para separar algunos de sus compuestos por cromatografía en columna, de esta forma se obtuvo de las primeras fracciones un hidrocarburo (fracción B), el cual se caracterizó por sus espectros infrarrojo, R.M.P. y espectro de masas, las cuales mostraron las señales características de este tipo de compuestos.

I. R. : Bandas en 3019, 2926 y 2854, correspondiente a vibraciones Carbono - Hidrógeno.

R. M. P. : Señal de metilos a 0.9 ppm y señal de metilenos a 1.35 ppm.

Espectro de masas : Ión molecular 464, fragmentación característica de cadena de metilenos.

Estos datos espectroscópicos indican que se trata de un hidrocarburo con 33 átomos de Carbono.

En las fracciones eluidas con una mezcla: Hexano-acetato de etilo 8:2, se obtuvieron 2 compuestos puros H y K (tabla 9), la polaridad de la mezcla hizo pensar que podrían ser algunos de los esteroides o terpenos más comunes, por lo que se corrió una placa con β -sitosterol y lupeol, como referencias. El compuesto H se correspondió con el β -sitosterol y el compuesto K con el lupeol, por lo que estas fracciones quedaron identificadas como correspondientes a estos dos compuestos.

TABLA COMPARATIVA DEL CONTENIDO TOTAL DE ALCALOIDES Y LA PRESENCIA DE SOLASODINA, CON ESPECIES DE *Solanum* DE LA INDIA.

	Especie	Frutos	Hojas
1.	<i>S. aculeatissimum</i>	0.14 (-)	0.26 (-)
2.	<i>S. arundo</i>	0.47 (-)	cero
3.	<i>S. auriculatum</i>	2.60 (+)	0.31 (+)
4.	<i>S. capsicoides</i>	Traz. (-)	1.98 (-)
5.	<i>S. clavatum</i>	0.92 (-)	1.85 (-)
6.	<i>S. denticulatum</i>	0.52 (-)	0.31 (-)
7.	<i>S. eleagnifolium</i>	3.40 (+)	0.18 (+)
8.	<i>S. ferrox</i>	0.30 (-)	0.43 (-)
9.	<i>S. giganteum</i>	0.39 (-)	1.92 (+)
10.	<i>S. glaucum</i>	cero	0.29 (-)
11.	<i>S. grandiflorum</i>	cero	0.25 (-)
12.	<i>S. hispidum</i>	Traz. (-)	Traz. (-)
13.	<i>S. incanum</i>	1.05 (-)	0.96 (-)
14.	<i>S. indicum</i>	0.20 (+)	0.20 (+)
15.	<i>S. integrifolium</i>	cero	cero
16.	<i>S. jasminoides</i>	Traz. (+)	1.10 (+)
17.	<i>S. khasianum</i>	6.10 (+)	0.89 (+)
18.	<i>S. kurzii</i>	cero	0.22 (-)
19.	<i>S. macranthum</i>	cero	0.25 (-)
20.	<i>S. nigrum</i>	0.10 (+)	0.43 (+)
21.	<i>S. pubescens</i>	0.55 (+)	0.99 (+)
22.	<i>S. robustum</i>	1.68 (-)	0.94 (-)
23.	<i>S. seaforthianum</i>	2.06 (-)	0.87 (-)
24.	<i>S. silymbriifolium</i>	cero	0.15 (-)
25.	<i>S. spirale</i>	cero	1.29 (-)
26.	<i>S. surattense</i>	0.21 (+)	0.71 (+)
27.	<i>S. torvum</i>	0.14 (+)	0.12 (+)
28.	<i>S. trilobatum</i>	0.95 (+)	0.36 (+)
29.	<i>S. vagum</i>	1.38 (-)	2.41 (-)
30.	<i>S. verbascifolium</i>	0.39 (+)	0.36 (+)
31.	<i>S. wendlandii</i>	0.30 (-)	sin exam.
*	<i>S. torvum</i>	sin exam.	0.12 (+)

* especie mexicana

Tabla 10. Se representa el contenido total de alcaloides (%) en frutos y hojas, seguido de un paréntesis que indica la presencia o ausencia de solasodina.

VI CONCLUSIONES

PERFILES CROMATOGRÁFICOS DE LOS EXTRACTOS HEXÁNICO Y METANÓLICO

Se encontró una distribución semejante para tallo, flor y raíz y diferente para hoja.

GRUPOS DE METABOLITOS SECUNDARIOS

La distribución de estos grupos fue diferente en todos los órganos.

ANÁLISIS DE ALCALOIDES

Los alcaloides totales encontrados en la hoja, tuvieron un porcentaje igual (0.12 %) al reportado por Maiti (1979).

El valor encontrado para los glicoalcaloides representó un rendimiento de 0.153 %, calculado para solasonina más solamargina, en una evaluación espectrofotométrica.

OBTENCIÓN DE COMPUESTOS DEL EXTRACTO HEXÁNICO

De este extracto se obtienen 3 compuestos puros que se caracterizan como:

a) Hidrocarburo con 33 átomos de Carbono.

b) β -sitosterol.

c) Lupeol.

VII LITERATURA CITADA

- Cronquist, A. (1981). An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York, Columbia University Press.
- Doepke, W., Nogueiras, C., Hess, U. (1975). Steroid alkaloid and saponin contents of *Solanum torvum*. Pharmazie, 755.
- Domínguez, X. A. (1979). Métodos de Investigación Fitoquímica. México. Limusa.
- Favez, M. B. E. and Saleh, A. A. (1967). Constituents of local plants XII. The steroidal constituents of *Solanum torvum*. Plant. Med. 15(4), pp. 430-433.
- Galindo, J.I.. (1986) Esteroides alcaloidales en *Solanum marginatum*. México Tesis Facultad de Química, UNAM.
- Jones, S. B. (1987). Sistemática Vegetal. México. Mc Graw Hill.
- Lewis, D. C. and Liljgren, D. R. (1970). Glycoalkaloids from *Archeosolanum* species. Phytochemistry, Vol. 9, pp. 2193-2195. Pergamon Press.
- Mahmood, U. Agrawal, P. and Thakur, S. (1985). Torvonin-A, a spirostane saponin from *Solanum torvum* leaves. Phytochemistry, Vol. 24, No. 10, pp. 2456-2457.
- Mahmood, U. Shukla, Y. and Thakur, R. (1983a). Non-alkaloidal constituents from *Solanum torvum* leaves. Phytochemistry, Vol. 22 No. 1, pp. 167-169.
- Mahmood, U., Thakur, R.S. and Blunden, G. (1983b) Neochlorogenin, Neosolaspigenin and solaspigenin from *Solanum torvum* leaves. J. Nat. Prod. 46 (43).
- Maiti, P.C., Mookherjee, S., Maitw, R. and Dan, S. S. (1979). Studies on indian *Solanum* I. Alkaloids contents and detection of solasodine. Economic Botany, 33 (1). pp. 75-77.
- Morales, A., Cázares, R. y Romo, J. (1970). Estudio de los componentes de *Solanum torvum* Sw. México. Inst. de Inv. Quím. Fac. de Farm. Univ. de los Andes Mérida Ven. Inst. de Quím. UNAM.
- Nee, M. (1993). Flora de Veracruz, Solanaceae II. Xalapa Ver. Instituto de Ecología A. C.
- Ripperger, H., Moritz, W. und Schreiber, K. (1971). Zur biosynthese von *Solanum*-alkaloiden aus cycloartenol oder lanosterin. Phytochemistry, Vol. 10, pp. 2699-2704. Pergamon Press.
- Rönsh, H. und Schreiber, K. (1966). *Solanum*-alkaloiden-LXXII. Phytochemistry, Vol. 10, pp. 1227-1233. Pergamon Press.
- Schreiber, K., and Ripperger, H. (1968). *Solanum*-alkaloids. LXXXIV. Isolation of jurubine, neochlorogenin and paniculogenin from *Solanum torvum*. Kulturpflanze, 15, pp. 199-204.
- Stahl, E. (1965). Thin-layer chromatography, a laboratory hand book. Berlin. Springer Verlag.
- Verbist, J. F., Monet, R. and Dobremez, J. F. (1977). Steroidal alkaloids of seven nepalese *Solanum* (species): Identification, content. Plant. Med. Phytoter, 11 (1).. 40-48.