

Los glicósidos esteroidales. Aislamiento y elucidación estructural

José Orestes Guerra de León

Edición: Liset Ravelo Romero

Corrección: Estrella Pardo Rodríguez

Diagramación: Roberto Suárez Yera

© José Orestes Guerra de León, 2009

© Sobre la presente edición: Editorial Feijóo, 2009

ISBN: 978-959-250-541-4

EDITORIAL
Feijóo

Editorial Samuel Feijóo, Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas, Carretera a Camajuaní, km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54830

INTRODUCCIÓN

Las saponinas esteroidales son compuestos que poseen una estructura compleja formada por un núcleo esteroidal hidrofóbico y una parte hidrofílica constituida por unidades de monosacáridos. Estas están ampliamente distribuidas en el reino vegetal y aunque en mayor o menor medida se encuentran en una gran cantidad de plantas, son especialmente abundantes en algunas familias, entre ellas la *Agavaceae*.

Estos compuestos poseen como propiedades comunes la alta capacidad de formación de espumas en soluciones acuosas, su actividad hemolítica, ser tóxicos para los peces y la formación de complejos con el colesterol.^{1, 2}

Las saponinas tienen un amplio rango de actividades biológicas tales como su acción antimicótica³, antiviral⁴, anticáncer⁵, hipolesterolémica⁶, hipoglicaémica⁷, antitrombótica⁸, diurética⁹, antiinflamatoria¹⁰ y molusquicida.^{11, 12}

¹ Lacaille-Dubois, M. A.; Wagner, H. **1996**. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. *Phytomedicine*, 2, 363-386.

² Agrawal P. K.; Jain D. C.; Gupta R. K.; Thakur R. S. **1985**. Carbon-13 NMR spectroscopy of steroidal sapogenins and steroidal saponins. *Phytochemistry*, 24, 2479-2496.

³ Zamilpa, A.; Tortoriello, J.; Navarro, V.; Delgado, G.; Alvarez, L. **2002**. Five New Steroidal Saponins from *Solanum chrysotrichum* Leaves and Their Antimycotic Activity. *J. Nat. Prod*, 65, 1815-1819.

⁴ Aquino, R.; Conti, C.; DeSimone, F.; Orsi, N.; Pizza, C.; Stein, M. L. **1991**. Antiviral activity of constituents of *Tamus communis*. *J. Chemother.* 3, 305-309.

⁵ Sung, M. K.; Kendall, C. W. C.; Rao, A. V. **1995**. Effect of saponins and *Gypsophila* saponin on morphology of colon carcinoma cells in culture. *Food Chem. Toxicol.* 33, 357-366.

⁶ Sauvaire, Y.; Ribes, G.; Baccou, J. C.; Loubatier'es-Mariani, M. M. **1991**. Implication of steroid saponins and sapogenins in the hypocholesterolemic effect of fenugreek. *Lipids*, 26, 191-197.

En los últimos años, el desarrollo de técnicas espectroscópicas modernas de Resonancia Magnética Nuclear (TOCSY, HMBC, HSQC, HSQC-TOCSY, COSY, NOESY)^{13, 14} y de Espectrometría de Masas (ESI y FAB)^{15, 16} ha sido de gran ayuda en el trabajo de caracterización y ha permitido un incremento en el número de publicaciones referidas a estos metabolitos.

Saponinas y sapogeninas esteroidales

Estructura

Las saponinas son glicósidos (fig. 1) en los cuales varias unidades de monosacáridos se enlazan mediante un enlace glicosídico a un resto denominado

⁷ Kato, A.; Miura, T.; Fukunaga, T. **1995**. Effects of steroidal glycosides on blood glucose in normal and diabetic mice. *Biol. Pharm. Bull.* 18, 167-168.

⁸ Zhang, J.; Meng, Z.; Zhang, M.; Ma, D.; Xu, S.; Kodama, H. **1999**. Effect of six steroidal saponins isolated from *Anemarrhenae rhizoma* on platelet aggregation and hemolysis in human blood. *Clin. Chim. Acta.* 289, 79-88.

⁹ Silva G. M., De Souza A. M., Lara L. S., Mendes T. P., Da Silva B. P., Lopes A. G., Caruso-Neves C., Parente J. P. **2005**. A new steroidal saponin from *Agave brittoniana* and its biphasic effect on the Na⁺-ATPase activity. *Z. Naturforsch. C*, 60, 121-127.

¹⁰ Da Silva, B. P.; De Sousa, A. C.; Silva, G. M.; Mendes, T. P.; Parente, J. P. **2002**. A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*. *J. Biosci.* 57, 423-428.

¹¹ Abdel-Gawad, M. M.; El-Sayed, M. M.; Abdel-Hameed, E. S. **1999**. Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*. *Fitoterapia*, 70, 371-381.

¹² El-Sayed, M. M. **1998**. Molluscicidal steroidal saponins from *Agave ferox*. *J. Pharm. Sci.*, 7, 73-79.

¹³ Gonzalez, A. G.; Hernández, J. C.; León, F.; Padrón, J. I.; Estévez, F.; Quintana, J.; Bermejo, J. **2003**. Steroidal saponins from the bark of *Dracaena draco* and their cytotoxic activities" *J. Nat. Prod.*, 66, 793-798.

¹⁴ Oleszek, W.; Sitek, M.; Stochmal, A.; Piacente, S.; Pizza, C.; Cheeke, P. **2001**. Steroidal saponins of *Yucca schidigera* Roetzl. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4392-4396.

¹⁵ De Combarieu, E.; Fuzzati, N.; Lovati, M.; Mercalli, E. **2003**. Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*. *Fitoterapia*, 74, 583-591.

¹⁶ Feng, L.; Li-Jun, L.; Zeper, A.; Yun-Chong, Y.; Jian-Gong, S. **2002**. Structural characterization of steroidal saponins by electrospray ionization and fast-atom bombardment tandem mass spectroscopy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 16, 1168-1173.

aglicón. El aglicón puede ser de naturaleza triterpénica o esteroidal y en función de esto las saponinas se clasifican en saponinas triterpénicas y saponinas esferoidales, respectivamente.

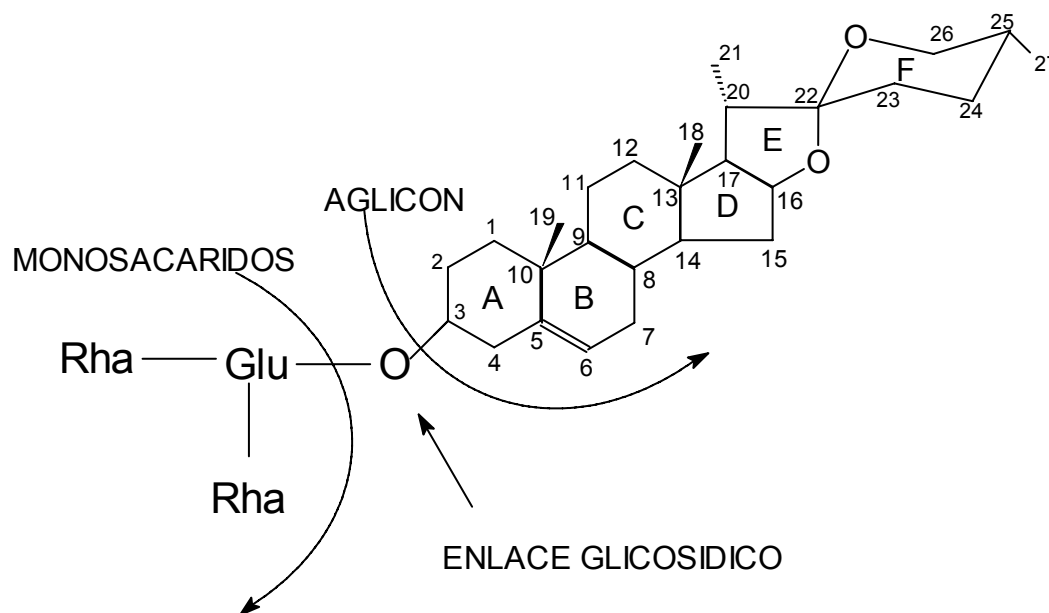


Fig.1. Ejemplo de saponina esteroidal

El aglicón en las saponinas esteroidales (sapogenina) presenta el esqueleto tetracíclico característico de este tipo de compuestos, denominado gonano (ciclopentanoperhidrofenantreno) en el caso de ser saturado.

La característica estructural fundamental de estas sapogeninas radica en la presencia de dos anillos adicionales que se originan a partir del C-17 del esqueleto base y están contenidos, respectivamente, en dos planos perpendiculares entre sí.

Además, el átomo de carbono común a estos dos nuevos anillos está unido a dos átomos de oxígeno (estructura de un cetel) por los que a esta “cadena” lateral se le ha dado el nombre de cadena espirocetálica. Las sapogeninas pueden clasificarse de acuerdo a la estructura de los anillos E y F en espirostanos, furostanos y furoespirostanos, fundamentalmente, siendo el primer grupo el más importante (fig. 2). Estos compuestos pueden presentar unión trans (serie 5α) o

cis (serie 5 β) entre los anillos A y B, además todos presentan grupos metilos en C-10 y C-13 dirigidos hacia la cara β de la molécula. En el caso de que las sapogeninas posean una insaturación entre C-5 y C-6 se clasifican como Δ^5 espirostanos.

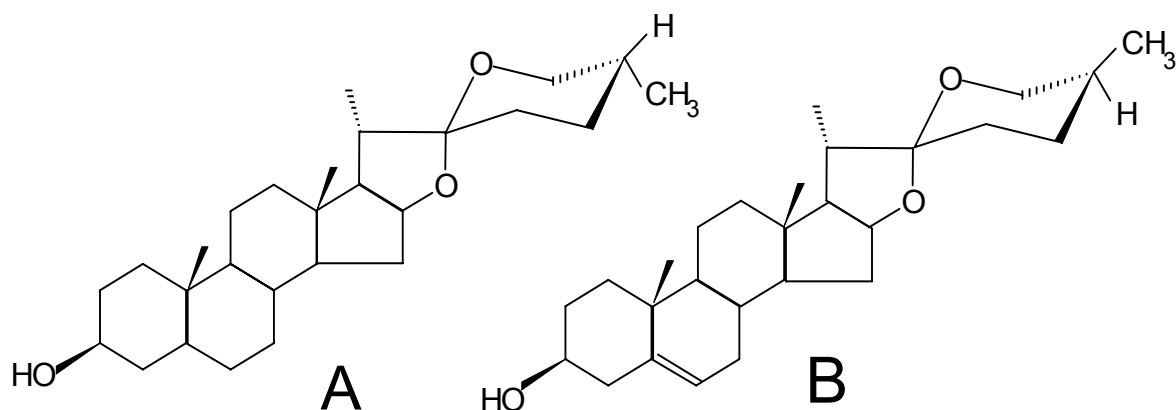


Fig. 2. Ejemplos de espirostanos

A) 3 β -hidroxi-5 α , 25R-espiroetano.

B) 3 β -hidroxi-25S-espirost-5-eno.

Adicionalmente a otros esteroides las sapogeninas presentan centros quirales en C-22 y C-25, determinando este último dos series para la clasificación de estos compuestos, la serie "*iso*" (configuración 25 R) y la serie "*neo*" (configuración 25 S).

Las saponinas esteroidales poseen de una a seis unidades de monosacáridos unidas entre sí mediante enlaces glicosídicos. Estas unidades son comúnmente hexosas, pentosas y deoxihexosas, entre las que se encuentran principalmente glucosa, rhamnosa, galactosa y xilosa. Los enlaces glicosídicos pueden tener configuración α o β . Este resto glicosídico, que puede ser lineal o ramificado en la mayoría de los casos se une con el aglicón a través del C-3 del mismo.

Aislamiento

En la literatura se encuentra una gran cantidad de trabajos en los que se reporta la extracción de saponinas. En los mismos se aprecia la existencia de un tronco común en las metodologías utilizadas que se puede resumir en los pasos siguientes:

- a) Proceso de desengrase del material vegetal: El mismo tiene como objetivo eliminar los compuestos lipídicos que posee la planta, que pueden afectar operaciones posteriores. El desengrase puede realizarse directamente al material vegetal o a extractos obtenidos de éste.
- b) Obtención del “crudo” de saponinas: Se realiza la extracción del material vegetal empleando solventes polares tales como metanol, etanol y n-butanol o mezclas hidroalcohólicas de cada uno de ellos. El n-butanol es muy utilizado por su especificidad para este tipo de compuestos.
- c) Hidrólisis de las saponinas: Generalmente se realiza por vía química utilizando un ácido mineral como catalizador y su finalidad es liberar las sapogeninas.
- d) Extracción de las sapogeninas liberadas en el proceso de hidrólisis: En este proceso se utilizan solventes de mediana polaridad como acetato de etilo y cloroformo.

Los pasos c y d se realizan para obtener las sapogeninas que se encuentran en forma de glicósidos y proceder a su caracterización como información previa en la elucidación estructural de las saponinas. En los últimos años, aparejado al desarrollo de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear, es cada vez más posible determinar las estructuras de estas moléculas sin necesidad de utilizar métodos destructivos por lo que estas etapas pueden omitirse.

En el aislamiento y purificación de estos compuestos los métodos cromatográficos juegan un papel decisivo. En la literatura se reporta el uso de la cromatografía de capa delgada preparativa (CCDP)^{17, 18} y cromatografía de columna (CC)¹⁹. Entre

¹⁷ Luck de Ugaz O. 1988. "Investigación fitoquímica: Métodos en el estudio de productos naturales". Editorial de la Pontificia Universidad Católica. Perú. p 1, 9, 63.

los adsorbentes más utilizados en estas técnicas se encuentran la alúmina, sílicagel de diferentes granulometrías y más recientemente sephadex LH-20^{20, 21}. La cromatografía gaseosa (CG)^{22, 23} y más actualmente la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)^{24, 25} así como las técnicas de cromatografía de partición a contracorriente RLCC (Rotation Locular Countercurrent Chromatography) y DCCC (Droplet Countercurrent Chromatography)^{26, 27} se han utilizado con estos propósitos.

En algunos trabajos encontrados en la literatura aparece el uso combinado de estas técnicas, especialmente en el caso de las saponinas, que por ser altamente polares y solubles en agua su purificación es una tarea difícil. Ejemplos de esto último son los trabajos de Fukahara y Kubo²⁷ en los cuales se logró la obtención de glicósidos con propiedades alelopáticas combinando técnicas basadas en la partición y los de Hostettman *et al.*²⁶, en los que aíslan saponinas esteroidales de

¹⁸ Heftmann E. 1976. "Chromatography of steroids". Journal Chromatography Library. Vol. 8. Ed. Elsevier Scientific Publishing. Amsterdam.

¹⁹ Usubillaga A., Meccia G. 1987. "Steroidal sapogenins from *Solanum sacorpioideum*". *Journal of Nat. Prod.* 50.

²⁰ Espejo O. 1981. "Spirostanic diosgenin precursors from *Dioscorea* composite tubers". *Phytochemistry.* 21, 413-416.

²¹ Hostettmann K., Hostettmann M. Marston A. 1985. "Preparative Chromatography Techniques. Application in Natural Product Isolation". Edited by Springer-Verlag. Berlín. p. 15,121.

²² Robaina C. 1979. "Estudio Fitoquímico del *Agave fourcroydes*". *Revista Cubana de Farmacia.* 13, 59-61.

²³ Sánchez M. J. 1972. "Estudio de la variación del contenido de sapogeninas en el *Agave fourcroydes* de diferentes plantaciones de Cuba". *Rev. Cubana de Farmacia* 6, 2-3.

²⁴ Pettit G., Doubek D., Herald D., Numata A. 1991. "Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the african medicinal plants *Balanites aegyptica*". *J. Nat. Prod.* 54, 1491-02.

²⁵ Hunter I., Walden M., Bailey G., Heftmann E. 1981. "High-performance liquid chromatography, infrared and raman spectra of steroidal sapogenins". *Journal of Natural Products.* 44.

²⁶ Hostettmann K., Hostettmann M. Marston A. 1985. "Preparative Chromatography Techniques. Application in Natural Product Isolation". Edited by Springer-Verlag. Berlín. p. 15,121

²⁷ Fukuhara K. y Kubo I. 1991. "Isolation of steroidal glycoalkaloids from *Solanum incanum* by two countercurrent chromatographic methods". *Phytochemistry.* 30, 685-687.

la corteza del *Cornus florida* mediante la utilización combinada de CC (Filtración por gel utilizando LH-20) y DCCC. En el aislamiento de saponinas esteroideas de las raíces y corteza de la planta denominada *Balanites aegyptiaca* fue utilizada esta última combinación y comparada con técnicas convencionales de CCD preparativa y CC. Utilizando sucesivamente la CC con sephadex LH-20 y sílicagel así como la aplicación de técnicas de HPLC se logró en la misma planta el aislamiento de saponinas de sus semillas.²⁸

Elucidación estructural

Si se cuenta con patrones adecuados la cromatografía de capa delgada es un procedimiento eficaz para detectar de forma rápida las sapogeninas presentes en un extracto^{29, 30} lo cual puede ser corroborado por otros procedimientos. Esta técnica es menos útil en el caso de las saponinas por no disponerse comercialmente de patrones de este tipo de compuestos.

De modo general, en todos los trabajos donde se aborda la caracterización de estos metabolitos se hace uso de técnicas espectroscópicas.

El espectro infrarrojo (IR) de una sapogenina esteroidea posee³¹ cuatro señales características del anillo F que aparecen aproximadamente a 850, 900, 920 y 985 cm^{-1} . Si la intensidad de la señal en 900 cm^{-1} es mayor que la de 920 cm^{-1} estamos en presencia de una sapogenina de la serie "iso" (25 S) y en el caso contrario de una sapogenina de la serie "neo" (25 R). Por otra parte, el espectro IR

²⁸Pettit G., Doubek D., Herald D., Numata A. 1991. "Isolation and structure of cytostatic steroidal saponins from the african medicinal plants *Balanites aegyptiaca*". *J. Nat. Prod.* 54 , 1491-02.

²⁹Martínez A., Nogueiras C. 1993. "Contenido de sapogeninas esteroideas en agaves de ciclo corto: *Manfreda brachystachis* (cav.) Rose (rizomas)" . Trabajo de Diploma. Facultad de Química. Universidad de La Habana.

³⁰Lorey S., Porzel A. 1996. "Two new steroidal alkaloid glycosides from *Solanum coccinerum*". *Phytochem.* 41, 1633

³¹ Wall M., Eddy C., Klumpp M. 1952. *Journal Am. Chem Soc.* 42, 4013.

nos puede revelar la presencia de determinados grupos funcionales (OH, CO, etc.) que poseen una frecuencia de absorción característica.

La espectrometría de masas (EM) es una técnica que ha tenido amplia aplicación en el campo de los productos naturales. En el caso de las sapogeninas esteroidales los trabajos de Budzicbievicz, Djeriaasi y Wiltioms,³² en el año 1962, marcaron pautas para la interpretación de los espectros y el establecimiento de los caminos de fragmentación de dichas sustancias. El espectro de masas de una sapogenina esteroideal permite establecer el sistema de anillos, la naturaleza y posible localización de un sustituyente. Los espirostanos siguen un patrón de fragmentación en el que el sistema espiro es el que origina todos los fragmentos importantes, ya sea portando la carga o eliminándose como un fragmento neutro. En el caso específico de las sapogeninas podemos considerar que en el ion molecular (Fig. 3) la carga se localiza sobre uno de los átomos de oxígeno del sistema espiro (A y B), especies estas que pueden fragmentarse originando los iones oxonio A-1, A-2, B-1 y B-2.

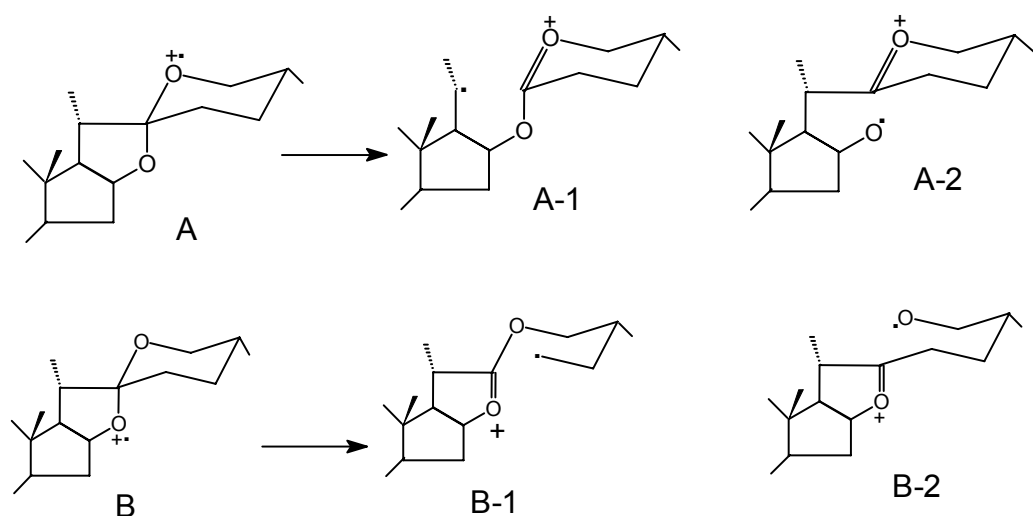


Fig. 3. Fragmentación del ion molecular

³² Budzikiewicz H., Djerassi C., Williams D. 1964. "Structure elucidation of natural products by mass spectroscopy". Vol II: Steroidal sapogenins. Ed Holden-Day. 2da. Edición. San Francisco. California. p. 110.

La formación de A-1 está favorecida por la existencia de un efecto estereoelectrónico³³ en el cual, un orbital p de O_F que está situado en posición antiperiplanar respecto al enlace C₂₀ - C₂₂, asiste a su ruptura. Cuando el anillo F invierte su conformación, el otro orbital p de O_F se sitúa en posición anti respecto al enlace C₂₂-O_E con lo que se favorece la formación de A-2 (fig. 4). Un análisis similar puede realizarse con el ion molecular B.

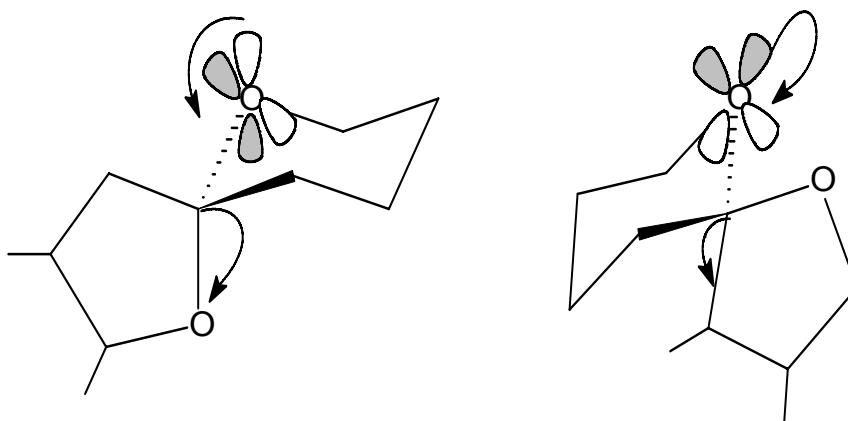


Fig. 4. Efectos estereoelectrónicos en la fragmentación del ion molecular

Estos iones producen diferentes fragmentaciones³² que se encuentran sólidamente confirmadas por estudios realizados utilizando marcaje con deuterio. El pico base para un gran número de compuestos entre los que se encuentran la diosgenina, hecogenina, tigogenina, sarsapogenina y deoxitigogenina tiene un valor m/e=139 lo cual se deriva de la fragmentación que muestra la figura 5.

³³ Deslongchamps P. 1983. "Stereochemical effect in organic chemistry". Ed Pergamon Press. 1ra. Edición. Londres.

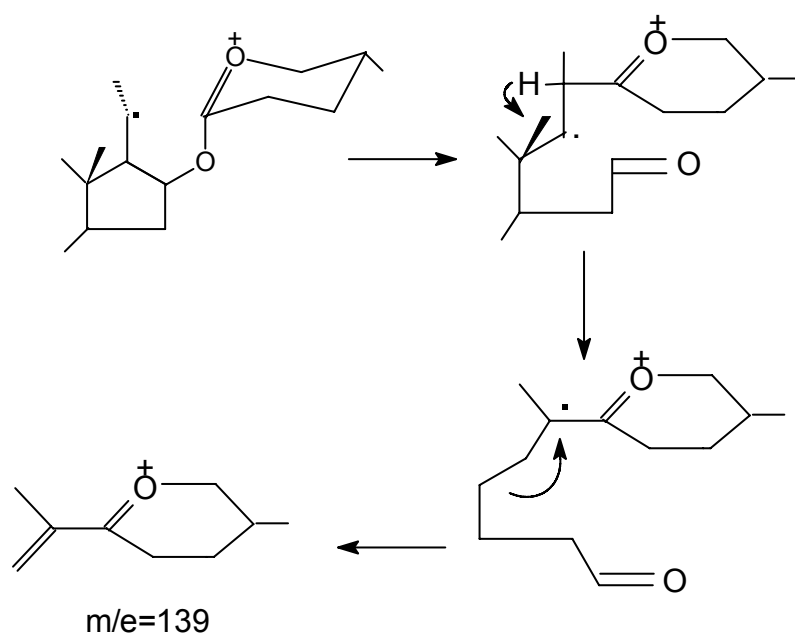


Fig. 5. Fragmentación

Otra fragmentación importante conduce a una señal en m/e 115 (fig. 6).

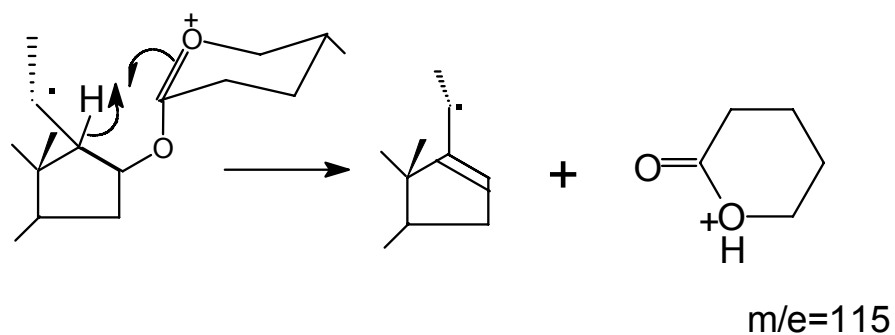


Fig. 6. Fragmentación

También en estos espectros aparecen señales a m/e 271, 285, 300, 342, 345 y 355 que son producto de procesos similares.

En ocasiones en los espectros de masa ordinarios hay señales que no se observan o aparecen con muy baja intensidad, lo que dificulta su asignación. Este problema se ha solucionado con la aparición desde la década de los ochentas de nuevas técnicas^{34, 35} para el registro de estos espectros. Así tenemos la espectrometría de masa por ionización de campo (FI-MS) y desabsorción en el campo (FD-MS) que son métodos de ionización suave para sustancias de baja volatilidad; espectrometría de masas por ionización química (CI-MS) y por bombardeo rápido de átomos (FAB-MS), siendo este último muy utilizado para ionizar moléculas no volátiles. Actualmente, en muchos trabajos donde se reportan la caracterización de glicósidos^{24, 36} se hace uso de estas técnicas, especialmente del FAB-MS. En uno de los más representativos³⁷, investigadores chinos al tratar de establecer la estructura de un compuesto nuevo, aislado de las raíces del *Solanum incanum*, no observaron el pico correspondiente al ion molecular al registrar un espectro de masa ordinario. Al registrar un FAB-EM (modo positivo) pudieron identificar un pico a m/z 986 que asignaron a $[M+H]^+$ y otros picos significativos a m/z 882 $[M - \text{Pentosa} + \text{CHO}]^+$, 720 $[m/e\ 882 - \text{Pentosa} - \text{CHO}]^+$, 576 $[m/e\ 720 - \text{Deoxihexosa} + \text{CHO}]^+$, 442 $[m/e\ 576 - \text{Pentosa}]^+$ y 397 $[\text{Aglicón} + H]^+$ con lo cual propusieron la fragmentación que se aprecia en la figura 7.

³⁴Riviera C. 1986. "Avances recientes en la espectrometría de masas por desabsorción en el campo y por bombardeo rápido de átomos en productos naturales". *Revista Latinoamericana de Química*. 17, 191-199.

³⁵ Xing-Long Li, De-Zu Wang, Su-Gong Wu, Chong -Pen Yang. 1990 "Triterpenoid saponins from *Pulsatilla campanella*". *Phytochemistry* 29, 595.

³⁶ Avilov S. 1994. "Structure of cocumarioside G-2, a novel nonholostane glycoside from the sea Cucumber *Eupentacta Fraudatrix*". *Journal of Nat. Prod.* 57, 1166-71.

³⁷ Chun-Nan Lin, Chai-Ming Lu, Ming-Kung Cheng, Kim-Hong Gan, Shen-Jeu Won. 1990. "The cytotoxic principles of *Solanum incanum*". *Journal of Natural Products*. 53, 513.

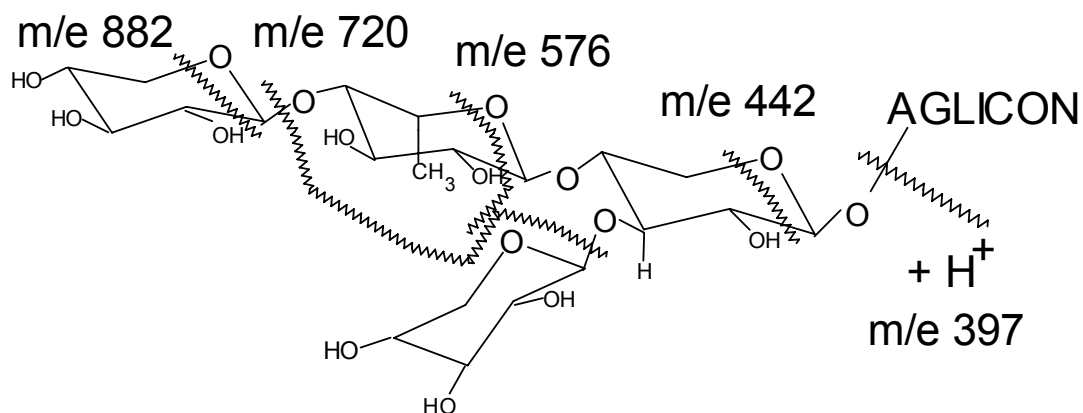


Fig. 7 Fragmentación de un glicósido

La Resonancia Magnética Nuclear (RMN) es una técnica muy poderosa y útil en la caracterización de saponinas y sapogeninas esteroidales.

En la literatura aparecen compilaciones de los corrimientos químicos en los espectros de RMN ^1H de gran cantidad de sapogeninas esteroidales. Se destaca en la década de los sesentas, la realizada por K. Tori y K. Aono³⁸ donde aparecen 155 compuestos y se relaciona la posición de las señales correspondientes a los metilos en C-18, C-19, C-21 y C-27 que son características de estos compuestos con la presencia de sustituyentes o insaturaciones en distintas posiciones, así como se plantean reglas de aditividad para los corrimientos químicos de los metilos angulares en función de dichos sustituyentes, siempre que no haya cambios en la estereoquímica del esqueleto esteroideal. Los metilos 18 y 19 aparecen como singletes con corrimientos químicos entre 0,95 y 1,10 ppm y los metilos 21 y 27 aparecen como dobletes que acoplan con el H-20 y el H-25, respectivamente ($J^3=6,5,5 \pm 0,3$ Hz) y corrimiento químico entre 0,78 y 0,80 ppm.

La asignación de las señales en estos espectros se comienza a realizar por las más desblindadas que son fácilmente identificables y que pertenecen a

³⁸ Tori K., Aono K. 1964. "NMR studies on steroid V. Steroidal sapogenins and their derivatives". Annual Report of SHIONOGI. No. 14. 136.

hidrógenos enlazados a carbonos con hibridación sp_2 o enlazados a un átomo de oxígeno.

También son señales características de estos compuestos las correspondientes a los H α y β) unidos a C-26 entre 3,30 y 3,5 ppm. El H-26 α (axial) aparece como un triplete alrededor de 3,32 ppm, su multiplicidad se debe a un doble acoplamiento cuasi degenerado geminal y vecinal axial-axial ($J^2 \approx J^3 \approx 10,6$ Hz). El H-26 β (ecuatorial) aparece como un doblete de doblete en 3,5 ppm y su multiplicidad se debe al acoplamiento geminal ($J^2 = 10,6$ Hz) y vecinal ecuatorial-axial ($J_{ea}^3 = 2,6$ Hz).

La señal del H-16 α aparece como cuarteto en 4,4 ppm y es debida al acoplamiento con protones 15 β (ecuatorial), 15 α y 17 β (cuasiecuatoriales).³⁹

Los estudios de RMN ^{13}C son muy útiles en la elucidación de la estructura de estos compuestos dada la sensibilidad de la señal al tipo y estereoquímica de los sustituyentes. En la década de los sesentas, Blunt y Stothers⁴⁰ realizaron una compilación de los corrimientos químicos de los espectros de alrededor de 400 derivados esteroidales. Posteriormente, se realizaron otros trabajos de este tipo, destacándose el resumen presentado por Agrawal y colaboradores² dirigido a saponinas y sapogeninas esteroidales.

En general, los espectros RMN ^{13}C de estos compuestos se registran de forma desacoplada para evitar el solapamiento de señales debido a la elevada magnitud del acoplamiento $^{13}C-^1H$ (120-250 Hz).

En este caso, la asignación se comienza a realizar también por las señales más desblindadas y otras típicas de estas estructuras que son fácilmente reconocibles.

³⁹ Alonso E. 1990. "Síntesis de análogos espirostánicos de brasinoesteroides". Tesis en opción al grado de Doctor en Ciencias Químicas. Facultad de Química. Universidad de La Habana.

⁴⁰ Blunt J. W. , Stothers J. B. 1977. " ^{13}C - NMR spectra of steroids. A survey and commentary". *Organic Magnetic Resonance*. 9, 439.

Las señales diagnósticas de los espirostanos pertenecen al anillo F y se muestran en la tabla 1.

Tabla 1. Señales diagnósticas de los espirostanos

C #	25R	25S
22	108,7-110,0	108,7-110,0
23	31,3±0,3	27,3±0,3
24	28,8±0,3	26,1±0,3
25	30,3±0,3	-
26	66,9±0,2	65,1±0,1
27	17,1±0,1	16,2±0,2

En los Δ^5 - espirostanos aparecen señales a $141,2 \pm 0,8$ y $121,0 \pm 0,4$ ppm asignadas a C-5 y C-6, respectivamente.

La determinación de las constantes de acoplamiento (J_{C-H}) facilita la asignación de carbonos hidroxilados pues en este caso su valor es de 142 ± 2 Hz mientras que en el resto de los átomos oscila de 120 a 130 Hz ².

Para estos compuestos normalmente no hay afectación en los corrimientos químicos de los átomos de carbono del anillo F por la presencia de sustituyentes en A, B y C. La comparación con espectros compilados en la literatura facilita la asignación del resto de las señales. ²

Muy utilizadas son las técnicas auxiliares DEPT (Distortion Enhancement by Polarization Transfer), SFORD (Single Frequency Off Resonance Decoupled), ATP (Attached Proton Test) e INEPT (Insensitive Nuclei Enhanced By Polarization

Transfer) que permiten diferenciar los distintos átomos de carbono (CH_3 , CH_2 , CH y C cuaternario) y facilitan la asignación.^{41, 42}

En los glicósidos, además de caracterizar el aglicón es necesario determinar el número de monosacáridos y caracterizarlos, lo que se realiza a partir del número de señales correspondientes a carbonos anoméricos y por comparación con espectros de azúcares libres.

La forma de conexión entre las distintas unidades de azúcares es quizás la información más significativa que brinda el espectro RMN ^{13}C , la que es muy difícil de obtener por otras vías. La secuencia de los azúcares puede determinarse sobre la base de los corrimientos químicos o la medición de los tiempos de relajación (τ_1). Los corrimientos químicos de los monosacárido terminales de una cadena glicosídica prácticamente no varían respecto a los metil-O-glicósidos correspondientes. En las unidades de monosacáridos internas la glicolización provoca un corrimiento de la señal a bajo campo en el carbono α (anomérico) y a campo alto en el carbono β . Estos efectos son independientes de la naturaleza del monosacárido y brindan un método para el establecimiento de la conectividad entre las unidades de azúcares. El resto de las señales de cada unidad no se afectan y pueden ser comparadas con los metil-O-glicósidos correspondientes. El uso del tiempo de relajación para este objetivo está basado en que el valor $N \cdot \tau_1$ (N: población del estado) para los carbonos de las unidades de monosacáridos se incrementa con la distancia a que estos se encuentren del aglicón.

Por otra parte, según el valor del corrimiento químico, es posible establecer la configuración de los carbonos anoméricos por la dependencia que existe entre ellos.

⁴¹ Puri R.; Wong T. C.; Puri R. K. 1994. " ^1H and ^{13}C NMR assignments and structural determination of a novel glycoalkaloid from *Solanum platanifolium*". *Journal of Natural Products*. 57, 587.

⁴² Mahato B., Sahuwp A., Tanaka K.. 1980 "Steroidal alkaloids from *Solanum khasianum*. Application of ^{13}C NMR spectroscopy to their structural elucidation" *Phytochemistry*. 13, 2017-2020.

Por último, comparando los valores de los corrimientos químicos de la saponina con los de la sapogenina libre correspondiente se puede conocer el lugar del aglicón en el que se unen los azúcares, por la variación que experimenta este valor en el carbono unido a un OH (sapogenina), respecto al mismo carbono unido al resto azucarado (saponina).²

Trabajos más recientes^{43,44,45} reportan la utilización de técnicas bidimensionales en la asignación de señales de RMN entre las que se encuentran las de correlación homonuclear HH COSY (Correlation Spectroscopy) y TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) así como HMQC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation) que permite correlacionar las señales de los espectros protónico y de carbono. También en estos trabajos se reporta el uso de la técnica NOESY (Nuclear Overhauser Effects Spectroscopy) en la cual la interacción de los protones que correlacionan ocurre a través del espacio y es útil en el establecimiento de la forma de unión entre las unidades de monosacáridos. Mediante la misma se pueden observar picos cruzados de protones separados por enlaces glicosídicos (4 enlaces) y por tanto pertenecientes a diferentes unidades de monosacáridos.

Saponinas aisladas de agaves

Las plantas pertenecientes al género *Agave* (fam. *Agavaceae*) son especies americanas que, desde la época de la conquista, los europeos calificaron como “*maravillas del nuevo mundo*” y se conocen en Cuba con el nombre de “*Maguey*”, vocablo que precisamente proviene de la cultura taína.

⁴³ Ripperger H., Porzel A. 1997. "Steroidal alkaloid glycosides from *Solanum suaveolens*". *Phytochemistry*. 46, 1279-82.

⁴⁴ Ripperger H. 1997. "Steroidal alkaloid glycosides from *Solanum upuro*". *Phytochemistry*. 44, 731-734.

⁴⁵ Tian R. H., Ohumura E.; 1997. "Abutiloside A, a 26-acylamino-3 beta, 16 alpha-dihidroxi-5 alpha-cholesta-22-one glycoside from *Solanum abutiloides*". 44, 723-726.

Este género está formado por 300 especies, de las que cerca de 50 crecen en la región de las Antillas. En Cuba hay una abundante presencia con 16 especies que se distribuyen a lo largo de todo el país.⁴⁶



Fig. 8. Agave florecido

Estas plantas poseen hojas de aspecto carnososo, con un margen comúnmente armado de espinas fuertes, de color castaño oscuro, que se disponen como rosetas rígidas con forma de espiral, en un número que oscila de 50 a 150. Después de varios años de crecimiento, en los mismos se produce una inflorescencia que llega a alcanzar una altura que sobrepasa los 6 m y agota la planta que muere poco después.

Los agaves se caracterizan por ser ricos en saponinas esteroidales, metabolitos que aparecen fundamentalmente en sus hojas y flores. Los trabajos que aparecen en la literatura, referidos al aislamiento y elucidación de las estructuras de glicósidos en las mismas, se resumen a continuación:

⁴⁶ Alvarez de Zayas A. 1995. "Los agaves de las Antillas". *Bol. Soc. Bot. México*.57, 37-48.

SAPONINAS AISLADAS DE AGAVES

Saponinas tipo espirostanos

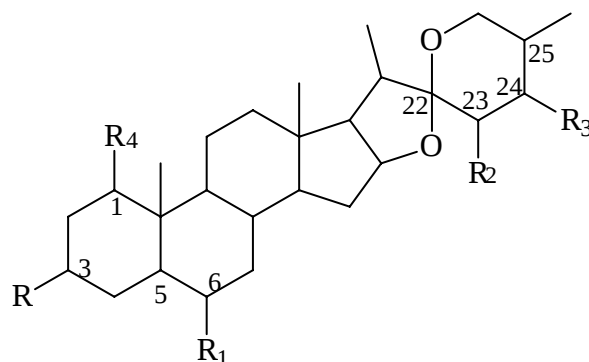


Fig. 9. Estructura general de las saponinas tipo espirostanos

- 1) Nombre: (3 β ,5 β ,25S)-espirostan-3-O- β -D-glucopiranosil- (1 $\rightarrow$ 2)- $\square$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O-[β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopiranosido⁴⁷

Aislada de las hojas del *Agave attenuata*.

R= Glu (1-2)-Glu (1-2)-[Glu (1-3)]-Glu (1-4)-Gal-

R₁= R₂= R₃= R₄= H

- 2) Nombre: (25R)-5 $\square$ -espirostan-3 $\square$ -ol-3-O-[$\square$ -D-apiofuranosil](1 $\square$ 4) $\square$ -D-glucopiranosil (1 $\square$ 3)[$\square$ -D-glucopiranosil(1 $\square$ 2)] $\square$ -D-galactopiranosido⁴⁸

Aislada de las hojas del *Agave lophantha*.

R= Ap (1-4)-Glu (1-3)-[Glu (1-2)]-Gal-

R₁= R₂= R₃= R₄= H

⁴⁷ Mendes T. P.; De Medeiros S., Graziela; Da Silva, Bernadete Pereira; Parente, Jose Paz. 2004 "A new steroidal saponin from *Agave attenuata*". *Nat. Prod. Res.* 18, 183-188.

⁴⁸ Abdel-Khalik, S. M.; Miyase, T.; Melek, F. R.; El-Shabraway, O. A.; Mahmoud, I. I.; Mina, S. A. 2002 "New steroidal saponins from *Agave lophantha* Schiede and their pharmacological evaluation". *Pharmazie* 57, 562-566.

- 3) Nombre: (25R)-5 α -espirostan-3 α -ol-3- O - α -rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopyranosido⁴⁹.

Aislada de los residuales del jugo de las hojas del *Agave sisalana*.

R= Rha (1-4)-Glu (1-2)-[Glu (1-3)]-Glu (1-4)-Gal-

R₁= R₂= R₃= R₄= H

- 4) Nombre: (25R)-5 α -espirostan-3 α -ol-3- O - α -L-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[β -D-xilopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- β -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopyranosido⁴⁹

Aislada de los residuales del jugo de las hojas del *Agave sisalana*.

R= Rha (1-4)-Glu (1-2)-[Xil (1-3)-Glu (1-3)]-Glu (1-4)-Gal-

R₁= R₂= R₃= R₄= H

- 5) Nombre: (22S,23S,24R,25S)-24- O -[(β -D-glucopyranosil)]-5 α -espirostan-3 α ,6 α ,23-triol-6- O - β -D-glucopyranosido⁵⁰

Aislada de los residuales del proceso industrial de la separación de la fibra

R= R₄= H, R₁=Glu, R₂= OH, R₃=Glu

- 6) Nombre: (22S,23S,24R,25S)-5 α -espirostan-3 α ,23,24-triol 24- O - β -D-glucopyranosido.⁵⁰

Aislada de los residuales del proceso industrial de la separación de la fibra.

R= OH, R₁= R₄=H, R₂= OH, R₃= Glu

- 7) Nombre: (25R)-5 α -espirostan-3 α -ol-3- O -[β -D-apiofuranosil](1 $\rightarrow$ 4) β -D-glucopyranosil(1 $\rightarrow$ 3)[β -D-glucopyranosil(1 $\rightarrow$ 2)] β -D-galactopyranosido⁵¹

⁴⁹ Yi, D.; Rui Hua, T.; Chong Ren, Y.; Yan Yong, C.; Toshihiro, N. 1993 "Two new steroidal saponins from dried fermented residues of leaf-juices of *Agave sisalana* forma Dong No. 1". *Chem. & Pharm. Bull.*, 41, 557-560.

⁵⁰ Jian-Ming, J.; Ying-Jun, Z.; Chong-Ren, Y. 2004 "Four new steroid constituents from the waste residue of fibre separation from *Agave americana* leaves". *Chem. & Pharm. Bull*, 52, 654-658.

Aislada de las hojas del *Agave lophantha*.

R= Ap(1-4)-Glu(1-3)-[Glu(1-2)]-Gal-

R₁= R₂= R₃= R₄= H

- 8) Nombre: Espirost-5, 25(27)-dieno-1 β , 3 β -diol-1- O - β -D-glucopiranosil-(1 β 3)-[β - L -rhamnopiranosil-(1 β 2)]- β -D-glucopiranosil-(1 β 4)- β -D-galactopiranosido⁵²

Aislada del extracto metanólico de las hojas del *Agave decipiens*. Tiene actividad molusquicida.

R= OH, R₁= R₂= R₃= H,

R₄= Glu (1-3) [Rha (1-2)]-Glu (1-4)-Gal-

- 9) Nombre: Espirost-5, 25(27)-dieno-1 β , 3 β -diol-3-O- β -D-glucopiranosil-(1 β 3)-[β -D-xilopiranosil-(1 β 3)- β -D-xilopiranosil-(1 β 2)]- β -D-glucopiranosil-(1 β 4)- β -D-galactopiranosido⁵².

Aislada del extracto metanólico de las hojas del *Agave decipiens*. Tiene actividad molusquicida.

R= Glu (1-3)-[Xil (1-3)-Xil (1-2)]-Glu (1-4)-Gal-

R₁= R₂= R₃= H, R₄=OH

- 10)Nombre: (25S) espirost-5-eno-3 β -ol- 3- O - β - L -rhamnopiranosil-(1 β 2)-[β - L-arabinopiranosil-(1 β 3)]- β -D-glucopiranosido⁵³

Aislada del del extracto metanólico de las hojas del *Agave ferox*. Tiene actividad molusquicida

⁵¹ Abdel-Khalik, S. M.; Miyase, T.; Melek, F. R.; El-Shabraway, O. A.; Mahmoud, I. I.; Mina, S. A. 2002 "New steroidal saponins from *Agave lophantha* Schiede and their pharmacological evaluation". *Pharmazie*, 57, 562-566.

⁵² Abdel-Gawad, M. M.; El-Sayed, M. M.; Abdel-Hameed, E. S. 1999 "Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*". *Fitoterapia*. 70, 371-381.

⁵³ El-Sayed, M. M. 1998 " Molluscicidal steroidal saponins from *Agave ferox*". *J. Pharm. Sciences*, 7, 73-79.

R= Rha (1-2)-[Ara (1-3)]-Glu-

R₁= R₂= R₃= R₄=H

11)Nombre: (25S)-espirost-5-eno-3 α -ol- 3- O - α - L -rhamopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)[- α - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- α - D -glucopiranosido ⁵³.

Aislada del extracto metanólico de las hojas del *Agave ferox* actividad molusquicida.

R= Rha (1-2)-[Glu (1-4)]-Glu-

R₁= R₂= R₃= R₄=H

12)Nombre: (25R)-espirost-5 α -3 α -ol-3- O - α - L -rhamopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3) α - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-[α - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- α - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- α - D -galactopiranosido⁵⁴

Aislada de las hojas del *Agave americano*.

R= Rha (1-3)- Glu (1-2)-[Glu (1-3)]- Glu (1-4)-Gal-

R₁= R₂= R₃= R₄=H

13)Nombre: (25R)-5 α -espirost-3 β , 6 α -diol- 3- O - α - L -rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-[β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β - D -galactopiranosido.⁵⁵

Aislada de las hojas del *Agave fourcroydes*. Actividad citotóxica frente a células HeLa.

R= Rha(1-4)-Glu(1-3) [Glu (1-3)-Glu(1-2)]-Glu(1-4)-Gal-

R₁= OH, R₂= R₃= R₄=H

⁵⁴ Jian-Ming, J.; Xikui, L.; Chong-Ren, Y. 2002 "New staroidal saponin from fermented leaves of *Agave americana*". *Yunnan Zhiwu Yanjiu*, 24 , 539-542.

⁵⁵ Ohtsiki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Sakai, S.; Kawahara, N.; Goda, Y.; Yamaguchi, N.; Ishibashi, M. 2004. "New chlorogenin hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities". *Biorg. Med. Chem.* 12, 3841-3845.

14)Nombre: (25R)-5 α -espirost-3 β -ol- 3- O - α - L -rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β - D - glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-[β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β - D -galactopiranosido.⁵⁵

Aislada de las hojas del *Agave fourcroydes*. Actividad citotóxica frente a células HeLa

R= Rha(1-4)-Glu(1-3) [Glu (1-3)-Glu(1-2)]-Glu(1-4)-Gal-

R₁= R₂= R₃= R₄=H

15)Nombre: (25R)-6- O -[β - D -glucopiranosil]-5 α -espirostan-3 β , 6 α -diol- 3- O - α - β - D -glucopiranosido.⁵⁵

Aislada de las hojas del *Agave fourcroydes*. Actividad citotóxica frente a células HeLa.

R= Glu

R₁= Glu, R₂= R₃= R₄= H

16)Nombre: (25R)-6- O -[β - D -glucopiranosil]-5 α -espirostan-3 β , 6 α -23-triol- 3- O - α - β - D -glucopiranosido⁵⁵.

Aislada de las hojas del *Agave fourcroydes*. Actividad citotóxica frente a células HeLa.

R= Glu

R₁= Glu, R₂= OH, R₃= R₄=H

Saponinas tipo espirostanos con grupo carbonilo en 12

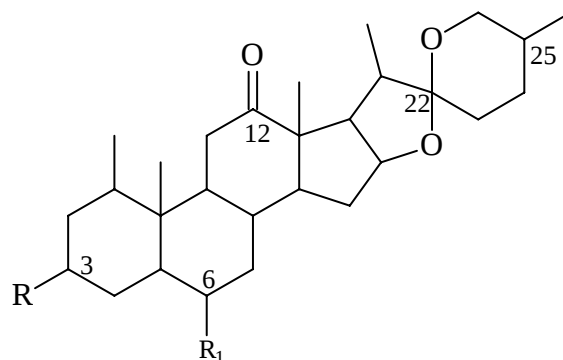


Fig. 10. Estructura general de las saponinas tipo espirostanos con un grupo carbonilo en C-12

- 1) Nombre: 3-O-(α -L-rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3))(α -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4))- α -D-glucopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- α -D-galactopyranosil-25R-espirostan-5 β -12-oxo-3 α ,6 α -diol⁵⁶

Aislada de las hojas del *Agave brittoniana*. Posee actividad diurética.

R = [rha(1-4)-glu(1-3)][glu(1-3)-glu(1-2)]-glu(1-4)-gal

R₁ = OH

- 2) Nombre: (25R)-3 α ,6 α -dihidroxi-5 β -espirostan-12-ona 3,6-di-O- α -D-glucopiranosido⁵⁷

Aislada de las hojas del *Agave americano*. Posee actividad citotóxica frente a células HL-60

⁵⁶ Silva G. M., De Souza A. M., Lara L. S., Mendes T. P., Da Silva B. P., Lopes A. G., Caruso-Neves C., Parente J. P. 2005 "A new steroidal saponin from *Agave brittoniana* and its biphasic effect on the Na⁺-ATPase activity". *Z. Naturforsch. C.*, 60, 121-127.

⁵⁷ Yokosuka, A.; Mimaki, Y.; Kuroda, M.; Sashida, Y. 2000 "A new steroidal saponin from the leaves of *Agave americana*". *Planta Medica*, 66, 393-396.

R= Glu, R₁= Glu

- 3) Nombre: (25R)-espirost-5-en-12-ona-3 β -ol-3- O - β - L -rhamnopyranosil-(1 β 2)-[β - L -arabinopyranosil-(1 β 3)]- β - D -glucopyranosil-(1 β 4)- β - D -galactopyranosido ⁵⁸

Aislada del extracto metanólico de las hojas del *Agave ferox*. Tiene actividad molusquicida.

R= Rha (1-2)-[Ara (1-3)]-Glu (1-4)-Gal-

R₁= H

- 4) Nombre: (25R)-espirost-5-en-12-ona-3 β -ol-3- O - β - L -rhamnopyranosil-(1 β 2)-[β - D -glucopyranosil(1 β 3)]- β - D -glucopyranosil-(1 β 4)- β - D -galactopyranosido⁵⁸

Aislada del extracto metanólico de las hojas del *Agave ferox*. Actividad molusquicida.

R= Rha (1-2)-[Glu (1-3)]-Glu (1-4)-Gal- R₁= H

- 5) Nombre: (25R)-espirost-5 β -12-ona-3 β -ol-3- O - β - L -rhamnopyranosil-(1 β β)- β - D -glucopyranosil(1 β 2)- β - D -glucopyranosil-(1 β 4)- β - D -galactopyranosido.⁵⁹

Aislada de las hojas del *Agave americana*.

R= Rha (1-3)-Glu (1-2)-Glu (1-4)-Gal-

R₁= H

- 6) Nombre: (25R)-espirost-5 β -12-ona-3 β -ol-3- O - β - L -rhamnopyranosil-(1 β β)- β - D -glucopyranosil(1 β 2) -[β - D -xilopyranosil (1 β 3)]- β - D -glucopyranosil-(1 β 4)- β - D -galactopyranosido.⁵⁹

Aislada de las hojas del *Agave americano*.

⁵⁸ El-Sayed, Mortada M. 1998 “ Molluscicidal steroidal saponins from *Agave ferox*”. *J. Pharm. Sc.*, 7, 73-79.

⁵⁹ Jian-Ming, J.; Xi-Kui, L.; Chong-Ren, Y. 2003 “Three new hecogenin glycosides from fermented leaves of *Agave americana*”. *Journal of Asian Natural Products Research*, 5, 95-103.

R= Rha (1-3)-Glu (1-2)-[xil (1-3)]-Glu (1-4)-Gal-

R₁= H

- 7) Nombre: (25R)-espirost-5 α -12-ona-3 β -ol-3- O - α - L -xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- α -D -glucopiranosil(1 $\rightarrow$ 2) -[α - D -glucopiranosil (1 $\rightarrow$ 3)]- α - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- α - D -galactopiranosido.⁵⁹

Aislada de las hojas del *Agave americano*.

R= Xil (1-3)-Glu (1-2)-[Glu (1-3)]-Glu (1-4)-Gal-

R₁= H

- 8) Nombre: (25R)- 3 β -hidroxi-5 α -espirostan-12-ona-3- O - α - L - rhamnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-[β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β - D -galactopiranosido⁶⁰

Aislada de las hojas del *Agave fourcroydes*. Actividad citotóxica frente a células HeLa.

R= Rha(1-4)-Glu(1-3) [Glu (1-3)-Glu(1-2)]-Glu(1-4)-Gal-

R₁=H, R₂= H

⁶⁰ Ohtsiki, T.; Koyano, T.; Kowithayakorn, T.; Sakai, S.; Kawahara, N.; Goda, Y.; Yamaguchi, N.; Ishibashi, M. **2004**. "New chlorogenin hexasaccharide isolated from *Agave fourcroydes* with cytotoxic and cell cycle inhibitory activities". *Biorg. Med. Chem.* 12, 3841-3845.

Saponinas tipo furostano

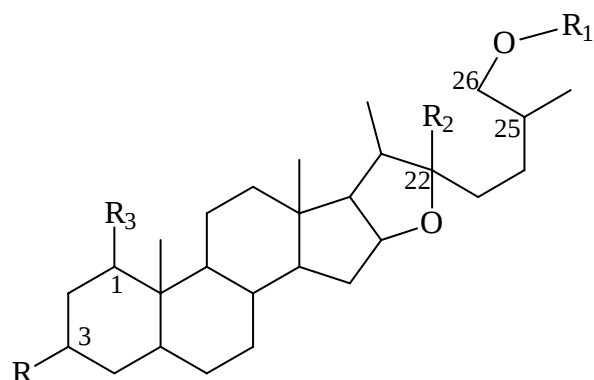


Fig. 11. Estructura general de las saponinas tipo furostano

- 1) Nombre: 26- O - α - D -glucopiranosil (25R)-5 α -furost-20(22)-eno-3 α ,26-diol-3- O - α - D -xilopiranosil(1 α 3)- α - D -glucopiranosil(1 α 2) α - D -galactopiranosido⁶¹

Aislada de las hojas del *Agave lophantha*.

R= Xil (1-3)- Glu (1-2)-Gal-

R₁= Glu , R₃=H, R₂= Δ^{20-22}

- 2) Nombre:(3 β ,5 β ,22 α ,25S)-26- O -(β - D -glucopiranosil)-22-metoxifurostan-3- O- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- O -[β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]- β - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β - D -galactopiranosido.⁶²

Aislada de las hojas del *Agave attenuata*. Actividad antiinflamatoria.

R= Glu (1-2)- Glu (1-2)-[Glu (1-3)]-Glu (1-4)-Gal-

⁶¹ Abdel-Khalik, S. M.; Miyase, T.; Melek, F. R.; El-Shabraway, O. A.; Mahmoud, I. I.; Mina, S. A. 2002 "New steroidal saponins from *Agave lophantha* Schiede and their pharmacological evaluation". *Pharmazie*, 57, 562-566.

⁶² Da Silva, B. P.; De Sousa, A. C.; Silva, G. M.; Mendes, T. P.; Parente, J. P. 2002. "A new bioactive steroidal saponin from *Agave attenuata*". *Journal of Biosciences*, 57, 423-428.

R₁=Glu, R₂= OMe, R₃=H

- 3) Nombre: 3- O - α - L -rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α - L -rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- α - D -glucopyranosil-26- O - α - D -glucopyranosil-22- α -metoxy-(25R)-furost-5-eno-3 α ,26-diol ⁶³

Aisladas del extracto metanólico de las hojas del *Agave decipiens*. Actividad molusquicida.

R = Rha (1-2)- [Rha (1-4)]-Glu-

R₁=Glu, R₂= OMe, R₃=H

- 4) Nombre: 1- O - α - L -rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-[α - L -rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]- α - D -glucopyranosil-26-O- α - D -glucopyranosil-22- O -metilfurosta-5,25(27)-dieno-1 α ,3 α ,22,26-tetraol ⁶³.

Aisladas del extracto metanólico de las hojas del *Agave decipiens*. Actividad molusquicida.

R = H

R₁=Glu, R₂= OMe, R₃= Rha (1-2)-[Rha (1-4)]-Glu-

- 5) Nombre: 26- O - α - D -glucopyranosil(25R)-5 α -22-metoxi-furostan-3 α ,26-diol-3- O - α - D -glucopyranosil(1 $\rightarrow$ 2)- α - D -glucopyranosil (1 $\rightarrow$ 4) [α -D-glucopyranosil(1 $\rightarrow$ 4)]- α -D-glucopyranosil (1 $\rightarrow$ 4)- α - D -galactopiranosido ⁶⁴

Aislada de las hojas del *Agave shrevei*. Inhibe la permeabilidad capilar.

R= Glu(1-2)- Glu(1-4)-[Glu (1-6)]-Glu(1-4)-Gal-

R₁=Glu, R₂=OMe R₃= H

⁶³ Abdel-Gawad, M. M.; El-Sayed, M. M.; Abdel-Hameed, E. S. 1999 "Molluscicidal steroidal saponins and lipid content of *Agave decipiens*". *Fitoterapia*, 70, 371-381.

⁶⁴ Da Silva B. P, Parente J. P. 2005 "A New Bioactive Steroidal Saponin from *Agave shrevei*" *Z. Naturforsch. C*, 60, 57.

Saponina del β -sitosterol

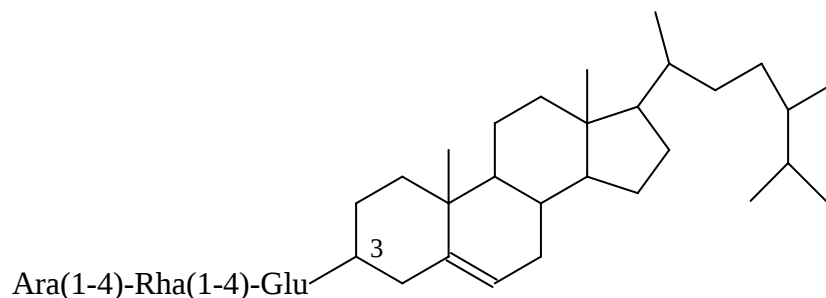


Fig. 12. Estructura de saponina del β -sitosterol

Nombre: 3 β -hidroxiestigmast-5-eno-3- O - β - D -arabinofuronosil-(1 $\rightarrow$ 4)- O - L -rhamnopyranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- O - β - D -glucopiranosido⁶⁵.

Aislada de las raíces del *Agave americano*.

⁶⁵ Chouhan, R. P. S.; Lal, L. M. 1992 " β -Sitosterol-3-O- β -D-arabinofuronosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O-L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -D-glucopyranoside from roots of *Agave americana* Linn". *Asian Journal of Chemistry*, 4, 673.

Otra saponina

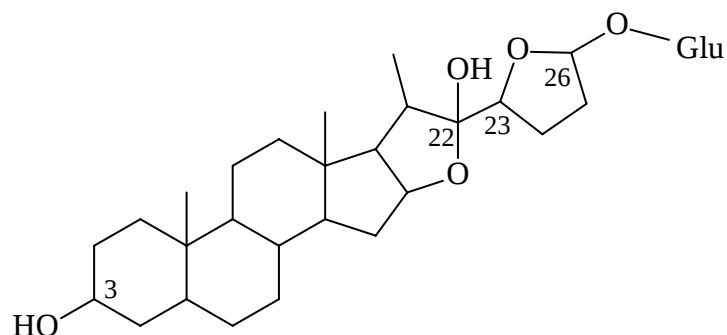


Fig. 13. Estructura de la saponina

Nombre: (22S,23S,25R,26S)-23,26-epoxy-5 α -furostano-3 α ,22,26-triol 26-O - α - D -glucopiranosido⁶⁶.

Aislada de los residuales en el proceso industrial de separación de la fibra del *Agave americano*.

Simbología utilizada

Glu: glucosa; Gal: galactosa; Ap: apiosa; Rha: rhamnosa; Xil: xilosa

Ara: arabinosa

⁶⁶ Jin, Jian-Ming; Zhang, Ying-Jun; Yang, Chong-Ren. 2004 "Four new steroid constituents from the waste residue of fibre separation from *Agave americana* leaves" *Chemical & Pharmaceutical Bulletin* 52, 654-658.

Una de las especies agaves, el *A. brittoniana* Trel., crece en la región central de Cuba de donde es endémica y cuenta con dos subespecies, el *A. brittoniana* T. ssp. *Spirituana* y el *A. brittoniana* T. ssp. *Brachypus* (Fig. 14). Esta última ha sido recientemente estudiada⁶⁷ y algunos de los glicósidos obtenidos de la misma los utilizaremos para ejemplificar procedimientos de aislamiento y elucidación estructural.



Fig. 14. *Agave brittoniana* T. Planta joven

Aislamiento de saponinas y sapogeninas esteroidales del *Agave brittoniana* T.

Para la obtención de las sapogeninas libres se maceró el material vegetal en AcOEt (3 x 48 horas), a temperatura ambiente y en la oscuridad. Los extractos se unieron y se evaporó a vacío.

El sólido obtenido se cromatografió en una columna de sílicagel utilizando como fase móvil mezclas de n-hex: AcOEt de polaridad creciente (0-60 %). De esta forma se obtuvieron varias sapogeninas, siendo la Yucagenina la más abundante.

Por otra parte el material vegetal se maceró en una mezcla de etanol y agua (7:3 v/v, 3 x 48 horas) a temperatura ambiente y en la oscuridad. Los extractos etanólicos se unieron y se evaporaron al vacío.

⁶⁷ Guerra de León J. O. 2005. "Compuestos con actividad antiparasitaria del *Agave brittoniana* T". Tesis en Opción al Grado de Doctor. Universidad de Cádiz. España.

Para la obtención de un “crudo de saponinas” (extracto rico en saponinas) a partir del extracto hidroalcohólico se emplearon dos métodos:

Método A: Se disolvieron 10 g del extracto etanólico en metanol, se adicionaron 30 g de sílicagel (70-230 mesh) y se evaporó el disolvente de forma que el extracto quedara uniformemente adherido.

La mezcla se colocó en el cartucho de un Soxhlet y se extrajo durante 8 horas con cada uno de los solventes siguientes: n-hexano, cloroformo, acetato de etilo y n-butanol saturado en agua.

Método B: Se disolvieron en agua 10 g del extracto etanólico y se extrajo en un embudo de decantación con n-hexano y después con n-butanol saturado en agua.

Al evaluar los resultados obtenidos se apreció que el rendimiento para el “crudo de saponinas” al utilizar el método B es menor, sin embargo, los análisis posteriores en cromatografía de capa fina (CCF) y columna (CC) permitieron conocer que el extracto n-butanólico obtenido por el método A contenía una alta proporción de material resinoso, presumiblemente azúcares, en tanto que en el método B se obtenía un crudo con mayor contenido y pureza en saponinas. Esto puede explicarse teniendo en cuenta que en el método B la extracción se realiza en embudo de decantación a temperatura ambiente, disminuyendo las posibilidades de descomposición de la muestra mientras que en el soxhlet (método A) sufre una temperatura de 118 °C (temperatura de ebullición del n-butanol).

Por otra parte, el método A requiere una menor cantidad de disolvente, pero tiene la desventaja de que una gran parte del sólido queda irreversiblemente adsorbido en el gel de sílice. Cuando se utiliza el método B no se realizan extracciones con cloroformo o acetato de etilo pues, debido al poder tensoactivo de las saponinas, se forman emulsiones irreversibles.

Teniendo en cuenta estos resultados se eligió el método B para continuar el trabajo.

Para el fraccionamiento del crudo de saponinas también se utilizaron dos procedimientos.

Procedimiento A: 10 g del “crudo de saponinas” se cromatografiaron en una columna con sílicagel fase normal utilizando como eluyentes mezclas de cloroformo: metanol en proporciones 8:2, 7:3, 6:4 y 5:5 (v:v), sucesivamente.

Procedimiento B: 10 g del “crudo de saponinas” se cromatografiaron en una columna con sílicagel fase inversa utilizando como eluyentes mezclas de metanol: agua en proporciones 2:3, 3:2, 4:1 (v:v) y agua, sucesivamente.

Un análisis comparativo de ambos procedimientos mostró que en el B se recupera el 88,9 % del extracto que se adiciona a la columna, mientras que para el procedimiento A este valor sólo alcanza el 44,0 %. En el primer caso se obtuvieron tres fracciones ricas en saponinas esteroidales a partir de las cuales, utilizando la técnica HPLC con una columna RP-18 y mezclas MeOH:H₂O, fase móvil, permitieron el aislamiento y purificación de varios glicósidos.

Caracterización de saponinas y sapogeninas esteroidales aisladas del *A. brittoniana* T.

De esta planta han sido aisladas y caracterizadas 6 sapogeninas y 12 saponinas esteroidales, algunas de las cuales se presentan a continuación para ejemplificar el uso de las técnicas espectroscópicas en la elucidación estructural.

Yucagenina

Esta se aisló como un sólido amorfo blanco. Su espectro de masas (EM) nos muestra un ión molecular m/z 430 correspondiente a una fórmula C₂₇H₄₂O₄.

El espectro ¹H-RMN presenta un patrón característico de los esteroides con dos dobletes de intensidad 3H en δ 1,11 ppm (J=6,9 Hz) y 0,67 ppm (J=5,8 Hz) y dos singletes de intensidad 3H en δ 0,82 ppm y 1,08 ppm respectivamente. Estas dos últimas señales son las correspondientes a los dos metilos H-18 y H-19 del sistema tetracíclico de esta familia de compuestos.

El espectro ¹³C-RMN presenta 27 señales, una de las más significativas es la que resuena a 109,5 ppm, desplazamiento característico de los carbonos cetálicos.

El espectro infrarrojo de este compuesto presenta cuatro bandas en 850, 900, 920 y 985 cm^{-1} , lo que es característico de los espirostanos; la intensidad de la señal en 900 cm^{-1} es mayor que la de 920 cm^{-1} , lo que nos indica una configuración R (serie "neo") alrededor de C-25. Por otra parte, el espectro de masas presenta un pico base de valor m/z 139 y otra señal en m/z 115 que son características del sistema espiro en este tipo de compuestos.

Los valores de desplazamiento químico de las señales correspondientes al fragmento espirostánico, como son las de C-22 (109,2 ppm), C-23 (31,8 ppm), C-24 (29,2 ppm), C-25 (30,6 ppm), C-26 (66,8 ppm), C-27 (17,3 ppm) y los protones H-26 (3,48 y 3,56 ppm) y H-27 (0,67 ppm) corresponden con los registrados en la literatura⁶⁸ para los 25R-espirostanos con anillo F no sustituido, de esta forma corroboramos la información obtenida de los espectros IR y EM. Por otra parte, las diferencias entre los desplazamientos químicos de los protones geminales ($\Delta_{ab} = \delta_a - \delta_b$) en 23 (1,67-1,62) y 26 (3,56-3,46) no son superiores a 0,20 ppm por lo que se cumplen las regularidades planteadas por Agrawal⁶⁹ para este tipo de compuestos.

Una vez determinado el esqueleto de este compuesto queda por justificar una insaturación y dos átomos de oxígeno para ajustarnos a su fórmula molecular.

Entre las señales que presenta el espectro ^{13}C -RMN se encuentran las situadas en 141,2 y 121,2 ppm, características de un doble enlace. El espectro en el HSQC nos relaciona la segunda señal con un doblete en 5,40 ppm ($J=5,2$ Hz).

Por otra parte, en el espectro ^1H -RMN hay dos señales a δ 4,13 (1H, ddd) y δ 3,82 ppm (1H, ddd) características de protones unidos a carbonos oxigenados. Un estudio detallado del espectro $\text{H}^1\text{-H}^1$ COSY determina que estos protones se encuentran en un sistema de espín [-C-CH₂-CHOH-CHOH-CH₂-], que sólo puede situarse en el anillo A del espiroetano, siendo los carbonos oxigenados C-2 y C-3. Por otra parte, el hecho de que C-5 sea cuaternario, así como el

⁶⁸ Pastel, A. V.; Blunden, G.; Crabb, T.; Sauvarie, Y.; Baccou, Y. 1987. *Fitoterapia*. 58, 56.

⁶⁹ Agrawal, P. W. 2003 "Spectral Assignments and Reference Data" *Magn. Reson. Chem.* 41, 965-968

desapantallamiento sufrido por los protones del C-4 (δ 2,71 y 2,66) hace proponer el doble enlace entre los carbonos 5 y 6.

Esta hipótesis es corroborada por la correlación observada entre el metilo 19 y C-5 en el espectro HMBC.

Los espectros H^1-H^1 COSY, HSQC y HMBC ayudaron a asignar cada una de las señales de los espectros 1H y ^{13}C -RMN.

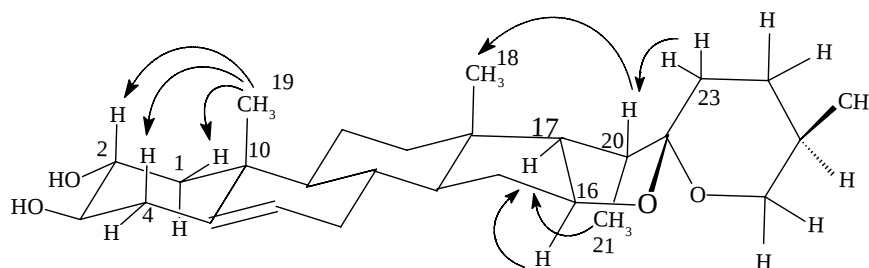


Fig. 15. Correlaciones en el espectro NOESY

El espectro NOESY ayudó a determinar los sustituyentes que se presentan en cada cara de la molécula y de esta forma establecer la estereoquímica relativa de los centros quirales. Como hipótesis se partió de la forma espacial que presentan todos los esteroides naturales.⁷⁰

En la cara β del esteroide se encuentran los metilos 18 y 19, en posición axial, el metilo 19 presenta efecto NOE con H-2 por lo que el hidroxilo de este centro se presenta en posición ecuatorial.

El valor de la constante de acoplamiento entre H-2 y H-3 (8,9 Hz) indica que se presentan en posición trans-diaxial.

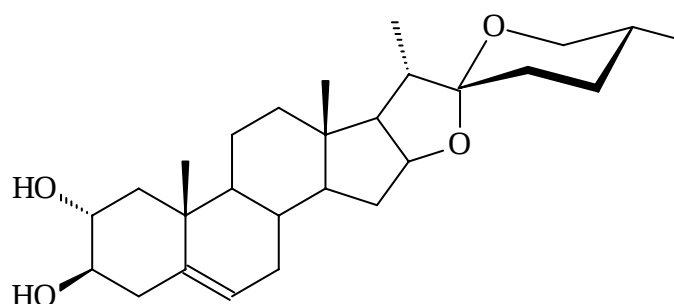
Un efecto NOE que es común a los dos metilos es el de H-8, que permite confirmar la unión "trans" de los anillos B y C.

⁷⁰ Colígate, S. M.; Molyneux, R. J. 1993. Bioactive Natural Products: detection, isolation and structural determination." CRC Press, Inc.

El metilo situado en C-20 se considera en la cara α ya que el H-20 muestra una correlación con el metilo 18, también este protón muestra una relación con H-23, lo que indica una configuración “R” en el carbono espiroestánico (C-22).

El resto de las correlaciones NOE facilitan la asignación de los protones de los grupos metilenos de la molécula.

Con todos estos elementos se llegó a la conclusión que esta molécula es el 25R-espirost-5-en-2 α , 3 β -diol, conocido como Yucagenina.⁷¹



Yucagenina

Kataraviósido A

El espectro de ^1H RMN de este compuesto es característico de una saponina esteroideal, presentando como señales más apantalladas un patrón típico de espirostanos y como señales más desapantalladas, dobletes en δ 5,56 ($J=7,7$ Hz), 5,27 ($J=5,4$ Hz), 5,24 ($J=7,7$ Hz), 5,20 ($J=8,1$ Hz), y 4,92 ($J=7,7$ Hz). Entre ellas, la señal a δ 5,27 corresponde al protón H-6 del doble enlace de un Δ^5 espiroetano y el resto a protones anoméricos.

El espectro de ^{13}C -RMN tiene 50 señales, las más desapantalladas δ 140,1; 121,9 y 109,2 se asignan como C-5, C-6 y C-22 de Δ^5 espirostanos y cuatro (δ 104,9; 104,8; 104,7 y 103,3) corresponden a carbonos anoméricos.

⁷¹ Yang, Minghe. 1981. “Steroidal sapogenins in genus *Dioscorea*”. *Zhongcaoyao*. 12, 441-32.

En el espectro IR se aprecian las señales características del anillo F de los espirostanos, siendo más intensa la de 900 cm^{-1} respecto a la situada en 920 cm^{-1} lo que indicó que el aglicón presenta una configuración R en el C-25.

El análisis detallado da cada una de las señales de los espectros de ^1H y ^{13}C RMN confirma que el aglicón es la yucagenina.

Por otra parte, el espectro de masa ($\text{ESI}^+\text{-MS}$) presenta una señal en m/z 1071 mientras que en $\text{ESI}^-\text{-MS}$ se observó otra en m/z 1047. Teniendo en cuenta la diferencia de 24 entre éstas, se asignaron al aducto $[\text{M} + \text{Na}]^+$ y al ion $[\text{M} - \text{H}]^-$ respectivamente, que comúnmente aparecen en este tipo de compuestos⁷².

Hasta aquí, se conoce que este compuesto es una saponina derivada de la yucagenina, que tiene cuatro unidades de azúcares y una fórmula molecular $\text{C}_{50}\text{H}_{80}\text{O}_{23}$.

También en el $\text{ESI}^+\text{-MS}$ se encuentra la señal de m/z 938 que difiere en 133 unidades con la de m/z 1071, fue asignada al ion $[\text{M} + \text{Na} - \text{Pentosa}]^+$ e informó que el glicósido posee una pentosa terminal.

La naturaleza de las unidades de azúcares presentes en el compuesto, se determinó mediante la asignación completa de cada una de sus señales pese a encontrarse solapadas unas con otras en un pequeño intervalo. Para poder realizar esa labor se utilizaron las técnicas COSY, TOCSY 2D y TOCSY 1D.

Mediante la técnica Total Correlation Spectroscopy (TOCSY), se irradiaron las señales correspondientes a cada uno de los protones anoméricos; estos, debido a su naturaleza, están desapantallados con respecto a las demás, lo que facilita esta labor.

Utilizando el procedimiento conocido como “TOCSY en array” y diferentes valores de mix (tiempo de mezcla) comprendidos entre 0,015 y 0,15 segundos, se pudieron obtener los subespectros (figura 16). El aumento en el valor del tiempo

⁷² De Combarieu, E.; Fuzzati, N.; Lovati, M.; Mercalli, E. 2003 “Furostanol saponins from *Tribulus terrestris*”. *Fitoterapia* 74, 583-591.

de mezcla permite ver correlaciones a mayor distancia en sistemas de espín, siempre que la magnitud de la constante de acoplamiento con el protón vecino permita este efecto.

Así se fueron asignando cada uno de los protones de los azúcares estudiados.

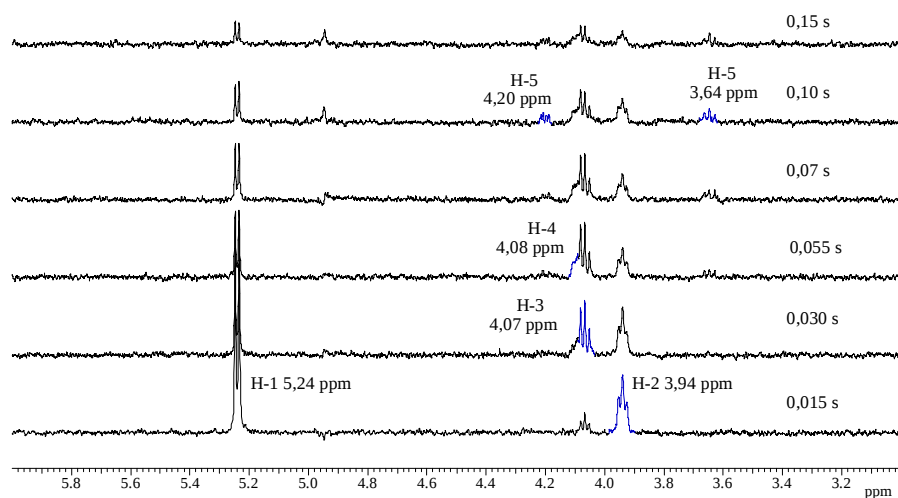


Fig. 16. Espectro "TOCSY en array" de la unidad de xilosa con la asignación de cada una de sus señales

En la figura 17 se superponen los espectros TOCSY 1D (mix=0,15 ms) para las cuatro unidades de azúcar, en ésta se aprecia la simplificación que se obtiene con respecto al ^1H -RMN.

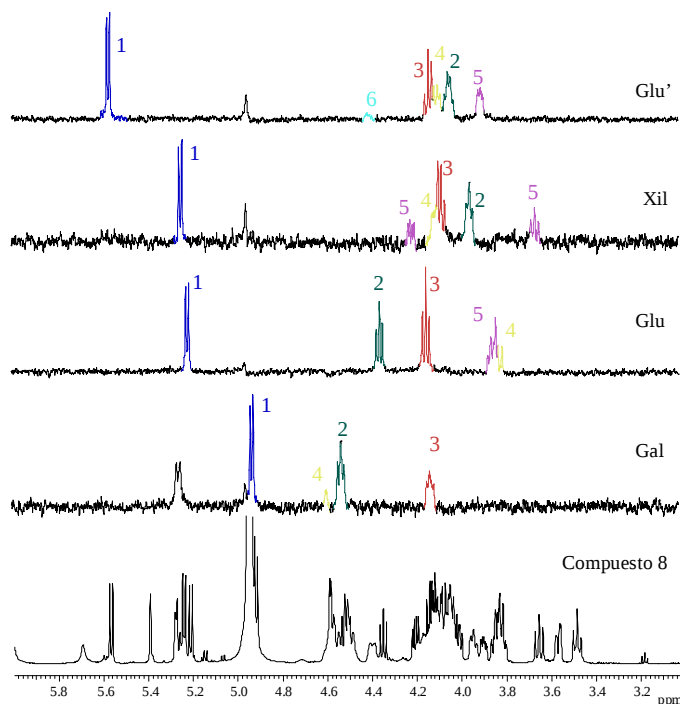


Fig. 17. Espectros TOCSY 1D de las unidades de azúcar y la asignación de cada una de sus señales

Los espectros de TOCSY 2D y ^1H - ^1H COSY ayudaron a completar la asignación. El análisis de los valores de las constantes de acoplamiento entre protones condujo al conocimiento de la naturaleza de las unidades de azúcar.

La magnitud de los acoplamientos vecinales (3J) depende del ángulo dihedro. En el caso de los sistemas hexacíclicos, esto se puede resumir en que para protones *trans* diaxiales la constante de acoplamiento (J_{aa}) toma valores entre 7 y 12 Hz mientras que para los que están en posición ecuatorial-ecuatorial (J_{ee}) y ecuatorial-axial (J_{ea}), estos valores oscilan entre 1 y 4 Hz. Tanto en la estructura de la β -glucosa como de la β -xilosa (figura 18), los átomos de H están en posiciones transdiaxiales (excepto H-6 de glucosa y H-5 de xilosa); así se pudo identificar como glucosas, los azúcares cuyos protones anoméricos resuenan 5,56 y 5,20 ppm y xilosa el de 5,24 ppm, todas con configuración β en el carbono anomérico ($J_{H-1}=7-8$ Hz).

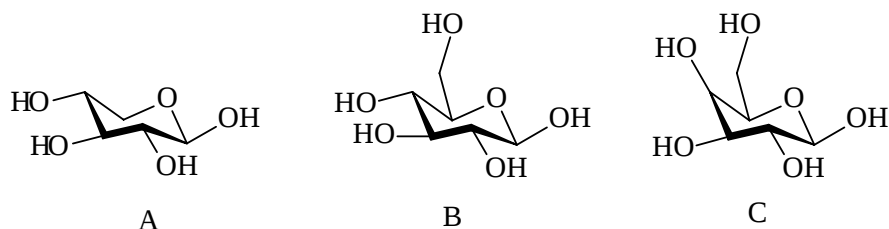


Fig. 18. Estructuras de la β -D-xilosa (A), β -D-glucosa (B) y β -D-galactosa (C)

La unidad con un protón anomérico más apantallado (4,92 ppm) presenta valores correspondientes a protones *trans* diaxiales hasta H-3, la relación de éste con H-4 es ecuatorial-axial por lo que $^3J_{(H-3 \ H-4)}$ es pequeña; esto motivó que en el experimento TOCSY 1D, la señal de H-4 sea poco intensa y no continúen las correlaciones.

Para completar el experimento, se irradió a la frecuencia de H-4 y se obtuvieron las señales del resto de los protones. De esta forma se confirmó que se trataba de la galactosa.

El espectro ROESY-1D del protón anomérico de la galactosa, permite correlacionar este con los que se encuentran en posición axial (H-3 y H-5), ratificando la relación entre los fragmentos C1-C3 y C4-C6 de la misma (figura 19).

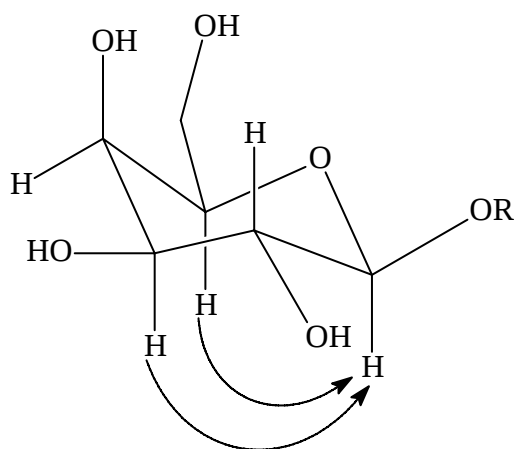


Fig. 19. Efectos NOE en la galactosa

Mediante los espectros HSQC-DEPT, HSQC-TOCSY y HMBC se logró asignar las señales de ^{13}C -RMN en esta molécula. Identificar las pertenecientes a los

carbonos hidroxilados fue especialmente difícil, teniendo en cuenta la gran cantidad de señales que aparecen en un intervalo tan pequeño.

El espectro que ayudó de manera más eficiente fue el HSQC-TOCSY, que gracias al ajuste del valor de tiempo de mezcla a 0,08 segundos, dio una correlación de los carbonos de cada una de las unidades de azúcar, con las señales de sus respectivos protones anoméricos.

Mediante la comparación del espectro de ^{13}C RMN de este compuesto con el de la yucagenina se aprecia una gran coincidencia en la mayoría de la señales del aglicón, excepto las del anillo A (tabla 2), lo que indicó que la glicosilación debía encontrarse en C-3, pues el valor de su desplazamiento químico ha aumentado notablemente con respecto al valor de la yucagenina.

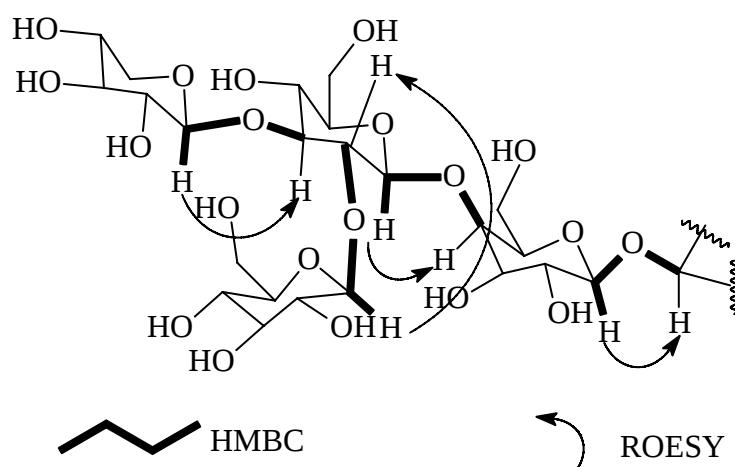
Finalmente, se procedió a establecer la forma de conexión entre las distintas unidades de azúcares. Para esta información, los espectros ROESY 1D, ROESY 2D y HMBC constituyen las herramientas necesarias.

Tabla 2. Diferencias entre los desplazamientos químicos de los carbonos del Karataviósido A y la yucagenina

Carbono	δ	δ en Yucagenina	Diferencia
1	45,7	46,6	-1,1
2	70,0	72,6	- 2,6
3	84,5	76,8	+ 7,7
4	37,7	40,9	- 3,2
5	140,1	141,2	-1,1
10	37,9	38,5	-0,6

En los espectros ROESY 1 y 2D, se ajustó un valor del tiempo de mezcla de 0,20 segundos y de esta forma, se observaron las interacciones entre los protones anoméricos y los protones de los puntos de conexión.

En el espectro de HMBC, la utilización de una constante de acoplamiento a larga distancia (J_{NH}) de 8 Hz, fue óptimo para conseguir correlacionar los protones anoméricos con los carbonos a tres enlaces, entre los que se encuentran los puntos de conexión (fig. 20).



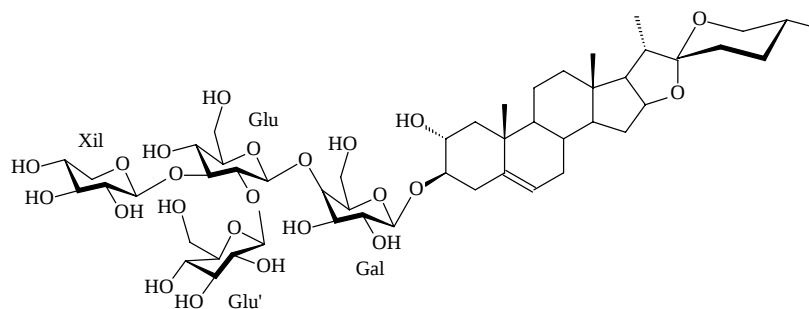
H anomérico	HMBC	ROESY
5,24 ppm (xil)	86,9 ppm C-3 de glu	4,13 ppm H-3 glu
5,56 ppm (glu')	81,2 ppm C-2 de glu	4,34 ppm H-2 glu
5,21 ppm (glu)	79,3 ppm C-4 de gal	4,58 ppm H-4 gal
4,93 ppm (gal)	84,5 ppm C-3 de aglicón	3,80 ppm H-3 aglicón

Fig. 20. Correlación entre las distintas unidades de azúcares del compuesto 8 mediante experimentos ROESY y HMBC

Como se observa en la figura 20, se determinó que es la galactosa quien se encuentra unida, a través de su carbono anomérico, al C-3 de la yucagenina y por

C-4 a una unidad de glucosa. A esta última, se conectan por C-2 y C-3, una glucosa y una xilosa, respectivamente.

De esta forma, se llegó a la conclusión de que este compuesto es el 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)(β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3))- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)- β -D-galactopiranosil-25R-espirost-5-en-2 α , 3 β -diol, aislado por primera vez de una planta de la familia *Agavaceae*



Karataviósido A

Agabrittonósido A

Los espectros de RMN de este compuesto muestran un gran parecido con los del compuesto anterior, las señales correspondientes al aglicón son prácticamente iguales, encontrándose las diferencias fundamentales en las señales de las unidades de azúcar.

El espectro de ^1H RMN presenta las señales de cinco protones anoméricos en 5,59 ppm (d , $J=7,5$ Hz); 5,19 ppm (d , $J=8,1$ Hz); 5,15 ppm (d , $J=7,9$ Hz); 5,05 ppm (d , $J=7,3$ Hz) y 4,90 ppm (d , $J=7,7$ Hz), mientras que en el ^{13}C RMN hay 55 señales, entre ellas las situadas en 103,1; 103,6; 104,1; 104,6 y 105,9 ppm que corresponden a los carbonos anoméricos.

Por otra parte, en el espectro de masa (ESI^+ -MS) se observa una señal en m/z 1203 $[\text{M} + \text{Na}]^+$ mientras que en el ESI^- -MS aparece otra en m/z 1179 $[\text{M} - \text{H}]^-$.

A partir de esta información se dedujo que este compuesto es un glicósido derivado de la yucagenina, que posee cinco unidades de monosacáridos y fórmula molecular $C_{55}H_{88}O_{27}$.

Igual que en el caso anterior, mediante la utilización de las técnicas TOCSY y COSY, se procedió a determinar la naturaleza de cada una de las unidades de azúcares. Las cuatro unidades de azúcares presentes en el compuesto anterior se reproducen aquí, siendo la quinta unidad una xilosa, como se determina en el espectro TOCSY 1D de su protón anomérico a 5,05 ppm. Aquí también resultó muy útil el espectro HSQC-TOCSY (figura 21) para la asignación de las señales en el espectro de ^{13}C RMN correspondiente a los azúcares.

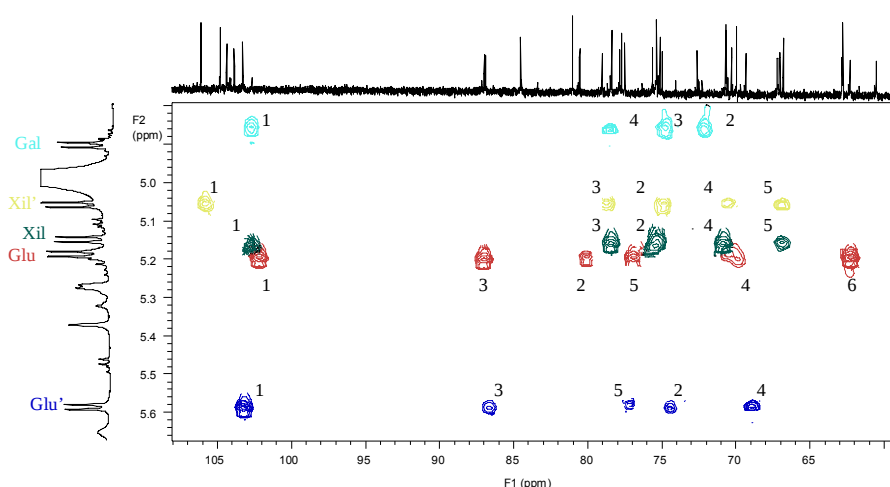


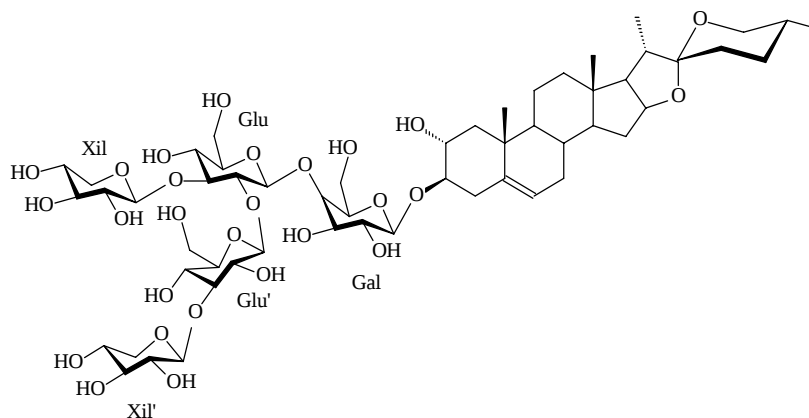
Fig. 21. Espectro HSQC-TOCSY. Ampliación del intervalo de señales correspondientes a los protones anoméricos de los azúcares

Los espectros ROESY y HMBC nos permiten determinar que la conexión entre azúcares es idéntica a la del Karataviósido A, presentándose una nueva xilosa unida al C-3 de la glucosa cuyo anomérico se encuentra a 5,59 ppm. (Tabla 3)

Tabla 3. Información de los espectros HMBC y ROESY para establecer la conectividad entre las partes de la molécula

H anomérico δ ppm	HMBC δ ppm	ROESY δ ppm
5,15 (xil)	86,8 (C-3 de glu)	4,09 (H-3 glu)
5,59 (glu')	80,5 (C-2 de glu)	4,31 (H-2 glu)
5,19 (glu)	79,0 (C-4 de gal)	4,57 (H-4 gal)
4,90 (gal)	84,5 (C-3 del aglicón)	3,78 (H-3 aglicón)
5,05 (xil')	87,0 (C-3 de glu')	4,08 (H-3 glu')

Así se llegó a la conclusión de que este compuesto es el 3-O-((β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2))(β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3))- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4))- β -D-galactopiranosil-25R-espiros-5-en-2 α , 3 β -diol, que se describe por primera vez en la literatura y se denominó Agabrittonósido A.



Agabrittonósido A

Agabrittonósido B

El espectro ^1H RMN de este compuesto presenta una apariencia más compleja que el de los anteriores. En la región de los protones anoméricos se observan

señales a 5,59 ppm (*d*, J=7,5 Hz), 5,19 ppm (*d*, J=7,9 Hz), 5,16 ppm (*d*, J=7,7 Hz), 5,06 ppm (*d*, J=7,5 Hz), 4,91 ppm (*d*, J=7,5 Hz) y 4,80 ppm (*d*, J=7,7 Hz) mientras que el espectro de ^{13}C RMN tiene 61 señales, entre ellas las de 103,3; 103,9; 104,4; 104,9; 104,9 y 106.2 ppm, correspondientes a carbonos anoméricos.

En el espectro de masas (ESI⁺-MS), se encuentra una señal a *m/z* 1383 [M + Na]⁺ y en el ESI⁻-MS otra en *m/z* 1359 [M - H]⁻.

Estos datos confirman que este glicósido tiene una fórmula molecular C₆₁H₁₀₀O₃₃ y seis unidades de azúcares. La naturaleza de éstos y del aglicón, así como sus conexiones se determinó mediante un estudio detallado de los espectros TOCSY y COSY de los azúcares que nos indican que además de dos glucosas, dos xilosas y una galactosa, presentadas por el compuesto anterior, tenemos una galactosa adicional.

En cuanto a la aglicona, la comparación de sus datos con los de la yucagenina, indicó una gran similitud entre ellas para los anillos A-D, mientras que comienzan a observarse algunas variaciones en la zona espirostánica. La asignación de las señales para los anillos E y F (tabla 4), se realizó de forma exhaustiva utilizando los espectros COSY, TOCSY, HSQC y HMBC.

Tabla 4. Comparación de los datos de ^{13}C RMN de la región espirostánica para la yucagenina con los del Agabrittonósido B

C	δ ppm	
	Yucagenina	Agabrittonósido B
16	81,1	81,1
17	62,8	63,8
20	42,0	40,5
21	15,0	16,4
22	109,2	110,6
23	31,8	37,2
24	29,2	28,4

25	30,6	34,3
26	66,8	75,1
27	17,3	17,4

Al sustraer el peso correspondiente a los azúcares del peso molecular, queda un valor para la aglicona dos unidades mayor que el de la yucagenina. Este hecho y la ausencia de funcionalizaciones nuevas en la zona espirostánica, tal y como se deduce de la comparación de datos espectroscópicos (tabla 4) hacen pensar que en este compuesto se ha producido una apertura del ciclo F , siendo la aglicona del tipo furostano.⁷³

La apertura del ciclo deja una función hemiacetálica en el C-22 del anillo E. Para este centro quiral se propone una configuración relativa idéntica a la de los compuestos Karataviósido A y Agabrittonósido A (cíclicos), siendo dicha hipótesis confirmada por el claro efecto NOE encontrado entre H-20 y H-23 frente a la débil interacción entre H-21 y H-23, acorde con una configuración “R” alrededor de C-22. (figura 22). Procediendo igual que en los casos anteriores, aquí también se definió una configuración “R” alrededor de C-25.

⁷³ Piccinelli, A.; De Ariza, J.; Velásquez, R.; Quesada, S.; Aquino, R.; Rastrelli, L. 2005. “Three new furostanol saponins from the leaves of *Licanthes synanthera* (“Chomte”), and Edible Mesoamerican Plants”. *J. Agric. Food Chem.*5., 289-294.

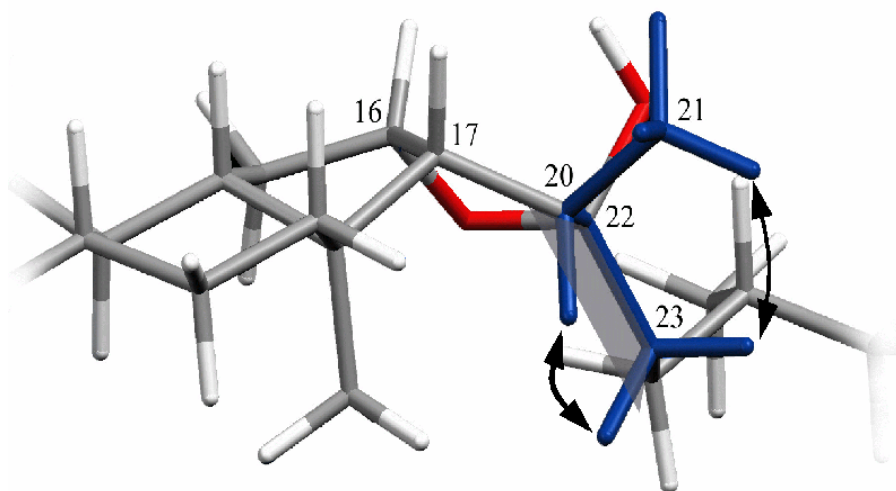


Fig. 22. Representación gráfica de los efectos NOE que definen la configuración de C-22

Sólo falta establecer la conectividad entre las distintas partes de la molécula. La primera información en este sentido se recibió del espectro de masas ESI⁺-MS, donde aparece una señal a m/z 1234 que fue asignada al ion $[M + Na - \text{Pentosa}]^+$; esto indicó que en la cadena glicosídica había, al menos, una xilosa terminal.

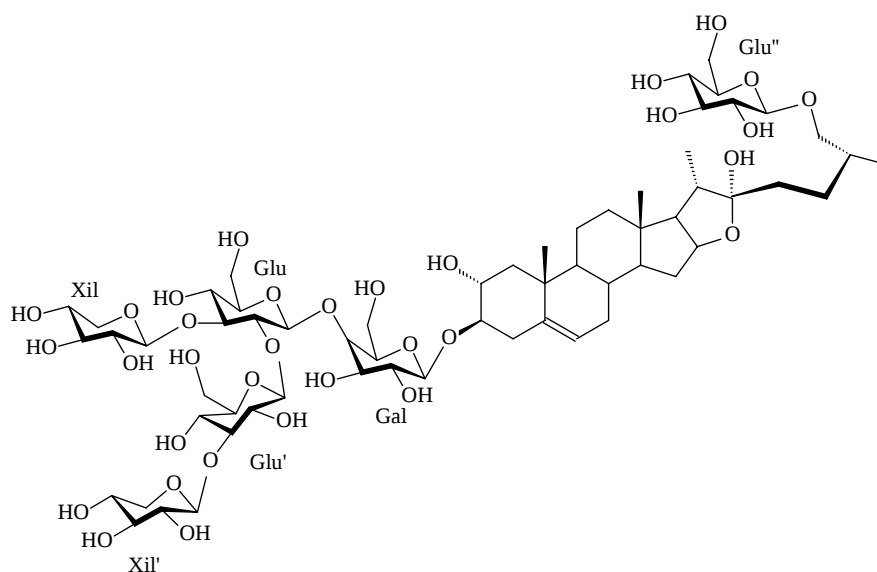
La comparación de los datos espectroscópicos de ^1H y ^{13}C RMN de los azúcares con los del Agabrittonósido A indicó que el nuevo compuesto presenta el mismo resto unido a C-3.

Los espectros ROESY y HMBC sirvieron para corroborar la afirmación anterior y situar a la nueva glucosa (tabla 5) unida al C-26 teniendo en cuenta la relación entre la señal de su protón anomérico (δ , 4,80 ppm) en el ^1H RMN y las señales del H-26 del aglicón (3,59 y 3,46 ppm) y el C-26 (75,2 ppm) en el HMBC.

Tabla 5. Información de los espectros HMBC y ROESY para establecer la conectividad entre las partes de la molécula

H anomérico δ ppm	HMBC δ ppm	ROESY δ ppm
5,16 (xil)	86,9 (C-3 glu)	4,09 (H-3 glu)
5,59 (glu)	80,6 (C-2 glu)	4,31 (H-2 glu)
5,19 (glu)	79,1 (C-4 gal)	4,57 (H-4 gal)
4,91 (gal)	84,6 (C-3 aglicón)	3,80 (H-3 aglicón)
4,80 (glu)	75,2 (C-26 aglicón)	3,59 y 3,46 (H-26 aglicón)
5,06 (xil')	87,0 (C-3 glu')	4,08 (H-3 glu')

Todos estos datos permitieron concluir que este compuesto es el 3-O-((β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3))- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2))(β -D-xilopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3))- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4))- β -D-galactopiranosil-26-O- β -D-glucopiranosil-25R-furost-5-en-2 α , 3 β ,22 α -triol cuya estructura se describe por primera vez en la literatura y se denominó Agabrittonósido B.



Agabrittonósido B (**10**)