



Facultad de Ciencias Químicas BUAP

BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

TESIS

“Validación del método por HPLC-UV/Vis para cuantificar
derivados ftalamidil-triptofanatos esteroidales”

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIADO EN FARMACIA

PRESENTA
EDWIN LARA CRUZ

Directores de tesis

MC. FELIX LUNA MORALES

LAB. DE NEUROENDOCRINOLOGÍA, DEPTO. DE FARMACIA, FCQ-BUAP

DR. ALAN CARRASCO CARBALLO

LAB. DE ELUCIDACIÓN Y SÍNTESIS EN QUÍMICA ORGÁNICA, LESQO, ICUAP-BUAP



Puebla, Puebla. 31 de agosto 2023

Historial académico

El presente trabajo se desarrolló en el laboratorio de Neuroendocrinología y en el Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica bajo la dirección del M. en C. Félix Luna Morales y el Dr. Alan Carrasco Carballo. Las comunicaciones en congresos y actividades académicas realizadas son los siguientes:

1. **II Simposio de ciencia que palpita. Unidad de seminarios BUAP**, Puebla 29 y 30 de noviembre de 2018, modalidad cartel: “Alteraciones cardíacas en el diagnóstico de la enfermedad de Fabry”. Diana Patricia Rodríguez Ugarte, **Edwin Lara Cruz**, Fátima Varela Dávila.
2. **Congreso Internacional Hispanoamericano de Farmacia en Puebla**, Puebla, BUAP, FCQ, 24 - 30 de octubre 2022, modalidad cartel en línea: “Aproximación *in silico* de los efectos sobre sistema nervioso central de los fármacos más utilizados en México contra enfermedades cardiovasculares”. **Edwin Lara Cruz**, Félix Luna Morales, Alan Carrasco Carballo.
3. **Congreso virtual de químicos latinoamericanos LATINXCHEM**, del 27 de noviembre de 2022, modalidad cartel en línea: “Aproximación *in silico* de los efectos sobre sistema nervioso central de los fármacos más utilizados en México contra enfermedades cardiovasculares”. **Edwin Lara Cruz**, Félix Luna Morales, Alan Carrasco Carballo.
4. **Haciendo Ciencia en la BUAP - primavera 2022**. VIEP-BUAP, con el proyecto: “Validación del método de HPLC para cuantificar derivados esteroidales de diosgenina en suero de rata”. **Edwin Lara Cruz**, Félix Luna Morales, Alan Carrasco Carballo.

Oficio de Publicación de Tesis



OFICIO C.Q./CT 036A/2023

Dr. Jorge R. Cerna Cortez
Director Facultad de Ciencias Químicas
Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Los que suscriben, integrantes de la Comisión Revisora de Tesis del alumno de la Licenciatura en Farmacia

Edwin Lara
Cruz

comunican a Usted la autorización para la publicación del trabajo de tesis bajo la dirección del M.C. Félix Luna Morales y del D.C. Alan Carrasco Carballo con el siguiente título:

"Validación del método por HPLC-UV/Vis para cuantificar derivados ftalamidil-triptofanatos esteroideos"

Se extiende la presente, para los usos que al interesado convengan el día 17 de agosto de 2023.

Atentamente

"Pensar bien, para vivir mejor"

H. Puebla de Z., a 21 de agosto de 2023



D.C. María Isabel Martínez García, Presidente



D.C. Liliana Martínez Mendieta, Secretario



D.C. Victorino Gilberto Serafín Alatraste Bueno, Vocal

c.c.p. Archivo

Cadena digital: 1Me#Yh&Df.Ze'Jr/Ro(PI!Ra!Kc"Vb/In#LI\$Zq.Zq*Lp-Yy,Io'Tg+Hy.Bc/Tm*Ou!Yb,Ex*Sa#Ou!Wc/Uj+Mp(Oa)Iw!Bs!Jl-Oa*Wn%Wv(Hk'Oa#Cw(Zl"Zz/Vp,Fl*Wg/Pt#Eu&Sy'Ph-We\$Ls%Mm+Fk%Zn'Kw%Sl/Ph,Eo+Cc,Cd.Qq,Sc%Rc!Nm(Lz)Om.Qg*Uv"Cx(Jz)Fg-Yc)Oz&Dt&Ko'Ur'Zp,Eh#Mq'Dy#Pt'Ft#Un(Od%Eq!Jx(Jq,Av/Yz-Ry\$Ze(Ik\$Jb#

Dedicatoria

Hacia mis padres

Arlen Araceli Cruz Silva

Víctor Lara Rodríguez

Por su apoyo en todo momento, incondicionalmente, confiando en mi camino que decidí emprender, esto es para ustedes que han pasado por momentos muy difíciles y se merecen la mejor de las alegrías, para ustedes que han sido mi motor día con día, que saben que los amo y sin ustedes nada de lo que he hecho sería posible.

Hacia mi abuelo

Horacio Lara Torres

El cual siempre quiso tener a un nieto con una carrera profesional, aunque no pudo llegar a verlo, sé que en donde quiera que esté, él se sentirá bien al verme crecer día con día, para él, que estuvo en mi mente desde el inicio, no hubiera tenido esa motivación que tuve día tras día para que cumpliera con su deseo.

Agradecimientos

Al **MC. Félix Luna**, por permitirme involucrarme en diferentes proyectos, con la finalidad de que adquiriera nuevos conocimientos, así como potenciar los que ya tenía, por el tiempo y la paciencia que me brindó en cada momento, de igual manera en varios momentos compartiéndome sus conocimientos profesionales y de vida, que me han hecho ver de diferente manera varios sucesos que acontecen en nuestro camino de vida, en particular quiero agradecerle por abrirme las puertas de su laboratorio, sin limitantes, con lo cual le estoy demasiado agradecido.

Al **Dr. Alan Carrasco**, por su compromiso en el proyecto, el cual siempre estuvo en la disponibilidad de querer mostrarme nuevas herramientas de trabajo y ayudarme en cada paso del proceso, por su conocimiento de cada área, lo cual me llevó a desarrollarme en mi vida escolar/profesional. Por recibirme en su laboratorio y motivarme a querer participar en diferentes congresos lo cual me dieron diversas habilidades de desenvolvimiento. Por el impulso que él tuvo para crear diferentes trabajos con la finalidad de incursionar en otras áreas de conocimiento que fueron nuevas para mí. Por estas y muchas más cosas estoy agradecido inmensamente.

A mi comisión revisora de este trabajo de tesis de licenciatura, la cual dio sus mejores aportaciones y puntos de vista, con la finalidad de que fuera un adecuado trabajo, muchas gracias.

A mi hermana que estuvo escuchándome en cada momento que parecía que ya no quería seguir, pero con sus palabras me confortaba y me hizo tener motivación para poder seguir con lo que me gustaba y pensar que no por un mal momento está todo perdido.

A mi novia la cual le agradezco cada momento que estuvo conmigo desde el inicio hasta el final de mi vida universitaria, con su apoyo y comprensión en cada paso que tuve que dar, por sus consejos y la manera de motivarme en mi camino de la mejor manera, por esa y mil cosas más estoy muy agradecido.

A mis tíos, primos, que estuvieron apoyándome cuando les platicaba mi proceso del trabajo de tesis que estaba realizando y me daban ánimos con sus palabras.

A mis compañeros del laboratorio que siempre estuvieron de buena manera conmigo cuando tenía alguna duda y me guiaron en los diversos procesos que con llevaba adentrarme de nuevo a un laboratorio después de la pandemia.

INDICE

1. Introducción	1
1.1 Diosgenina	2
1.2 Hecogenina	4
1.3 Solasodina	6
1.4 Cuantificación de esteroides	7
2. Antecedentes	8
2.1 Sapogeninas esteroidales	8
2.2 Bioconjugados esteroidales	9
2.2.1 Bioconjugado de Arginil-Diosgenina	10
2.2.2 Bioconjugados de diosgenina-ácido betulínico	11
2.2.3 Metotrexato de diosgenina	12
2.3 Cromatografía HPLC	12
2.4 Procesos de Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicología (ADMETx)	14
2.5 Modelamiento <i>in silico</i>	15
2.6 Validación del método analítico	16
3. Justificación	17
4. Hipótesis	18
5. Objetivo general	18
5.1 Objetivos específicos	18
6. Metodología	19
6.1 Análisis <i>in silico</i>	19
6.2 Síntesis	19
6.3 Caracterización química	20
6.4 Datos técnicos del equipo de HPLC-UV/Vis	20
6.5 Análisis <i>in vitro</i>	20
6.6 Análisis <i>in vivo</i>	20
7. Resultados y Discusión	22
7.1 Ensayo <i>in silico</i> : SwissTarget Prediction	22
7.2 Síntesis y caracterización química de los bioconjugados	25
7.2.1 Caracterización química del Ft-Trp-Dg	26
7.3 Detección por espectrofotometría UV/Vis vs HPLC UV/Vis	30
7.4 Elección del derivado esteroide	30

7.5 Modelo biológico	36
7.5.1 Resultados obtenidos en el ensayo <i>in vivo</i>	37
7.6 Validación del método analítico.....	38
8. Conclusiones	39
9. Referencias	40

Lista de abreviaturas

CE: Electroforesis capilar

C_{máx}: Concentración máxima

DCC: N, N'-diciclohexilcarbodiimida

Dg: Diosgenina

DMAP: 4-Dimethylaminopyridine

Ft: Ftalamidato

Ft-Trp-Dg: Ftalamidil-Triptofano de Diosgenina

Ft-Trp-Hg: Ftalamidil-Triptofano de Hecogenina

Ft-Trp-Slg: Ftalamidail-Triptofano de Solasodina

Hg: Hecogenina

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

HPLC-MS: Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a la espectrometría de masas

IR: Infrarrojo

LDI: Limite de detección inferior

LDS: Limite de detección superior

LESQO: Laboratorio de Elucidación y Síntesis en Química Orgánica

MCD: Mínima cantidad detectable

RMN: Resonancia Magnética Nuclear

Slg: Solosodina

t_R: Tiempo de retención

Trp: Triptofano

UV/Vis: Ultravioleta/Visible

Resumen

Los estirostanos como la diosgenina (Dg), la hecogenina (Hg) y la solasodina (Slg) se utilizan para la estandarización de los medicamentos de origen herbal contra diversas patologías como; cáncer, diabetes, enfermedades cardiovasculares, enfermedades del sistema respiratorio y en infecciones por bacterias, entre otras. La principal limitante con estos derivados esteroidales es la escasa disponibilidad de protocolos para su detección *in vivo* debido a su estructura química. Sin embargo, mediante una esterificación de Steglich se le puede conferir propiedades de detección como cromóforos para cuantificación por UV/Vis. Adicionalmente, esta transformación química permite el diseño, síntesis y caracterización de nuevas estructuras moleculares con propiedades de interés químico/biológico con características para la detección por UV/Vis. Esta ruta de trabajo hace necesaria la validación de un método analítico que sea lineal, selectivo, preciso, repetitivo, exacto, sensible y robusto.

Mediante un diseño bioinformático de las estructuras en la herramienta Web; SwissTargetPrediction, se determinó el potencial biológico de los candidatos ftalamidil triptofanatos esteroidales (Figura 1), por lo cual se procedió a realizar una esterificación del grupo OH del esteroide con un grupo cromóforo como el triptófano. El proceso requirió proteger la parte del nitrógeno con un grupo anhídrido ftálico para dirigir la reacción. Posteriormente se caracterizó cada una de las estructuras químicas por RMN y por UV/Vis se detectaron estos compuestos a 230 nm, y después continuar con la validación del modelo *in vitro e in vivo* usando HPLC-UV/Vis. En el modelo *in vitro* se utilizaron los bioconjugados esteroidales puros, con diferentes escalas de concentración en base a las diluciones realizadas, para verificar en base a un modelo estadístico cual compuesto era el que cumplía con ciertas características para utilizarlo en un modelo biológico, en el modelo *in vivo* se utilizaron ratas Wistar macho adultas de 250–300 g que fueron administradas con una dosis única de 1.0 mg/Kg del compuesto Ft-Trp-Dg por tener el mejor rendimiento en el ensayo *in vitro*. Previamente se hizo la validación del método analítico. Los datos obtenidos en el modelo *in vivo* fueron relevantes usando muestras por triplicado que se obtuvieron a los 3, 6, 9, 12, 15 y 18 minutos donde la $C_{\text{máx}}$ en suero ocurrió a los 12 minutos. De acuerdo con el trabajo realizado se puede concluir que el método analítico de cuantificación por HPLC UV/Vis para los derivados ftalamidil-triptofanatos esteroidales fue validado dado que

cumplió con los parámetros de linealidad, selectividad, precisión, repetibilidad, exactitud, sensibilidad y robustez.

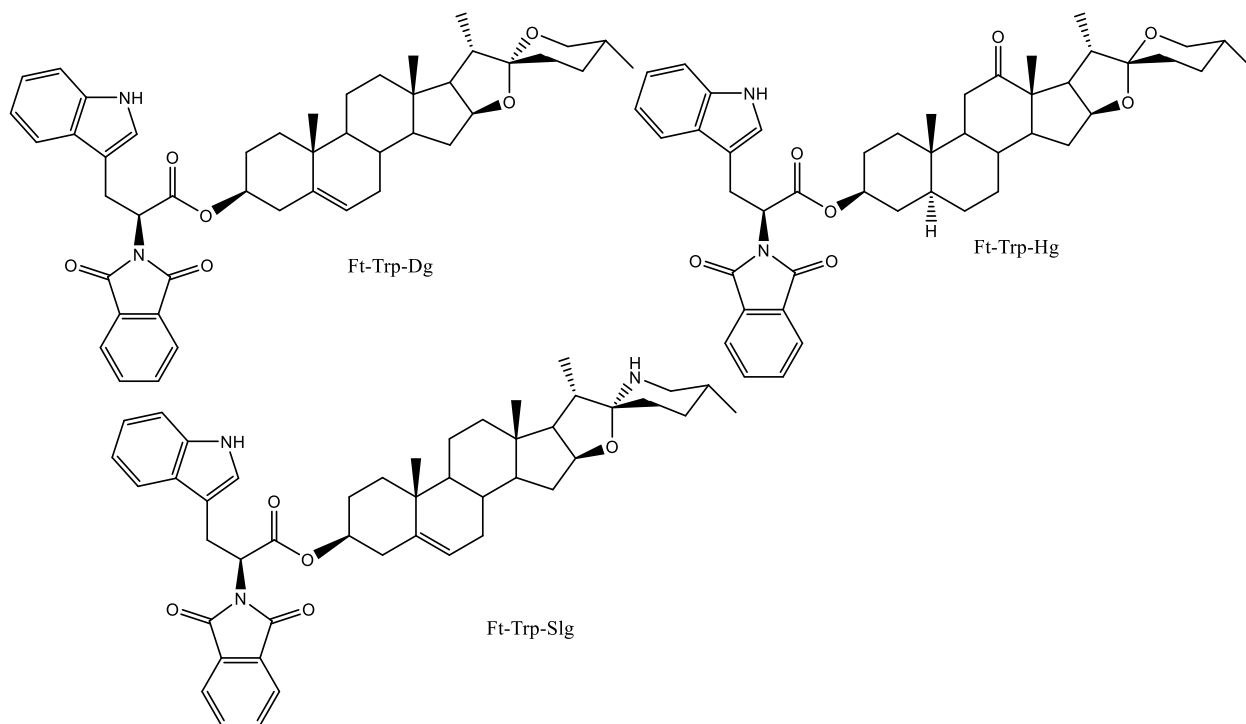


Figura 1. Moléculas de los derivados esteroidales que fueron objeto de estudio.

1. Introducción

Los esteroides participan en diversos procesos biológicos, fisiológicos y patológicos a través de su unión a receptores membranales o intracelulares. Lo más destacado es que los esteroides, así como sus derivados, juegan un papel muy importante en el metabolismo, la señalización, la inmunidad y la reproducción. Adicionalmente, otras moléculas se han desarrollado al paso de los años por modificaciones estructurales que les permite tener actividad biológica específica (Hameedat et al., 2022; Li et al., 2023).

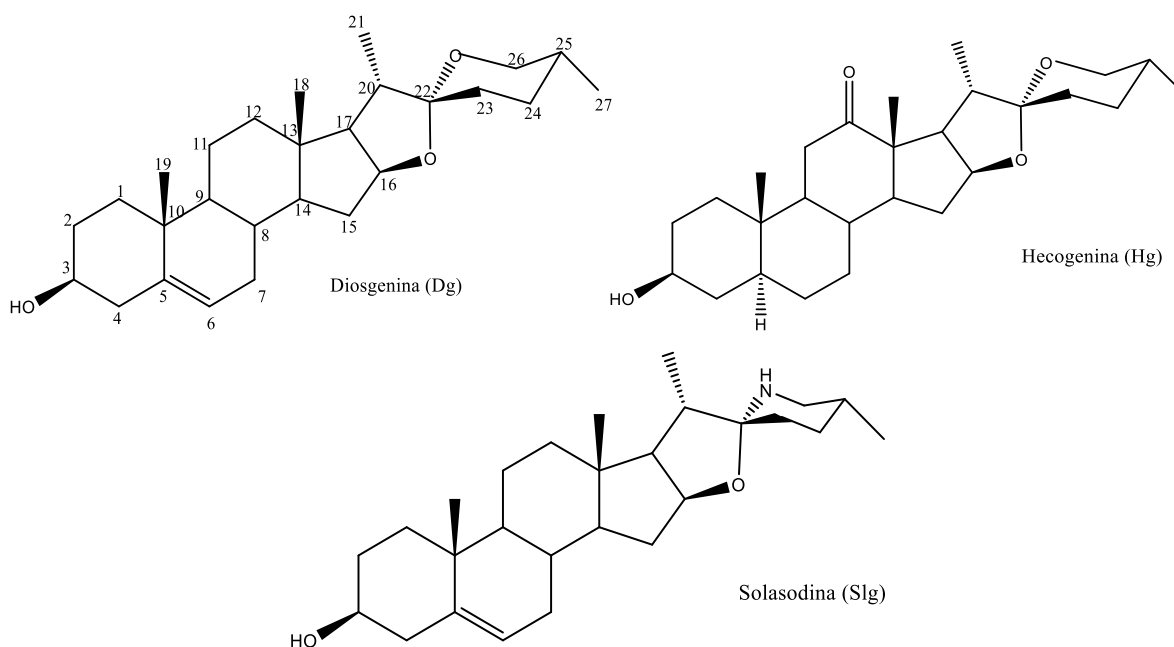


Figure 2. Principales esteroides bioactivos.

En la naturaleza existen saponinas esteroidales como la Diosgenina (**Dg**), la Hecogenina (**Hg**) y la Solasodina (**Slg**) (Figura 2) que se han usado como agentes terapéuticos en varias enfermedades que afectan al humano (Li et al., 2022; Borges et al., 2023), también han sido materia prima para obtener derivados con propiedades fisicoquímicas específicas para aumentar afinidad y eficacia en los tratamientos terapéuticos (Semwal et al., 2022; Chowański et al., 2022; Borges et al., 2023). Específicamente, para estas tres saponinas existen varios reportes de su potencial terapéutico, de los cuales a continuación se precisan.

1.1 Diosgenina

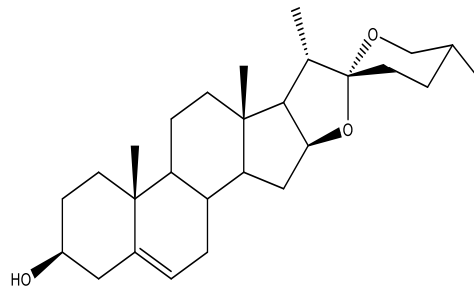


Figura 3. Fotografía de la planta *Dioscorea*, fuente natural de la diosgenina y estructura química de la diosgenina.

La diosgenina es una sapogenina espiroestánica cuya molécula está sustituida en la posición 3 por un grupo hidroxilo en configuración beta, también tiene un doble enlace en la posición 5 y configuración (*R*) en el C-25. La molécula se clasifica como un 3β -esterol y espiroacetalo (Figura 3). De manera natural se encuentra en los tubérculos de *Dioscorea villosa L* y se utiliza como materia prima para la síntesis comercial de esteroides como la cortisona, la pregnenolona y la progesterona. La diosgenina tiene propiedades neuroprotectoras, anticancerígena, antiaterosclerótica, antiasmática y hepatoprotectora. En el sistema nervioso central, se ha descrito como agente que mejora la cognición, también tiene propiedades antiinflamatorias, mejora a pacientes con esclerosis múltiple, mejora las lesiones en la médula espinal, los accidentes cerebrovasculares, trombosis e incluso a pacientes con dolor neuropático (Semwal et al., 2022; Li et al., 2022).

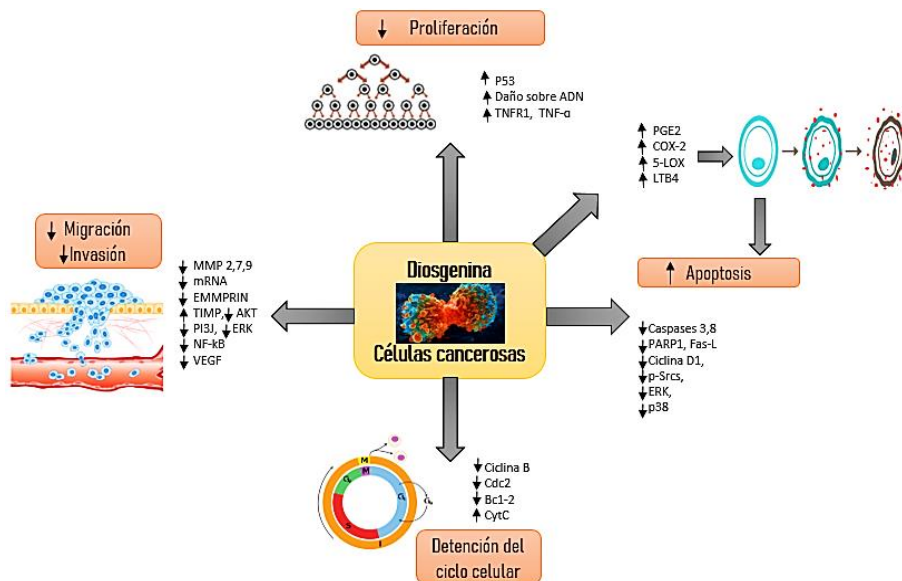


Figura 4. Diagrama con dianas celulares y mecanismos moleculares involucrados en el efecto anticancerígeno de la diosgenina. Abreviaturas y símbolos: ↑: aumentado; ↓: disminuido (Semwal et al., 2022).

Varios grupos de investigación han realizado experimentos para valorar los efectos de la diosgenina sobre la proliferación, la migración y la invasión celular (Figura 4) (Semwal et al., 2022; Li et al., 2022), destaca una excelente respuesta frente a células cancerosas humanas, mostrando alta actividad citotóxica sobre células cancerosas específicas con efectos de bajos a nulos sobre células sanas. En pacientes con aterosclerosis hay depósito e infiltración de lípidos en la capa íntima de las arterias. Uno de los efectos reportados de diosgenina es regular el metabolismo del colesterol en los macrófagos. Estudios *in vivo* con diosgenina en ratas Wistar con dieta aterogénica o formadora de ateromas, la diosgenina contrarrestó el efecto, disminuyeron los marcadores de inflamación e inhibió el progreso de la aterosclerosis. Adicionalmente, Junchao y colaboradores evaluaron el efecto antiinflamatorio de la diosgenina en ratones con asma inducido con ovoalbúmina y en cultivo primario de células de la tráquea obteniendo buena respuesta antiinflamatoria (Junchao et al., 2017). En otras investigaciones se ha estudiado la interacción de la diosgenina con el receptor alfa a glucocorticoides. Los investigadores mostraron que la diosgenina suprimió significativamente la secreción de factores inflamatorios TNF- α , IL-1 β , and IL-6. A nivel intracelular, han sugerido que la acción de la diosgenina es a través de regular la vía Raf-1/MEK/MAPK/ERK (Figura 4) (Junchao et al., 2017). Dada la alta frecuencia de las enfermedades que afectan al hígado, Nie et. al publicaron el efecto de la diosgenina sobre el factor de crecimiento transformante (TGF)- β 1 en células estrelladas hepáticas y su respuesta en el tratamiento de la fibrosis. Se ha reportado que la diosgenina inhibe la proliferación de TGF- β 1 y reduce la expresión de diferentes receptores funcionales implicados en el daño hepático con mejora de la fibrosis hepática. En un modelo de hígado graso en ratones, la diosgenina protegió contra la acumulación de lípidos, el estrés oxidativo, el daño celular y la inflamación, en el mismo modelo aumentó la expresión de Sirtuin 6 y de los transportadores de ácidos grasos (Nie et al., 2023).

1.2 Hecogenina

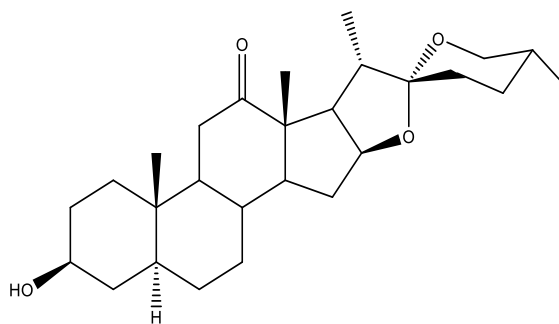


Figura 5. Fotografía de la planta de *Agave sisalana*, fuente natural de la hecogenina y estructura química de hecogenina.

La hecogenina se encuentra en plantas del género *Agave* y *Tribulus terrestris* L (Figura 5) y se le ha utilizado como sustancia precursora en la producción de esteroides. La hecogenina se encuentra principalmente en las hojas maduras de *Agave sisalana*. Al igual que otras saponinas, la hecogenina tiene efectos nociceptivos, antiinflamatorios, antitumorales, mejora la úlcera gástrica y actúa como antimicrobiano (Borges et al., 2023; Santos et al., 2012). Varios estudios han reportado la capacidad de la hecogenina y sus derivados para actuar como analgésico sobre las vías descendentes espinales. Ha sido efectiva en el dolor inducido por varios agentes como calor, glutamato, capsaicina, TNF- α , PGE2, mentol, cinamaldehído o dopamina. Además, la hecogenina fue eficaz como analgésico cuando se administró localmente o por vía sistémica. La analgesia se evaluó por la expresión de cFOS, un factor de transcripción indicador de la actividad nerviosa. Después de la administración sistémica de hecogenina hubo disminución de cFOS en la médula espinal y disminución de la excitabilidad de las vías centrales implicadas en el dolor. Adicionalmente, en modelos *in vivo*, la hecogenina actúa sobre la inflamación al suprimir la expresión de citocinas proinflamatorias como IL-1 β , IL-6, IL-12 y TNF- α (Figura 6). En el ámbito celular, reduce la producción de superóxido proveniente de los neutrófilos, e influye en la migración de estas células y de los eosinófilos. Es establecido que la hecogenina puede actuar en diferentes respuestas inflamatorias, tanto agudas como crónicas inhibiendo la secreción de citoquinas (Figuras 6a y b).

La hecogenina también actúa contra el desarrollo de tumores. En células hepáticas humanas HepG2 en cultivo, se ha reportado que la hecogenina tiene efecto citotóxico a

concentraciones superiores a 100 μM . El efecto antitumoral ocurre por la interacción con los receptores activados por peroxisoma (PPAR γ) que se expresan en las células tumorales e inducen apoptosis (Borges et al., 2023).

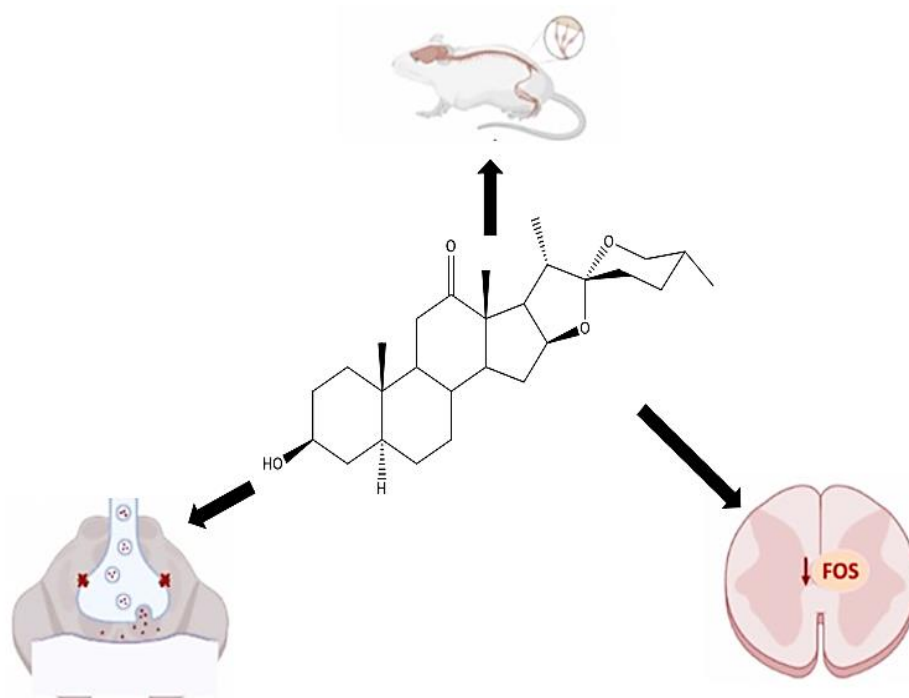


Figura 6 a. Esquema que ilustra las propiedades analgésicas de la hecogenina (Hg). Hg reduce la expresión de c-fos, un marcador de actividad neuronal; - Hg actúa como antagonista no competitivo en los receptores opioides; - Hg minimiza el dolor después de una lesión del nervio ciático (Borges et al., 2023).

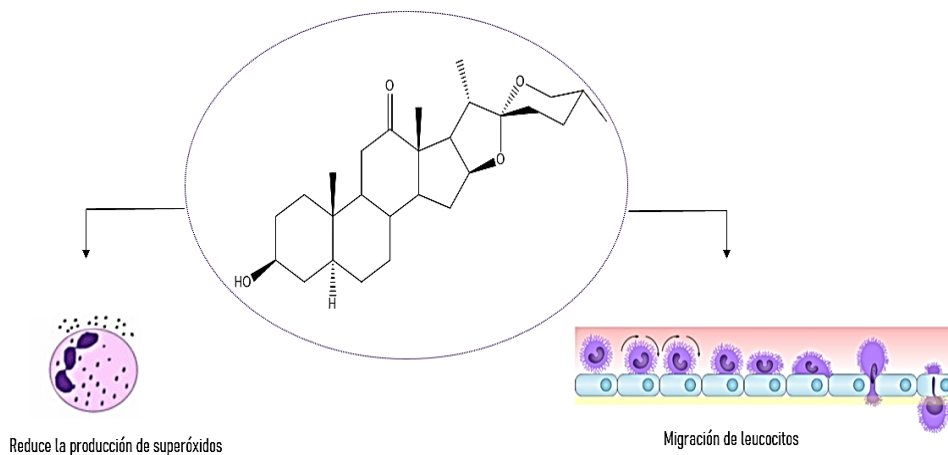


Figura 6 b. Esquema que ilustra la relación de la Hg en el proceso inflamatorio. -Hg reduce la producción de superóxidos; -Hg influye en la migración de neutrófilos y eosinófilos (Borges et al., 2023).

1.3 Solasodina

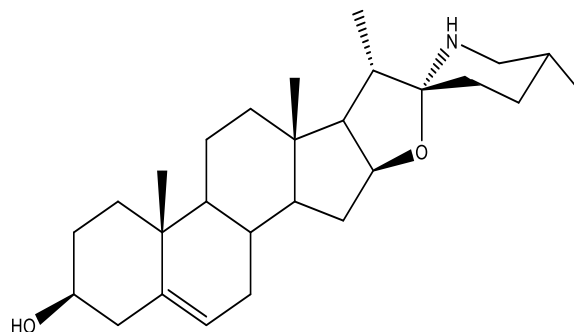


Figura 7. Fotografía de la planta *Solanácea sisymbriifolium*, fuente natural de Solasodina y estructura química de Solasodina.

La solasodina se extrae de la planta *Solanácea* que pertenece a la familia *Solanum sisymbriifolium*. La solasodina es un metabolito que posee diversas propiedades farmacológicas. La solasodina se ha usado como precursor en la síntesis de compuestos esteroideos complejos para uso en las píldoras anticonceptivas (Fan et al., 2021). También se ha usado como agente antifúngico (Arumuganainar et al., 2023), inmunomodulador, antiinflamatorio (Arora et al., 2022), antitumoral (Fan Y al., 2021), hepatoprotector y anticonvulsivo (Chauhan et al., 2011). La solasodina es un glicoalcaloide que contiene una estructura de colestano C27 con un nitrógeno básico y seis moléculas de azúcares unidas al esqueleto esteroideal. Además de las aplicaciones farmacológicas, la molécula se emplea en la industria farmacéutica como precursor de la semisíntesis de anticonceptivos y hormonas esteroides anabólicas, progesterona y cortisona (Arora et al., 2022).

Sin embargo, un aspecto importante de las moléculas bioactivas es conocer sus propiedades farmacocinéticas y realizar estudios sobre su mecanismo de acción y de su seguridad terapéutica. Para mejorar estos aspectos farmacéuticos, es posible agregar grupos funcionales a la molécula que permitan su cuantificación en fluidos corporales como sangre y orina. Debido a la naturaleza compleja de la mayoría de las muestras de esteroides, los métodos analíticos también deben ser selectivos para cuantificar de manera confiable los esteroides objetivo y separarlos de otros compuestos e interferencias endógenas de estructura similar. Otro objetivo es permitir una extracción efectiva y un pretratamiento químico más simple antes del análisis químico de separación por HPLC. Esto es especialmente importante ya que

el pretratamiento de la muestra puede provocar la pérdida la molécula o de su analito (Hameedat et al., 2022).

1.4 Cuantificación de esteroides

Los métodos más utilizados en el análisis de esteroides son la cromatografía de gases, espectrometría de masas o espectrometría de masas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC-MS), electroforesis capilar (CE) y HPLC UV/Vis. Cada técnica cromatográfica tiene características especiales para poder ocuparlas. Aunque la cromatografía de alta resolución en masas es una técnica de alto costo en comparación con la HPLC de fluorescencia y la HPLC-UV/Vis, las cuales son técnicas muy utilizadas, confiables y de menor costo (Hameedat et al., 2022; Li et al., 2023). Algunas características para tomar en cuenta son que, en la espectroscopia de masas y la espectroscopia de fluorescencia, se necesita utilizar un paso de derivatización, que consiste en obtener una molécula con estructura similar, esto debido a una débil ionización de los esteroides. Considerando la espectroscopia UV/Vis, la región en el campo electromagnético de la luz hace que pueda usarse para ser observado un compuesto debe tener características de átomos unidos mediante enlaces covalentes con enlaces simples y múltiples alternados, o sea sistemas conjugados (Hameedat et al., 2022).

Como anteriormente se mencionó, existe una serie de características esenciales que los compuestos deben de tener para ser detectados y cuantificados por técnicas analíticas de alta sensibilidad y bajo límite de detección. Consecuentemente se utilizará la técnica de HPLC-UV/Vis para detectar nuestros derivados esteroidales bioconjugados de diosgenina (Dg), hecogenina (Hg) y la solasodina (Slg), para lo cual les incorporaremos a su estructura química otra molécula, la que nos dará otras propiedades como mejorar la permeabilidad al tener compuestos nuevos con características apolares e incorporaremos sistemas conjugados a la molécula, dado que es una característica principal para observar los compuestos en la región UV/Vis del espectro electromagnético. Para esto, se hizo un diseño, modelamiento y síntesis de los derivados esteroidales a partir de Dg, Hg y Slg.

Las saponinas de penogenina también son raras en las plantas (Figura 8), sin embargo, si la diosgenina se hidroxila en C-17, C-23, C-24 y C-27 puede formar penogenina o hidroxipenogenina saponina, como la polifilina D, Paris VI y Paris VII aisladas de las especies de París. Las saponinas esteroides tienen una amplia gama de funciones y actividades farmacológicas debido a sus conexiones con diferentes esqueletos de aglicona y diferentes números de cadenas de azúcar, además de haber varios tipos diferentes de saponinas esteroides en la misma planta. Por lo tanto, la distribución y las formas existentes de saponinas esteroidales en las plantas son diversas y pueden estar relacionadas con las diferentes funciones de las saponinas esteroidales en diferentes plantas. Específicamente, para las plantas, las saponinas esteroides pueden ayudarlas a hacer frente a las tensiones biológicas y abióticas como los patógenos, los herbívoros y la sequía (Szakiel et al., 2011). Moisés et al. propuso que las saponinas en las plantas se producen como respuesta al estrés biológico (Moisés et al., 2014). En las reacciones de estrés, como cuando son atacadas por insectos herbívoros o durante la infección por patógenos, el aumento del contenido de saponina en las plantas suele estar mediado por hormonas, como el ácido jasmónico y el ácido salicílico (Szakiel et al., 2011; De costa et al., 2013). En los humanos, las saponinas esteroidales aisladas de plantas tienen una variedad de usos farmacológicos, que incluyen actividad antibacteriana, actividad antitumoral, actividad antiinflamatoria, efectos hipoglucemiantes y reductores de lípidos, por lo que son una importante materia prima industrial para la producción de medicamentos con principios activos esteroidales (De costa et al., 2013).

2.2 Bioconjugados esteroidales

A lo largo del tiempo, se ha optado por nuevos estudios con diferentes moléculas con fin terapéutico para uso humano. A medida que aparecen nuevas enfermedades o cambian las ya existentes, son necesarias diversas estrategias para obtener agentes terapéuticos más seguros, efectivos y específicos. La bioconjugación es un enfoque biotecnológico novedoso en el cual dos fracciones químicas se unen para lograr resultados notables. La bioconjugación se ha identificado como una técnica simple y altamente importante para obtener moléculas potentes al unir características estructurales específicas (Bansal et al., 2022). Adicionalmente, el uso de esteroides es una base privilegiada con varias propiedades medicinales significativamente notables en el proceso de descubrimiento y desarrollo de

nuevos fármacos. Las moléculas esteroidales se prefieren por su rigidez y buena capacidad de atravesar las membranas biológicas. Específicamente, se ha utilizado la modificación o alteración en la estructura básica del anillo dando como resultado la formación de derivados esteroidales con una amplia gama de actividades terapéuticas (Bansal et al., 2022). La conjugación de los esteroides resulta en varias estructuras biológicamente activas que puede dar a la molécula final ventajas de acuerdo con sus nuevas características como lipofilicidad, estabilidad y especificidad de objetivo con disminución de efectos adversos. La exploración científica de estos bioconjugados esteroides han sido extensamente explorados por la utilidad contra diversos trastornos que afectan al humano, y se les considera relevantes con potencial efecto terapéutico como anticancerígenos, antiinflamatorios, anticoagulantes, y agentes antivirales, entre otros (Bansal et al., 2022).

A continuación, se mencionan algunos trabajos realizados para valorar el efecto biológico de bioconjugados esteroidales.

2.2.1 Bioconjugado de Arginil-Diosgenina

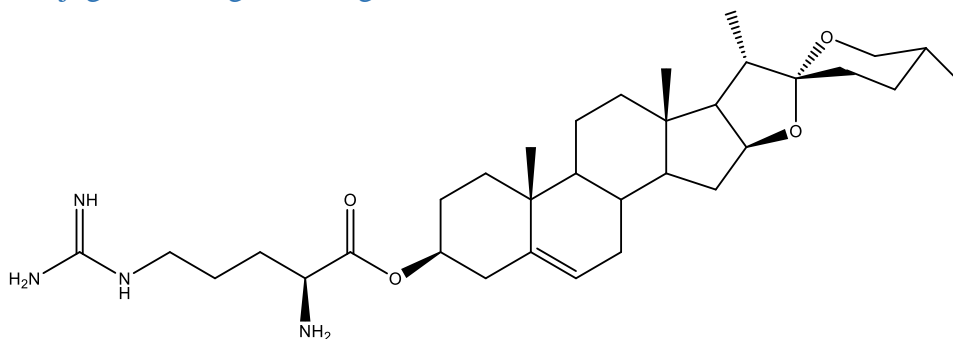


Figura 9. Estructura química del bioconjugado Arginil-Diosgenina.

Se diseñó, sintetizó y evaluó la actividad biológica del conjugado de arginil-diosgenina (Arg-Dg) (Figura 9) el cual se caracteriza por ser soluble en agua. Este conjugado se caracterizó utilizando espectroscopia IR, RMN y HPLC-MS, seguidos de la evaluación de su actividad biológica. Hubo comparación entre el compuesto de Dg y el bioconjugado Arg-Dg donde hubo menor citotoxicidad contra las células L929 y mayor actividad antiproliferativa contra las células del hígado. Se midió la seguridad del bioconjugado utilizando el ensayo Alamar Blue de alta sensibilidad que indicó que la actividad metabólica celular aumentaba a concentraciones bajas. Además, el bioconjugado promovió la formación de tubos con células endoteliales y mejoró la diferenciación de osteoblastos con efectos sinérgicos de la actividad

de la fosfatasa alcalina. Los resultados del trabajo realizado mostraron que el bioconjugado Arg-Dg puede tener aplicaciones biomédicas por la remodelación de tejidos óseos, así como aplicaciones terapéuticas por su asociación a rutas biológicas de proliferación celular y citotóxicas (Liao et al., 2018 revisar).

2.2.2 Bioconjugados de diosgenina-ácido betulínico

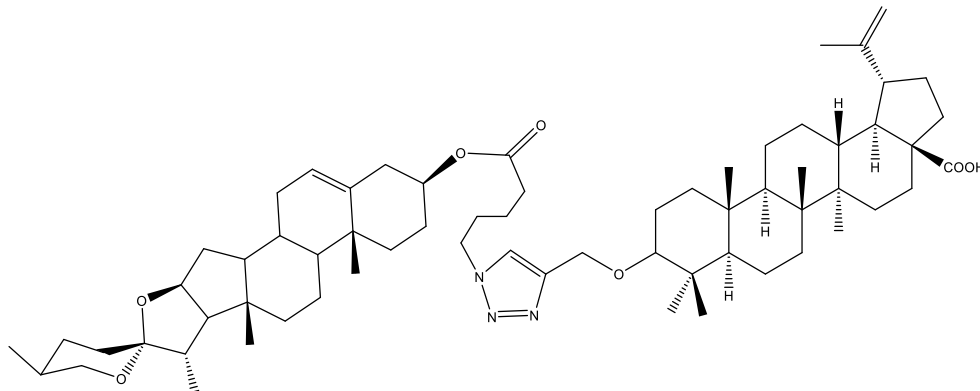


Figura 10. Estructura química del bioconjugado de Diosgenina/Ácido betulínico

Para la conjugación de la diosgenina con el ácido-betulinico (Figura 10) se hizo por procedimiento de síntesis que incluye la cicloadición dipolar 1,3 de Huisgen con el catalizador cobre y una desbencilación catalizada por paladio mediante hidrogenólisis. Con esto bioconjugado se midió la citotoxicidad en células cancerosas de leucemia linfoblástica T humana, células HeLa de cáncer de cuello uterino y células HTC116 de cáncer de colon. También se hicieron mediciones para comparar los parámetros cinéticos de absorción, distribución, metabolismo y excreción (ADME) y calculados *in silico*, lo cual dio como resultado datos importantes de los distintos conjugados que fueron de interés para este estudio, lo cual permitió deducir las mejoras en la actividad por las líneas de investigación que se realizaron (Özdemir et al., 2020).

2.2.3 Metotrexato de diosgenina

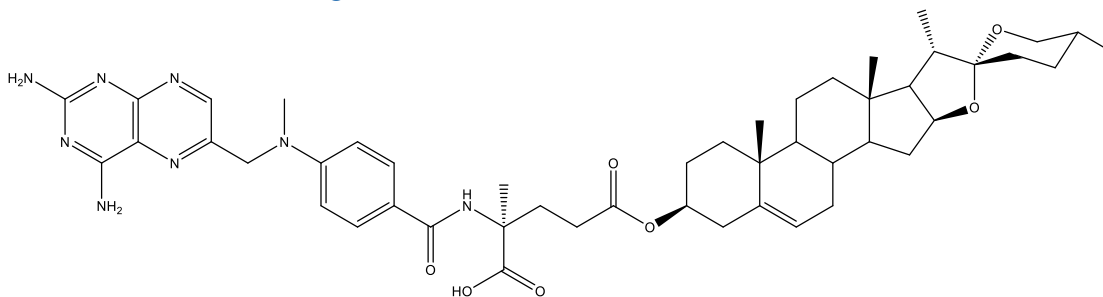


Figura 11. Estructura química del bioconjugado de diosgenina/metotrexato

Se diseñó y sintetizó una serie de bioconjugados de metotrexato-diosgenina para mejorar la internalización pasiva de metotrexato (MTX) en células resistentes al transporte. Se investigaron los efectos inhibitorios de estos conjugados sobre el dihidrofolato reductasa (DHFR), además se estudiaron los efectos antiproliferativos en células MDA-MB-231, una línea celular de cáncer de mama resistente al transporte. Los resultados sugirieron que la conjugación de MTX con diosgenina puede ser una forma eficaz de superar su resistencia al transporte de MTX en las células cancerosas. Se obtuvieron mejores resultados con la conjugación de diosgenina vs el MTX solo, esto respecto a la actividad anti proliferativa y de inhibición de la enzima DHFR (Brangrong et al., 2016).

2.3 Cromatografía HPLC

La técnica de cromatografía se acredita a Mikhail Semenovich Tswett, un investigador ruso en el año 1906. Mikhail usó columnas de carbonato de calcio para separar pigmentos de hojas verdes en la que obtuvo varias bandas con diferentes colores, como eluyente usó éter de petróleo. Dado que separó compuestos que tenían colores denominó a la técnica “cromatografía”, este término deriva de “chrom” (color) y “graphe” (escribir), escribir en colores. El proceso no depende de que los compuestos a separar posean color, pero sí pueden dar color por reacción química, esto para que pueda visualizarse su ubicación (García et al., 2016; Abelaira et al., 1992; Pássaro et al., 2016).

A lo largo de varios años ha habido diversas contribuciones para la mejoría de esta técnica. El desarrollo notable se dio entre los años 1930-1950. De acuerdo con (Pássaro et al., 2016) destacan Martin y Synge (1952) al inventar la cromatografía de partición, y James al

desarrollar la técnica de cromatografía de gases. En breve, la cromatografía es un método para separar componentes de una mezcla. Existen dos fases; la fase fija o estacionaria y la fase en movimiento o móvil, la cual fluirá en dirección específica. La primera puede ser un sólido, un líquido retenido sobre un sólido o un gel, mientras que la segunda puede ser un líquido o un gas (Meyer et al., 2004; Gary, 2009).

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) es una de las técnicas de cromatografía más utilizadas debido a su capacidad de separar analitos de distinta naturaleza presentes en una mezcla. Su aplicación industrial abarca la farmacéutica, la bioquímica, los alimentos, los productos de la industria química, la medicina clínica, incluso la química forense (García et al., 2016)

La HPLC es uno de los métodos de cromatografía para la separación y análisis de los componentes químicos de una mezcla. En este método participan dos fases, la móvil y la estacionaria (inmiscibles entre sí). La fase móvil es líquida y su función es llevar la muestra a través de todo el equipo, cruzando la fase estacionaria que puede ser sólida o una película líquida soportada en un sólido inerte, la cual es representada por una columna con número de carbonos específicos para cada análisis. Las distintas fuerzas químicas y físicas que actúan entre la mezcla a analizar y las dos fases determinan la retención y separación de cada uno de los componentes de la mezcla. Los componentes con mayor afinidad con la fase estacionaria se desplazarán con menor velocidad que aquellos que presentan menor afinidad (Suarez et al., 2018).

El propósito del análisis por HPLC de cualquier fármaco es confirmar su identidad y proporcionar resultados cuantitativos para conocer el progreso del fármaco en la terapia de una enfermedad, para este trabajo se requieren parámetros cualitativos y cuantitativos para poder medir parámetros de la validación del método analítico, hablando de su tiempo de retención (t_R) y la concentración observada en el cromatograma del equipo, tanto para medir sus límites de detección superior e inferior, un claro ejemplo de las mediciones cualitativas y cuantitativas se muestra en la figura 12.

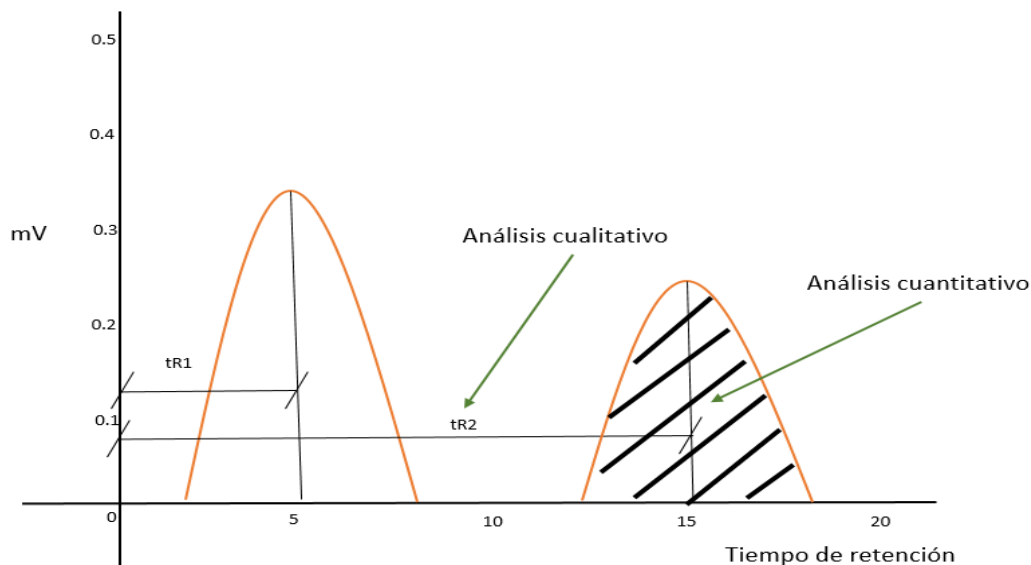


Figura 12. Análisis cualitativo; mide el t_R específico de cada compuesto en el cromatograma de HPLC, bajo condiciones idénticas. Análisis cuantitativo; se puede identificar en esa área bajo el pico de la curva la concentración de la muestra de interés por parte de nuestro analito de estudio.

Se han observado diferentes metodologías para evaluar parámetros farmacocinéticos de derivados esteroidales como la diosgenina, la charantina y la hidroxicalcona (Salunkhe et al., 2021). El método para poder conseguir datos farmacocinéticos en esos estudios fue aceptado, sin embargo, tiene algunas limitaciones, las cuales con este trabajo proponemos superar y potenciar optimizando la relación costo/beneficio por la utilización de HPLC con detector UV/Vís dada su mayor accesibilidad y rentabilidad ecológica, además de tener buena sensibilidad, y poder utilizar mezclas capaces de tener buena separación por la alta resolución del equipo.

2.4 Procesos de Administración, Distribución, Metabolismo, Excreción y Toxicología (ADMETx)

Al realizar un estudio *in vitro* y posteriormente hacer un estudio *in vivo*, es necesario tomar en cuenta una serie de parámetros de gran interés por la respuesta del cuerpo a la administración de una sustancia biológicamente activa. El estudio de los procesos ADMETx implica seguir la ruta de un fármaco en el organismo en los procesos de absorción, distribución, metabolismo y excreción. También puede integrarse el parámetro de seguridad del fármaco, o sea, la toxicidad hacia el sistema vivo. Conocer los parámetros cinéticos permite decidir la dosis, la forma farmacéutica y la vía de administración a usar en el sistema

vivo. En farmacia experimental, el análisis cinético contribuye a entender los fenómenos fisicoquímicos, bioquímicos y metabólicos del fármaco en el organismo, su tiempo de vida media y la duración de la acción, así como sus posibles interacciones. Desde el punto de vista clínico, la farmacocinética orienta el uso racional y eficaz de los fármacos. Los procesos parámetros cinéticos son base para el desarrollo de las mejores formulaciones, el establecimiento de las dosis, los intervalos de dosis y la duración de los tratamientos, y desde luego la adaptación individualizada de la posología. También permite el seguimiento farmacoterapéutico, incluso con un enfoque farmacogenético (Verstuyft et al., 2022).

2.5 Modelamiento *in silico*

La predicción de parámetros y comportamientos de las moléculas en diferentes condiciones ambientales por medio de las herramientas bioinformáticas son conocidas como método *in silico*. Estos estudios pertenecen a una rama de la biología computacional cuyo objetivo es explorar y experimentar con los procesos biológicos por medio de simulaciones por softwares especializados en computadora. Dicho enfoque digital ha permitido visualizar las estructuras tridimensionales de péptidos, observar el rol y la función de diferentes moléculas y proteínas o bien de una célula completa hasta llegar a predecir respuestas a estímulos a través de la modelación de experimentos *in silico* (Fuentes et al., 2021).

Un ejemplo de la aplicación de esta tecnología es en el área farmacéutica, ya que ayuda no solo a predecir la eficacia de posibles moléculas para uso terapéutico sino también provee modelos del comportamiento farmacocinético de dichos compuestos, es decir, su perfil ADME (Fuentes et al., 2021).

La información sobre la interacción de los fármacos por estudios clínicos (en seres humanos) permite tener un avance muy importante, sin embargo, se requieren otras formas de estudio menos riesgosas y costosas, por lo que los estudios preclínicos *in silico* se utilizan de forma predictiva para anticipar y disponer de información antes de la administración de un fármaco a los seres humanos, también permiten el diseño de nuevas moléculas potencialmente útiles en la clínica humana (Fuentes et al., 2021).

2.6 Validación del método analítico

La validación de un método analítico es un paso importante para la idoneidad de un método, esto se refiere a que los resultados que son entregados por un método sean confiables. Una gran ayuda es el fundamento estadístico, el cual busca que el método sea el adecuado para fines previstos. La validación se basa en la habilidad por parte del personal, así como tener en cuenta ciertos factores que pueden modificar los resultados de esta, para lo cual se busca que la validación se efectúe en forma metódica, ordenada, trazable y confiable. Es importante que el laboratorista tenga claridad de los requerimientos del método para establecer el alcance de la validación del método. En este trabajo de tesis se persigue obtener con los siguientes parámetros: linealidad, selectividad, precisión, repetibilidad, exactitud, sensibilidad y robustez del método analítico (Duffau et al., 2010). Previamente han desarrollado trabajos similares de validación en base al equipo que se utiliza como el HPLC (Zhang et al., 2015; Mehmood et al., 2022; Veeran et al., 2021), sin embargo, en este trabajo, la diferencia es el uso del detector UV/Vis.

3. Justificación

La resistencia a los fármacos en los tratamientos actuales y la aparición de nuevas enfermedades son justificaciones suficientes para desarrollar nuevas moléculas para las terapias farmacológicas. Este trabajo de tesis se estudiaron nuevas moléculas de bioconjugados esteroidales con potencial efecto biológico, de acuerdo con sus dianas moleculares, además se determinó su absorción por espectrofotometría UV/Vis y HPLC-UV/Vis, al realizar modificaciones en su estructura química a compuestos esteroidales, con las cuales podrán ser detectados en la región UV/Vis del espectro electromagnético de la luz. Para que las moléculas puedan ser detectadas en esta región del espectro de luz, se necesita que se tengan sistemas conjugados, o sea átomos unidos mediante un enlace covalente con enlaces simples y múltiples alternados. Al utilizar el equipo de HPLC-UV/Vis podemos realizar diversos análisis de acuerdo con los datos recabados, inicialmente se tiene planeado hacer la validación del método analítico, con el fin de obtener datos estandarizados para el procedimiento por HPLC-UV/Vis. La importancia de la validación del método analítico es que podamos mostrar la linealidad, selectividad, precisión, repetitividad, exactitud / error sistemático, sensibilidad y robustez que el procedimiento analítico debe tener y ser apto para el propósito indicado, en síntesis, que el método analítico sea confiable y reproducible. Para los compuestos bioconjugados existe relevancia de los datos que se obtienen como su concentración. Para esto se utiliza el límite de detección inferior (LDI) y límite de detección superior (LDS), donde al tener los datos de cada compuesto esteroidal, se puede hacer una comparación de este método *in vitro* vs el método *in vivo*. Para esto último se utilizaron ratas de la cepa Wistar por su extenso empleo en ensayos preclínicos, además de permitir la detección de los biconjugados en líquidos corporales como el suero por HPLC-UV/Vis. En resumen, los resultados obtenidos en esta tesis contribuirán a la estandarización metodológica para la detección y la cuantificación de bioconjugados esteroidales *in vitro* e *in vivo* que contribuirán al desarrollo de nuevas moléculas con potencial uso terapéutico.

4. Hipótesis

Utilizar los bioconjugados ftalamidil-triptofanatos esteroidales de diosgenina, hecogenina y solasodina probará que es posible cuantificarlos por el método HPLC-UV/Vis. Al hacer mediciones usando diluciones con los mismos bioconjugados permitirá conocer los límites de detección inferior, así como superior y en un modelo *in vivo* con el mejor bioconjugado por sus mejores propiedades de detección por HPLC-UV/Vis mostrará que es posible evaluar el comportamiento del compuesto en un sistema vivo completo.

5. Objetivo general

Validar el método HPLC-UV/Vis para cuantificar compuestos ftalamidil-triptofanatos esteroidales.

5.1 Objetivos específicos

- Analizar los tiempos de retención (tR) de los compuestos ftalamidil-triptofanatos esteroidales puros *in vitro*.
- Analizar los tiempos de retención (tR) de los compuestos ftalamidil-triptofanatos esteroidales *in vivo*.
- Analizar los compuestos ftalamidil-triptofanatos esteroidales en modelos *in vitro* e *in vivo* para establecer su límite de detección inferior y superior por HPLC-UV/Vis.
- Estudiar el área bajo la curva de los compuestos ftalamidil-triptofanatos esteroidales a dosis de 1.0 mg/kg.

6. Metodología

Para validar el método analítico se requiere verificar cada parámetro que lo caracteriza, esto con el objetivo de cumplir con las características para la aceptación del proceso analítico. Para eso se debe de hacer una guía del proceso que se debe llevar a cabo, considerando desde el análisis *in silico* de las moléculas, hasta el análisis estadístico con los resultados obtenidos en los modelos *in vitro* e *in vivo* (Figura 13).

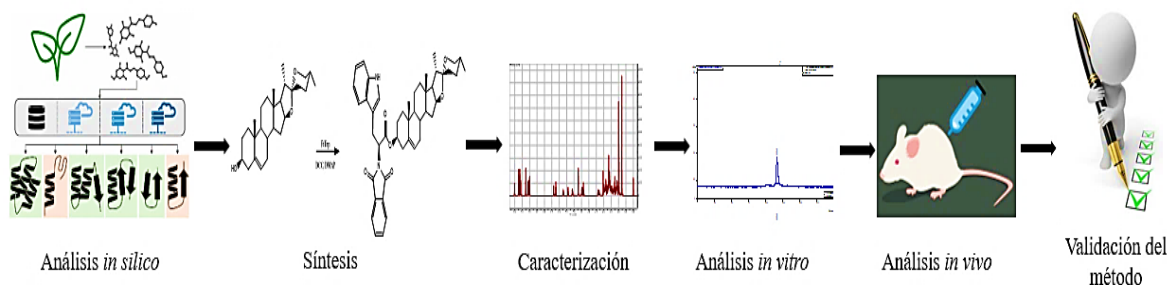


Figura 13. Esquema de la metodología de trabajo realizado en esta tesis.

6.1 Análisis *in silico*

Para esta etapa del proyecto se realizó la búsqueda en las plataformas bioinformáticas de SwissTargetPrediction (Swiss Institute of Bioinformatic) para conocer los comportamientos que tendrían los nuevos compuestos en estudio. En esta fase de la investigación se obtuvieron las dianas biológicas para cada compuesto que se obtenían como resultado de esta búsqueda, para lo cual se utilizaron los códigos “smiles” de los nuevos bioconjugados esteroidales **Ft-Trp-Dg**, **Ft-Trp-Hg** y **Ft-Trp-Slg**. Los códigos “smiles” se obtienen dibujando la estructura química en un apartado de la plataforma que se llama “MARVIN JS” y con esto obtener todos los resultados de interacción con las dianas biológicas que nos proporciona la plataforma. Este proceso da cuenta de las proteínas que son de interés terapéutico por su unión con las nuevas moléculas y por lo tanto, hacer un estudio dirigido por el alto interés clínico.

6.2 Síntesis

Para la síntesis de los bioconjugados esteroidales, se realizó una esterificación de Steglich, para lo cual se utiliza como materia prima cualquier esteroide como la diosgenina, la hecogenina o la solasodina. Se utiliza un Mmol de cada esteroide, 1.5 Mmoles de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo de acoplamiento y 1.5 Mmoles de 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador de la reacción, además de 1.5 Mmoles de

ftalamidato de triptófano como aminoácido. Las reacciones realizadas por triplicado. Posteriormente, los componentes de la reacción se separaron por cromatografía en columna para obtener el producto puro.

6.3 Caracterización química

Los bioconjugados se caracterizaron por RMN a 500 MHz en un equipo Bruker. Como disolvente se usó cloroformo deuterado con TMS como señal de referencia, y los desplazamientos se expresarán en ppm.

6.4 Datos técnicos del equipo de HPLC-UV/Vis

Equipo: HPLC marca Varian Polaris ProStar; modelo 210 con bombas mecánicas Varian Polaris ProStar; modelo 210.

Detector: UV/Vis, marca Varian ProStar modelo 350

Inyector: manual con “Loop” de 20 μ L, marca Rheodyne

Columna de carbono: C8 marca Varian ProStar.

Solventes: Agua grado HPLC 50% - Acetonitrilo grado HPLC 50%

Sistema de registro: Star Chromatography Workstation Versión 6.0.

6.5 Análisis *in vitro*

Los bioconjugados esteroidales se midieron de forma secuencial, con el fin de obtener el límite de detección superior y límite de detección inferior de cada uno de los nuevos compuestos. Para esto se utilizó como solución madre una mezcla de 1 mg de compuesto en 1 mL de acetonitrilo para poder ser detectados en el HPLC-UV/Vis. Posteriormente se realizaron diluciones de 1:10 hasta llegar a tener los resultados ya mencionados de los límites de detección, para que se pueda escoger un compuesto para el análisis *in vivo* con los criterios de mejor comportamiento en los datos obtenidos *in vitro*.

6.6 Análisis *in vivo*

Después de elegir el compuesto con mejor comportamiento de acuerdo con los datos que se obtuvieron *in vitro*, se procedió a medir el compuesto en un sistema vivo. El modelo animal empleado fue la rata Wistar macho adulta con peso de 250 – 350 g. Adicionalmente, se hizo un estudio parasitológico en fresco para descartar posible parasitosis que pudiera influir en los resultados. El compuesto bioconjugado se administró como suspensión que estuvo

compuesta por una mezcla de 900 μL de SSI y 100 μL de etanol absoluto, El etanol sirvió como co-solvente para que haya una correcta mezcla del compuesto (1 mg). La homogenización de la muestra se realizó en el vórtex durante un minuto, para posteriormente realizar la administración por vía intraperitoneal (Ip) a una dosis de 1 mg/Kg del modelo biológico.

Esquema del procedimiento usado en el ensayo *in vivo*:

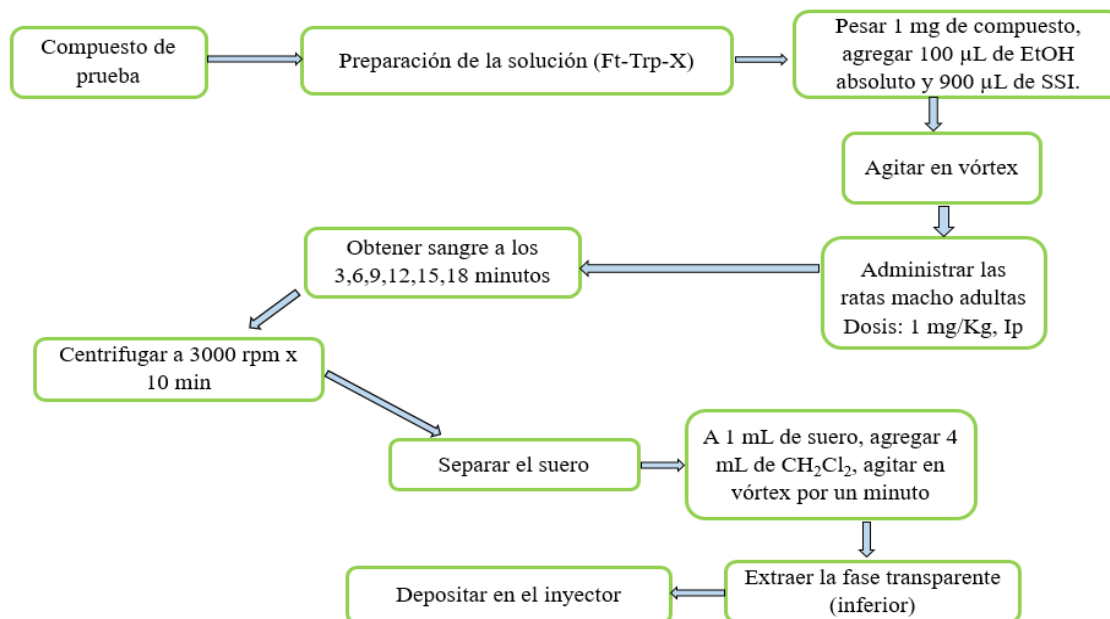


Figura 14. Diagrama de trabajo usado con los compuestos esteroideos en el ensayo *in vivo* en ratas.

La muestra sanguínea se obtiene por medio de punción cardiaca tratando de extraer mínimo 6 mL de sangre por rata, esto realizándolo por triplicado en cada tiempo marcado en los minutos (3,6,9,12,15,18), posteriormente, después de seguir el procedimiento de la separación del suero y la adición de un solvente de características compatibles con el compuesto esteroideo como lo es el CH_2Cl_2 para que se tuviera una correcta mezcla y se pudiera administrar al equipo del HPLC-UV/Vis, una vez depositada la muestra en el inyector y a la hora de obtener los cromatogramas con los datos que arroja el software, se requiere hacer un análisis estadístico de los datos para analizarlos apropiadamente y crear una gráfica donde muestre el comportamiento obtenido a los diferentes tiempos de obtención de las muestras. Finalmente se debe validar el método analítico siguiendo la serie de criterios planteados previamente.

7. Resultados y Discusión

7.1 Ensayo *in silico*: SwissTarget Prediction

Se obtuvieron los siguientes gráficos donde se predijeron las dianas de interés biológico de cada compuesto por medio de la plataforma de SwissTarget Prediction. Con estos datos se puede tratar la probable interacción de los bioconjugados esteroidales con las proteínas diana considerando el mayor porcentaje de probabilidad.

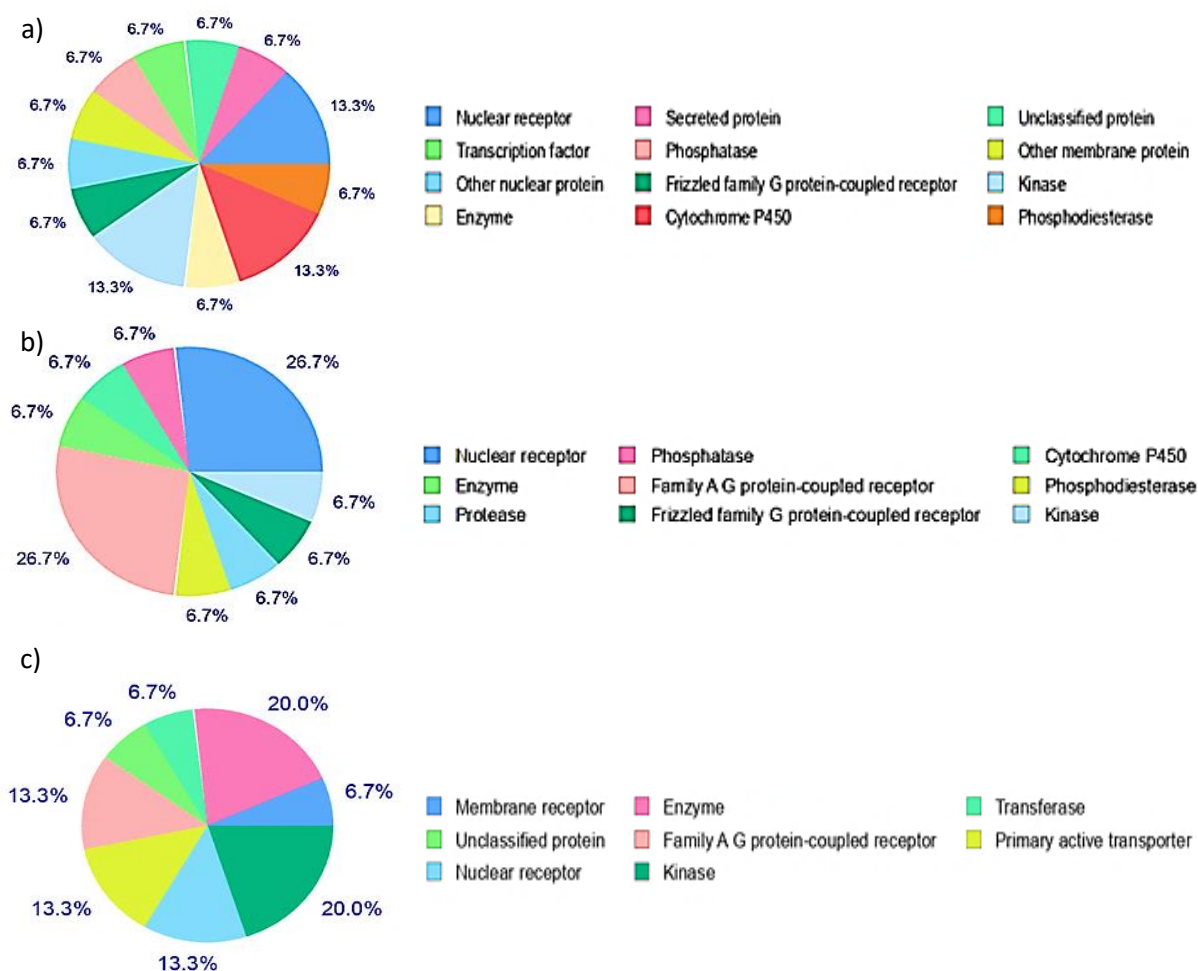


Figura 15. Probabilidades de interacción con las dianas biológicas para a) Diosgenina, b) Hecogenina y c) Solasodina.

En la figura 15 se muestran las posibles dianas biológicas con su probabilidad de interacción según la plataforma de SwissTargetPrediction. Se puede ver que los mayores datos colectados para cada espirostanos de **Dg**, **Hg** y **Slg** fueron similares. Las proteínas de interacción fueron cinasas, el receptor nuclear y citocromos de la familia p450. Para observar la potencial interacción con otras proteínas o la disminución de la interacción con los bioconjugados, se realizó nuevamente el análisis por STP. Los resultados se muestran en la figura 16.

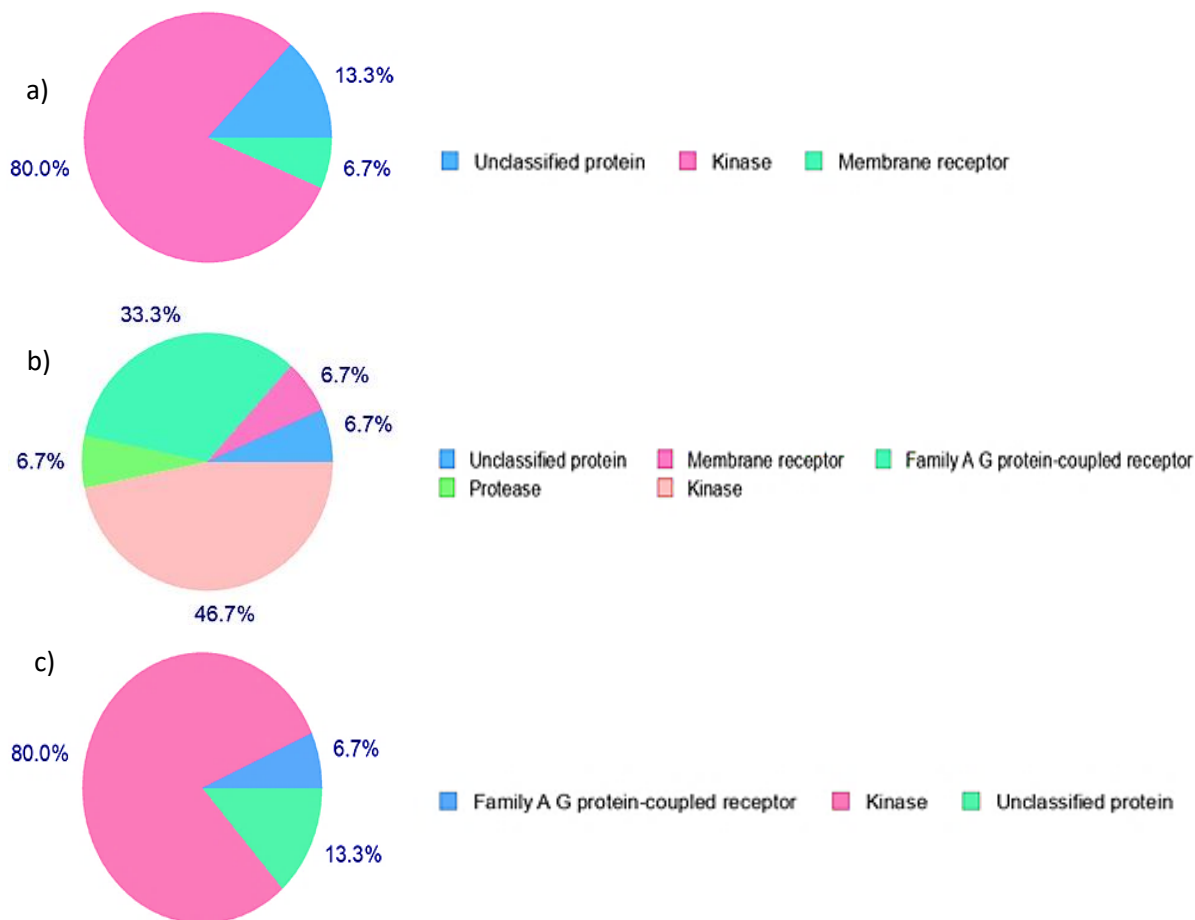


Figura 16. Probabilidades de interacción entre las dianas biológicas y los bioconjugados esteroidales a) Ft-Trp-Dg. b) Ft-Trp-Hg y c) Ft-Trp-Slg.

De acuerdo con la adición estructural en el compuesto esteroideal, se hizo evidente la posible interacción con cinasas, con receptores acoplados a proteína A y G y a receptores de la membrana celular. Estos resultados confirman lo reportado previamente (Shalayel et al., 2023; Liagre et al., 2005).

Para analizar las interacciones entre los bioconjugados y sus proteínas diana, se construyó el diagrama de frecuencia acumulada, el cual representa de manera gráfica las proteínas que tienen mayor interacción haciendo una relación de los 3 compuestos derivados esteroidales, así como los 3 bioconjugados ftalamidil triptófanatos esteroidales que se estudian en este trabajo.

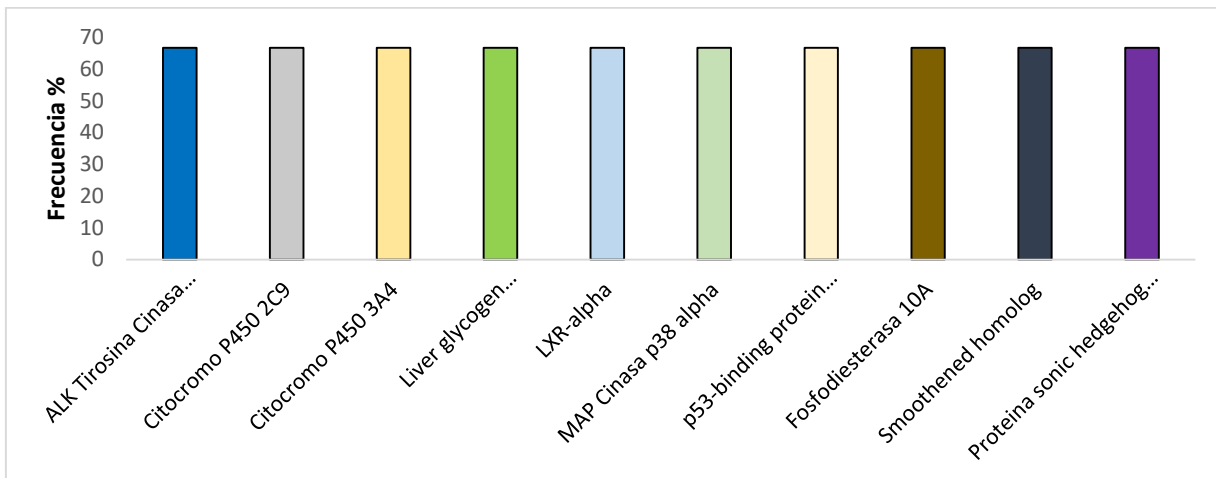


Figura 17. Diagrama de frecuencia acumulada de los compuestos esteroidales puros con las dianas moleculares identificadas por SwissTargetPrediction

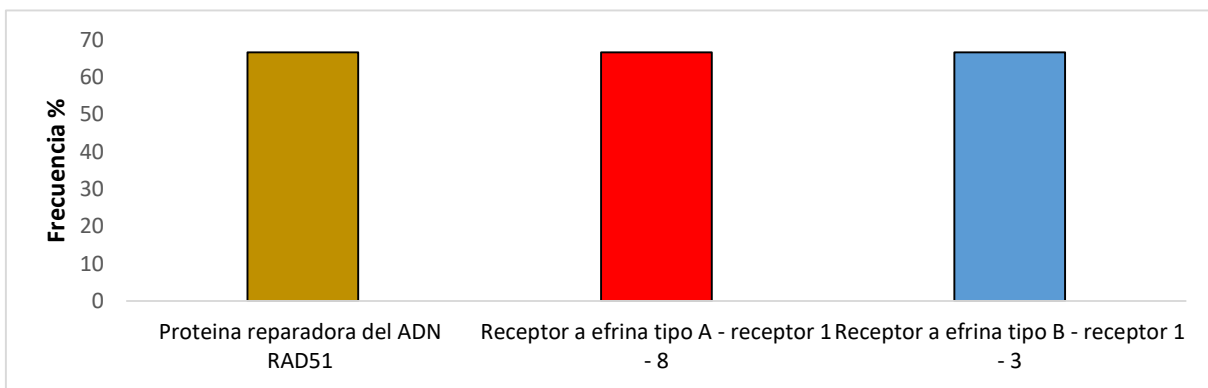


Figure 18. Diagrama de frecuencia acumulada de los bioconjugados esteroidales con las dianas moleculares identificadas por SwissTargetPrediction

Primero se realizaron los diagramas de frecuencia acumulada de los compuestos esteroidales puros y posteriormente de los bioconjugados, para observar de manera bioinformática las posibles interacciones con mayor frecuencia en modo de porcentaje hacia proteínas específicas.

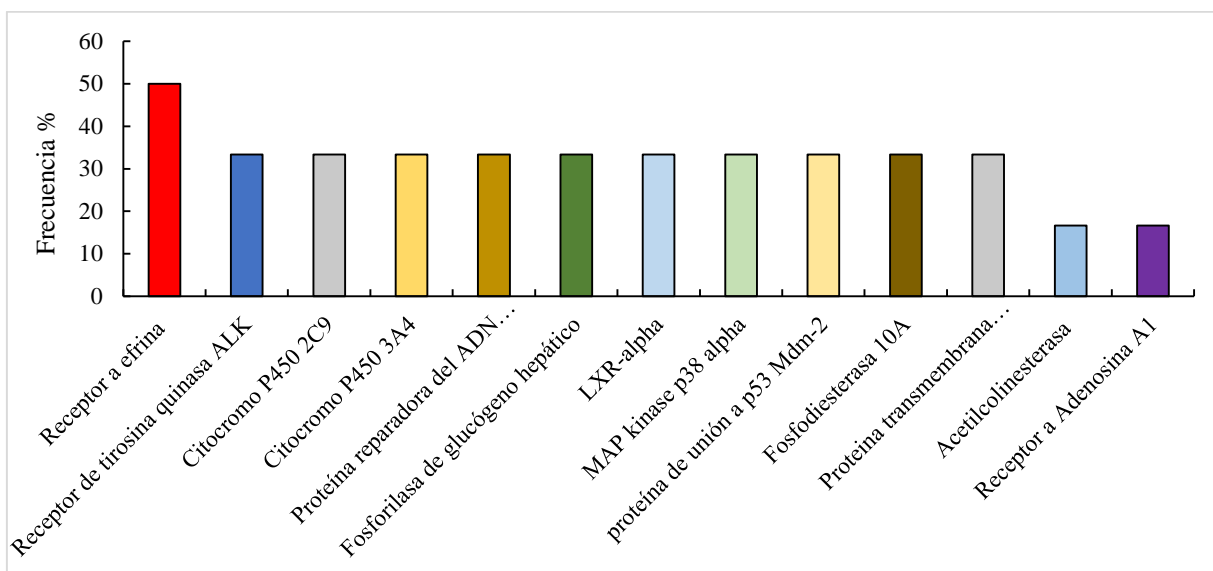


Figura 19. Diagrama de frecuencia acumulada de los compuestos esteroidales con las dianas moleculares identificadas por SwissTargetPrediction.

Posteriormente, haciendo un análisis de los resultados obtenidos, mezclando compuestos esteroidales puros y bioconjugados esteroidales, de acuerdo con el diagrama de la figura 19, se puede observar que la probabilidad de interacción con múltiples dianas biológicas, específicamente, para el receptor a efrinas fue del 50 % (receptores Eph). Mientras que, para el receptor a tirosina, proteínas de la familia del citocromo p450, proteína reparadora del ADN, la fosforilasa de glucógeno hepático y una cinasa fue cercana al 30 %.

Estos datos sugieren los potenciales efectos que tendrían nuestros nuevos compuestos esteroidales y con ello poder identificar el posible uso en posteriores proyectos. Para seguir con el trabajo, decidimos realizar la síntesis de los bioconjugados esteroidales planteados anteriormente y caracterizarlos químicamente para confirmar su pureza.

7.2 Síntesis y caracterización química de los bioconjugados

Se requirió una síntesis principal, ya sea con Diosgenina (**Dg**), Hecogenina (**Hg**) o Solasodina (**Slg**), dado que los 3 se ocuparían como materia prima para realizar la síntesis del nuevo compuesto con cualidades diferentes por su estructura química. Para esto se realizó una esterificación por Steglich (Figura 20). Esta esterificación se realiza utilizando los grupos de unión del ácido carboxílico con un grupo alcohol, para lo cual se utilizó la reacción diciclohexilcarbodiimida (DCC) como reactivo de acoplamiento y 4-dimetilaminopiridina (DMAP) como catalizador. En esta fase del proceso se obtenía el nuevo producto con su unión al grupo aminoácido y el grupo protector. En cuanto a los agentes protectores, los

más utilizados son el anhídrido acético o anhídrido trifluoroacético, o el anhídrido ftálico, el cual se utilizó en este trabajo para que no hubiera posibles interacciones por ser una zona de alta reactividad en el grupo amino del aminoácido, ya que por su naturaleza química es fácil que se formen enlaces peptídicos, donde se hace la unión del compuesto esterooidal con el grupo de un aminoácido (Triptófano) el cual tiene características importantes que le darán a la nueva estructura, así como el grupo protector (Ftalamidato).

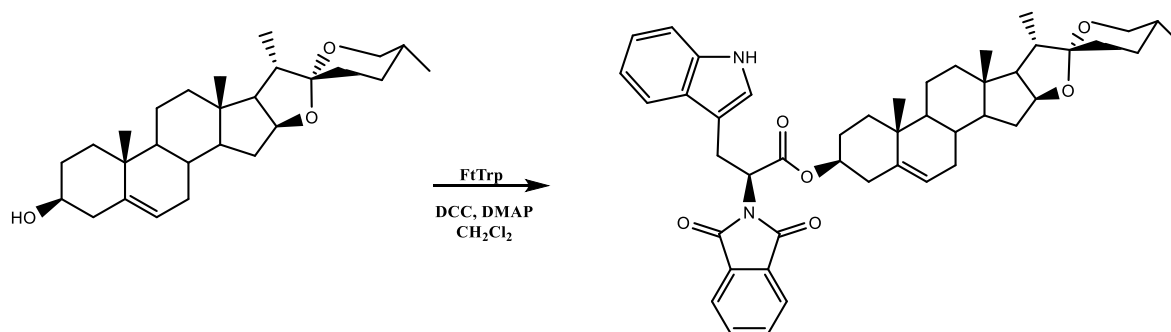


Figura 20. Esquema de la reacción de esterificación de Steglich.

7.2.1 Caracterización química del Ft-Trp-Dg

En los modelos de síntesis química, es recomendable utilizar herramientas útiles para caracterizar la estructura química del nuevo. Se utilizan herramientas analíticas como la espectroscopia infrarroja y la espectroscopia de resonancia magnética nuclear. Para ello se obtuvieron espectros con un equipo RMN de 500 MHz, los cuales se realizaron para poder hacer elución de la posición de cada parte del nuevo compuesto, así como para diferenciar en qué posición se encontraban los distintos átomos que eran de interés y verificar que se haya formado el nuevo compuesto esterooidal como se predijo teóricamente. Esto lo mostramos en las figuras 21, 22, 23, 24, 25 y 26 con un modelo de ¹H, haciendo una comparación entre los espectros de los compuestos esterooidales (Dg, Hg y Slg) con los bioconjugados esterooidales (Ft-Trp-Dg, Ft-Trp-Hg, Ft-Trp-Slg) con el fin de diferenciar los cambios que se tienen al hacer la reacción de Steglich y la comparación de los átomos que siguen permaneciendo en la estructura del esteroide.

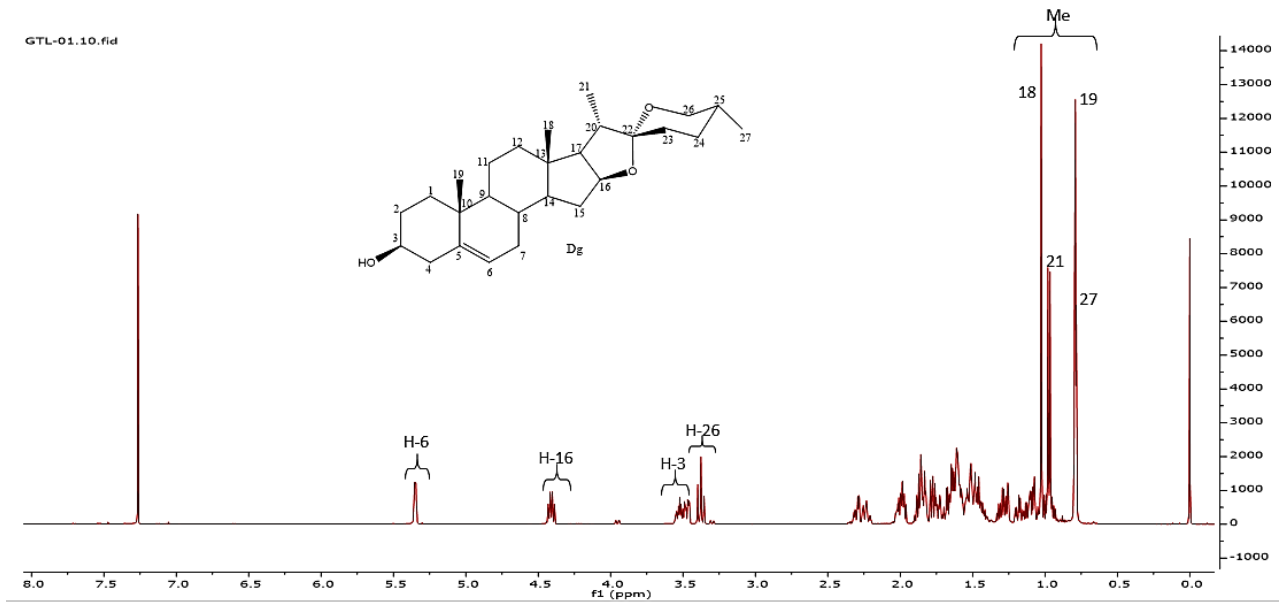


Figura 21. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de Dg. Las señales representativas se pueden observar en la región de 0.7 a 5.4 ppm, marcándose las que se identifican de mejor manera de acuerdo a su estructura química por medio de la absorción de ^1H en cada parte del compuesto, como lo es en el ^1H 3, 6, 16, 18, 19, 21, 26 y 27.

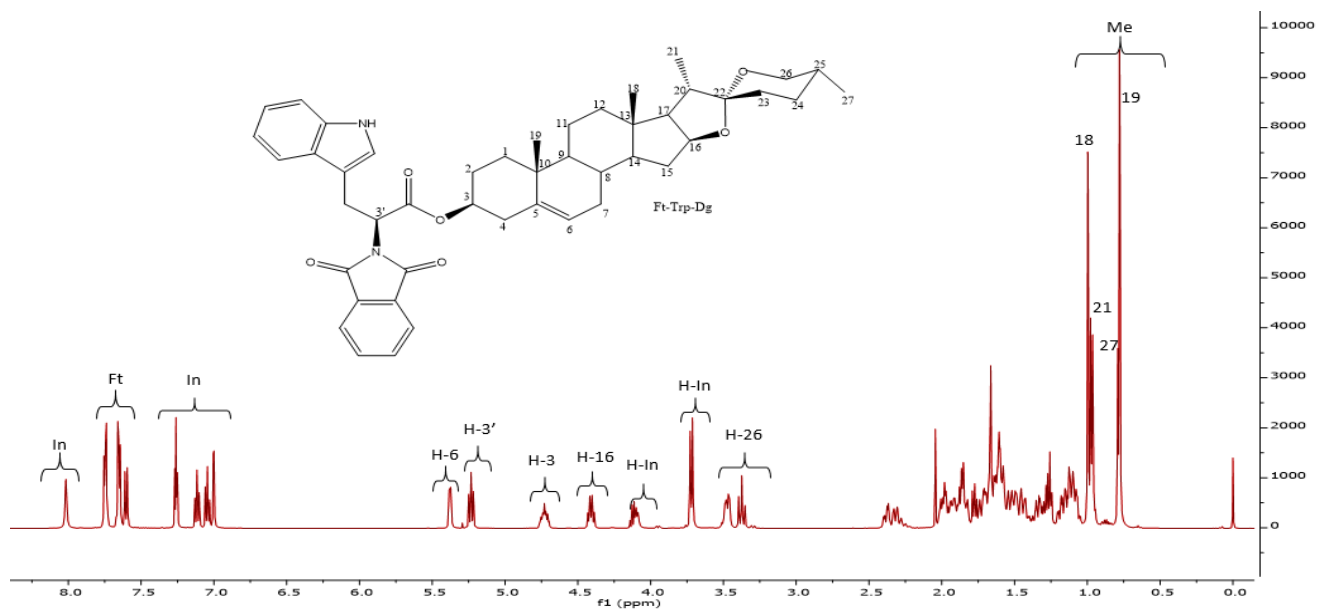


Figura 22. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz Ft-Trp-Dg. En comparación con la estructura precursora (Dg), se pueden observar las mismas señales características antes mencionados en los ^1H de interés energético, sin embargo, ya se pueden observar las nuevas señales del bioconjugado esteroidal, que aparecen en la región de 7 – 8 ppm, específicamente las del grupo indol representado con las letras (In) y del Ftalimidato representado con las letras (Ft).

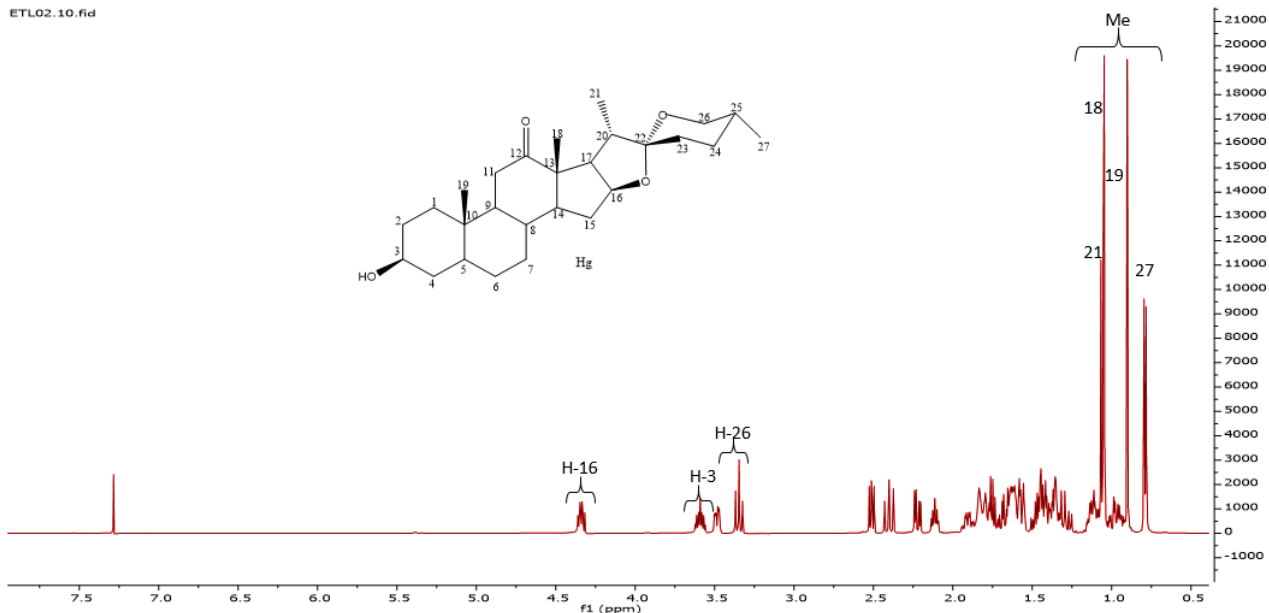


Figura 23. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de Hg. Las señales representativas se pueden observar en la región de 0.7 a 5.4 ppm, marcándose las que se identifican de mejor manera de acuerdo a su estructura química por medio de la absorción de ^1H en cada parte del compuesto, como lo es en el ^1H 3, 16, 18, 19, 21, 26 y 27, que, a diferencia de la Dg, este compuesto no cuenta con un doble enlace en la región del carbono 5 a 6, por lo cual no muestra esa señal.

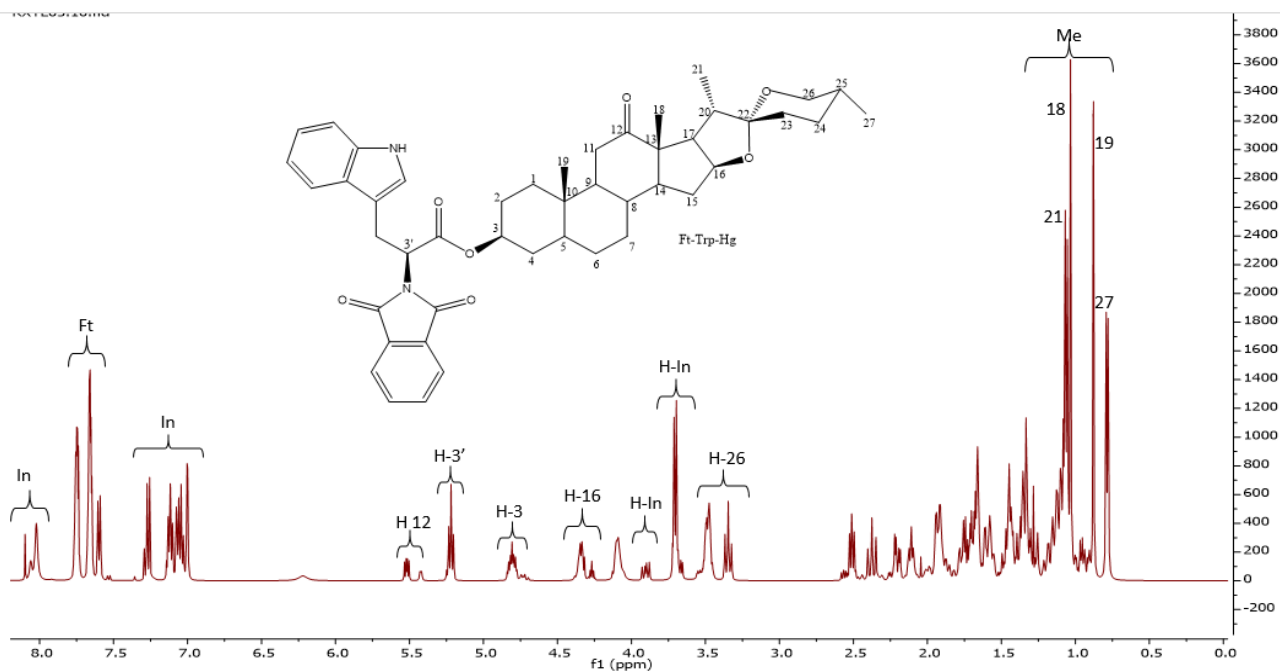


Figura 24. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz Ft-Trp-Hg. En comparación con la estructura precursora (Hg), se pueden observar las mismas señales características antes mencionados en los ^1H de interés energético, sin embargo, ya se pueden observar las nuevas señales del bioconjugado esteroidal, que aparecen en la región de 7 – 8 ppm, específicamente las del grupo indol representado con las letras (In) y del Ftalamidato representado con las letras (Ft).

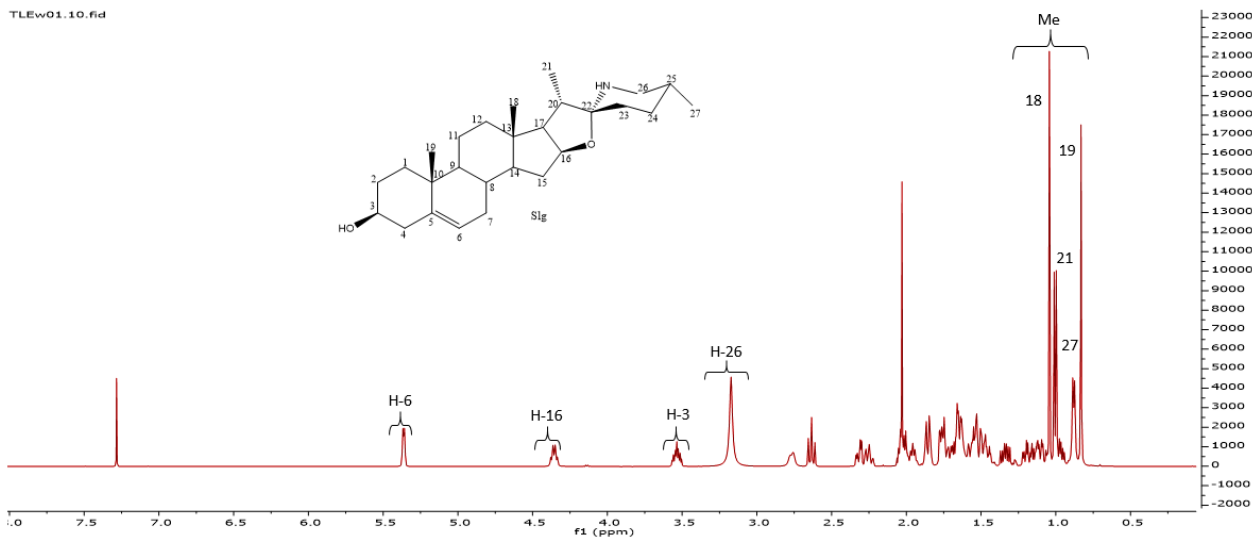


Figura 25. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz de Slg. Las señales representativas se pueden observar en la región de 0.7 a 5.4 ppm, marcándose las que se identifican de mejor manera de acuerdo a su estructura química por medio de la absorción de ^1H en cada parte del compuesto, como lo es en el ^1H 3, 6, 16, 18, 19, 21, 26 y 27.

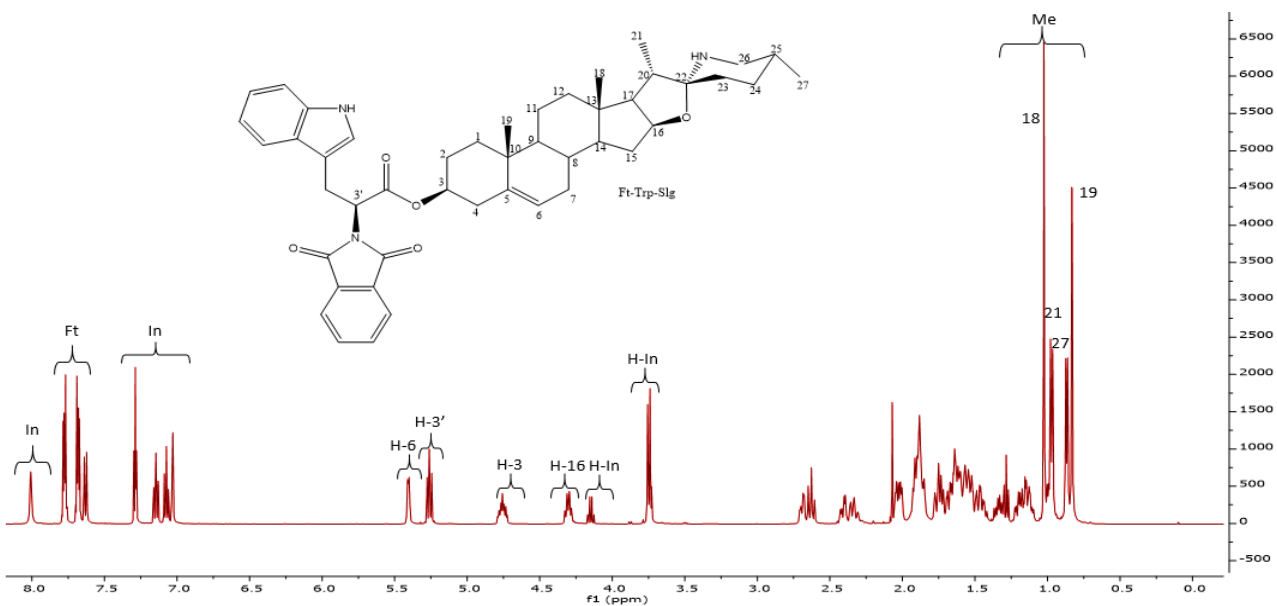


Figura 26. Espectro de RMN de ^1H a 500 MHz Ft-Trp-Slg. En comparación con la estructura precursora (Slg), se pueden observar las mismas señales características antes mencionados en los ^1H de interés energético, sin embargo, ya se pueden observar las nuevas señales del bioconjugado esteroidal, que aparecen en la región de 7 – 8 ppm, específicamente las del grupo indol representado con las letras (In) y del Ftamidato representado con las letras (Ft).

Se visualizaron las señales características de los bioconjugados esteroidales, las cuales son marcadas desde los metilos que sobresalen en la estructura del espirostano, hasta la parte de unión del grupo protector marcado como (Ft), también el grupo del aminoácido que tiene un indol en su estructura química marcado como (In).

Se comparó el compuesto esteroideal (**Dg**), (**Hg**) y (**Slg**) vs sus bioconjugados (**Ft-Trp-Dg**), (**Ft-Trp-Hg**), (**Ft-Trp-Slg**) para ver si se conservaron ciertas señales características de la estructura.

Con base en los resultados de RMN, podemos deducir la posición de diferentes partes de la estructura química de nuestros compuestos esteroidales, así como la similitud entre sí de las partes del espirostano con las partes del bioconjugado esteroideal, persistiendo las señales características de cada compuesto. Se pueden apreciar señales significativas de comparación, las cuales son los grupos metilos de los carbonos 18, 19, 21 y 27 que resaltan al inicio del espectro. También señales representativas de hidrogeno 6 en Dg y Slg por tener el doble enlace en la parte del carbono 5 – 6, excepto el de Hg, ya que no se encuentra un sistema conjugado en esa posición, y, por último, al final del espectro se encuentra la señal característica del grupo OH en 7.3 ppm cuando se encuentra sin unión del grupo protector y el grupo aminoacídico.

7.3 Detección por espectrofotometría UV/Vis vs HPLC-UV/Vis

La importancia de realizar el análisis por espectroscopia UV/Vis radica en los pocos experimentos en los que se utilizan esta herramienta. Existen pocos estudios con nuevas estructuras para detección *in vivo*, sin embargo, tienen menos costo en comparación con otras técnicas. Se utiliza esta región espectral de la luz porque podemos detectar compuestos con características específicas, como son estructuras de compuestos que contengan grupos conjugados, grupos de doble enlace y grupos aromáticos. Por esta razón, se trabajó con longitud de onda de 230 nm, ya que ahí fue donde hubo la mayor absorción de luz de los nuevos compuestos y da buena ventana de detección en un detector de HPLC-UV/Vis.

7.4 Elección del derivado esteroideal

Para elegir el compuesto derivado esteroideal, consideramos que el compuesto hubiera tenido mejor límite de detección superior (LDS) y mejor límite de detección inferior (LDI). Estos parámetros son muy importantes en los ensayos *in vivo* dado que debe considerarse la

concentración del compuesto en cómo actuará en un sistema vivo. En otras palabras, podemos decir que es la cantidad de bioconjugado disponible en circulación sistémica. El resultado dependerá de las características químicas del compuesto. Se usaron los resultados del análisis *in vitro* para guiarnos en seleccionar el biconjugado a probar en los ensayos *in vivo* y obtener los mejores resultados. Para llevar a cabo una buena selección del derivado se necesita estudiar la normalidad de los datos. En la figura 27 se muestra que de acuerdo a la prueba de Anderson Darling no hubo distribución normal de los datos en ninguno de los compuestos bioconjugados de Ft-Trp-Dg y Ft-Trp-Slg ya que no se ajustan a una distribución normal por tener un valor de p menor a 0.05. Sin embargo, el bioconjugado Ft-Trp-Hg tiene un valor de p mayor a 0.05, pero es muy poco el valor que está por encima de ese rango permitido, no existe significancia importante, por lo cual se deben de tener en cuenta más criterios para determinar la normalidad en los datos

Prueba de normalidad de Anderson-Darling			Prueba de normalidad de Anderson-Darling		
a)	A-cuadrado	0.67	b)	A-cuadrado	1.66
	Valor p	0.052		Valor p	<0.005
	Media	219.11		Media	252.89
	Desv.Est.	130.97		Desv.Est.	214.96
	Varianza	17153.59		Varianza	46206.02
	Asimetría	0.42895		Asimetría	1.15826
	Curtosis	-1.69340		Curtosis	-0.53721
	N	9		N	12
	Mínimo	74.90		Mínimo	96.80
	1er cuartil	91.20		1er cuartil	98.82
	Mediana	188.00		Mediana	157.00
	3er cuartil	379.50		3er cuartil	501.13
	Máximo	390.50		Máximo	605.00
	Intervalo de confianza de 95% para la media			Intervalo de confianza de 95% para la media	
	118.44	319.78		116.32	389.47
	Intervalo de confianza de 95% para la mediana			Intervalo de confianza de 95% para la mediana	
	88.59	379.77		98.86	496.04
	Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar			Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar	
	88.47	250.91		152.27	364.97

c) Prueba de normalidad de Anderson-Darling	
A-cuadrado	0.80
Valor p	0.026
Media	324.32
Desv.Est.	179.04
Varianza	32054.14
Asimetría	-0.27186
Curtosis	-1.80399
N	12
Mínimo	56.00
1er cuartil	158.90
Mediana	343.95
3er cuartil	499.72
Máximo	510.90
Intervalo de confianza de 95% para la media	
210.57	438.08
Intervalo de confianza de 95% para la mediana	
160.05	499.30
Intervalo de confianza de 95% para la desviación estándar	
126.83	303.98

Figura 27. Tablas de análisis estadístico de los bioconjugados esteroidales con el modelo de normalidad de Anderson-Darling para los bioconjugados esteroidales a) Ft-Trp-Dg, b) Ft-Trp-Hg y c) Ft-Trp-Slg.

Con base en los resultados anteriores, se deben usar métodos estadísticos no paramétricos. Dado el número de concentraciones obtenidas, el más adecuado es la prueba de Kuskal-Wallis, como se muestra en las figuras 28, 29 y 30, haciendo énfasis al comportamiento de cada compuesto.

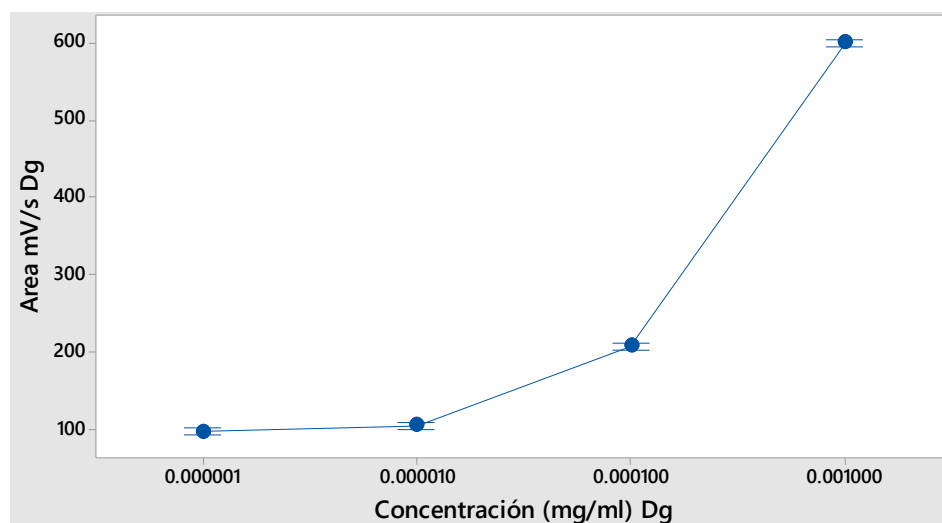


Figura 28. Prueba de Kuskal-Wallis para el compuesto Ft-Trp-Dg.

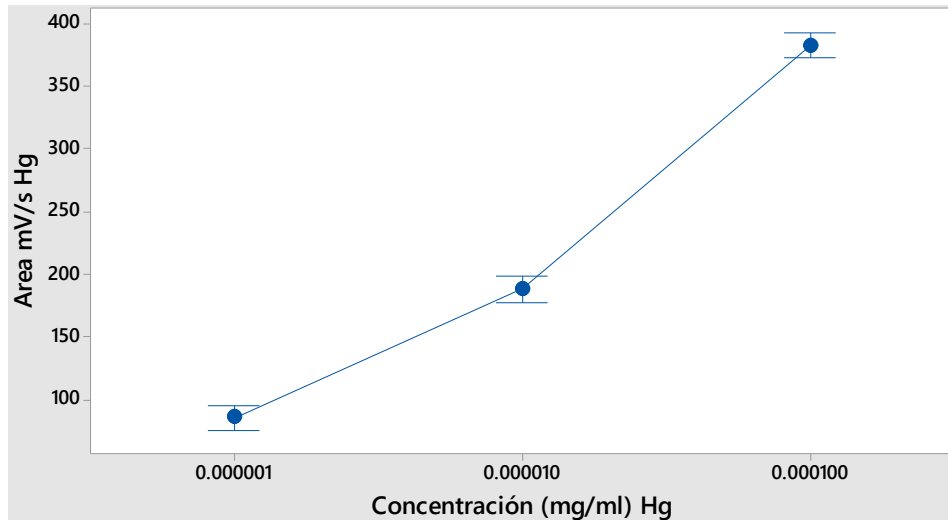


Figura 29. Prueba de Kuskal-Wallis para el compuesto Ft-Trp-Hg.

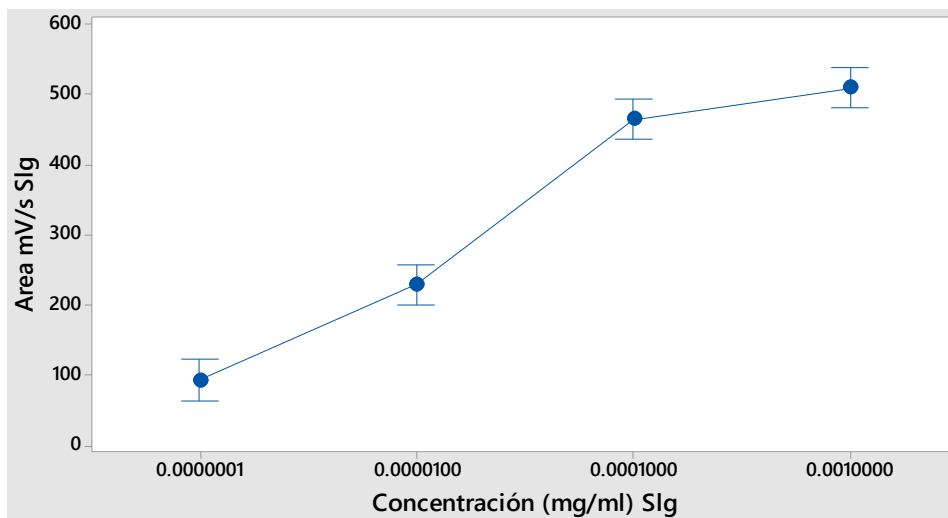


Figura 30. Prueba de Kuskal-Wallis para el compuesto Ft-Trp-Slg.

En el compuesto de Ft-Trp-Dg al haber mayor rango de detección en el área de mV/s hay mayor exactitud de los datos, se puede visualizar de igual manera, el comportamiento que se tiene por parte de la concentración de Ft-Trp-Dg, ya que existe valor mínimo de 0.000001, el cual fue detectado en el equipo, y un valor máximo de 0.001 el indica que hubo buena detección de sus límites. En el caso del análisis de Ft-Trp-Hg no mostró las características mencionadas, ya que tiene menor rango de mV/s y menor concentración obtenida por el equipo. En contraste, con el compuesto Ft-Trp-Slg hubo un resultado inesperado, ya que tuvo una tendencia parecida a Ft-Trp-Dg, pero la diferencia es que en la herramienta de minitab,

nos da por autocorrección, la eliminación de uno de los datos obtenidos, lo cual hace que nos indique ese comportamiento, por lo cual, a manera de elección, el compuesto con mejor comportamiento estadístico es el Ft-Trp-Dg.

En seguimiento de observar el compuesto con los mejores rendimientos por sus límites de detección, se muestra en la figura 31, existe el pico más grande y esto es influenciado por la mayor concentración detectada en el equipo de HPLC UV/Vis, mostrando la $C_{m\acute{a}x}$ de cada compuesto que en Ft-Trp-Dg mg/mL fue a 0.001 mg/mL, en Ft-Trp-Hg a 0.0001 mg/mL y en Ft-Trp-Slg a 0.001 mg/mL.

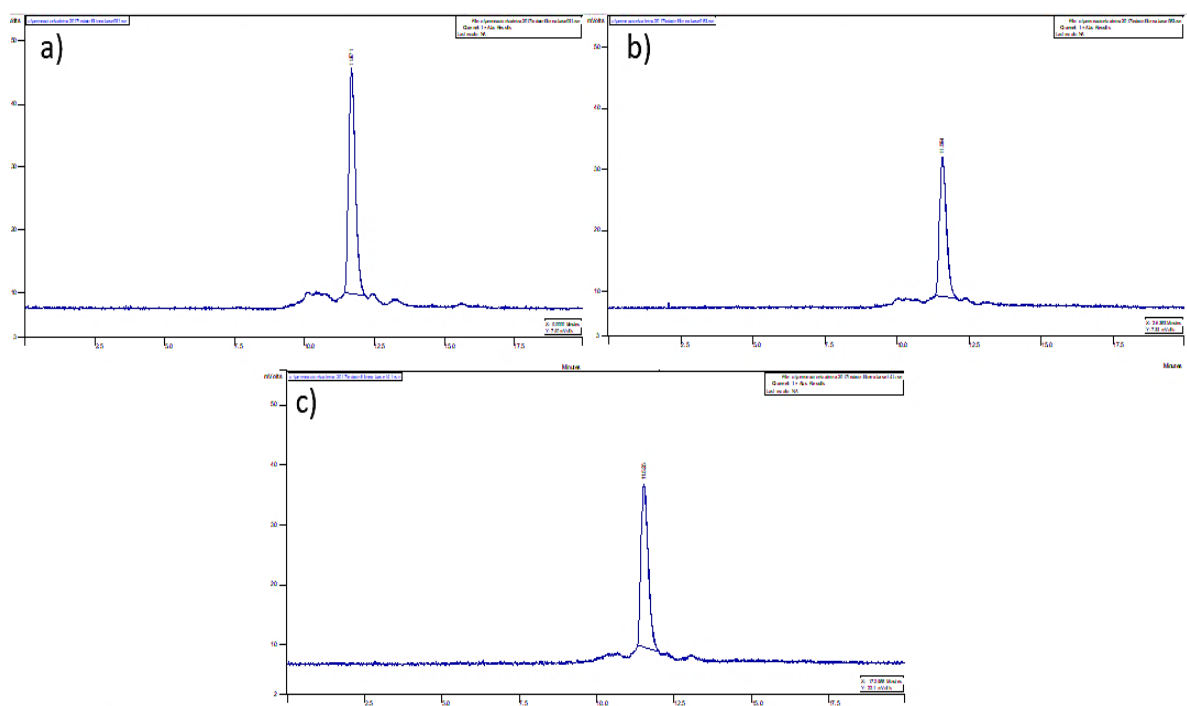


Figura 31. Detección máxima de los compuestos esteroidales conjugados. a) Ft-Trp-Dg, b) Ft-Trp-Hg, c) Ft-Trp-Slg. LDS de cada bioconjugado esteroidal identificados por medio de sucesivas diluciones donde los compuestos no sufrían saturación con la columna cromatografica, identificados para uso del posterior análisis estadístico.

Cuando hay saturación de la columna cromatográfica se deformará el registro y aparecerán distintas señales en el cromatograma, y su detección es incalculable por nuestro programa. Por esta razón se hicieron diluciones del compuesto para que no hubiera saturación de la columna cromatográfica. En la figura 32 se observa la máxima detección permitida del equipo, la cual fue en el compuesto Ft-Trp-Dg de 0.01 mg/mL, en Ft-Trp-Hg de 0.001 mg/mL y en Ft-Trp-Slg 0.01 mg/mL.

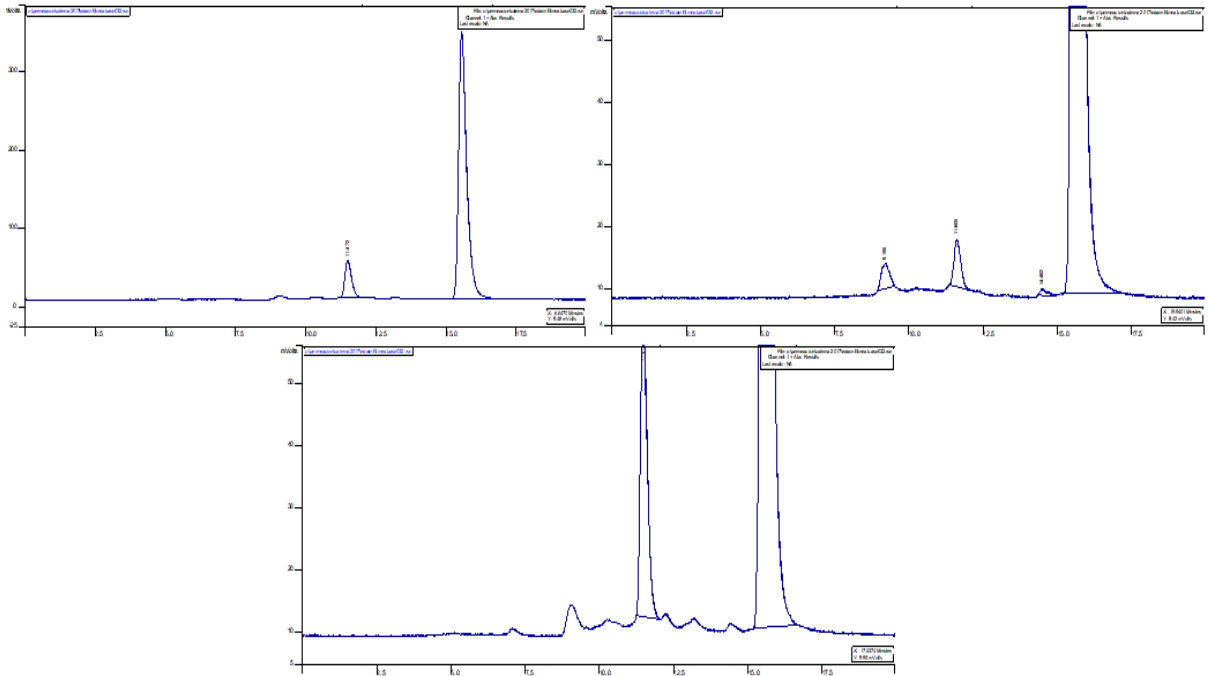


Figura 32. Cromatogramas con deformaciones por pasar el LDS de los 3 bioconjugados esteroidales. Cuando un compuesto llega a saturar la columna cromatografica, tiende a mostrar varias señales donde se dispersa el compuesto administrado al equipo de HPLC UV/Vis.

Considerando los resultados previos se eligió el compuesto Ft-Trp-Dg para realizar el ensayo *in vivo* en las ratas.

Los límites de detección inferiores se pueden observar en la figura 33 y en base a estos resultados, se midió la concentración mínima que pudo ser detectada por el equipo de HPLC-UV/Vis, los cuales fueron representados en base a datos por el modelo estadístico de análisis antes mencionado.

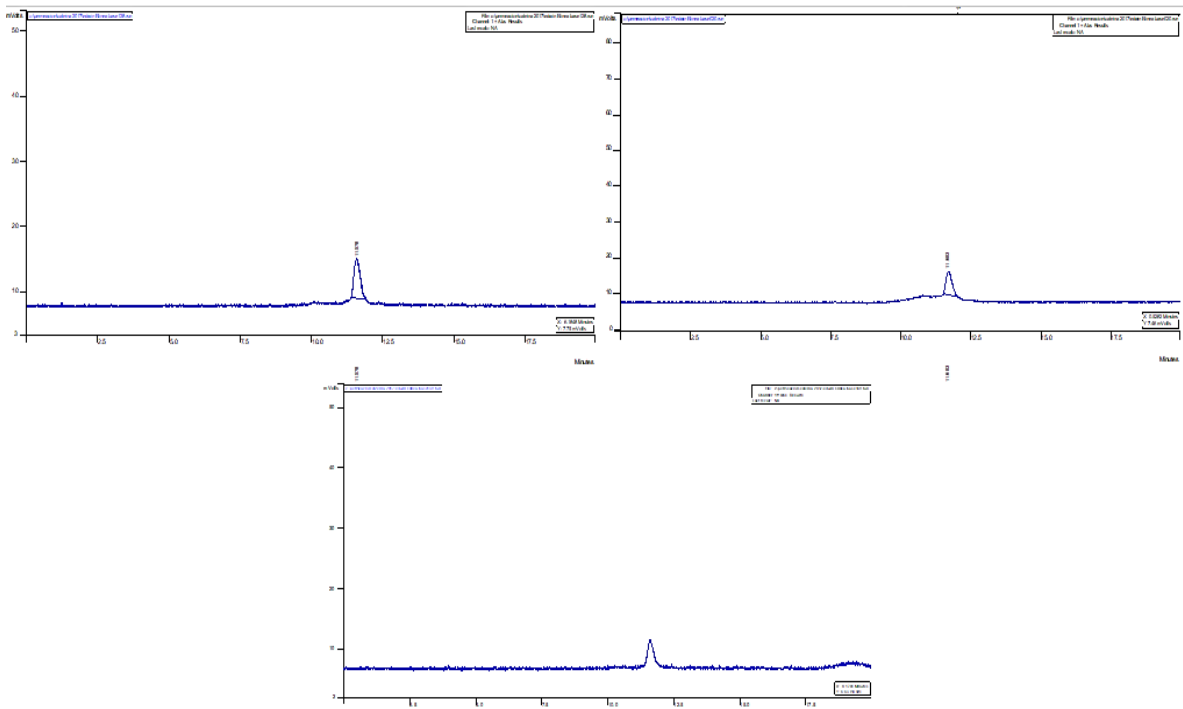


Figura 33. Cromatogramas con detección de los LDI de los 3 bioconjugados esteroidales. LDI de cada bioconjugado esterooidal por medio de sucesivas diluciones (estas señales mostradas fueron las mínimas detectables por parte del equipo de HPLC UV/Vis) para tener datos relevantes con lo cual se plantea hacer una comparación de cual compuesto tuvo mejor LDI de acuerdo a los datos recolectados, para su posterior análisis estadístico.

7.5 Modelo biológico

El modelo *in vivo* permite conocer la concentración del bioconjugado en los líquidos corporales de un sistema vivo. También la permanencia en él y las respuestas farmacológicas. Utilizamos ratas Wistar machos adultos jóvenes de 250-350 g de peso. Administramos 1.0 mg/Kg por vía intraperitoneal. Esperamos obtener el valor de $C_{m\acute{a}x}$ en un intervalo t de 10-15 minutos considerando lo reportado en la literatura para otros compuestos esteroides de estructura química similar (Suarez et al., 2018).

7.5.1 Resultados obtenidos en el ensayo *in vivo*

El ensayo fue por triplicado y los resultados se presentan como promedio y desviación estándar.

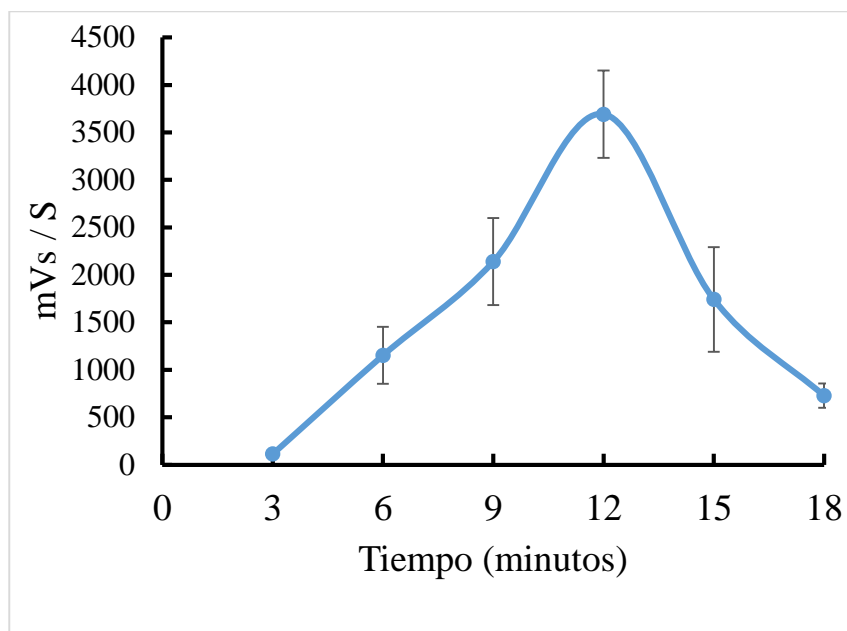


Figura 34. Grafica mVs/S vs tiempo. Compuesto Ft-Trp-Dg evaluado en el suero de ratas Wistar. La C_{máx} se obtuvo a los 12 minutos.

Con el ensayo *in vivo* realizado en las ratas obtuvimos que el valor de C_{máx} ocurrió a los 12 minutos. Estos resultados sugieren la velocidad de ingreso del compuesto al sistema y la eliminación. Adicionalmente, están presentes el proceso de distribución y de redistribución a los tejidos periféricos. Desde luego, se requieren más estudios para precisar estos fenómenos cinéticos.

7.6 Validación del método analítico

Linealidad: se realizaron mediciones por triplicado de los bioconjugados esteroidales Ft-Trp-Dg, Ft-Trp-Hg y Ft-Trp-Slg.

Selectividad: las señales de elución de estas fueron representativas, teniendo un tiempo de retención 11.5 minutos en base al tiempo en el que salía cada compuesto en nuestros cromatogramas en el ensayo *in vitro* y nuestras señales fueron medibles.

Precisión: hubo alto grado de precisión al realizar diluciones de nuestros compuestos, verificando que el tiempo de elución no fuera diferente entre ellos. Hubo concordancia entre los mismos de manera aceptable.

Repetitividad: los ensayos pudieron ser repetitivos, no influyo el día, el tiempo o los reactivos utilizados.

Exactitud y error sistemático: con el ensayo *in vivo* pudimos verificar la exactitud de nuestros tR de cada compuesto, analizando y validando que otras señales pudieron ser medibles en nuestros cromatogramas, verificando que no hubiera interferencias.

Sensibilidad: se obtuvieron los límites de detección superior e inferior en el ensayo *in vitro*, obteniendo buenos resultados con los 3 compuestos probados. El comportamiento por medio del análisis estadístico que tuvo un rendimiento más adecuado al comparar los resultados de los 3 bioconjugados esteroidales de acuerdo a su LDS, LDI, análisis de normalidad de los datos, fue para el compuesto Ft-Trp-Dg.

Robustez: se hicieron ensayos que permitieron trabajar la robustez, sin embargo, se necesitan más para poder determinar una robustez valida que implica el uso de otros equipos de HPLC, como el HPLC acoplado a masas, o de fluorescencia.

Con base en los resultados anteriores, este método de detección y cuantificación por HPLC-UV/Vis es confiable y reproducible.

8. Conclusiones

1. Se validó el método analítico HPLC-UV/Vis para cuantificar compuestos bioconjugados ftalamidil-triptofanatos esteroidales.
2. El tiempo de retención de los compuestos ftalamidil-triptofanatos esteroidales fue de 11.5 minutos en modelo *in vitro* e *in vivo* por HPLC-UV/Vis.
3. La cuantificación de los compuestos ftalamidil-triptofanatos esteroidales se realizó eficientemente considerando los límites de detección inferior y superior en modelos *in vitro* e *in vivo*, obteniendo mejores rendimientos con el compuesto Ft-Trp-Dg.
4. Se determinó que no había normalidad en los resultados, por lo que se utilizó un modelo estadístico para datos no paramétricos para saber el comportamiento de los datos y referenciar cual compuesto era útil para en el ensayo *in vivo*.
5. El compuesto Ft-Trp-Dg fue el que tuvo mejor comportamiento, por lo que fue usado en el modelo biológico de rata.
6. La evaluación en la rata Wistar mostró que el compuesto administrado por vía intraperitoneal puede cuantificarse en suero obteniendo un pico de concentración máxima a los 12 minutos.
7. Este estudio puede escalarse a más parámetros farmacocinéticos como la velocidad de absorción, velocidad de distribución, velocidad de redistribución y velocidad de eliminación, mismos que son de interés en los ensayos preclínicos para caracterizar nuevas moléculas.

9. Referencias

1. Abelaira S, Quattrocchi OA, Laba RF. Introducción a la HPLC, Aplicación y Practica. Cap 10 Análisis Cuantitativo. 1992. https://www.researchgate.net/publication/315771927_Introduccion_a_la_HPLC_Aplicacion_y_Practica.
2. Arora P, Nainwal LM, Gupta G, Singh SK, Chellappan DK, Oliver BG, Dua K. Orally administered solasodine, a steroidal glycoalkaloid, suppresses ovalbumin-induced exaggerated Th2-immune response in rat model of bronchial asthma. *Chem Biol Interact* 2022;366:110138. doi: 10.1016/j.cbi.2022.110138.
3. Arumuganainar D, Yadalamb PK, Alzahranic KJ, Alsharife KF, Alzahrani FM, Alshammeri S, Ahmed Jeque SSJ, Vinothkumar TS, Baeshenh HA, Patil S. Inhibitory effect of lupeol, quercetin, and solasodine on *Rhizopus oryzae*: A molecular docking and dynamic simulation study. *J Infect Public Health*. 2023 doi: 10.1016/j.jiph.2022.12.006.
4. Bangrong C, Liao, Lee K, Ban JS, Yang HS, Chun C. Diseño, síntesis de conjugados de metotrexato-diosgenina y evaluación biológica de su efecto sobre células resistentes al transporte de metotrexato. *Epub Steroids*. 2016; 116: 45-51. doi: 10.1016/j.esteroides.2016.10.006.
5. Bansal R, et al poner todos los autores. Una revisión exhaustiva sobre los bioconjugados de esteroides como pistas prometedoras en el descubrimiento de fármacos. *ACS Bio Med Chem Au*. 2022. PMID: 37102169.
6. Borges MADH, Passos FRS, Quintans JSS, Azeredo FJ. Hecogenin and its derivatives: A pharmacology review. *Biomed Pharmacother*. 2023;159:114251. doi: 10.1016/j.biopha.2023.114251.
7. Chauhan K, Shet N, Ranpariya V, Parmar S. Anticonvulsant activity of solasodine isolated from *Solanum sisymbriifolium* fruits in rodents. *Pharm Biol*; 2011;49(2):194-9. doi: 10.3109/13880209.2010.508499.
8. Chowański S, Winkiel M, Szymczak-Cendlak M, Marciniak P, Mańczak D, Walkowiak-Nowicka K, Spochacz M, Bufo SA, Scrano L, Adamski Z. Solanaceae glycoalkaloids: α -solanine and α -chaconine modify the cardioinhibitory activity of

- verapamil. Pharm Biol. 2022;60(1):1317-1330. doi: 10.1080/13880209.2022.2094966.
9. De Costa F., Yendo ACA, Fleck JD, Gosmann G., Fett-Neto AG. La acumulación de una fracción de saponina triterpénica bioactiva de las hojas de Quillaja brasiliensis se asocia con estrés abiótico y biótico. *Fisiol Vegetal. Bioquímica* 2013; 66 :56–62. doi: 10.1016/j.plaphy.2013.02.003.
 10. Duffau B, Rojas F, Guerrero I, Roa L, Rodríguez L, Soto M, Aguilera M, Sandoval S. Validación de métodos y determinación de la incertidumbre de la medición: Aspectos generales sobre la validación de métodos. Instituto de Salud Pública. Guía técnica No. 1. 2010. Recuperado de: https://www.ispch.cl/sites/default/files/documento_tecnico/2010/12/Guia%20T%C3%A9cnica%201%20validaci%C3%B3n%20de%20M%C3%A9todos%20y%20determinaci%C3%B3n%20de%20la%20incertidumbre%20de%20la%20medici%C3%B3n_1.pdf
 11. Fan Y, Li Z , Wu L, Lin F, Shao J, Ma X, Yao, Zhuang W, Wang Y. Solasodine, isolated from *Solanum sisymbriifolium* fruits, has a potent anti-tumor activity against pancreatic cancer. *Drug Desing, Development and Therapy*. 2021: S266746. Doi: 10.2147/DDDT.S266746.
 12. Fuentes R, Vargas A. Estudios In Silico, simulando vida en un entorno virtual. *Gaceta Médica Boliviana*, ISSN 1012-2966, Vol. 44, N°. 2, 2021.
 13. García DeM, Adrián YM. Dolores Y. HPLC Instrumental. Editorial Universitat Politècnica de Valencia. 2016. ISBN 978-84-9048-357-2. https://gdocu.upv.es/alfresco/service/api/node/content/workspace/SpacesStore/0fc53ce9-a267-4235-85bb-31be388412c0/TOC_0360_11_01.pdf?guest=true.
 14. Gary DC. Química Analítica. Sexta edición. McGRAW-HILL/INTERAMERICANA EDITORES, S. A. DE C. V. 2009. Página 604-635. ISBN: 0-471-21472-8.
 15. Hameedat F, Hawamdeh S, Alnabulsi S, Zayed A. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detección de fluorescencia para la cuantificación de esteroides en muestras clínicas, farmacéuticas y ambientales: una revisión. *Moléculas*. 2022; 27 (6): 1807. doi: 10.3390/moléculas27061807.

16. Junchao Y, Zhen W, Yuan W, Liying X, Libin J, Yuanhong Z, Wei Z, Ruilin C, Lu Z. Junchao Anti- trachea inflammatory effects of diosgenin from *Dioscorea nipponica* through interactions with glucocorticoid receptor α . *J Int Med Res.* 2017; 45(1):101-113. doi: 10.1177/0300060516676724.
17. Li Y, Tan C, Li Z, Guo J, Li S, Chen X, Wang C, Dai X, Yang H, Song W, Hou L, Xu J, Tong Z, Xu A, Yuan X, Wang W, Yang Q, Chen L, Sun Z, Wang K, Pan B, Chen J, Bao Y, Liu F, Qi X, Gang DR, Wen J, Li J. The genome of *Dioscorea zingiberensis* sheds light on the biosynthesis, origin and evolution of the medicinally important diosgenin saponins. *Hortic Res.* 2022. doi: 10.1093/hr/uhac165
18. Li Y, Yang H, Li Z, Li S, Li J. Avances en la Biosíntesis y Evolución Molecular de Saponinas Esteroidales en Plantas. *Int J Mol Sci.* 2023; 24 (3): 2620. doi: 10.3390/ijms24032620.
19. Liagre B, Bertrand J, Leger D, Beneytout J. Diosgenin, a plant steroid, induces apoptosis in COX-2 deficient K562 cells with activation of the p38 MAP kinase signalling and inhibition of NF- κ B binding. 2005
<https://doi.org/10.3892/ijmm.16.6.1095> <https://www.spandidos-publications.com/10.3892/ijmm.16.6.1095>
20. Liao AM, JungH, YuJW, Lee D, Sang-Soo P, Bangrong C, Chun C. Síntesis y evaluación biológica del conjugado de arginil-diosgenina como potencial agente de ingeniería de tejido óseo. *Chem Biol Drug Des.* 2017 revisar. doi: 10.1111/cbdd.13050.
21. Mehmood T, Hanif S, Azhar F, Ali I, Alafnan A, Hussain T, Moin A, Alamri MA, Syed MA. Validación del método HPLC para la estimación de clorhidrato de lidocaína, ketoprofeno e hidrocortisona: análisis de verbor utilizando la puntuación AGREE. *Int J Mol Sci.* 2022; 24 (1): 440. doi: 10.3390/ijms24010440.
22. Meyer V. Practical high performance liquid chromatography. Fourth edition. John Wiley & Sons, Ltd. 2004. ISBN: 0-470-09377-3 (Hardback) 0-470-09378-1 (Paperback). [https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/Veronika%20R.%20Meyer%20-%20Practical%20high-performance%20liquid%20chromatography%20\(2004,%20John%20Wiley\).pdf](https://web.vscht.cz/~schulzov/HPLC/Veronika%20R.%20Meyer%20-%20Practical%20high-performance%20liquid%20chromatography%20(2004,%20John%20Wiley).pdf)

23. Moisés T, Papadopoulou KK, Osbourn A. Diversidad metabólica y funcional de saponinas, productos intermedios biosintéticos y derivados semisintéticos. *crítico Rev. Bioquímica. mol. Biol.* 2014; 49 :439–462. doi: 10.3109/10409238.2014.953628.
24. Nie K, Gao Y, Chen S, Wang Z, Wang H, Tang Y, Su H, Lu F, Dong H, Fang K. Diosgenin attenuates non-alcoholic fatty liver disease in type 2 diabetes through regulating SIRT6-related fatty acid uptake. *Phytomedicin* 2023; 111:154661. doi: 10.1016/j.phymed.2023.154661.
25. Pássaro CP, Rivera CM, Roman MA, Cardona LM, Muñoz LM, Gomez DD, Quiceno JM, Rojas LC. Guía sobre principios básicos de cromatografía y sus aplicaciones. SENNOVA. Tecnoparque nodo Rionegro - Antioquia. 2016. https://repositorio.sena.edu.co/bitstream/handle/11404/4694/guia_cromatograf%EDa.pdf;jsessionid=6F1E489073F98D8A6AFEE9430D137634?sequence=1
26. Özdemir Z, Rybková M, Vlk M, Šaman D, Rárová L, Wimmer Z. Síntesis y efectos farmacológicos de los conjugados de diosgenina -ácido betulínico. *Moléculas.* 2020; 25 (15): 3546. doi: 10.3390/moléculas25153546.
27. Salunkhe R, Gadgoli C, Naik A, Patil N. Perfil farmacocinético y biodisponibilidad oral de diosgenina, charantina e hidroxicalcona a partir de una formulación polihierbal. *Frente Farmacéutico.* 29 de abril de 2021; 12: 629272. doi: 10.3389/ffhar.2021.629272.
28. Santos Cerqueira G, dos Santos e Silva G, Rios Vasconcelos E, Fragoso de Freitas AP, Arcanjo Moura B, Silveira Macedo D, Lopezs Souto A, Barbosa Filho JM, de Almeida Leal LK, de Castro Brito GA, Souccar C, de Barros Viana GS. Effects of hecogenin and its possible mechanism of action on experimental models of gastric ulcer in mice. *Eur J Pharmacol.* 2012. doi: 10.1016/j.ejphar.2012.02.043
29. Semwal P, Painuli S, Abu-Izneid T, Rauf A, Sharma A, Daştan SD, Kumar M, Alshehri MM, Taheri Y, Das R, Mitra S, Emran TB, Sharifi-Rad J, Calina D, Cho WC. Diosgenin: an updated pharmacological review and therapeutic perspectives. *Oxid Med Cell Longev.* 2022:1035441. doi: 10.1155/2022/1035441.
30. Shalayel M, Al-Mazaideh G, Alanezi A, Almuqati A, Alotibi M, Diosgenina y monohidroxiestirostanol de semillas de *Prunus amygdalus* var *amara* como

- supresores potenciales de tirosina quinasas EGFR y HER2: un enfoque computacional. *Productos farmacéuticos* 2023, 16 (5), 704; <https://doi.org/10.3390/ph16050704> <https://www.mdpi.com/1424-8247/16/5/704>
31. Suarez D, Morales Y. Principios básicos de la cromatografía líquida de alto rendimiento para la separación y análisis de mezclas. *Revista Semilleros: Formación Investigativa*, vol. 4, 2018. ISSN 2619-5267.
 32. SwissTargetPrediction. Swiss Institute of Bioinformatics. <http://www.swisstargetprediction.ch/predict.php>
 33. Szakiel A, Paćzkowski C. Influencia de los factores ambientales abióticos en el contenido de saponinas en las plantas. *Fitoquímica. Rev.* 2011; 10 :471–491. doi: 10.1007/s11101-010-9177-x.
 34. Veeran MG, CK, BB, Painuly D, Aprem AS. Validación del método RP- HPLC para la extracción y cuantificación rápidas del fármaco Levonorgestrel a partir de un dispositivo intrauterino a base de silicona destinado a la formulación final y en proceso. *Daru.* 2021; 29 (1): 185-193. doi: 10.1007/s40199-021-00396-7.
 35. Verstuyft C, Becquemont L, Mouly S. Farmacocinética de los medicamentos. *EM – Tratado de Medicina* Volume 26, Issue 1, marzo de 2022, páginas 1-9. [https://doi.org/10.1016/S1636-5410\(22\)46044-2](https://doi.org/10.1016/S1636-5410(22)46044-2).
 36. Zhang X, Guo Z, Li J, Ito Y, Sun W. Un nuevo método de cuantificación de protodioscina por HPLC -ESI-MS/MS en plasma de rata y su aplicación al estudio farmacocinético. *esteroides* 2016; 106: 62-9. doi: 10.1016/j.esteroides.2015.12.009. Epub 2015 17 de diciembre.