

24  
60



**Universidad Nacional Autónoma de México**

Facultad de Química

**CONTRIBUCION AL ESTUDIO DE LOS  
GLUCOSIDOS DE Dioscorea mexicana**

**T E S I S**

Que para obtener el título de:

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

P r e s e n t a :

**José Guadalupe Hernández Reyna**

México, D. F.

1986



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## INDICE

1.	Introducción...	1
2.	Parte Teórica ...	6
2.1	Heterósidos ...	6
2.1.1	Propiedades Químicas ...	8
2.1.2	Hidrólisis alcalina ...	11
2.1.3	Hidrólisis Ácida ...	11
2.1.4	Acetilación ...	12
2.2.	Determinación de Estructura ...	13
2.2.1	Métodos Químicos ...	14
2.2.2	Métodos Instrumentales ...	16
2.3	Insectos Perjudiciales ...	18
2.3.1	Productos Naturales de Plantas como Control Biológico de Insectos. ...	19
3.	Parte Experimental ...	24
3.1.	Material ...	24
3.2.	Métodos ...	24
3.2.1	Desengrasado ...	24
3.2.2	Extracción ...	25
3.2.3	Separación de los componentes de la mezcla purificada . ...	25
3.2.4	Identificación de Azúcares Libres ...	26
3.2.5	Identificación de Sapogeninas Libres.. ...	27
3.2.6	Identificación de los azúcares en los Glucósidos del Extracto Purificado... ..	27

3.2.7	Identificación y aislamiento de Saponinas ...	28
3.2.8	Separación de Glucósidos ... .. .	30
3.2.8.1	Compuesto 1 ... .. .	30
3.2.8.2	Compuesto 2 ... .. .	33
3.2.8.3	Compuesto 3 ... .. .	37
3.2.8.4	Compuesto 4 ... .. .	42
3.2.8.5	Compuesto 5 ... .. .	46
3.3	Posible Efecto Insecticida del Extracto Purificado de <u>Dioscorea mexicana</u> ... .. .	49
3.3.1	Experimento con <u>Itebrio molitor</u> ... .. .	49
3.3.2	Experimento 1 con <u>Anastrepha ludens</u> ... .. .	53
3.3.3	Experimento 2 con <u>Anastrepha ludens</u> ... .. .	62
4.	Discusión de Resultados ... .. .	66
4.1	Espectros ... .. .	80
4.2	Estructuras químicas ... .. .	98
5.	Conclusiones ... .. .	102
6.	Bibliografía ... .. .	103

## 1. INTRODUCCION

La fuente de materia prima (diosgenina) para la producción de hormonas esteroidales hasta hoy ha sido el rizoma de Dioscorea composita (barbasco), sin embargo la fuente inicial de obtención de plantas americanas silvestres<sup>(1)</sup> fue la Dioscorea mexicana (cabeza de negro) cuya explotación fue desplazada por el barbasco por dar este mejores rendimientos de diosgenina. Igualmente desplazado fue el estudio posterior de la planta.

A pesar de ser el barbasco la fuente principal de diosgenina, por mucho tiempo su estudio químico solo estuvo enfocado a la parte esteroidal del glucósido, sin tomar en cuenta los azúcares por considerarlos sin valor para los fines comerciales en la producción de hormonas.

No es hasta años recientes que se llevó a cabo el estudio de las saponinas en Dioscorea composita,<sup>(2) (3) (4)</sup> estableciéndose la naturaleza de los azúcares, tipo de unión y estructura del aglucón que conforman a los glucósidos precursores de la diosgenina en esta planta.<sup>(3) (4)</sup>

El presente trabajo pretende dar los pasos iniciales en el estudio de los glucósidos aislados de Dioscorea mexicana Guillemin, tanto espiróstanicos como furostánicos, se discute también su posible actividad biológica así como su uso potencial en el control biológico de la mosca de la fruta (Anastrepha ludens).

Descripción botánica de la planta (9)

*Dioscorea mexicana* Guillemín.

Nombre común: CABEZA de NEGRO.

Distribución: Veracruz, Oaxaca, Chiapas,  
Guerrero, San Luis Potosí y  
Yucatán, toda la América Central  
hasta Panamá.

Localidad típica: cercanías de Panixthahuaca,  
Juquila, Oaxaca.

Pertenece a la familia Dioscoreaceae la cual está formada por 10 géneros y cerca de 650 especies divididas en dos tribus (Dioscoreae que son dioicas y Stenomeridae que son monoicas) distribuidas ampliamente en los trópicos, subtropicos y ligeramente en las zonas templadas del norte. El género más grande es *Dioscorea* cuyas especies se encuentran principalmente en los trópicos americanos. En la "Flora de Guatemala" se enumeran 24 especies de este género, en la "Flora de San Salvador" 10, en la "Flora de Panamá" 11, y en México tenemos 63 especies; los otros géneros que componen la familia son: *Halmia*, *Stenophora* y *Testudinaria*: la primera es americana, la segunda es asiática y la última se encuentra en Sudafrica.

Todas las especies desarrollan rizomas, los cuales le sirven a la planta como reserva de alimento, con el fin de que pueda sobrevivir en tiempos de sequía o bien en el invierno.

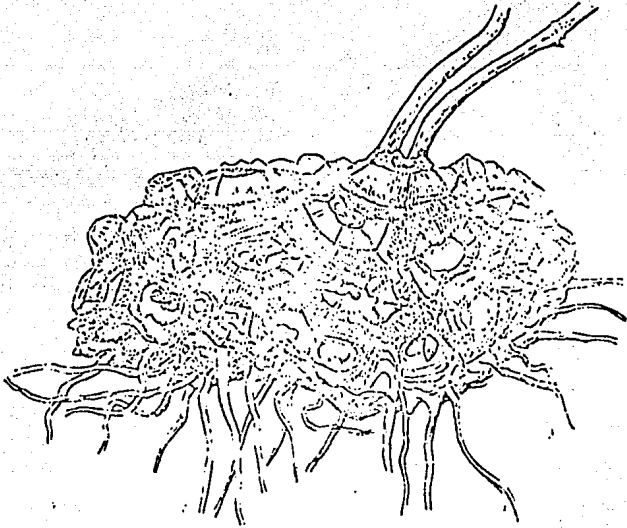
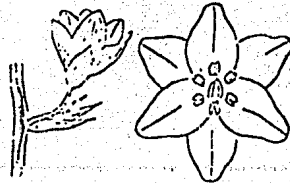
Son atractivas para los animales que cavan y comen tubérculos puesto que son fuentes ricas en almidón. Sin embargo las dioscoreas durante su evolución han adquirido características especiales que las protegen contra depredadores. Algunas han desarrollado tubérculos muy profundos, otras poseen espinas, algunas presentan sabores desagradables o bien contienen sustancias tóxicas para los animales. Los rizomas de algunas plantas del género *Dioscorea* fueron desde muy remoto tiempo conocidos como comestibles y algunos como venenosos en el viejo mundo, y en este continente; pero llamaron más la atención desde que se descubrió en 1940, con los trabajos de Marker, "1" que de los rizomas de *Dioscorea mexicana* y *Dioscorea composita* se puede obtener la materia prima para sintetizar hormonas sexuales y cortisona.

*Dioscorea mexicana* es una planta dioica, trepadora, de rizoma hemisférico tuberoso, tubérculo prismático de 15-25 cm de grosor, a veces más grande, la mitad sobresale de la tierra. Planta robusta con el tallo liso dextrorso. Las hojas alternas, largamente pecioladas, la lámina semicoriácea, anchamente ovada, truncada o profundamente cordada en la base, gradualmente acuminada y largamente apiculada en el ápice; verde brillante en la superficie superior y algo amarillento - blanquecina en la inferior, completamente glabra, con 7 - 9 nervaduras prominentes. Inflorescencia masculina simple o compuesta, de 15 - 30 cm de longitud con flores pequeñas que poseen 6 estambres fértiles, centrales, muy cortos, rodeando un rudimentario estilo cónico.

Inflorescencia femenina simple ; los periantios globosos de 1.5 - 2 mm de ancho, los segmentos siempre en dos series sesiles iguales ; con 6 estaminodios, pequeños; estigma subsésil, grueso, divergente, ahorquillado en el ápice, cápsula oblongo - oval de 2.5 cm de longitud, semilla oblonga, alada por todos lados.



Figura 1

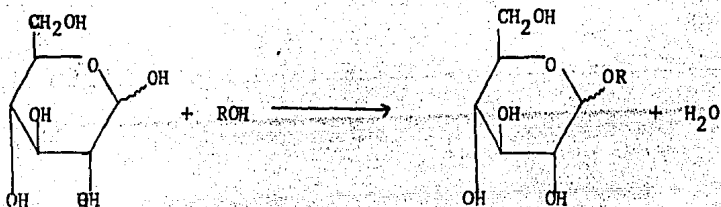
Rizoma de Dioscorea mexicana Guillemín, jovenD. mexicana Guillemín, flor  
amplificada

## 2. PARTE TEORICA.

2.1 Heterósidos - Las plantas de la familia Dioscoreaceae son caracterizadas por la presencia de saponinas. Las saponinas son glucósidos en este caso esteroides.

El término más apropiado para nombrar a los glucósidos es el de heterósido, cuyo prefijo indica que la molécula está formada por dos clases diferentes de sustancias y el sufijo hace referencia a que una de ellas es un azúcar; a la otra fracción se le conoce como aglicón o genina.

Los heterósidos son compuestos derivados de las formas cíclicas de los azúcares ( piranosas y furanosas ), en las que el hidrógeno del oxhidrilo hemiacetálico del azúcar ha sido sustituido por un grupo alquilo o arilo proveniente de un alcohol, formándose un nuevo enlace de tipo acetal, como esta unión es a través de un oxígeno se les nombra o-heterósidos y este tipo de union es la más abundante en las plantas.



El azúcar que con mayor frecuencia se encuentra formando parte de un heterósido es la glucosa, pueden encontrarse todos los azúcares naturales conocidos en mayor o menor proporción entre estas la galactosa, manosa, fructosa, arabinosa, xilosa, ramnosa, apiosa, etcetera.

Así también existen en la naturaleza una amplia variedad de aglucosnes y tomando como base su naturaleza química se ha hecho la siguiente clasificación: a) heterósidos de alcoholes y fenoles. b) heterósidos de antraquinonas. c) heterósidos cianogenéticos. d) heterósidos de cumarinas ( lactonas). e) heterósidos cardiotónicos. f) Saponinas. g) heterósidos de tiocianatos. h) Flavonoles. i) Otros. En la figura 2 se ilustran algunos de estos compuestos.

Los glucósidos cuyo aglucón deriva del ciclopentano perhidrofenantreno (Fig 3a) son de gran importancia farmacológica, pertenecen a estos los heterósidos cardiotónicos como la digitalina (Fig 2a) y las saponinas esteroidales como la dioscina (cuyo aglucón se muestra en la Fig 3b)

Las saponinas ( del latín sapon: jabón consistencia de,) se caracterizan por formar soluciones coloidales con el agua y poseen la propiedad de formar espuma jabonosa con ella ya que abaten la tensión superficial de la misma, son tóxicas para los animales de sangre fría y hemolizan los glóbulos rojos. Al aglucón de las saponinas se le nombra sapogenina. De acuerdo a la estructura del aglucón las saponinas se dividen en dos

diferentes grupos: saponinas neutras, que son derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig 3a) y saponinas ácidas de naturaleza triterpénica (Fig 3d). Las saponinas esteroidales son sustancias de 27 átomos de carbono con un esqueleto hidrocarbonado semejante al del colesterol (Fig 3c)

### 2.1.1 Propiedades químicas (\*\*)

Muchos de los heterósidos son solubles en agua, alcohol y mezclas de alcohol-agua. Son escasamente solubles o insolubles en éter y en cloroformo. La solubilidad en agua está en función inversa del carácter lipofílico del aglucón; la solubilidad en disolventes orgánicos disminuye a medida que aumenta el número de azúcares.

Los heterósidos no son capaces de reducir el nitrato de plata y las sales de cobre, ya que los azúcares reductores al formar la unión heterosídica están bloqueados en la función aldehídica del azúcar.

Los azúcares reductores en solución pasan de la forma lineal a la cíclica ya sea de tipo pirano o furano:

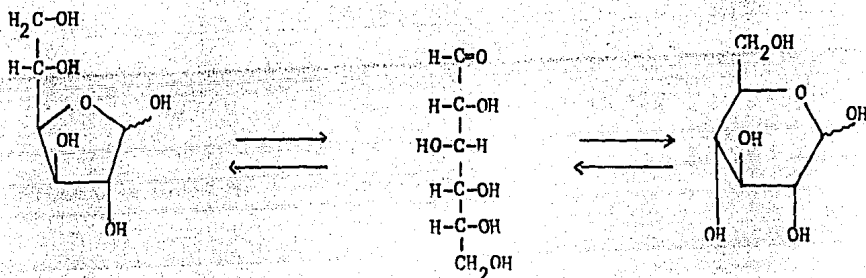
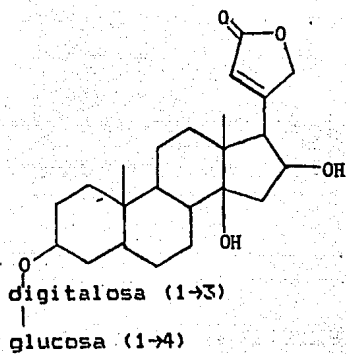
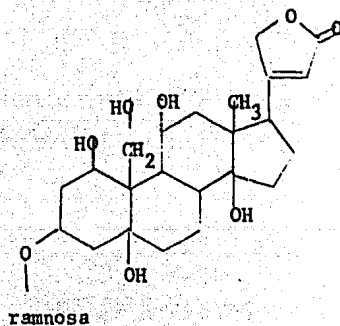


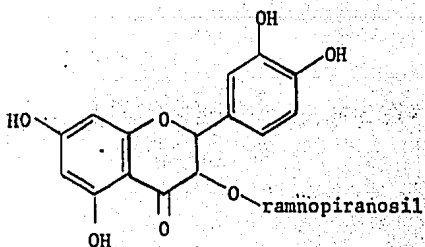
Figura 2



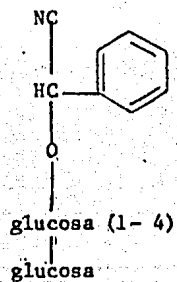
a) Digitalina



b) Uabaina



c) Quercitina



d) Amigdalina

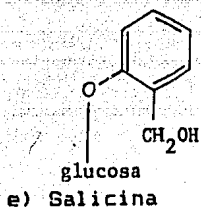
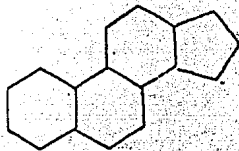
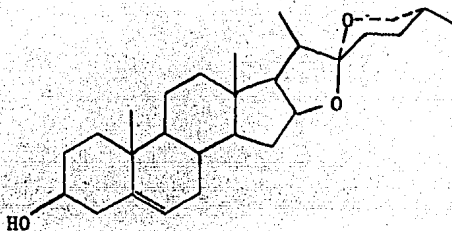


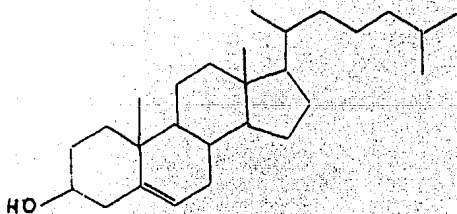
Figura 3



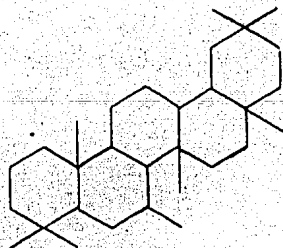
a) Ciclopentano-  
perhidrofenantreno



b) Diosgenina



c) Colesterol



d) Sistema  
triterpenoide

Existe la posibilidad de dos tipos de heterósidos para el mismo tipo de azúcar, ya que al efectuarse la ciclización del oxhidrilo del carbono No 1 puede adquirir dos orientaciones una axial y otra ecuatorial, denominados alfa y beta respectivamente, por lo cual el heterósido a que da lugar se le nombra como alfa o beta heterósido respectivamente. Por este tipo de isomerismo, al carbono 1 que es asimétrico en la forma cíclica se le denomina carbono anomérico.

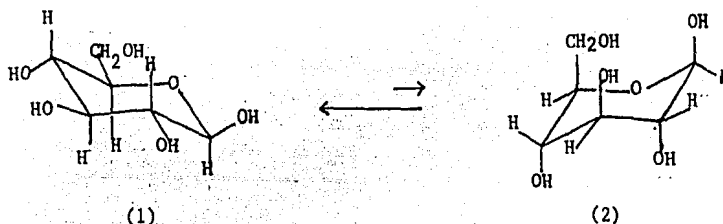
2.1.2 Hidrólisis alcalina.- Los heterósidos por ser acetales deberían ser resistentes a la hidrólisis con bases y por lo tanto no exhibir poder reductor frente a la solución de Fehling. Sin embargo, algunos sí la reducen y esto es debido a la estructura que poseen. Son sensibles a este tipo de hidrólisis algunos de los siguientes grupos (?) :

- a) Heterósidos de fenoles.
- b) Heterósidos de enoles conjugados con un grupo carbonilo.
- c) Heterósidos de alcoholes con sustituyentes electronegativos en posición beta.

2.1.3 Hidrólisis ácida .- Este tipo de reacción es de gran importancia en el estudio de los heterósidos puesto que permite establecer el tipo de aglucón y azúcares que lo componen. La mayor o menor facilidad de hidrólisis depende en gran medida de factores estructurales como son:

a) Efecto del aglúcon. Por regla general los heterósidos con aglicón alifático serán hidrólizados menos rápidamente que los aromáticos. El tipo de sustituyentes que soporten los oxhidrilos libres hará más o menos estable el enlace heterosídico.

b) Conformación del anillo piranósido. Las formas más estables de los ocho posibles conformeros de la glucosa son los que corresponden a las formas de silla 1 y 2 :



En ambas la mitad de los hidrógenos son ecuatoriales y la otra mitad son axiales. Cualquier sustituyente diferente de hidrógeno, que ocupe una posición axial inestabiliza la conformación del anillo.

c) Substitución en el carbono 5. Al incrementar la substitución en este carbono hay un efecto estabilizador que se refleja en una mayor resistencia a la hidrólisis.

2.1.4 Acetilación. Los grupos hidróxilos libres de los heterósidos pueden formar derivados acetilados, que son de gran utilidad en la determinación de su estructura. Los agentes acetilantes más utilizados han sido el ácido acético glacial y el anhídrido acético. Los catalizadores más empleados son acetato de



sodio anhidro o cloruro de zinc, también se han usado piridina, anhídrido trifluoroacético, ácido sulfúrico o perclórico. Los principales factores que afectan la esterificación son el impedimento estérico y la temperatura. Cuando el radical oligosacárido es relativamente grande y ramificado, da lugar a compuestos parcialmente acetilados.

## 2.2 Determinación de estructura

Para dar la estructura de un heterósido es necesario establecer:

- a) El tipo de aglicón y azúcares que lo componen ( estructura primaria )
- b) La relación cuantitativa entre los azúcares ( estructura secundaria )
- c) La secuencia y sitio de unión entre azúcares ( estructura terciaria )
- d) La estereoquímica de la unión glicosídica ( estructura cuaternaria )

La estructura de un heterósido puede ser determinada por métodos químicos o instrumentales que en la mayoría de los casos se complementan.

### 2.2.1 Métodos químicos

Para establecer la estructura primaria, los métodos principales son la hidrólisis total con ácidos minerales o enzimas y la posterior identificación de los productos de reacción ya sea por la formación de derivados o degradación de la molécula a compuestos conocidos. La formación de derivados como peracetatos, derivados permetilados, osazonas, hidrazonas y las reacciones coloridas como Fehling, Tollens, Molisch, etcétera, se emplean para la identificación de azúcares. (9)

Los ácidos más comunmente empleados son HCL y  $H_2SO_4$  a concentraciones 1N, 2N, 4N; es importante controlar el tiempo de reacción así como la temperatura, pues son factores importantes que dependiendo del tipo de heterósido pueden provocar la formación de reacciones colaterales de degradación tanto de los azúcares ( formación de anhídridos ) como del aglucón ( deshidratación e isomerización ). (10)

La estructura secundaria se establece, principalmente por la cuantificación de los azúcares, los principales métodos son los basados en las propiedades reductoras de los azúcares sobre iones  $Cu^{2+}$ ,  $Ag^{+}$ ,  $Hg^{+}$ , y  $Fe(CN)^{3+}$ .

Siendo el más usado (11) el de  $Cu^{2+}$  cuyos productos de reducción ( $Cu^{+}$ ), pueden determinarse por gravimetría o colorimetría. (12)

La secuencia y el sitio de unión entre los azúcares se pueden determinar por hidrólisis parcial, pero sólo es útil cuando se desea conocer la secuencia y sitio de unión de un heterósido que es homólogo superior de otros ya conocidos con los cuales se comparan los productos de reacción. Otra alternativa es la oxidación con ácido peryódico y análisis de los productos obtenidos.

La estereoquímica de la unión glicosídica en los heterósidos se puede determinar por métodos de medición o determinación de las diferencias de rotación molecular entre un glucósido y su aglicón, o realizando hidrólisis enzimática.

Las enzimas que desdoblan a un heterósido formado por hexosas son llamadas  $\alpha$ -o  $\beta$ -hexosidasas. La primera enzima en ser descubierta fue la emulsina, la cual está presente en las almendras dulces e hidroliza al glucósido amigdalina, también presente en las almendras. Esta enzima es principalmente una glucosidasa, aunque dependiendo del pH puede presentar actividad de  $\alpha$ -glucosidasa. La emulsina más utilizada con heterósidos es una mezcla de enzimas y no una glucosidasa exclusivamente. (\*)

La reacción de las hexosidasas es afectada por el pH de la reacción, la temperatura, concentración de enzima y sustrato; estructura, estereoquímica y substituyentes tanto del aglicón como de la porción de azúcar.

### 2.2.2 Métodos instrumentales

La determinación de la estructura química de una sustancia dada se ha facilitado enormemente por los avances de la espectroscopía, la interpretación y correlación de datos espectroscópicos y por el diseño de nuevos espectrómetros. Para los fines en relación a los glucósidos se tratarán por separado a aquellos que prestan mayor utilidad para elucidar las estructuras primaria, secundaria, terciaria y cuaternaria.

El análisis en un tiempo relativamente corto de la estructura primaria puede efectuarse por cromatografía de gases<sup>(11)</sup>. Si el método se efectúa en forma cuantitativa partiendo de los productos de hidrólisis de un glucósido, es posible determinar la estructura secundaria, la cual también puede conocerse por cuantificación colorimétrica, existiendo para ello procedimientos específicos para grupos de azúcares, o bien para azúcares individuales.<sup>(12)</sup>

Para la determinación de la estructura terciaria, se han desarrollado técnicas de espectroscopía de masas, realizando espectros por ionización de campo y por impacto electrónico; de esta forma es posible establecer con mayor precisión el peso molecular y el patrón de fragmentación respectivamente.

Otra técnica de gran utilidad para conocer la estructura terciaria es la RMN  $^{13}\text{C}$ . De acuerdo con los métodos de Kasai y

Tori (1977) (12) (13), y los de Lemieux (1977) (14).

El método de las diferencias de rotación molecular descrito por Klyne en 1950, es una técnica confiable para establecer la estructura cuaternaria. Se desarrolló originalmente para establecer el enlace anomérico de glucósidos cardiotónicos y su uso se ha extendido a los esteroides. Consiste en calcular la diferencia de la rotación molecular entre un glucósido y su aglucón, este resultado se sustrae a la rotación molecular de un metil- glucósido, empleado como referencia, cuyo enlace anomérico es conocido; si el resultado de esta última diferencia está en el rango de  $+ 100$  y  $- 70^\circ$  el enlace anomérico del glucósido desconocido será el mismo que el de la referencia. (15)

### 2.3 Insectos perjudiciales

La clase de los insectos agrupa aproximadamente 675 000 especies diferentes. Debido a su número y a sus relaciones biológicas, los insectos tienen una gran importancia económica, algunos son útiles y otros muy perjudiciales para el hombre.

Muchas especies de insectos dañan a las plantas ya sean cultivadas o no, árboles, arbustos o hierbas, consumiendo diferentes órganos de los mismos, granos y otros alimentos almacenados. Algunos son peligrosos para la salud por ser transmisores de diversas enfermedades tanto del hombre como de los animales.

Las plantas cultivadas suelen tener más de un insecto que las ataca y algunas como el trigo, el maíz, el algodón y el tabaco los tienen a centenares. Estos cobran un elevado tributo en pérdidas y en los gastos para luchar contra ellos mediante venenos y otros medios. Los alimentos del hombre son devorados o destruidos por hormigas, cucarachas, moscas y gorgojos, y ciertas mariposas nocturnas.

Muchos insectos y algunas garrapatas actúan como huéspedes intermediarios de varias enfermedades humanas, de los animales domésticos y de las plantas cultivadas<sup>(16)</sup>

Ciertos grupos de insectos perjudiciales poseen un tipo de desarrollo llamado metamorfosis completa el cual es único en el reino animal, constituye una especialización en la que el ciclo vital se divide en cuatro partes distintas; a) el huevo, b) la

larva o estado de alimentación, c) la pupa, o fase inmóvil de transformación, y d) el adulto o fase de reproducción.

En este tipo de ciclo vital, el crecimiento total del insecto es el resultado de la alimentación larvaria, el adulto, exclusivamente ingiere el alimento suficiente para la maduración de los espermatozoides u óvulos.

Este sistema permite a las larvas y adultos vivir en lugares y condiciones completamente diferentes. Así a la larva le es posible aprovechar las condiciones más favorables para su rápido crecimiento y al adulto vivir en las mejores condiciones para la fecundación, la dispersión y oviposición. Los insectos con este tipo de desarrollo incluyen mariposas, abejas, moscas, escarabajos, y ciertos miembros de los hemipteros, principalmente las cochinillas.<sup>(17)</sup>

### 2.3.1 Productos naturales de plantas como control biológico de insectos

Las plantas ante el acoso de los herbívoros han desarrollado a través de la evolución biológica, diversos mecanismos de defensa en los que intervienen factores morfológicos, fenológicos y químicos combinados.

Los compuestos defensivos de las plantas no afectan de la misma manera a todos sus depredadores potenciales. Los insectos especialistas cuya clase de huéspedes es muy reducida, muestran

mecanismos potentes de detoxificación y tolerancia a los compuestos defensivos y son mucho más resistentes a los efectos de los mismos en sus plantas huéspedes, que los insectos generalistas que no comen normalmente la planta en cuestión.<sup>(18)</sup> Los especialistas pueden utilizar las sustancias secundarias para localizar a las plantas hospederas.

El modo de acción de los metabolitos secundarios sobre los insectos depredadores es muy diverso y se le conoce sólo en algunos casos; por ejemplo los taninos forman complejos relativamente difíciles de digerir con las proteínas de las hojas, reduciendo de esta manera las posibilidades de que los herbívoros asimilen el nitrógeno en ellas contenido, los aceites esenciales inhiben la actividad microbiana del rumen de los ruminantes e interrumpen el proceso digestivo, los análogos de las hormonas de insectos interfieren en la metamorfosis y el desarrollo de los mismos, de igual manera que los análogos de las hormonas estrogénicas de los vertebrados interfieren en la implantación y el desarrollo del embrión.<sup>(19)</sup>

Actualmente se utilizan algunos extractos vegetales<sup>(20)</sup> como agentes del control biológico de insectos perjudiciales de plantas agrícolas, con la enorme ventaja de ser poco tóxicos al hombre si no es que inocuos puesto que pocos días antes de la cosecha se aplica el insecticida vegetal y al momento de la recolección de frutos, los extractos utilizados como pesticidas han sido transformados a formas inocuas y no necesitan



precauciones exageradas como en el caso de la estricnina y los insecticidas sintéticos. Los productos a los que se hace mención son las piretrinas 1 y 2 (extractos vegetales), y la nicotina.

La piretrina es el componente activo de muchas fórmulas contra insectos, se extrae de las flores del piretro y es el producto primario de Pyrethrum cinerariaefolium. Los componentes tóxicos son dos ésteres piretrina, 1 y 2. Se utiliza generalmente para pulverizaciones domésticas en forma de aerosol disuelto en queroseno.

El polvo del piretro se combina con talco o bentonita como soporte contra polilla, hormigas, cucarachas y chinches. Combinado con butóxido de piperonilo se usa contra insectos domésticos y de almacén.

Nicotina. Es el principal alcaloide de Nicotiana tabacum reacciona básicamente, levogira, volátil y de toxicidad mayor que sus sales no volátiles. Veneno mortal, tóxica por vía oral, por inhalación de su vapor concentrado y por absorción a través de la piel. Se obtiene por destilación por arrastre de vapor del tabaco crudo en presencia de álcali. Se vende en forma de sulfato de nicotina con 40 % de contenido de la misma, como polvo insecticida para jardines y cultivos conteniendo 2-4 % de sulfato de nicotina, se utiliza en pulverizaciones a concentraciones de 0.03 a 0.05 % contra áfidos, psilidos y larvas de polilla.

Ryanodina. De los tallos molidos de *Ryania speciosa* se extrae con agua y metanol el alcaloide ryanodina. este se utiliza en polvo a concentraciones de 40 % contra el gusano barrenador del maíz (*Pyrausta nubilalis*), sin perjudicar insectos útiles. Ha sido desplazado por el DDT.

#### Clasificación de insecticidas<sup>(20)</sup>

Los insecticidas se clasifican en dos grupos : insecticidas de contacto e insecticidas por ingestión, pero a estos deben añadirse los fumigantes y repelentes. No hay una diferencia clara entre ellos, ya que muchos pueden pertenecer a dos o más grupos. Así la nicotina puede considerarse tanto insecticida de contacto como fumigante y si se aplica en una forma menos volátil resulta ser activa por ingestión.

La clasificación de insecticidas por ingestión y por contacto se basa en la forma como el insecto ingiere su alimento. Así, los primeros se aplican sobre la superficie de las hojas para que los insectos masticadores al consumirlas ingieran el insecticida. Este es el caso de los insecticidas que poseen una elevada persistencia y pueden permanecer varios días en la planta antes de ser ingerida por los insectos ( por ejemplo el DDT y el arseniato de plomo )

En cambio los de contacto se usan principalmente contra el tipo de insectos chupadores , como áfidos y cochinillas. El producto es absorbido a través de las paredes del cuerpo o de los

estigmas ( por ejemplo la nicotina, paratión y toxafeno )

Los fumigantes son compuestos orgánicos simples de gran volatilidad p.e. el bromuro de metilo.

Los repelentes han sido enormemente utilizados contra moscas, piojos, ácaros y mosquitos.

### 3.- PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 Material biológico

Para este estudio se utilizó el rizoma fresco (es decir no fermentado) de Dioscorea mexicana colectado en la región de Pichucalco Chiapas. Se tuvo acceso al material proveniente de dos colectas diferentes y se encontró que no existía diferencia alguna en la composición de los extractos de ambas, al correrlos en cromatografía de capa fina. A pesar de ello se seleccionó el material de la primera colecta por tenerlo en mayor cantidad.

#### 3.2 Métodos

##### 3.2.1 Desengrasado

A 5 Kg de rizoma de "cabeza de negro" desprovisto de la corteza seco y molido se le agregaron 3 l de hexano. Se calentó a ebullición durante media hora, se dejó reposar durante 24 horas a temperatura ambiente, se decantó y agregó una nueva porción de 3 l de hexano, calentando a ebullición y decantando después de media hora. La operación se repitió una vez más.

### 3.2.2 Extracción

El material desengrasado se maceró con 3 l de metanol caliente durante 24 horas por tres veces consecutivas. Los extractos fueron filtrados y unidos en uno solo, evaporándose a presión reducida hasta un volumen pequeño de aproximadamente 1l, el cual al enfriarse produce un precipitado. El precipitado se filtró y el sólido se disolvió en metanol caliente y se precipitó nuevamente. El filtrado fue concentrado a un tercio de su volumen colocándolo dentro del refrigerador, obteniéndose mayor cantidad de glucósidos purificados, los cuales fueron recristalizados de metanol caliente. Por cromatografía de capa fina las dos porciones sólidas presentaron la misma composición, por lo que fueron unidas en una sola, a la cual se le nombró "mezcla o extracto purificado de glucósidos", de esta manera se le menciona en el presente trabajo.

### 3.2.3 Separación de los componentes de la mezcla purificada.

La separación de los glucósidos de esta mezcla se llevó a cabo por medio de cromatografía en columna y en capa fina usando como adsorbente gel de sílice con un diámetro de partícula de 0.063-0.200 mm, desactivada con agua destilada en acetona en una proporción de 8 ml por cada 100 g de sílice. Para la cromatografía en capa fina se usó Gel de sílice 60 G y también cromatofolios en aluminio de gel de sílice 60 F<sub>254</sub>.

Para separar los glucósidos del extracto purificado se utilizó como sistema eluyente cloruro de metileno, metanol, agua 85:15:0.1, en el cual se desarrollaron con los siguientes valores de Rf:

Compuesto	Rf	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Ehrlich
1	0.73	+	-
2	0.53	+	-
3	0.24	+	-
4	0.07	-	+
5	0.03	-	+
punto de aplicación	0.00	-	+

La visualización en cromatografía de capa fina de los glucósidos espirostánicos se llevó a cabo por aspersion de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5N y calentamiento por 30 seg visualizado con lámpara de UV. Para los furostánicos, por aspersion con reactivo de Ehrlich al 1 % en metanol exponiendose después a vapores de HCL.

### 3.2.4 Identificación de azúcares libres

5 mg de la mezcla purificada disuelta en metanol fueron tratados con 0.5 ml de reactivo de Fehling calentandolos en baño de agua por 5 min. Paralelamente al problema se utilizó un patrón positivo de 1 mg de glucosa tratado en las mismas condiciones. No se encontraron azúcares reductores libres en la mezcla purificada de glucósidos.

### 3.2.5 Identificación de saponinas libres

La búsqueda de saponinas libres en el extracto purificado se realizó por cromatografía en capa fina utilizando como patrones diosgenina, pennogenina y criptogenina, como patrones en un sistema de disolventes compuesto por benceno, acetato de etilo 80:20. No se detectó ningún tipo de saponina libre

### 3.2.6 Identificación de los Azúcares de los glucósidos del extracto purificado

10 mg del extracto purificado o mezcla purificada de glucósidos fueron disueltos en 1 ml de etanol y puestos a reflujo con dos gotas de HCL concentrado durante 6 horas, a este término, la mezcla de reacción fue neutralizada pasándola a través de una columnita de resina intercambiadora de iones (amberlita básica) de 50 x 10 mm; las aguas neutralizadas se corrieron en cromatografía de capa fina utilizando como patrones glucosa, ramnosa, xilosa, rafinosa, ribosa, galactosa, fructosa, arabinosa, mannosa y sacarosa, en un medio eluyente de isopropanol, agua 4:1 y visualizando con reactivo de anisaldehído al 1% en metanol; como azúcares liberados se detectaron únicamente glucosa y ramnosa.

### 3.2.7 Identificación y aislamiento de sapogeninas

4 g de extracto purificado fueron sometidos a cromatografía en columna, usando como adsorbente gel de sílice desactivada en una proporción de 1 a 300 y eluyendo con el sistema cloruro de metileno, metanol, agua 85:15:0.1, con una velocidad de flujo de 5 ml/min y colectando fracciones de 50 ml. Las dimensiones de la columna fueron: longitud, 70 cm; diametro interno, 6.5 cm. La muestra fue aplicada a la columna adsorbida en 8 g de gel de sílice desactivada (en cama).

En los primeros 650 ml de volumen eluido, después del volumen muerto, se obtuvieron 15 mg de una mezcla de compuestos poco estables que fueron posteriormente identificados como sapogeninas. Esta mezcla se sometió a cromatografía en capa fina, usando sapogeninas libres como control y se obtuvo lo siguiente: 1) una mancha a la altura del dieno de diosgenina pero que reveló de color lila y no azul gris como el dieno, 2) un rastro que corre a la misma altura que hecogenina, 3) un rastro por arriba de diosgenina, 4) pennogenina, 5) un rastro por arriba de criptogenina, 6) un rastro a la altura de criptogenina, 7) otra mancha por abajo de criptogenina, y 8) el punto de aplicación.

Por cromatografía en capa preparativa se logró aislar las dos sustancias más estables que resultaron, la mancha color lila (en la cromatografía anterior) y una color azul situada por arriba de la anterior.



Ambas presentaron sin embargo el mismo espectro de infrarrojo con las siguientes señales principales (espectro 1):

### **infrarrojo**

<b>bandas (cm<sup>-1</sup>)</b>	<b>correspondiente a:</b>
2930	C - H
1730	C = O
1600 y 1580	- C = C -
1460	- CH <sub>2</sub>
1380	- CH <sub>2</sub>
1270	C - O
1120	C - O
1070	
1040	
950	

Debido a la inestabilidad de estas supuestas sapogeninas, a la pequeña cantidad que de ellas se obtiene y al hecho de ser posiblemente producto de descomposición por el paso a través de la columna de gel de sílice, se decidió discontinuar su posterior estudio.

### 3.2.8 Separación de glucósidos

#### 3.2.8.1 Compuesto 1

Utilizando cromatografía en columna para el extracto purificado, en las mismas condiciones que las citadas en ( 3.2.7 ) se aisló una cantidad pequeña de un compuesto que por c.c.f., usando un medio de elución para glucósidos ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$  85:15:0.1), presento un  $R_f$  de 0.72, que comparado con patrones auténticos provenientes de Dioscorea composita de mono, di, y triglucósidos de diosgenina, (\*) corresponde al monoglucósido

Debido a las escasas cantidades obtenidas, se procedio a aislar una mayor cantidad de este compuesto para lo cual 2.5 g de la mezcla de glucósidos purificada se sometieron a cromatografía en columna, utilizando gel de sílice desactivada como adsorbente en una proporción 11 a 100, eluyendo con cloroformo, metanol, agua 80:20:0.1 con una velocidad de flujo de 2.5 ml/min y colectando fracciones de 50 ml. Las dimensiones de la columna fueron: longitud 46 cm y diametro interno 3 cm. La muestra fue aplicada, adsorbida en 2 g de gel de sílice. Después del volumen muerto, de las fracciones 6 a 15 una mezcla se colectó ( 0.04 g ) del compuesto correspondiente al compuesto 1 y de un segundo ( compuesto 2 ). Las cuales presentan por c.c.f. iguales características de revelado al ser asperjados con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  5N, que los glucósidos de diosgenina A y B provenientes de D. composita.

Para aislar el primer compuesto, se recurrió entonces a una nueva cromatografía en columna en las siguientes condiciones: 0.19 g de la mezcla anterior (mancha 1 y 2) en 35 g de gel de sílice desactivada como adsorbente, eluyendo con cloroformo, metanol 80:20; con una velocidad de flujo de 0.5 ml/min y colectando fracciones de 2 ml/tubo, con un volumen muerto de 25 ml. Las dimensiones de la columna fueron: longitud 30 cm, diámetro interno 1 cm. El curso de la cromatografía en columna fue controlado por c.c.f. Después del volumen muerto empezó a salir el primer componente correspondiente al compuesto 1, que se colectó en las fracciones 1 a la 16 en las que aparece solo. A partir de la fracción 7 apareció acompañado del compuesto 2. Por este método se logró purificar 7.0 mg del compuesto 1 denominado "glucósido A mex", que purificado de la manera anterior presentó las siguientes constantes físicas.

#### GLUCOSIDO A mex LIBRE

pf = 250 - 4 °C

#### Infrarrojo ( espectro 2 )

bandas (cm <sup>-1</sup> )	correspondiente a :
3450	- OH
2900 - 3000	C - H
1400	- CH <sub>3</sub>
890 - 920	isosapogenina

### 3.2.8.1.1 Hidrólisis ácida total del compuesto 1

3 mg del glucósido A mex disueltos en 0.5 ml de etanol fueron puestos a reflujo con una gota de HCL concentrado, durante 2 horas. Siguiendo el curso de la reacción cada 15 min por c.c.f. y corriendolo contra patrones conocidos de glucósidos A y B, sapogeninas libres ( diosgenina, pennogenina ) y azúcares ( glucosa y ramnosa ). Después de 50 min, este compuesto dió como productos de hidrólisis: una mancha similar a pennogenina, diosgenina y glucosa ( las aguas de hidrólisis al término de la reacción fueron neutralizadas pasándolas a través de una columna pequeña con una resina intercambiadora de iones ( amberlita básica ) de 20 X 5 mm, para poder llevar a cabo la cromatografía en capa fina de los azúcares liberados ).

### 3.2.8.2 Compuesto 2

Aislamiento: 2g de la mezcla purificada de glucósidos fueron sometidos a cromatografía en columna, usando como adsorbente gel de sílice desactivado con agua, en una proporción de una parte de mezcla por 100 de adsorbente y eluyendo con el sistema de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH,  $\text{H}_2\text{O}$  85:15:0.1. Se colectó un volumen muerto de 245 ml y fracciones de 1 ml/min. Las dimensiones de la columna fueron: longitud, 50 cm; diámetro interno, 2.5 cm Después de evaporar a presión reducida las fracciones correspondientes, el compuesto fue purificado por cromatografía de capa preparativa con gel de sílice desactivada en placas de 25 x 25 cm utilizando el medio de elución mencionado anteriormente y recristalizado de metanol acuoso (0.015g). El compuesto fue denominado "glucósido B mex" y presentó las siguientes constantes físicas.

#### GLUCOSIDO B mex LIBRE

pf = 222 - 24 °C

#### Infrarrojo ( espectro 3 )

bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	correspondiente a
3420	-OH
2400 - 2980	C-H
1650	C = C
1390	- $\text{CH}_3$
910 y 890	iscapogenina

### 3.2.B.2.1 Hidrólisis ácida parcial

5 mg del glucósido B mex disueltos en 1.0 ml de etanol fueron hidrólizados parcialmente con 0.3 ml de  $H_2SO_4$  1N a reflujo por 1 hora, siguiendo el curso de reacción cada 15 min por cromatografía en capa fina. De esta forma se identificarán como productos de hidrólisis: dos manchas, una que corre a la altura del monoglucósido A y revela del mismo color (verde oscuro al revelar con  $H_2SO_4$  5N), y otra mancha que corre y revela igual que el diglucósido B. Esta mancha aún aparece como un rastro después de 3 horas. También aparece una tercera mancha en este medio para glucósidos, entre el rastro del diglucósido B y el punto de aplicación, la cual corresponde a la mezcla de azúcares liberados en la reacción. En un medio de eluyentes para azúcares (isopropanol, agua 4:1) y utilizando el mismo adsorbente, esta mezcla corrió en c.c.f., en forma de dos manchas que revelaron con reactivo de anisaldehído al 1 %, como ramnosa y glucosa. En medio de elución para saponinas se detectaron diosgenina y una pequeña mancha no identificada que corre por abajo de diosgenina y ligeramente encima de pennogenina ( en benceno, acetato de etilo 70:30 )

### 3.2.B.2.2 Hidrólisis ácida total

A la mezcla anterior de hidrólisis parcial se le agregó una gota de HCL concentrado y se hirvió a reflujo por 4 hrs.

Por cromatografía de capa fina se detectó un rastro de monoglucósido, diosgenina y una mancha no identificada ligeramente encima de la pennogenina.

### 3.2.8.2.3 Hidrólisis total y caracterización de la sapogenina del glucósido B

La mezcla de reacción de la hidrólisis total, una vez neutralizada por medio de una columna de resina intercambiadora de iones  $H^+$  (amberlita básica), fue evaporada a presión reducida, casi a sequedad. Posteriormente se le agregaron algunas gotas de agua fría con lo que precipitó la sapogenina, la cual fue extraída varias veces con un poco de cloroformo. El cloroformo se evaporó a sequedad con nitrógeno, quedando una ligera película en las paredes del matraz, que presenta las siguientes señales en el infrarrojo ( espectro 4 )

bandas ( $cm^{-1}$ )	correspondiente a :
3450	- OH
2920 - 2860	C - H
1730	$>C = O$
1460	-CH <sub>3</sub>
1390	-CH <sub>3</sub>
910 y 940	isosapogenina

Este producto extraído con cloroformo, se corrió en cromatografía de capa fina contra patrones de saponinas (diosgenina, pennogenina y criptogenina), correspondiendo una mancha marcada e intensa a la diosgenina, con un pequeño, rastro como un punto, no identificado, entre la diosgenina y la pennogenina.



### 3.2.8.3 Compuesto 3

Este compuesto denominado como glucósido D, (por relación al 4- glucósido aislado en D. composita) (4) fue obtenido por cromatografía en columna a partir del extracto purificado de Dioscorea mexicana. Las condiciones de la columna fueron: longitud, 70 cm; diametro interno, 6.5 cm; soporte, gel de sílice desactivado con agua, en relación muestra - adsorbente 1 a 300 partes, eluyente, CH<sub>2</sub>CL<sub>2</sub>, MeOH, H<sub>2</sub>O 85:15:0.1, volumen muerto, 2323 ml; fracciones de 50 ml; flujo, 0.5 ml/ min. La mezcla purificada ( 4 g ) fue aplicada adsorbida en gel de sílice uno a cuatro partes. El producto obtenido por fraccionamiento y recristalizado de metanol acuoso (0.260 g) presentó las siguientes constantes físicas:

#### GLUCOSIDO D mex LIBRE

pf = 257 °C

$$\left[ \alpha \right]_D^{25} = - 119^\circ \text{ ( piridina )}$$

$$\left[ \alpha \right]_D^{25} = - 102^\circ \text{ ( metanol )}$$

## Infrarrojo ( espectro 5 )

Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	correspondiente a :
3440	- OH
2930 - 2840	C - H
1640	C = C
1380	- CH <sub>3</sub>
920 y 890	isosapogenina

## 3.2.8.3.1 Hidrólisis ácida parcial

30 mg de glucósido D , disueltos en 6 ml de etanol se hidrólizaron con 3 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N a reflujo por 3 h siguiendo el curso de la reacción por cromatografía en capa fina cada 15 min, durante las primeras dos horas . Como producto de reacción se detectaron: trazas de diosgenina, glucósidos A, B, C<sup>(4)</sup> y ramnosa.

## 3.2.8.3.2 Hidrólisis ácida total

A la mezcla de reacción de la hidrólisis parcial, se le agregó cuatro gotas de HCL concentrado, calentando a reflujo por 5 horas; después de las cuales se detectaron por placa fina, los glucósidos A, B y ramnosa. Después de 12 horas a temperatura ambiente y 6 hrs a reflujo se detectaron, dieno de diosgenina, diosgenina, monoglucósido A, Ramnosa y glucosa.

### 3.2.8.3.3 Aislamiento y caracterización de la sapogenina del glucósido D mex

La mezcla de reacción anterior fue pasada a través de una columna con resina de intercambio iónico ( amberlita básica ) Una vez neutralizada esta mezcla, se evaporó a sequedad en condiciones de presión reducida y a baja temperatura, posteriormente se le agregaron unos mililitros de agua destilada; se detectaron por cromatografía en capa fina; glucosa y ramnosa. En el precipitado restante que se formó soluble en cloroformo, se detectó por c.c.f. un rastro del dieno de diosgenina y una mancha fuerte que corresponde a diosgenina. Esta mezcla de sapogeninas fue separada por cromatografía de capa preparativa utilizando placas de vidrio de 20 x 20 cm, con gel de sílice desactivada como adsorbente y un medio eluyente de benceno, acetato de etilo 80:20 . La mancha correspondiente a diosgenina, una vez recristalizada de etanol, presentó el siguiente espectro de infrarrojo

#### Infrarrojo ( espectro 6 )

Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	correspondiente a:
3400	- OH
2920 - 2840	C - H
1630 - 1600	C = C
1380	- CH <sub>2</sub>
920 y 890	isosapogenina

Este espectro se sobrepone al espectro de IR de una muestra autentica de diosgenina. ( espectro 18' ).

### 3.2.8.3.4 Acetilación del glucósido D

47 mg del glucósido D disueltos en 1 ml de piridina anhidra, fueron acetilados con 3 ml de anhídrido acético, y la mezcla fue agitada 24 hrs a temperatura ambiente y 20 min a reflujo. El peracetato fue extraído con cloroformo y evaporado a sequedad. La piridina restante se eliminó, lavando con una solución diluida de HCL. El derivado recristalizado de metanol acuoso (49.7 mg), presentó las siguientes constantes físicas.

pf = 129 °C

pf (de mezcla) = 133 °C (con un derivado peracetilado del triglucósido D, de diosgenina, proveniente de D. composita con pf = 133 - 34 °C).

#### Infrarrojo (espectro 7)

Bandas (cm <sup>-1</sup> )	correspondiente a:
2980	C - H
1740	>C = O carbonilo de éster
1380	- CH <sub>3</sub>
920 y 900	isosapogenina

## R.M.N.-H ( espectro B )

Bandas ( ppm )	correspondiente a :
0.9 - 1.2 ( 3H c/u )	- CH <sub>3</sub> , angulares
1.3 - 1.75	- CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> - anulares
2.2 - 2.4	6 señales CH <sub>3</sub> - C = O
3.35 - 3.65	bases de - OH
3.75 - 3.85	CH <sub>2</sub> -O- , azúcar.
4.3 - 5.4	CH-O-H, azúcar y HC=CH del del aglucón
7.6 (señal simple)	cloroformo.

## R.M.N.- H + LSR ( espectro 9 )

La adición de aproximadamente 10 mg de LSR / 40 mg de muestra, provocó un desplazamiento de las señales AcO- , a 2.1 - 4.2 ppm, donde se pueden observar las ocho señales para los grupos acetilo.

### 3.2.8.4 Compuesto 4

El compuesto denominado glucósido E, fue obtenido por cromatografía en columna a partir del extracto purificado de glucósidos. Las condiciones cromatograficas fueron las mismas que se utilizarón en el aislamiento del glucósido D. Este compuesto al ser asperjado en c.c.f. con el reactivo de Ehrlich, revela de manera positiva ( rosa intenso ). Una vez recristalizado de metanol-acetona ( 0.09 g ) presentó las siguientes constantes físicas.

#### GLUCOSIDO E mex LIBRE

pf = 204 - 5 °C

$$[\alpha]_D^{25} = -66 \text{ (metanol)}$$

Infrarrojo ( espectro 10 )

Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	correspondiente a :
3400	- OH
2930	C - H
1630 - 1650	C = C
1380	- CH <sub>3</sub>

#### 3.2.8.4.1 Hidrólisis ácida parcial

15 mg del glucósido E disueltos en 5 ml de metanol, fueron hidrolizados con 0.5 ml de  $H_2SO_4$  1N a reflujo durante 6 horas, siguiendo el curso de la reacción cada 15 min. El producto de la reacción fue analizado por cromatografía en capa fina corriendo contra los glucósidos conocidos monoglucósido A, di, triglucósido D de diosgenina\*, las sapogeninas diosgenina, pennogenina, criptogenina y los azúcares ramnosa y glucosa. Se observaron:

- un producto que se comporta como monoglucósido,
- otro semejante al diglucósido B,
- una mancha que corre ligeramente arriba del triglucósido D y
- otra ligeramente abajo del triglucósido, así como el compuesto original, y sólo se detectaron rastros ligeros de glucosa y ramnosa.

#### 3.2.5.4.2 Hidrólisis ácida total

A la mezcla anterior se le agregó una gota de HCL conc. y se puso a reflujo por 4 hrs, y 12 hrs a temperatura ambiente. como producto de reacción se observó la misma mezcla de glucósidos citados arriba ( 3.2.8.4.1 ) cuando se corre en un medio para glucósidos.

Al examinar la mezcla de reacción por c.c.f., usando un eluyente para sapogeninas se observa una mezcla de posibles intermediarios diferentes (una serie de 9 manchas) de distinto Rf y diverso comportamiento frente a los reactivos utilizados para

revelar. Todas estas manchas llegan a una última (Rf mayor) que corresponde a la diosgenina. Con un Rf inferior a la diosgenina aparece una mancha que revela y corre igual que la pennogenina. En este medio de c.c.f. el glucósido E, el cual se mantiene en el punto de aplicación continúa aún revelando de manera positiva, en tanto que las sapogeninas liberadas no observan el mismo comportamiento de reacción. En medio para azúcares se observó la liberación de ramosa y rastros de glucosa.

#### 3.2.9.4.3 Acetilación del glucósido E

60 mg del glucósido E, fueron disueltos en 0.5 ml de piridina anhidra, acetilándolos con 3 ml de anhídrido acético, con agitación a temperatura ambiente por 24 hrs y 20 min a reflujo. El compuesto acetilado (55 mg) se recuperó extrayéndolo por partición de cloroformo-agua acidulada, (para eliminar el exceso de piridina). Por cromatografía en capa fina presenta un Rf = 0.45 en un medio eluyente de benceno, acetato de etilo 60:40. Recristalizado de metanol acuoso presentó las siguientes constantes físicas:

mp = 102 °C

#### Infrarrojo (espectro 11)

Banda (cm <sup>-1</sup> )	correspondiente a:
2920	C - H
1740	C = O carbonilo de éster
1380	CH <sub>3</sub>



**R.M.N.-H ( espectro 12 )**

Bandas ( ppm )	correspondiente a :
0.8 - 1.1	- CH <sub>3</sub> angulares
2.03 - 2.2	B señales CH <sub>3</sub> -C=O
3.5 - 3.9	- CH <sub>2</sub> - O de azúcares
4.2 - 5.5	- CH - O de azúcares y protones HC=CH del aglucón.
7.5	CHCl <sub>3</sub>

**R.M.N.-H + LSR ( espectro 13 )**

Al agregar aproximadamente 10 mg de LSR, el derivado peracetilado del glucósido E, no dio respuesta capaz de ser apreciada por el aparato, debido a la descomposición del producto, al interaccionar con el LSR.

### 3.2.8.5 Compuesto 5

El compuesto 5 se obtuvo por cromatografía en columna a partir del extracto purificado de Dioscorea mexicana y se denominó glucósido F. Las condiciones cromatograficas fueron; longitud, 70 cm; diámetro interno, 6.5 cm; soporte, gel de sílice desactivada con agua; relación glucósido-soporte, de 1 a 300 partes; eluyente, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH 60:40

La muestra adsorbida en gel de sílice fue aplicada en una proporción de 1 a 4 ; volumen muerto 2323 ml; fracciones de 50 ml; flujo 0.5 ml por minuto. Fue purificado de impurezas coloridas , con carbón activado, filtrado a través de tierra de infusorios ( celita ) y recrystalizado de metanol-acetona (0.07g) Presentó las siguientes constantes físicas.

#### GLUCOSIDO F mex LIBRE

pf = 215 - 16 °C

Infrarrojo ( espectro 14 )

Bandas ( cm <sup>-1</sup> )	correspondiente a :
3400	O - H
2920	C - H
1630	C = C
1380	- CH <sub>3</sub>

Este compuesto reacciona de manera positiva (rosa intenso) con el reactivo de Ehrlich, al ser asperjado con este en c.c.f.

#### 3.2.8.5.1 Hidrólisis ácida parcial

5 mg disueltos en 1 ml de etanol, se hidrólizaron con 0.5 de  $H_2SO_4$  1N a reflujo por 6 hrs, siguiendo el curso de la reacción cada 15 min por cromatografía en capa fina, contra los glucósidos conocidos (\*) usados como patrones. Se detectaron como productos de reacción cuatro manchas, dos que corren a la altura del monoglucósido A, las otras dos corren a la altura del triglucósido D.

#### 3.2.8.5.2 Hidrólisis ácida total

A la mezcla anterior le fue agregada una gota de HCL conc. y puesta a reflujo por 2 hrs. Como productos de reacción, dio una mezcla de saponinas, de comportamiento semejante en c.c.f. a las del glucósido E, liberando glucosa y ramosa.

#### 3.2.8.5.3 Derivado peracetilado del glucósido F

40 mg del glucósido F, disueltos en 0.8 ml de piridina anhidra fueron acetilados con 2.5 ml de anhídrido acético, con agitación por 24 hrs a temperatura ambiente y 15 min a reflujo.

El derivado acetilado se recuperó agregando un poco de metanol y precipitándolo poco a poco sobre hielo picado. Una vez recristalizado de metanol acuoso (0.025g), presentó las siguientes constantes físicas:

pf = 120 -2 °C

**Infrarrojo ( espectro 15 )**

Bandas ( $\text{cm}^{-1}$ )	correspondiente a :
2640	C - H
1760	$\text{>C} = \text{O}$ carbonilo de éster
1380	- $\text{CH}_3$

**R.M.N.-H ( espectro 16 )**

Bandas ( ppm )	correspondiente a
0.8 - 1.3	- $\text{CH}_3$ , angulares
1.9 - 2.2	6 señales $\text{AcO-}$
3.6 - 3.8	- $\text{CH}_2\text{-O-}$ , azúcar
4.2 - 5.2	- $\text{CH-O-H}$ , azúcar
7.25	$\text{CHCl}_3$

**R.M.N.-H + LSR ( espectro 17 )**

Al adicionar aproximadamente 10 mg de LSR observó el mismo comportamiento que el peracetato del glucósido E.

### 3.3 Posible efecto insecticida del extracto purificado de D. mexicana

#### 3.3.1 Experimento con Tenebrio molitor

Cuando la cabeza de negro era la fuente de obtención de materia prima para la extracción de diosgenina, se observó en los beneficios un comportamiento interesante de los insectos voladores (mosquitos), que se manifestaba por la ausencia de estos insectos durante el procedimiento de preparación del secado y molienda de los rizomas y en cambio proliferaban cuando se empezó a trabajar con el barbasco ( F. Giral, comn.personal ). Partiendo de esta evidencia, se llevaron a cabo algunas pruebas biológicas con el objeto particular de encontrar alguna actividad de los glucósidos sobre insectos; los insectos utilizados fueron una especie no voladora Tenebrio molitor. Curculionido y otra voladora Anastrepha ludens, consideradas ambas como plagas, la primera de harinas almacenadas, la segunda de cítricos.

Se montó un experimento con un diseño de bloques completos al azar, con tres tratamientos representados por:

1. 2g de salvado de trigo para 30 larvas de T. molitor.
2. mezcla de gluc.purif.de D. mexicana, añadida a 2g de salvado en una proporción 1:3
3. mezcla de gluc.purf.de D. composita, añadida a 2g de salvado en una proporción 1:3

que se proporcionaron como alimento a las larvas de I. molitor. Se hicieron tres repeticiones por tratamiento que consistieron en igual número de recipientes con 30 larvas de Tenebrio cada uno, y con los correspondientes tratamientos.

Se tomó el peso de las larvas al inicio y al final del experimento y el porcentaje de sobrevivencia; el experimento se dió por concluido en el momento en que las larvas del testigo empezaron a pupar.

Tabla 1

Resultados del Experimento con *Tenebrio molitor* alimentado con salvado, glucósidos de *D.mexicana* y *D.composita*.

tratamiento y rept.	peso de las larvas (g)		increm.	decrem.	sobrevivencia	
	inicial	final	(g)	(g)	%	
SALVADO SOLO.	A 1	1.4475	2.472	1.025	-	100
	A 2	1.730	2.588	0.8584	-	100
	A 3	1.529	2.279	0.7503	-	100
SALVADO + GLUC. de <i>D.mexicana</i>	B 1	1.610	1.105	-	0.504	96
	B 2	1.680	1.262	-	0.418	100
	B 3	1.899	1.462	-	0.436	100
SALVADO + GLUC. de <i>D.composita</i>	C 1	1.762	1.642	-	0.120	96
	C 2	1.896	1.909	0.013	-	100
	C 3	1.554	1.495	-	0.058	100

Tiempo de duración: 45 días

No de larvas por repetición: 30

Tabla 2 Análisis de los resultados de incremento en peso de larvas de *I. molitor* bajo los tratamientos mencionados.

	bloques			total
	1	2	3	
salvado	1.025	0.8584	0.7503	2.6337
salvado + gluc. de <i>D. mexicana</i>	0	0	0	0
salvado + gluc. de <i>D. composita</i>	0	0.13	0	0.13
total	1.025	0.9884	0.7503	2.7637

$$SC \text{ total} = 2.3504 - 0.8486 = \underline{1.5018}$$

$$SC \text{ tratms.} = 6.9532 / 3 - 0.8486 = \underline{1.4691}$$

$$SC \text{ bloques} = 2.5976/3 - 0.8486 = \underline{0.0172}$$

$$SC \text{ error} = 1.5018 - 1.4691 - 0.0172 = \underline{0.0155}$$

fuentes de variación	grados de libertad	S.C.	C.M.	F
Bloques	2	0.0172	0.0086	-
Tratamientos	2	1.4691	0.7345	195.28 **
Error experimental	4	0.0155	0.0038	-
Total	8	1.5018	-	-

\*\* F es significativa al 1 %



### 3.3.2 Experimento 1 con *Anastrepha ludens*.

La mezcla de glucósidos purificados de *D. mexicana* fue probada sobre una especie de insecto volador: la mosca *Anastrepha ludens* (mosca de la fruta del mediterráneo) de importancia económica para la agricultura

El experimento se realizó con un diseño de bloques completos al azar con once tratamientos, tres de los cuales se usaron como testigos:

Tratamientos	cantidades (g) por 30 larvas
1. alimento-p* : gluc.purif. <i>D.composita</i>	0.3:0.05
2. alimento-p* : gluc.purif. <i>D.composita</i>	0.3:0.10
3. gluc.purif. <i>D.composita</i>	0.10
4. gluc.purif. <i>D.composita</i>	0.05
5. alimento-p* : <i>D.mexicana</i>	0.3:0.05
6. alimento-p* : <i>D.mexicana</i>	0.3:0.10
7. gluc.purif. <i>D.mexicana</i>	0.10
8. gluc.purif. <i>D.mexicana</i>	0.50
9. testigo A alimento-p*	0.40
10. testigo B alimento-p*:talco	0.3:0.5
11. testigo C alimento-p*:talco	0.3:0.10

que se proporcionaron como alimento a los adultos de la mosca de la fruta.

Se hicieron tres repeticiones por tratamiento que consistieron en igual número de frascos de vidrio de boca ancha en el fondo de los cuales se colocó un papel filtro sobre el que se espolvoreó la cantidad indicada de glucósidos de cada tratamiento con y sin alimento preparado (alimento-p\*) para las moscas, colocando 10 pupas en cada frasco, tapándolos con tapas metálicas con un orificio por el cual se colocó una mecha de gasa mojada con agua como bebedero para las moscas emergentes. En estos frascos las pupas fueron incubadas dentro de una estufa a 28 °C y 80 % de humedad relativa, durante 6 días, al sexto día se registraron los sobrevivientes.

\* El alimento-p utilizado en el bioensayo, es una mezcla artificial para el adulto de *Anastrepha ludens*. Que consiste en una mezcla homogénea de los siguientes ingredientes :

Azúcar granulada	2.5 Kg
Miel de abeja	200 ml
Jugo de mango	200 ml
Levadura de cerveza	150 ml
Polivitaminico ( molido y mezclado )	5 g
Hidrolizado de proteína	5 g
Vitamina E	5 g
Vitamina A	5 g

Tabla 3 Resultados del experimento con *Anastrepha ludens*

Tratamientos	cantidades (g) por 30 larvas	No de sobre- vientes	% de sobre- vivencia	% de mortalidad
1 alimento-p: <i>D. composita</i> (gluc. purf.)	0.3:0.05	6/30	20	80
2 alimento-p: <i>D. composita</i> (g.p.)	0.3:0.10	10/30	33	67
3 <i>D. composita</i> (g.p.)	0.10	0/30	0	100
4 <i>D. composita</i> (g.p.)	0.05	0/30	0	100
5 alimento-p: <i>D. mexicana</i> (g.p.)	0.30:0.05	5/30	16	84
6 alimento-p: <i>D. mexicana</i> (g.p.)	0.30:0.10	0/30	0	100
7 <i>D. mexicana</i> (g.p.)	0.10	1/30	3	97
8 <i>D. mexicana</i> (g.p.)	0.50	1/30	3	97
9 testigo A alimento-p	0.40	30/30	100	0
10 testigo B alim.-p: talco	0.3:0.5	5/30	16	84
11 testigo C alim.-p: talco	0.3:0.10	2/30	6	94

tiempo de duración : 6 días.

No de larvas por repetición : 30

Tabla 4 Análisis de varianza de los resultados de la tabla 3

Repeticiones	1	2	3	Supervivencia
Tratamientos				Totales
Testigo A	10	10	10	30
" B	2	3	0	5
" C	0	0	2	2
1	1	3	2	6
2	2	4	4	10
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	2	2	1	5
6	0	0	0	0
7	0	0	1	1
8	0	0	1	1
Totales	27	31	31	89

$$G = 99 \quad C = (89)^2 / 36 = 220.02$$

$$SC \text{ total} = 659 - 220.02 = 439.98$$

$$SC \text{ tratms} = (1933) / 3 - C = 711 - C = 424.31$$

$$SC \text{ bloques} = (2651) / 21 - C = 220.91 - C = 0.896$$

$$SC \text{ error expm.} = 438.98 - (424.31 + 0.896) = 13.774$$

## ANOVA

F. de Var.	grados de libertad	SC	CM	F
repeticiones	2	0.896	0.448	0.715
tratamientos	11	424.31	38.57	61.61
error experm.	22	13.774	0.626	-
	35	438.98	-	-

## Contrastes

C 1 : Testigo A v.s. alim. + talco

$$( 29 + 30 ) - ( 5 + 2 ) = 59 - 7 = 52$$

$$SC c1 = (52)^2 / 3(4) = 2704 / 12 = 225.33$$

$$F c1 = 225.33 / 0.626 = 359.95 **$$

C 2 : testigo A v.s. alimento + D. condosita

$$( 30 + 29 ) - ( 6 + 10 ) = 43$$

$$SC c2 = (42)^2 / 3(4) = 1849 / 12 = 154.08$$

$$F c2 = 154.08 / 0.626 = 246.13 **$$

$$C 3 : \text{Testigo A v.s. alimento + D. mexicana} \\ (30 + 29) - (5 + 0) = 54$$

$$SC c3 = (54)^2 / 12 = 2916 / 12 = 243$$

$$F c3 = 243 / 0.626 = 388.17 **$$

$$C 4 : \text{Testigo alimento v.s. D. composita} \\ (30 + 29) - 0 = 59$$

$$SC c4 = 59 / 12 = 3481 / 12 = 72.52$$

$$F c4 = 72.52 / 0.626 = 115.84 **$$

$$C 5 : \text{testigo alimento v. s. D. mexicana} \\ (30 + 29) - 2 = 57$$

$$SC c5 = (57)^2 / 12 = 3249 / 12 = 67.68$$

$$F c5 = 67.68 / 0.626 = 108.11 **$$

$$C 6 : \text{Alimento + talco v.s. alimento + D. composita} \\ (5 + 2) - (6 + 10) = -9$$

$$SC c6 = (9)^2 / 12 = 81 / 12 = 1.68$$

$$F_{c6} = 1.68 / 0.626 = 2.68 \text{ N.S.}$$

C 7 : Alimento + talco v.s. alimento + D. mexicana

$$(7 - 5) = 2$$

$$SC_{c7} = (2)^2 / 48 = 0.0833$$

$$F_{c7} = 0.0833 / 0.626 = 0.1330 \text{ N. S.}$$

C 8 : Alimento + talco v.s. D. composita

$$(7 - 0) = 7$$

$$SC_{c8} = (7)^2 / 48 = 49 / 48 = 1.02$$

$$F_{c8} = 1.02 / 0.626 = 1.62 \text{ N. S.}$$

C 9 : Alimento + D. composita v.s. D. composita

$$(6 + 10) - (0 - 0) = 16$$

$$SC_{c9} = (16)^2 / 48 = 256 / 48 = 5.33$$

$$F_{c9} = 5.33 / 0.626 = 8.51 \text{ **}$$

C 10 : Alimento + D. composita ( 300 g ) v.s.

alimento + D. composita ( 400 g ).

$$( 6 - 10 ) = - 4$$

$$SC_{c10} = (-4)^2 / 12(2) = 16 / 24 = 0.66$$

$$F_{c10} = 0.66 / 0.626 = 1.05 \text{ N.S.}$$

C 11 : Alimento + D. mexicana ( 350 mg ) v.s.

alimento + D. mexicana ( 400 mg ).

$$( 5 - 0 ) = 5$$

$$SC_{c11} = (5)^2 / 24 = 25 / 24 = 1.04$$

$$F_{c11} = 1.04 / 0.626 = 1.66 \text{ N.S.}$$



1. Existe una diferencia significativa al 1 % entre el testigo A y :

- a ) alimento + talco
- b ) alimento + D. composita
- c ) alimento + D. mexicana
- d ) D. composita
- e ) D. mexicana

2. Existe una diferencia significativa al 1 % entre el alimento + D. composita y D. composita sola.

3. No existe diferencia significativa al 1 % entre alimento + talco y :

- a ) alimento + D. composita
- b ) alimento + D. mexicana
- c ) D. composita

4. No existe diferencia significativa entre alimento + D. composita (350 mg) y alimento + D. composita (400 mg)

5. No existe diferencia significativa entre alimento + D. mexicana (350 mg) y alimento + D. mexicana (400 mg).

### 3.3.3 Experimento 2 con *Anastrepha ludens*

Se realizó un segundo experimento con los glucósidos de *Dioscorea mexicana* sobre la mosca de la fruta, probándolos como posibles agentes insecticidas de contacto, por aspersión en solución y por aspersión en seco. Para el primer caso el experimento se llevó a cabo con un diseño de bloques completos al azar con tres tratamientos:

1. etanol-acuoso 10:90 partes como testigo.
2. glucósidos purificados de *D. mexicana* ( 500 ppm ).
3. glucósidos purif. de *D. composita* ( 500 ppm ).

Se hicieron tres repeticiones por tratamiento con 20 moscas por frasco.

Se observó la supervivencia de las moscas, después de asperjar a las : 0.0, 0.15, 0.30, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, y 24.0 horas.

Los resultados se observan en la siguiente tabla.

TABLA 5 Resultados de la aspersión en solución de los glucósidos de *D. mexicana*, y *D. composita* sobre la mosca de la fruta.

Tratms.	Repts.	0.15	0.30	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	24.0 hrs
Testigo	1	5p	4p	4p	5p	3p	1p	1p	1p	1p	2p
etanol-	2	2p	3p	3p	3p	4p	3p	3p	1m,1p	1m,2p	1m,2p
agua	3	2p	2p	2p	2p	2p	2p	2p	2p	1p	2p
<i>D. mexicana</i>	1	5p	5p	10p	10p	9p	5p1m	5p1m	1m1p	1m5p	1m,5p
	2	14p	14p	11p	11p	8p	6p2m	6p3m	3p3m	5p3m	5p,3m
	3	3m	3p	4p	4p	2p	2p	2p	2p	2p	2p,1m
<i>D. composita</i>	1	3p	3p	3p	10p	11p	9p	10p	8p1m	9p1m	9p,1m
	2	10p	7p	12p	12p	12p	10p	11p	8p1m	8p1m	8p,1m
	3	5p	5p	5p	8p	6p	6p	10p	10p	9p1m	9p,1m

Tiempo de duración : 24 horas.

No de moscas por repetición : 20

p = moscas pegadas a la pared del frasco.

m = moscas muertas.

Para el segundo caso (aspersión en seco) se utilizó el mismo diseño experimental con tres tratamientos:

1. talco como testigo.
2. glucósidos purificados de *D. mexicana* (1000 ppm).
3. glucósidos purificados de *D. composita* (1000 ppm).

Se hicieron tres repeticiones por tratamiento con 20 moscas por frasco.

Se observó la mortalidad de las moscas después de asperjar a las 0.15, 0.30, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0, 12.0, 24.0 horas.

Los resultados se pueden observar en la tabla 6.

TABLA 6 Resultados de la espersion en polvo de los glucósidos de D.mexicana y D.composita sobre la mosca de la fruta

Tratms.	Rep.	0.15	0.30	1.0	2.0	4.0	6.0	8.0	10.0	12.0	24
testigo	1	-	-	-	-	-	-	-	1m	1m	10m
talco	2	-	-	-	-	-	-	1m	3m	3m	14m
	3	-	-	-	-	-	-	2m	6m	6m	11m
-----											
<u>D. composita</u>	talco-	1	-	-	-	-	-	1m	1m	3m	14m
	2	-	-	-	-	-	-	1m	2m	3m	14m
	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1m
-----											
<u>D. mexicana</u>	talco-	1	-	-	-	-	-	-	-	2m	14m
	2	-	-	-	-	-	-	-	4m	4m	10m
	3	-	-	-	-	-	-	7m	11m	12m	14m
-----											

Tiempo de duracion del experimento : 24 horas.

No de moscas por repeticion : 20

m = moscas muertas.

No se obtuvieron diferencias significativas.

#### 4. DISCUSION DE RESULTADOS

La clasificación de las especies del género *Dioscorea* ha sido muy confusa debido al pequeño tamaño de las flores dioicas y a la variabilidad de sus hojas. (1) Las especies mexicanas cuya clasificación se basa en la estructura de la flor masculina, (2) no ha sido la excepción. Esto despierta algunas inquietudes respecto a la clasificación de *Dioscorea mexicana* que tiene un rizoma hemisférico tuberoso, con una corteza con prismas muy diferente a los de las *Dioscoreas* clásicas cuyos rizomas típicos son de formas alargadas y delgadas; ( camotes ) y están sumidos profundamente en la tierra (lo que no sucede con *D. mexicana*), un ejemplo típico es el de *D. composita*.

*D. mexicana* contiene glucósidos cuyos aglucónes son de cadena abierta y están representados por una serie de compuestos aparentemente de transición, que en el medio de la hidrólisis dan origen a diosgenina ( ver hidrólisis GE y GF ). Asimismo contiene también glucósidos cuya sapogenina es de cadena cerrada como los representados en *D. composita* se supone que todos los aglucónes provienen biogénicamente del colesterol. (3)

Los resultados encontrados durante el presente trabajo indican la posibilidad de que se trate de una especie menos evolucionada dentro de la familia de las Dioscoreaceae

Por lo anterior sería conveniente revisar la clasificación de esta planta, tomando en cuenta las características químicas que presenta.

Puede suponerse que el desplazamiento de *D. mexicana* por *D. composita* como fuente principal de diosgenina, "'' no solamente fue debido al mayor rendimiento de la materia prima para la obtención de esteroides sino también a la cantidad de metabolitos secundarios de naturaleza esteroidal que presenta, y que van desde varias sapogeninas de cadena abierta inestables y difíciles de aislar hasta las sapogeninas de cadena cerrada, principalmente diosgenina.

Trabajando con el extracto purificado de rizomas frescos de "cabeza de negro" se obtiene una mezcla compuesta por 5 glucósidos principales y un resto que en c.c.f. permanece en el punto de aplicación de los cuales los primeros cinco lograron aislarse puros y que se mencionan en el texto como glucósidos A, B, D, E y F mex respectivamente.

El glucósido A<sub>max</sub> fue caracterizado como un glucósido precursor directo de la diosgenina, que corresponde por c.c.f. al monoglucósido A del barbasco, y está formado por un resto de glucosa y un aglucón esteroidal del tipo de las isosapogeninas puesto que presenta las señales de absorción en IR ( espectro 2 ) de 890 - 920  $\text{cm}^{-1}$ , para las isosapogeninas. (22)

El hecho de que la hidrólisis de este glucósido, caracterizado en principio como un monoglucósido de diosgenina, origine un producto con R<sub>f</sub> similar a la pennogenina, podría ser explicado por la posible apertura y transformación del componente espiroestánico, a través de una pseudosapogenina. Este tipo de transformaciones han sido ya reportadas. (23)

El glucósido B<sub>max</sub> se caracterizó como un diglucósido precursor de diosgenina con un aglucón del tipo de las isosapogeninas con las señales características en IR de 890 - 920  $\text{cm}^{-1}$  espectro 3. Por cromatografía en capa fina corresponde en revelado y R<sub>f</sub> al diglucósido B del barbasco; Diosgenina-3-O-( $\alpha$ -L-ranopiranosil 1-4 )-( $\beta$ -D-glucopiranosido).

Por el espectro de IR puede decirse que el glucósido no está completamente puro, ya que presenta una banda incipiente de carbonilo de cetona a 1740  $\text{cm}^{-1}$  ; esto se confirma al efectuar la hidrólisis. Por hidrólisis da origen a un monoglucósido, a los azúcares ramnosa y glucosa, y como aglucón a diosgenina así como



a una mancha que parece corresponder a la pennogenina, pero que revela en forma diferente.

Por infrarrojo, la banda de  $C = O$  se acrecienta, lo que hace suponer que esta mancha de  $R_f$  semejante a la pennogenina, esté constituida por un compuesto que posee un carbonilo cetónico. Esto estaría de acuerdo con la hipótesis de que los compuestos carbonílicos son los precursores de los glucósidos espirostánicos y parecería que estos se encuentran originalmente - al menos en pequeñas cantidades - como glucósidos.

El glucósido situado en c.c.f. entre el B y el D, denominado C, no se encuentra libre en la planta y sólo aparece como producto de hidrólisis del glucósido E.

El glucósido D<sub>mex</sub> se encuentra en mayor concentración ( 6.5 % aproximadamente ) en la mezcla total de glucósidos y fue identificado como un triglucósido de diosgenina. Este mismo glucósido se había identificado anteriormente en D. composita y fue caracterizado como Dioscina: ( ver estructura 3 ), diosgenina-3-O-bis (  $\alpha$ -L-ramnopiranosil 1-2,1-4 )-  
 $\beta$ -D-glucopiranosido.

Este glucósido por hidrólisis parcial dió como productos tres glucósidos los cuales correspondieron por cromatografía en capa fina a los identificados en D. composita como

monoglucósido A ( diosgenina-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido ),  
diglucósido B ( diosgenina-3-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil,1-4)-  
 $\beta$ -D-glucopiranosido ) y glucósido C (diosgenina-3-O-( $\alpha$ -L-ramno-  
piranosil,1-2)- $\beta$ -D-glucopiranosido ).

Durante esta hidrólisis sólo se liberó como azúcar a la ramnosa y no fue sino hasta la hidrólisis total que se liberó la glucosa y como aglucón la diosgenina ( espectro 6 ). De esta manera se comprueba que siguió el mismo patrón de hidrólisis que se observa en la Dioscina<sup>(23)</sup> proveniente del barbasco.

El derivado peracetilado del glucósido D mex mostró el mismo punto de fusión de mezcla que el peracetato de dioscina procedente del barbasco. El espectro de IR del derivado se sobrepone al espectro de una muestra auténtica de acetato de dioscina. La estructura fue comprobada por IR y por RMN-H ( espectros 7,8 y 9 ); el espectro de RMN-H del derivado acetilado presenta 5 señales para acetatos situados entre 1.9 y 2.2 ppm, que al adicionar LSR se resuelven como ocho señales desplazándose desde 2.1 hasta 4.2 ppm. Este desplazamiento hasta 4.2 ppm de las dos últimas señales, se debe posiblemente a un exceso de LSR ya que normalmente las señales de los grupos AcO- no aparecen más allá de 3.0 ppm cuando la adición de LSR guarda una proporción aproximada de 1 a 6 en peso con la muestra.<sup>(24)</sup>

Supuestamente el glucósido E posee una sapogenina de cadena abierta, por la coloración rosa intenso que presenta con el reactivo de Ehrlich, característico de sapogeninas furostánicas, (25) (24) y por la fácil conversión a sapogeninas espirostánicas, (25) (27) que se observó al realizar una hidrólisis parcial y total de este glucósido, en la primera da lugar a tres glucósidos espirostánicos A, B, C, y un posible D\* de cadena abierta con tres restos de azúcar en la posición 3 y un -OH en la posición 26 que revela positivo ( rosa intenso ) con el reactivo de Ehrlich. La posibilidad de que se presente un OH libre en 26 está dada por dar prueba positiva de Ehrlich y de que por RMN, se presentan señales sólo para 4 restos de azúcar o bien puede tener dos restos de azúcar en la posición 3 y uno en la posición 26 ( figura 4 (II) ).

Los glucósidos A, B, C y D\* a que da origen, aparecen simultáneamente en las condiciones del experimento ( 15 min de intervalo en la toma de la muestra de hidrólisis ). Se presume que la formación de los glucósidos A (IV), B (III), C (V) y D\*(II) se realiza por pérdida simultánea de una molécula de glucosa ( o ramosa ) de -O 26 y una o dos moléculas de ramosa de -O 3 según se esquematiza en la figura 4.

El glucósido C (V) y el D\* (II) son productos simultáneos de la hidrólisis del glucósido E (I), puesto que aparecen al mismo tiempo . Esto explica también el corrimiento en c.c.f. del glucósido D\* (II) por debajo del triglucósido D espirostánico, considerando mayor polaridad para el furostánico.

Se considera que el glucósido C de diosgenina es un isómero del glucósido B de diosgenina<sup>(3)</sup> en el cual una ramosa está unida a la glucosa en la posición 1 - 2, mientras que en el glucósido B lo hace en la posición 1 - 4. La aparición del glucósido B (II) indica que hay dos azúcares unidos a un resto de azúcar por las posiciones 1 - 2 y 1 - 4, y un cuarto resto de azúcar que puede estar unido a en C 26. El glucósido E (I) al perder un primer resto de azúcar da lugar al triglucósido (II), el glucósido A(IV) puede ser originado de manera secuencial tanto de (III) como de (V) o bien puede formarse del (I) como se muestra en la figura 4.

Por la RMN-H se supone la estructura como un tetraglucósido esteroidal, el espectro del derivado acetilado presenta 8 señales para los acetatos en el campo alto de 2 a 2.25 ppm. Al adicionar el reactivo de desplazamiento (LSR), se esperaba un desplazamiento de estas 8 señales para dar 10 a 12 señales y comprobarse la estructura como un tetraglucósido. Sin embargo el glucósido se descompuso con el reactivo, y no aparece ninguna señal para los acetatos, por lo que se sospecha que interactuó liberando los acetatos y cerrando la cadena lateral para formar sapogeninas de descomposición, lo cual fue observado al recuperar el material del LSR con una mezcla de cloroformo, metanol 1:1 y correr en cromatografía en capa fina.

No fue posible caracterizar la sapogenina original del glucósido ya que la hidrólisis con ácidos minerales generalmente cierra la cadena lateral formando sapogeninas espiroestánicas<sup>(\*) (23)</sup>.

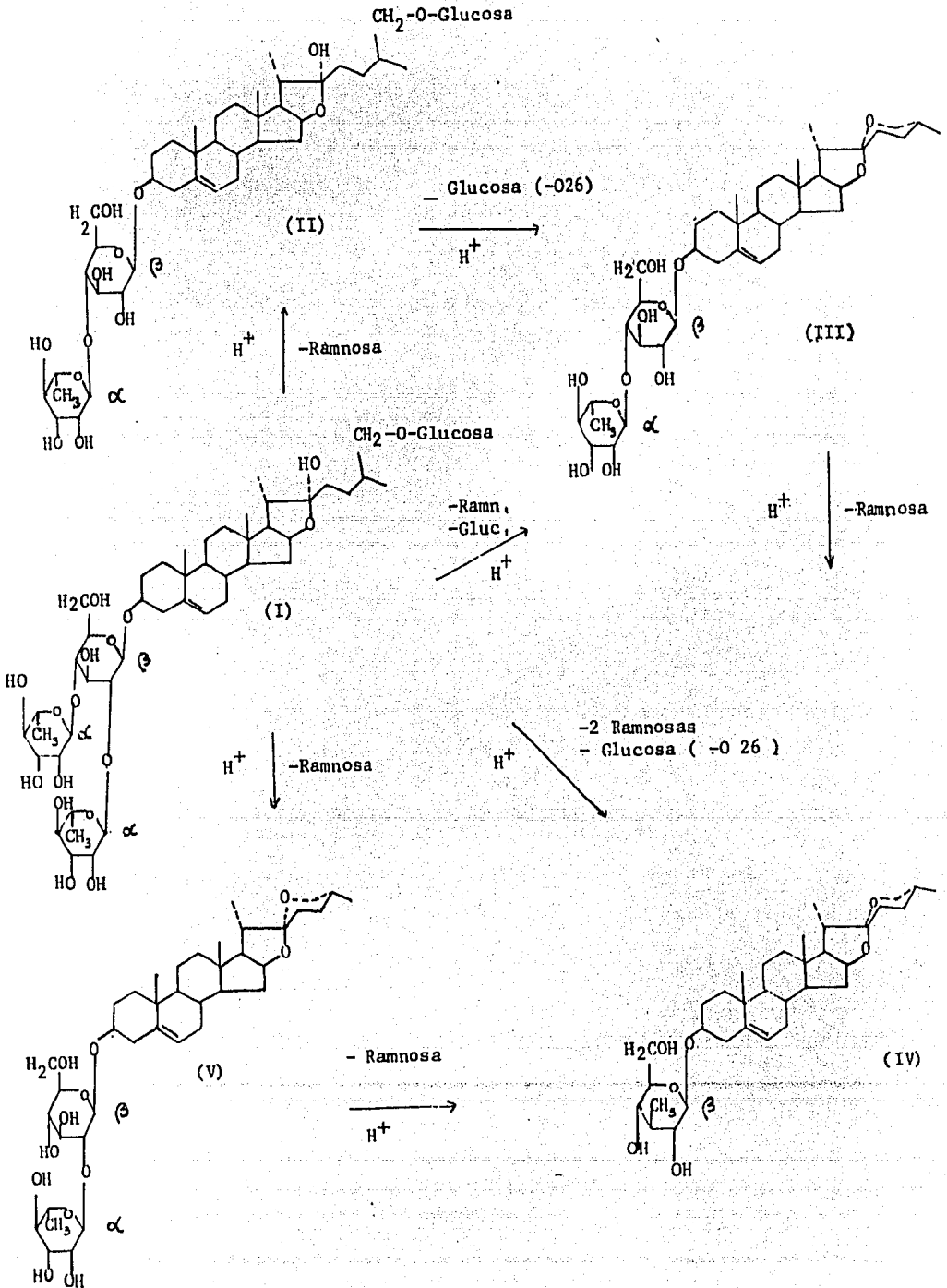
Para este caso la sapogenina liberada se cierra pasando a través de varios compuestos de transición hasta formar diosgenina. No obstante, no es imposible aislar las sapogeninas de esta serie de transición, pues existe la posibilidad de emplear enzimas para la hidrólisis y de separarlas por cromatografía de líquidos<sup>(20)</sup> o bien de gases<sup>(11)</sup> y posteriormente determinar el peso molecular por espectroscopia de masas. En el estado presente de la investigación la caracterización de este glucósido sólo puede proponerse como la de un tetraglucósido furostánico precursor de diosgenina .

El glucósido F presenta características semejantes en cuanto a su naturaleza furostánica, pero difiere en el comportamiento de la hidrólisis ácida dando un posible par de isómeros espirostánicos para un compuesto con R<sub>f</sub> semejante a un monoglucósido y otro para compuestos de polaridad semejante al triglucósido D. La formación de estos compuestos aparece de manera simultánea en las condiciones de reacción (intervalo de 15 min en la toma de muestra de hidrólisis ); las sapogeninas liberadas tienen un comportamiento semejante (no igual) al observado en el glucósido E .

La diferencia entre estos dos glucósidos parece estar principalmente en el número y unión de los azúcares , aunque como se discute más adelante existe la posibilidad de que se trate de un glucósido de una sapogenina diferente a diosgenina

Su derivado peracetilado en RMN-H muestra unicamente 6 señales en el campo alto de 1.9 a 2.1 ppm para los acetatos, al tratarse de un tetraglucósido como el glucósido E debería tener de 7 a 8 señales si tuviera los mismos azúcares, lo que hace suponer un cambio en el número de ramosas que lo constituyen así como las uniones entre ellas. Por otra parte la región de C - H correspondiente a la estructura hidrocarbonada policíclica del aglucón que incluye a los metilos angulares (0.8 - 1.3 ppm) muestra diferencias con los espectros de R.M.N. de otros glucósidos precursores de diosgenina. Esto permite caracterizarlo de manera preliminar como un tetraglucósido de cadena abierta diferente al glucósido E y precursor de diosgenina y de otra sapogenina diferente.

Es posible que se trate de un glucósido de tipo pseudosapogenina ya que presenta una banda de doble enlace particularmente intensa en relación a las otras sapogeninas que contienen solo un doble enlace.



Con relación a las pruebas de las mezclas purificadas sobre los insectos, en el caso del insecto no volador (*Tenebrio molitor*) esta mezcla tiene un fuerte efecto como reductor de la digestibilidad que se observa por el decremento en el peso de las larvas y por un retraso en el proceso de la metamorfosis, en este caso la interrupción del paso de larva a pupa (ver figura 5) . Para fines prácticos estos resultados no representan utilidad si se buscan efectos insecticidas, puesto que la mezcla purificada no produce la muerte de los insectos, solo prolongan la fase larvaria indefinidamente o al menos durante la administración de los glucósidos, lo cual no es conveniente con fines prácticos, puesto que la fase larvaria es la etapa en la cual los insectos requieren de mayores cantidades de alimento. Pero en cambio pueden tener interés para el estudio de la fisiología entomológica lo cual no es el objetivo de este trabajo

Para el caso de la mosca de la fruta, la mezcla de glucósidos tiene un efecto letal cuando se administra por vía oral pudiendo observarse este efecto en la tabla 3 y en la figura 6, donde sólo puede considerarse al testigo A como válido para contraste de los tratamientos. Los testigos B y C produjeron un 84 y 94 % de mortalidad causada por el talco que es una sustancia inorgánica no metabolizable y acumulable, y que puede interferir bloqueando túbulos respiratorios o bien almacenándose intracelularmente.

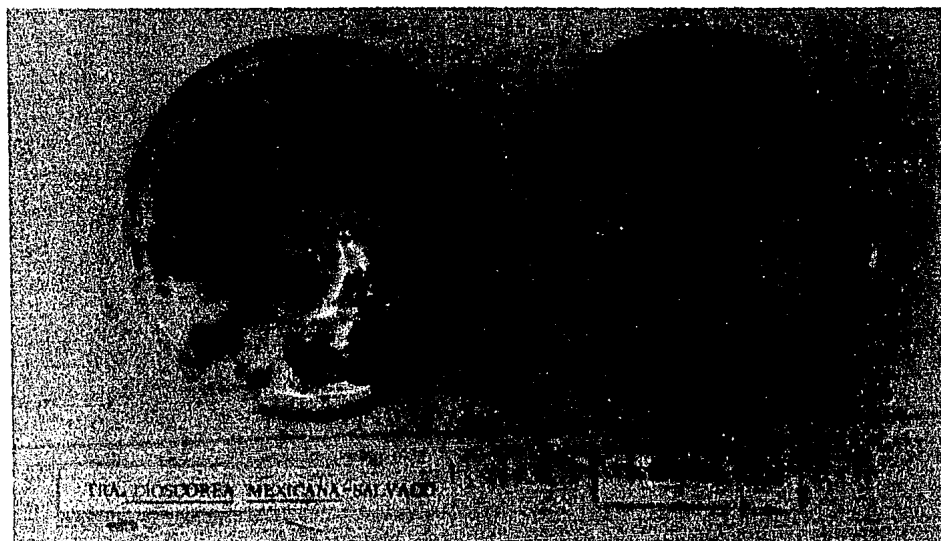


En el diseño experimental empleado en este trabajo se incluyeron estos testigos con el objeto de tener un control con alimento más una sustancia inerte, a semejanza de los tratamientos con alimento + merca purificada de ambas especies.

En el segundo experimento realizado con la aplicación de los glucósidos por contacto, asperjando una solución o el polvo finamente pulverizado, se presentaron problemas que no permiten llegar a una conclusión válida. El principal problema fue que las pupas de la mosca de la fruta además de un bajo porcentaje de emergencia no presentaron una viabilidad uniforme. Los adultos emergentes cualquiera que fueran los tratamientos presentaban ligeras diferencias fenotípicas comparadas con las moscas de experimentos anteriores, por ejemplo una diferente coloración en los ojos de algunas, la emergencia parcial de la envoltura puparia y su muerte en ese momento, así como variantes en la forma de las alas (arrugamiento). Estas características hacen suponer que se llevó a cabo el experimento con una cepa defectuosa de Anastrepha ludens.

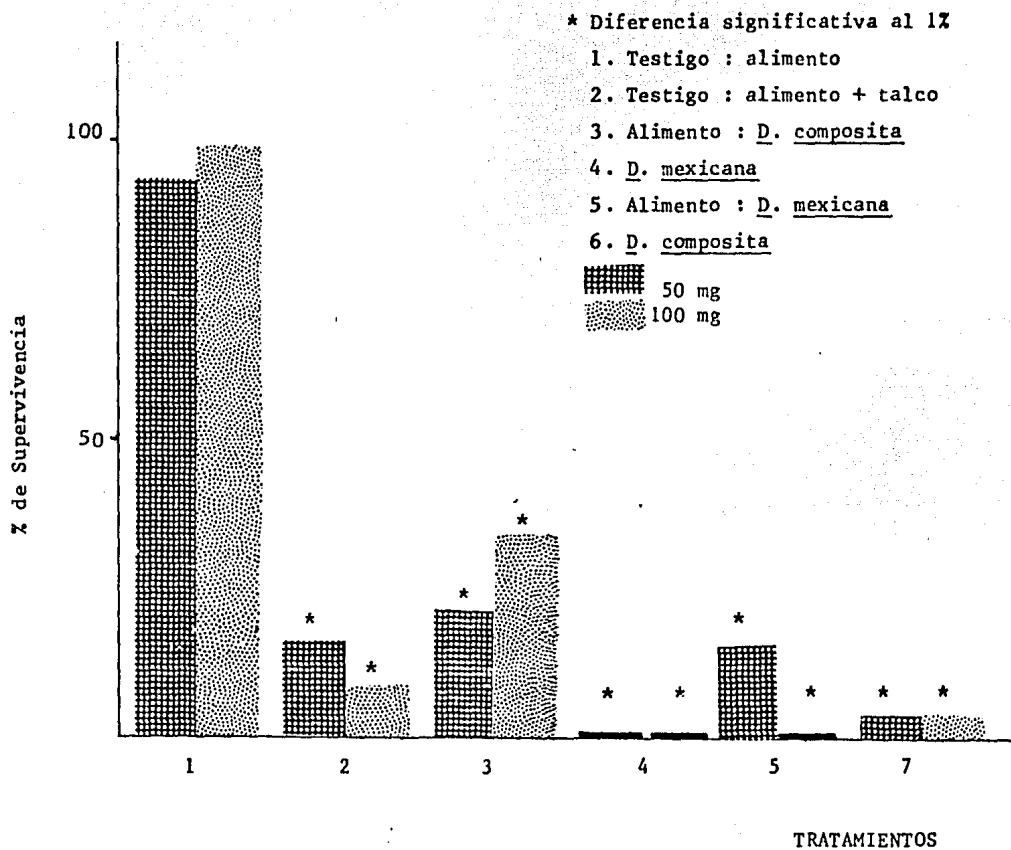
Por esta razón se sugiere, para un próximo experimento el mantenimiento del cultivo de los insectos de prueba en el laboratorio y la realización de pruebas preliminares a las pruebas biológicas, para poder contar con la seguridad de uniformidad en la emergencia y viabilidad de las moscas.

Figura 5

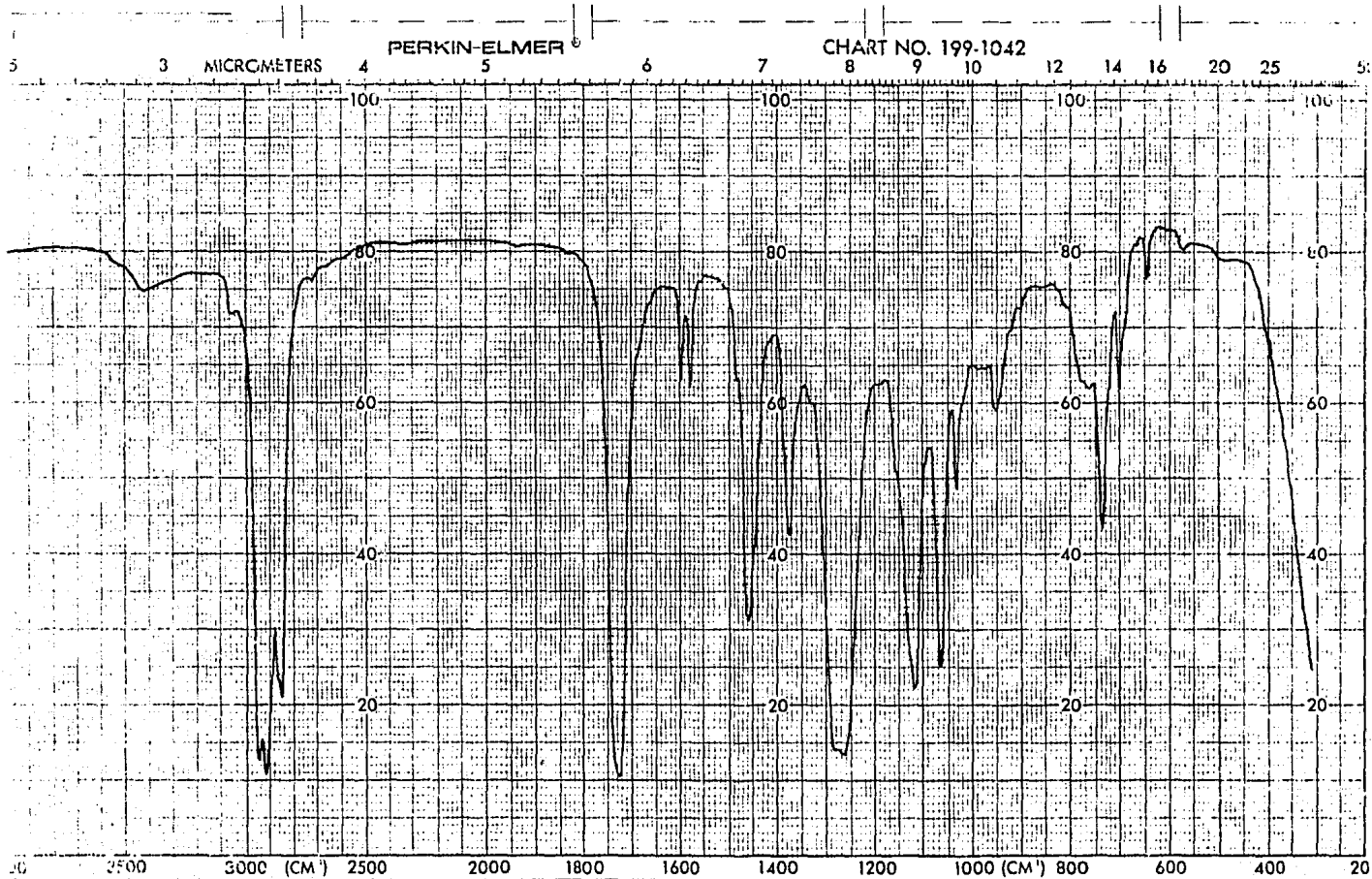


Efecto de los glucósidos purificados de *D. composita* y *D. mexicana*, sobre el insecto de prueba *Tenebrio molitor*.

Figura 6

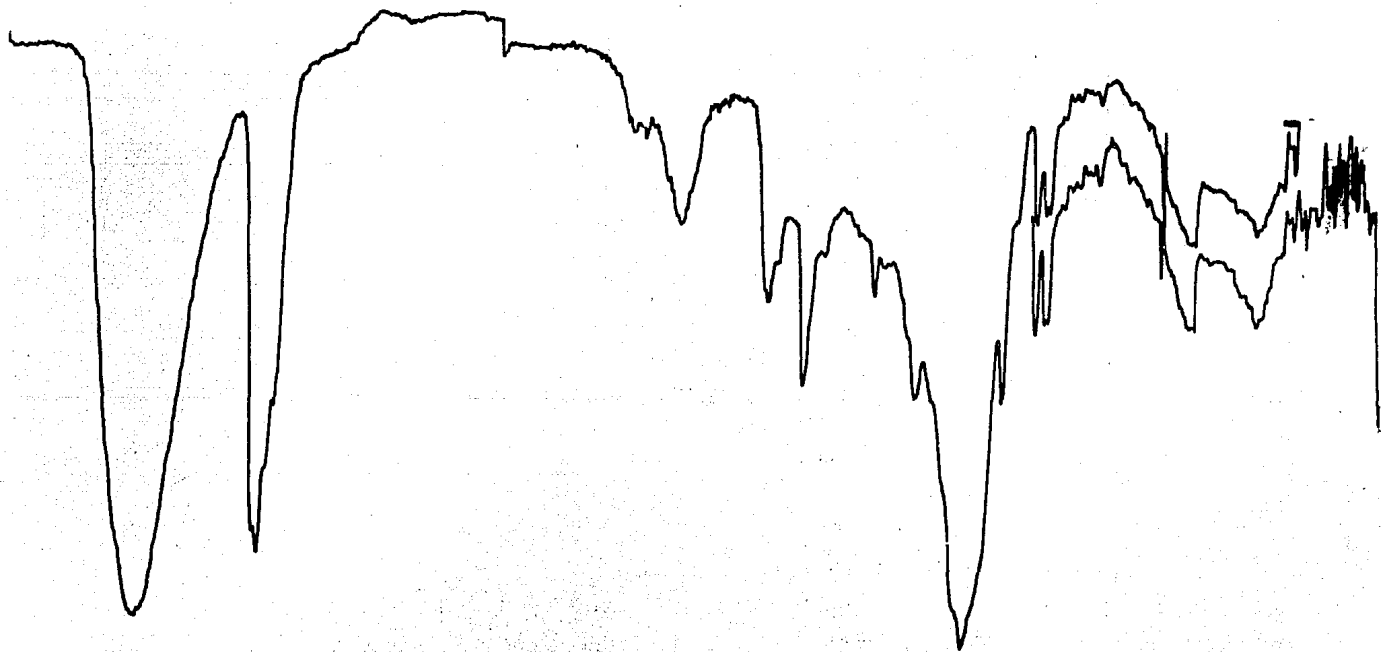


Porcentaje de supervivencia de la mosca de la fruta: Anastrepha ludens después de los tratamientos con glucósidos de D.composita y D.mexicana.



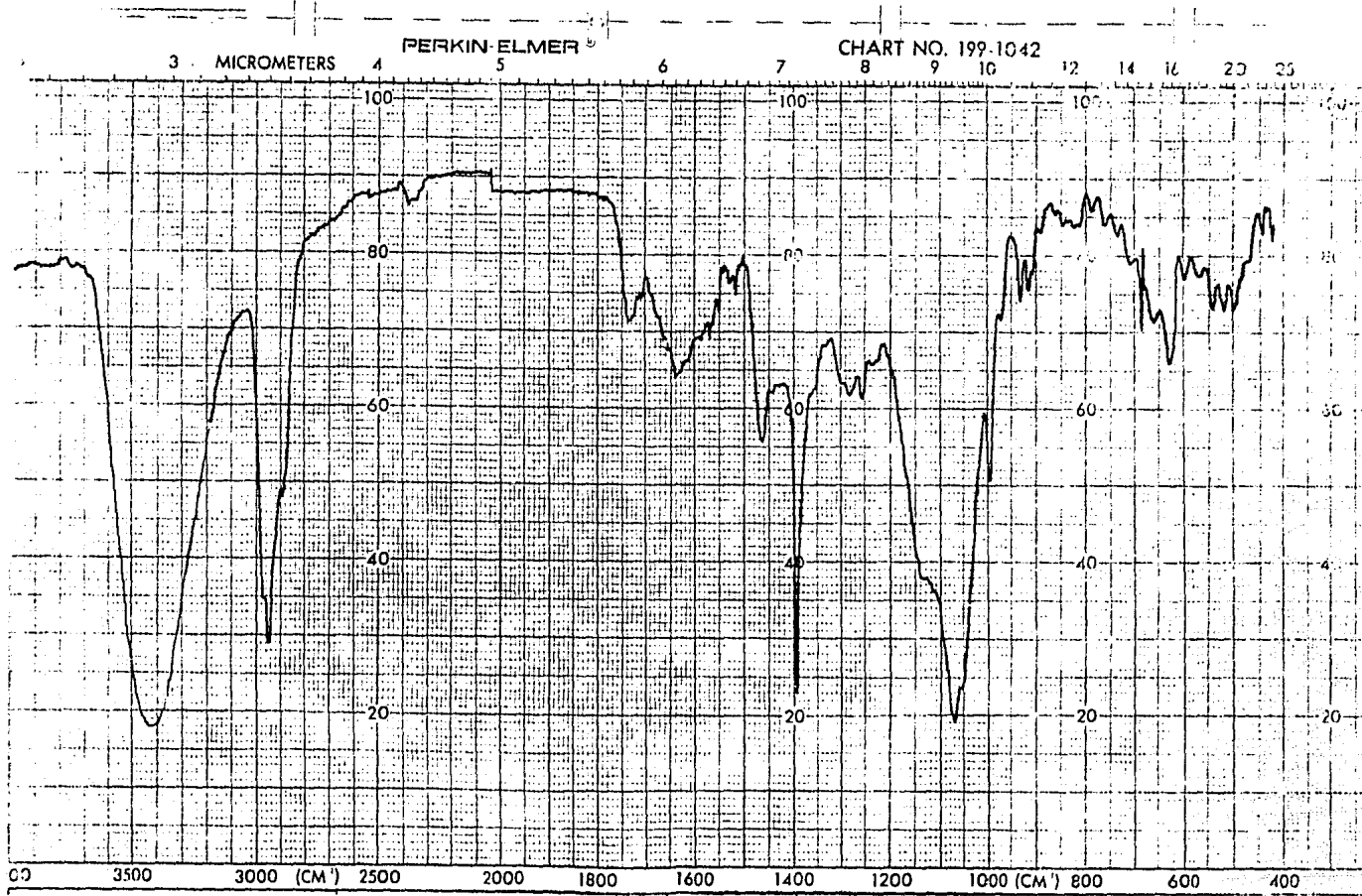
ESPECTRO N° 1

IR SAPOGENINA



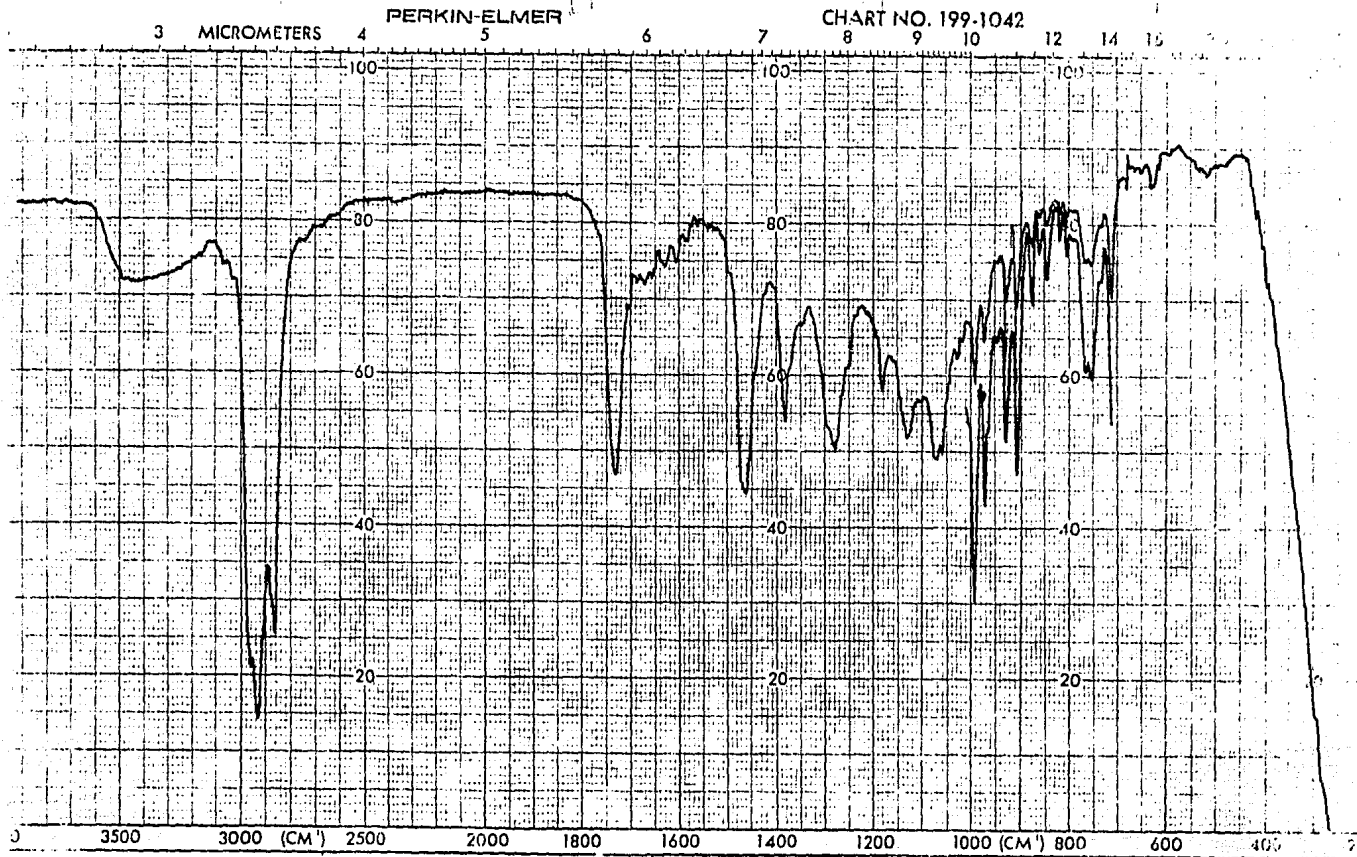
ESPECTRO N° 2

IR GLUCOSIDO A



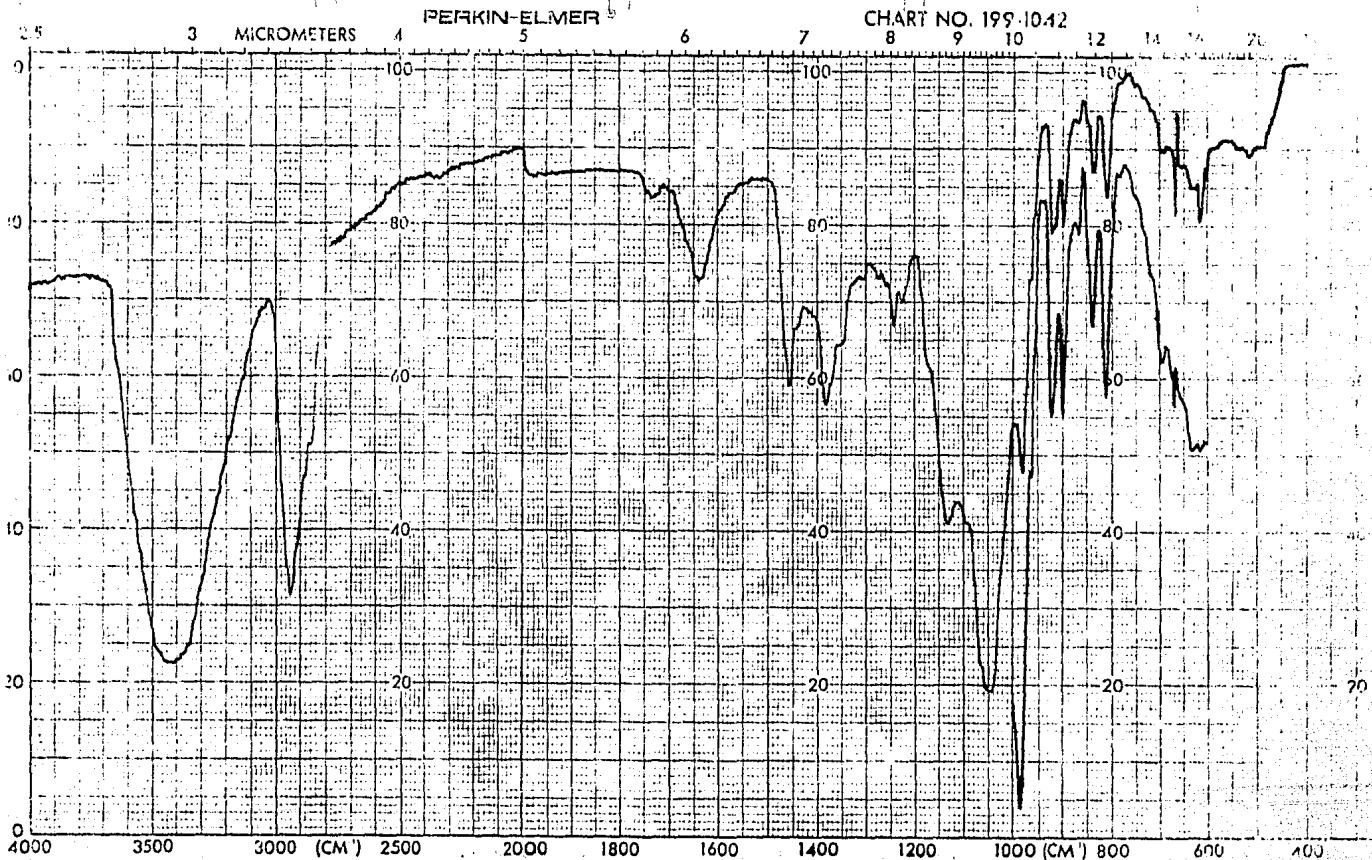
ESPECTRO N° 3

IR GLUCOSIDO B



ESPECTRO N° 4

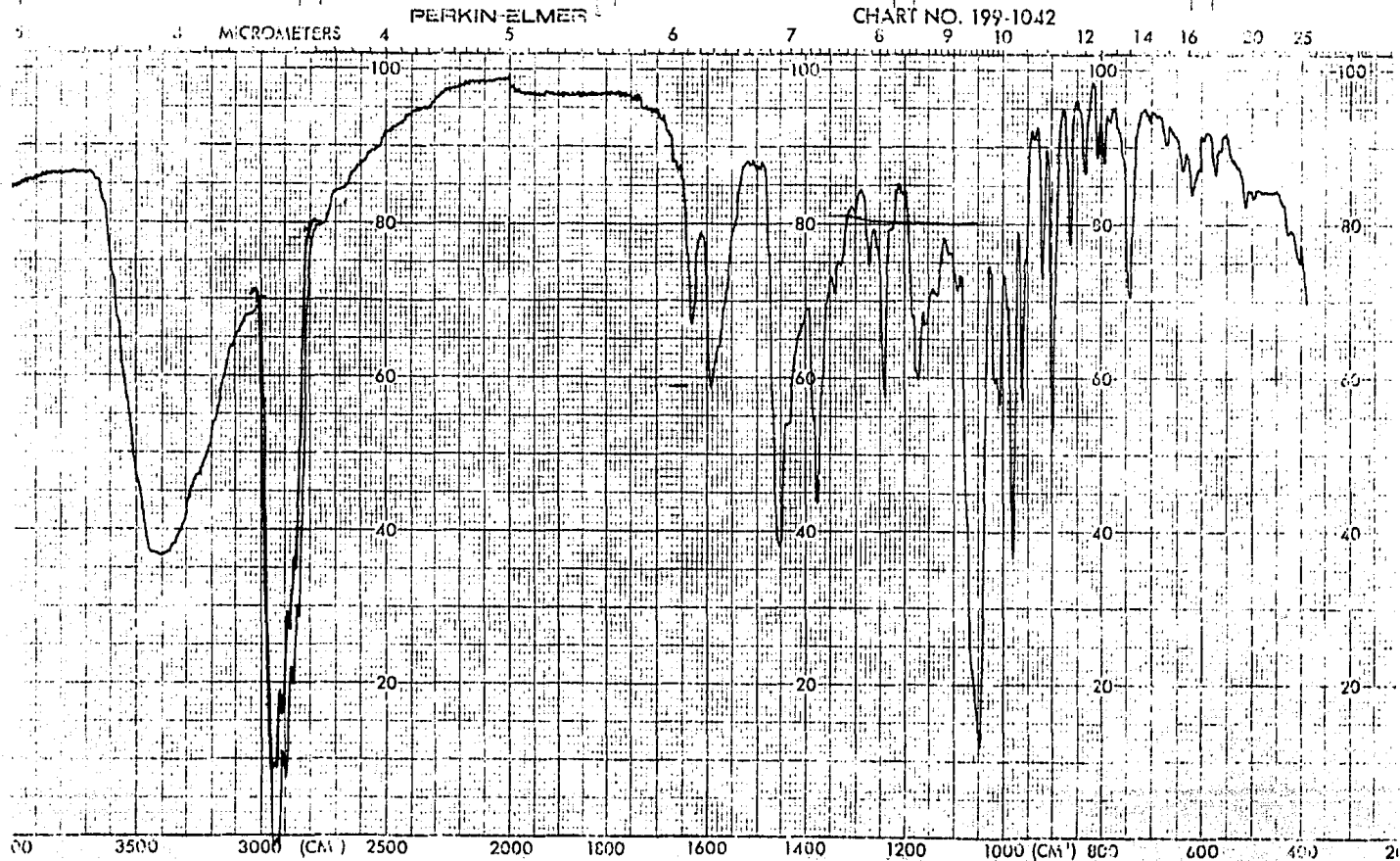
IR SAPOGENINA DEL GLUCOSIDO B



ESPECTRO N° 5

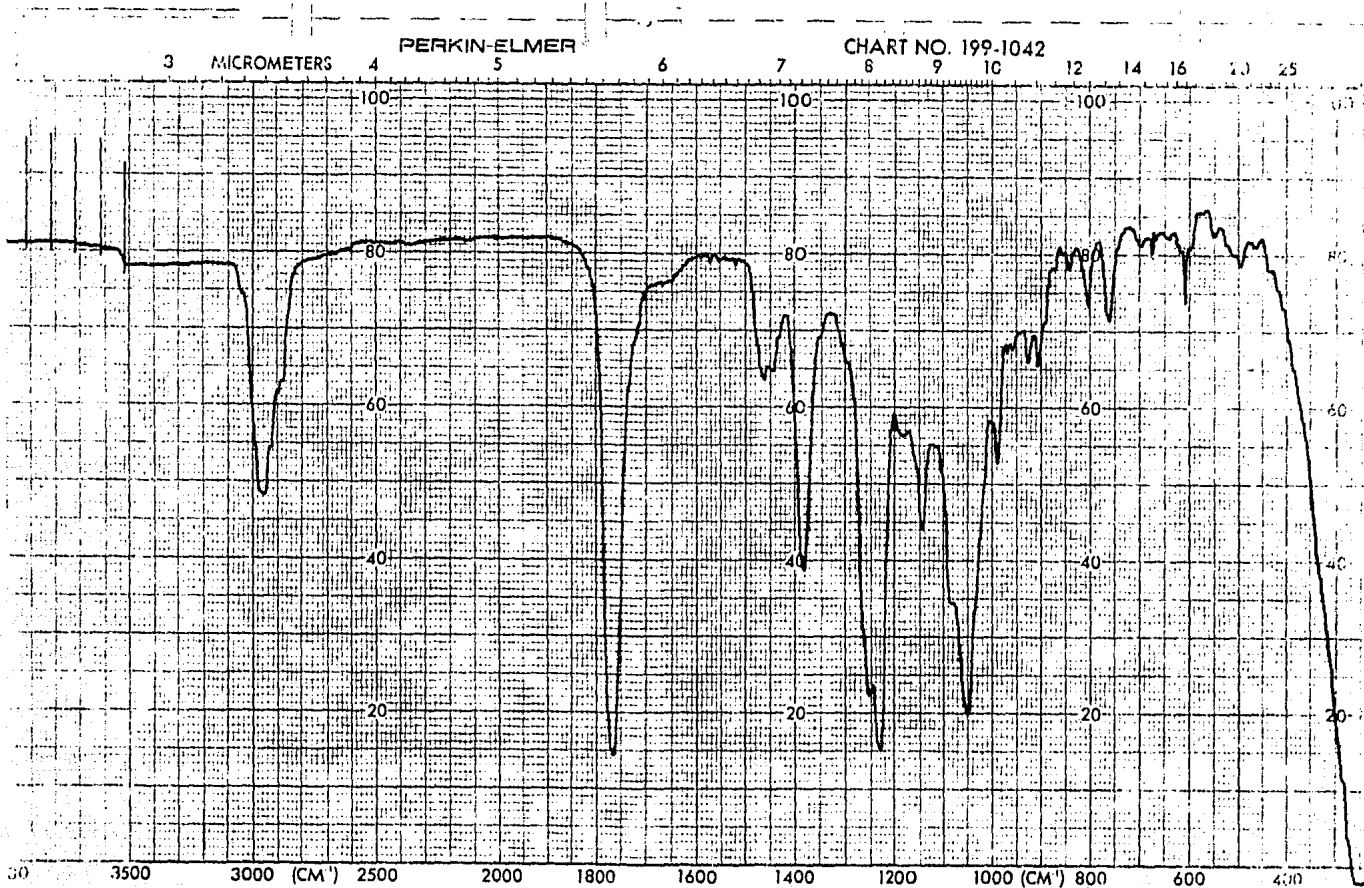
IR GLICOSIDO D





ESPECTRO N° 6

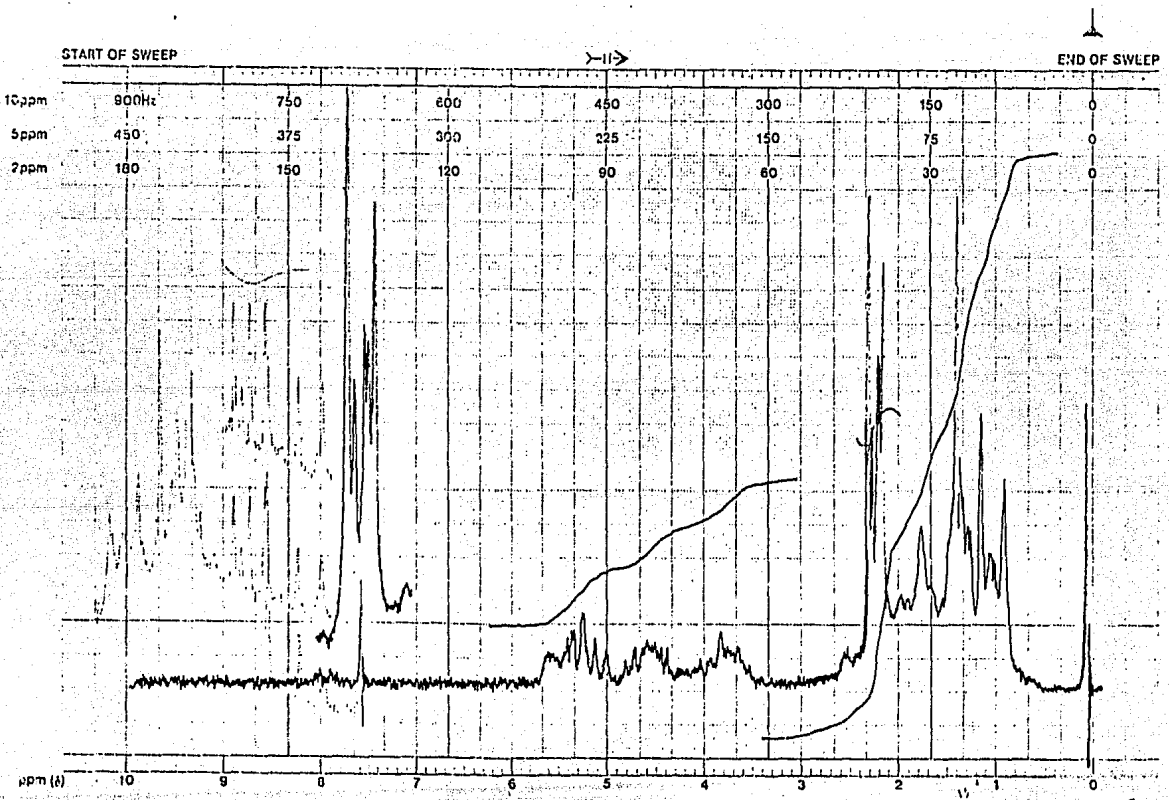
IR SAPOGENINA DEL GLUCOSIDO D



ESPECTRO N° 7

IR GLUCOSIDO D PERACETILADO

varian instrument division  
 scale alla cella J



EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

ESPECTRO N° 8

R.M.N. - II. GLUCOSIDO D PERACETILADO

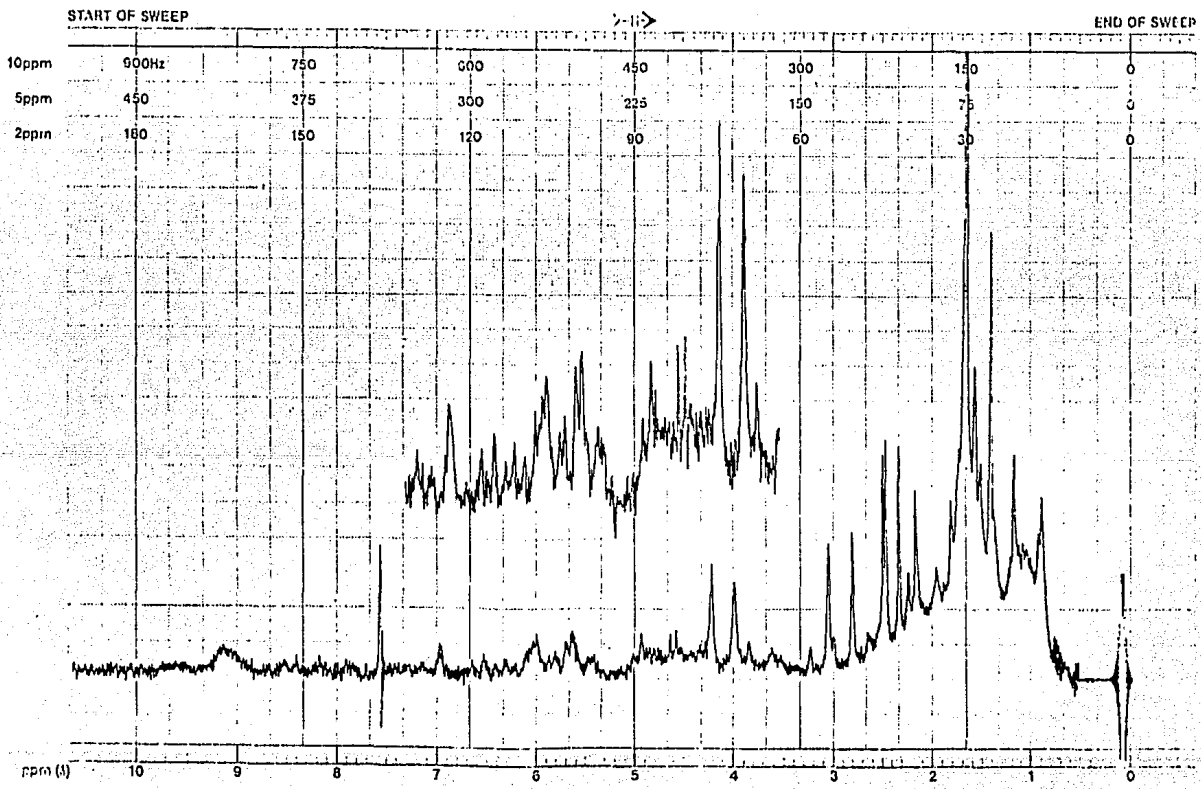
PRINTED IN U.S.A.

PATENT 3,425,132



varian instrument division

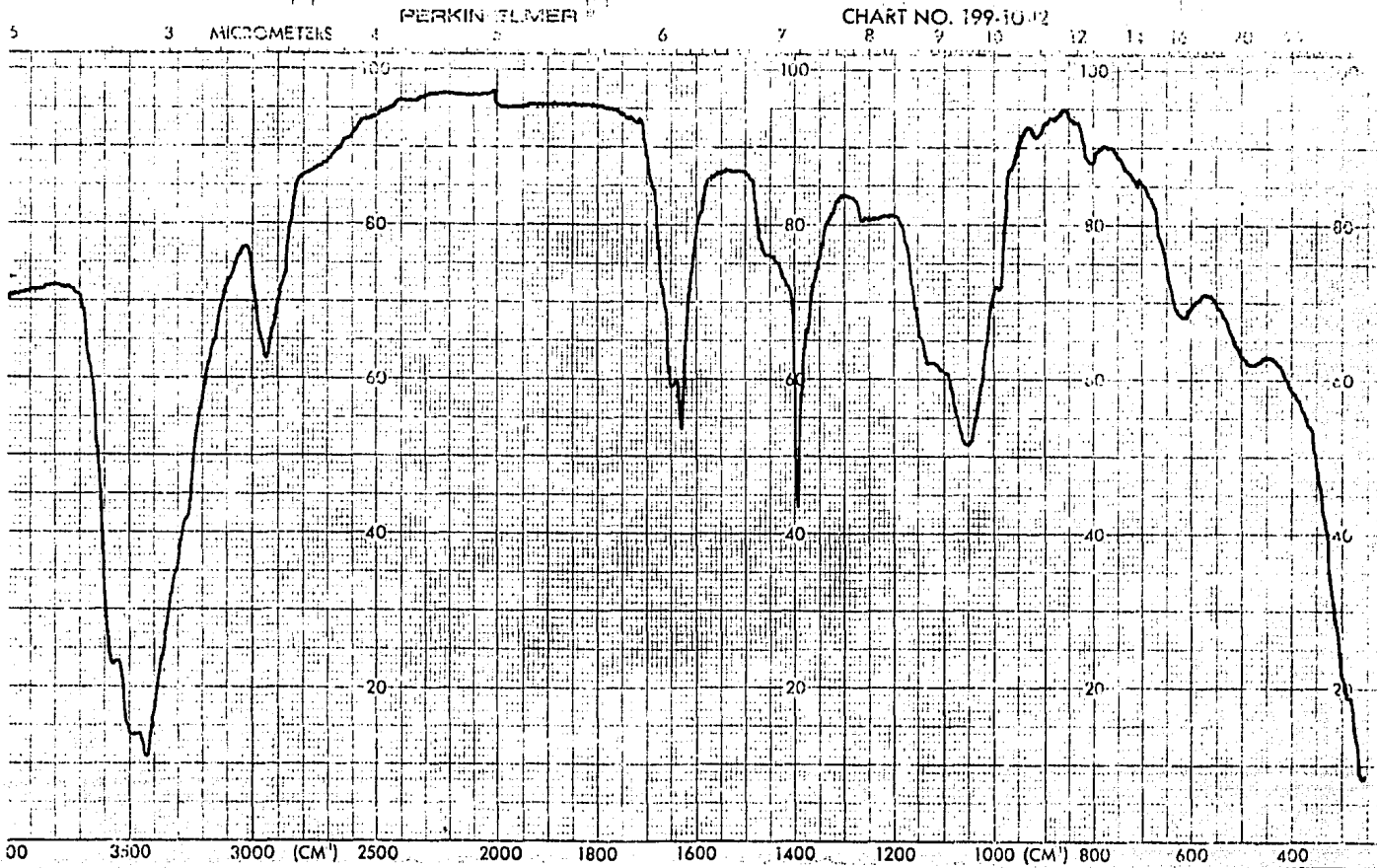
Palo Alto, Calif. 94303



EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

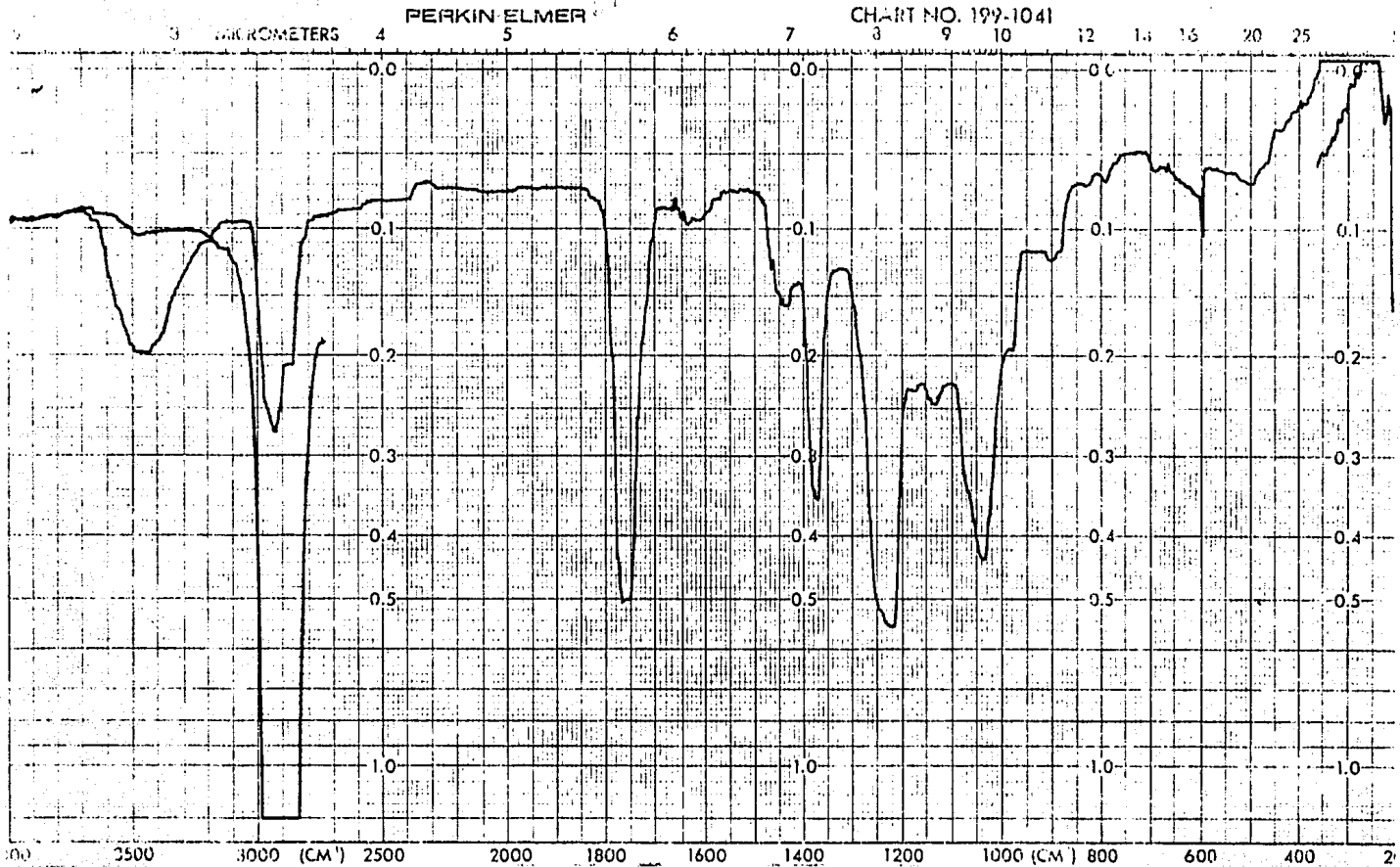
ESPECTRO N° 9

R.M.N. - H. GLUCOSIDO D PERACETILADO + LSR.



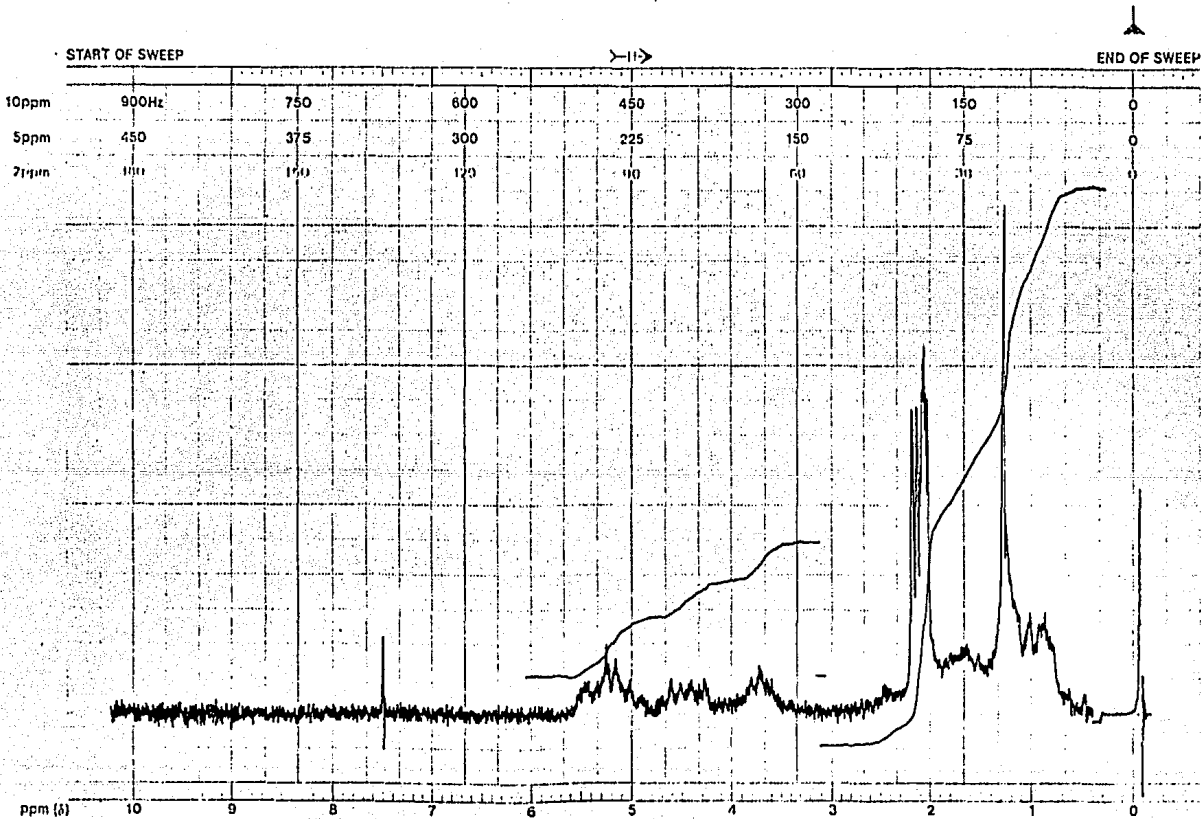
ESPECTRO N° 10

IR GLUCOSIDO E



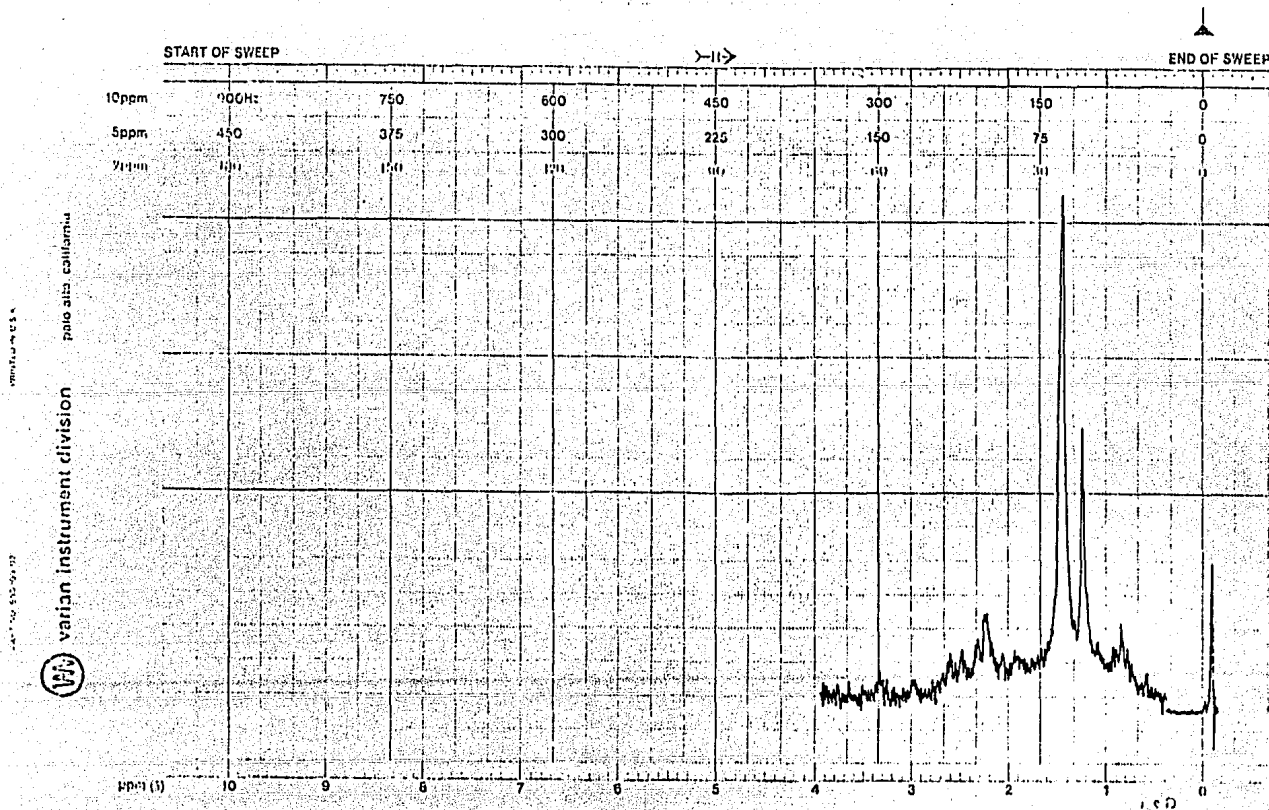
ESPECTRO N° 11

IR GLUCOSIDO E PERACETILADO



ESPECTRO N° 12

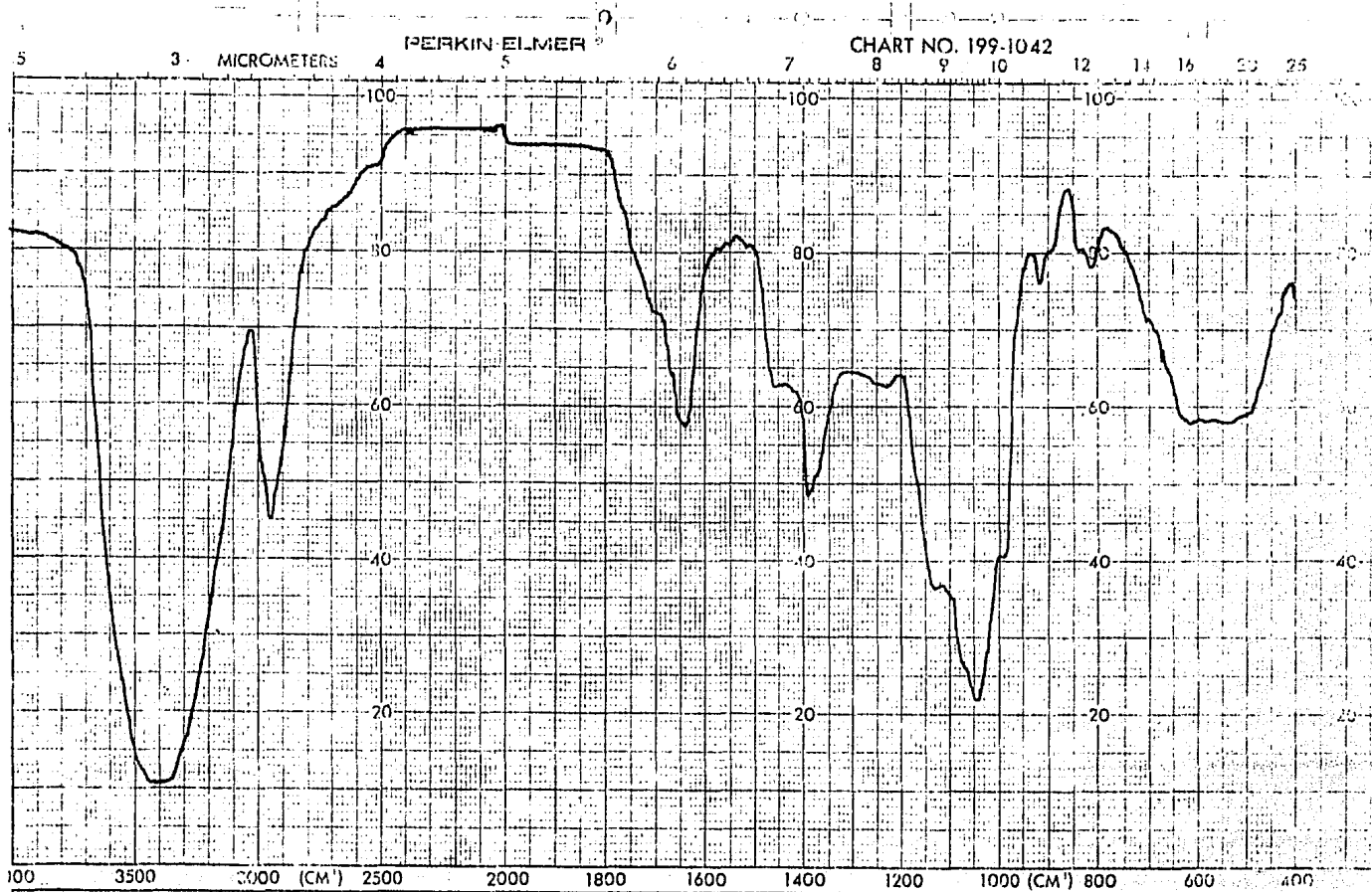
R.M.N. - H. GLUCOSIDO E. PERACETILADO



ESPECTRO N° 13

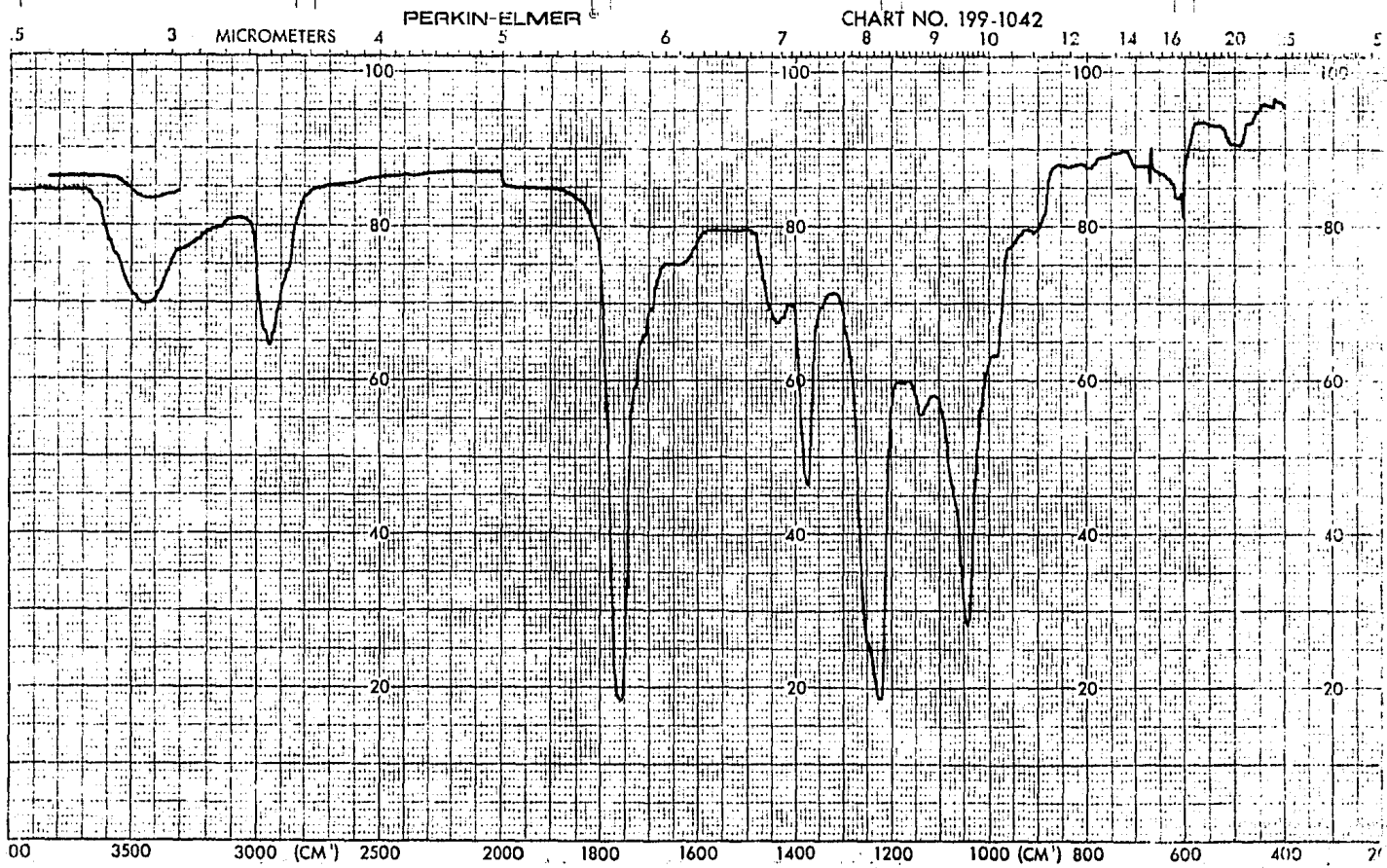
R.M.N. - H. GLUCOSIDO E PERACETILADO + LSR.





ESPECTRO N° 14

IR GLUCOSIDO F



ESPECTRO N° 15

IR GLUCOSIDO F PERACETILADO

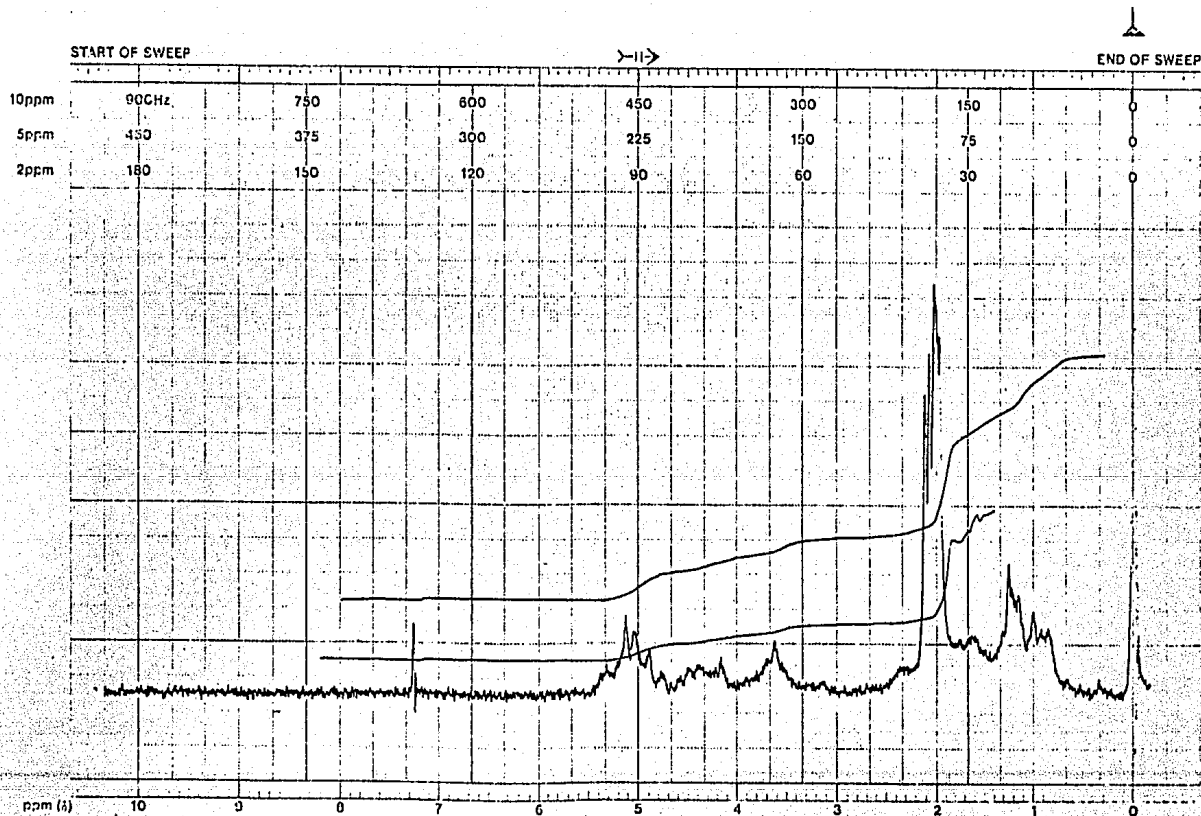
REVISED 1-6-64

MODEL A-60



varian instrument division

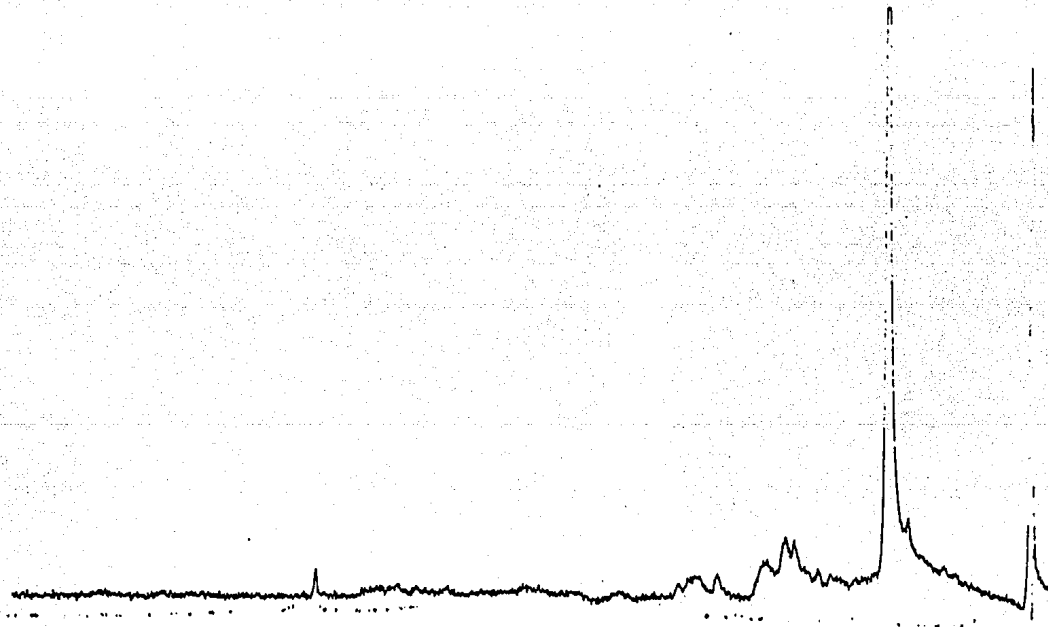
pasadena, california



EM-390 90 MHz NMR SPECTROMETER

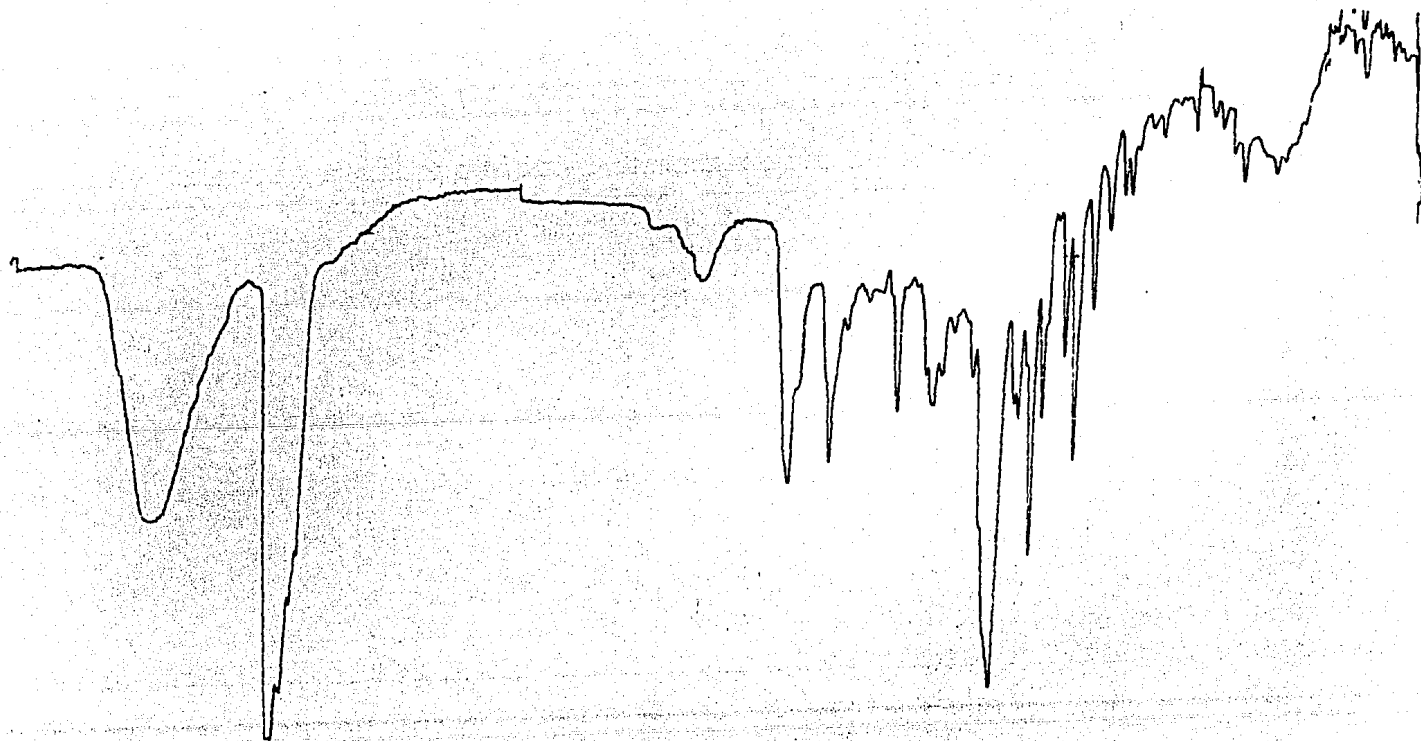
ESPECTRO N° 16

R.M.N. - H. GLUCOSIDO F PERACETILADO



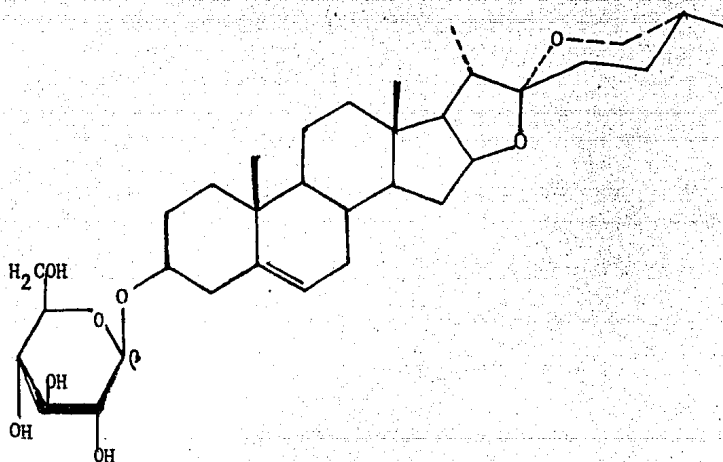
ESPECTRO N° 17

R.M.N. - H. GLUCOSIDO F PERACETILADO + LSR.



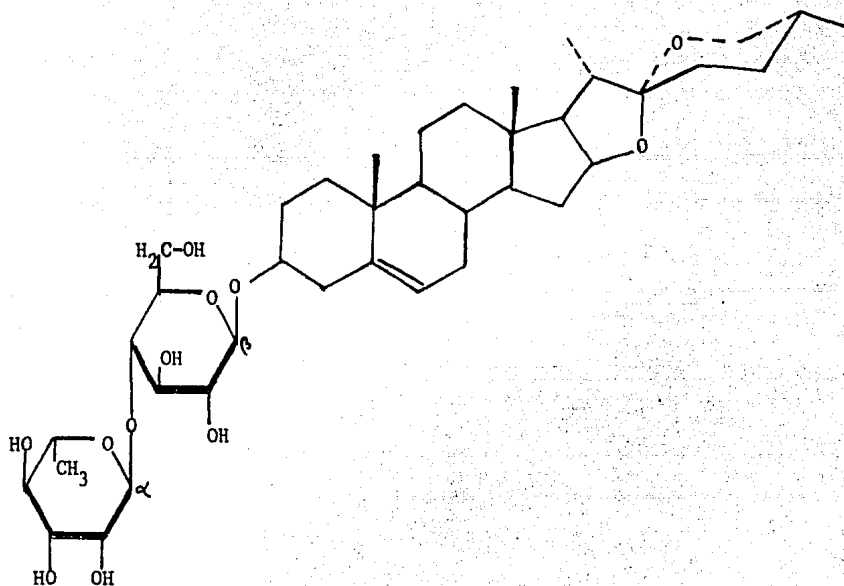
ESPECTRO N° 18

IR DIOSGENINA.



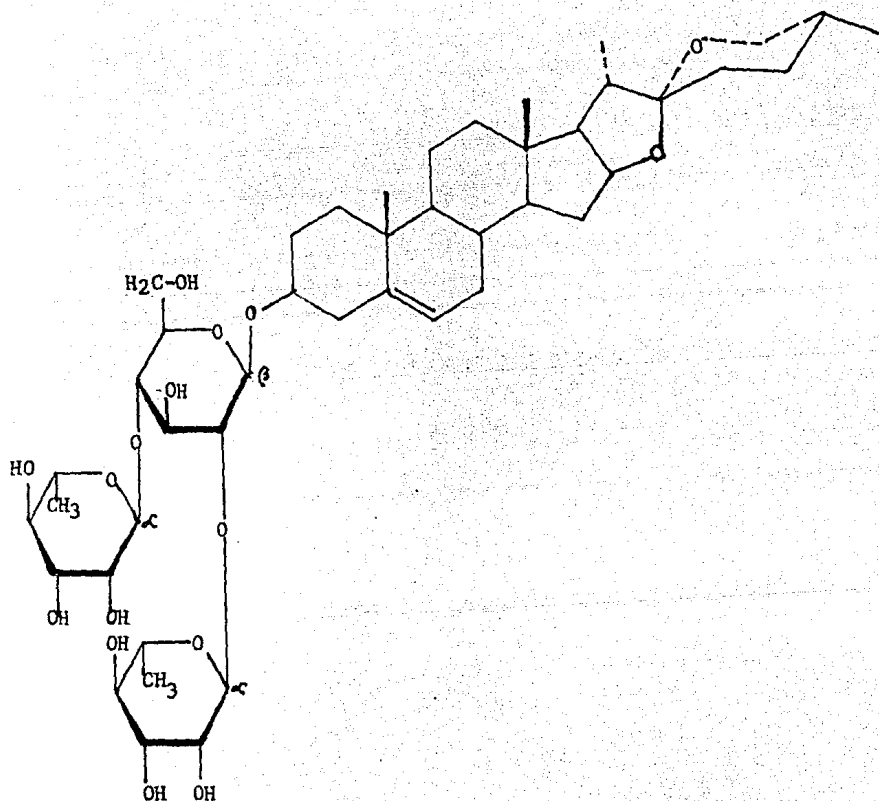
ESTRUCTURA I. GLUCOSIDO A

Diosgenina-3-O-β-D-glucopiranosido



ESTRUCTURA 2. GLUCOSIDO B

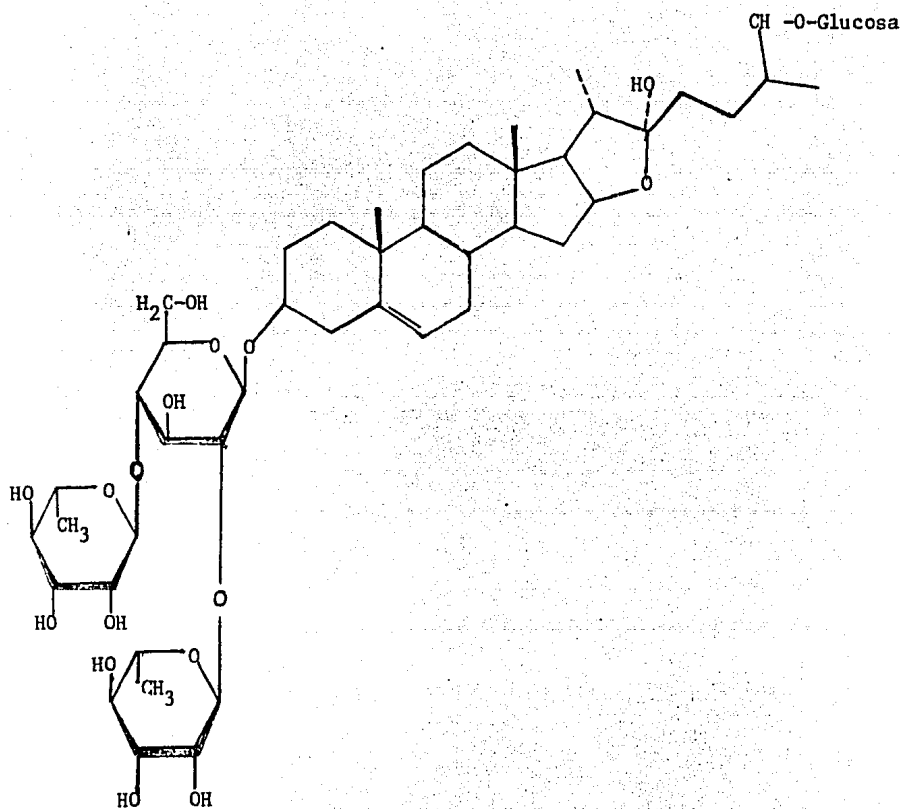
Diosgenina-3-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil,1 - 4)- $\beta$ -D-glucopiranosido



ESTRUCTURA 3, GLUCOSIDO -D

Diosgenina-3-o-bis( $\alpha$ -L-ranopiranosil 1-2, 1-4)- $\beta$ -D-glucopiranosido





ESTRUCTURA 4. GLUCOSIDO E

### 3. CONCLUSIONES

1. En el extracto de glucósidos purificados de *D. mexicana* ( cabeza de negro ) no existen azúcares libres.
2. No se identificaron saponinas libres en el extracto purificado de *D. mexicana*.
3. Se propone para un monoglucósido A, como un glucósido espirostánico formado por diosgenina y una molécula de glucosa ( ver estructura 1 pag. 98 ), la siguiente estructura  
 Diosgenina-3-O- $\beta$ -D-glucopiranosido.
4. Se propone para un diglucósido B como diosgenina-ramnosa-glucosa (ver estructura 2 pag. 99 ), la siguiente estructura  
 Diosgenina-3-O-( $\alpha$ -L-ramnopiranosil,1-4)- $\beta$ -D-glucopiranosido
5. Se identifica un triglucósido D (ver estructura 3 p. 100) con la siguiente estructura  
 Diosgenina-3-O-bis( $\alpha$ -L-ramnopiranosil 1-2,1-4) $\beta$ -D-glucopiranosido
6. Se identifica en forma preliminar al glucósido E furostánico como un tetraglucósido precursor de los glucósidos A y B de diosgenina en el extracto purificado (ver estructura propuesta 4 pag 101, y figura 4 (I) pag. 75 )
7. Se identifica en forma preliminar al glucósido F como un tetraglucósido furostánico precursor de diosgenina.
8. La mezcla purificada de glucósidos de *D. mexicana* tiene efecto reductor de la digestibilidad, sobre el insecto *Ixobrya molitor*.
9. La mezcla purificada de glucósidos de *D. mexicana* tiene un efecto letal por vía oral sobre la mosca *Anastrepha ludens*.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. Marker, R.E., D.L. Turner and P.R. Ulshafer J. Am. Chem. Soc. 62, 2542 (1940).
2. Jung, C.J., Contribución al Estudio de los Glucósidos de *Dioscorea mexicana*, Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM (1975).
3. Campos, LL., Glucósidos de *Dioscorea composita*, Tesis profesional, Facultad de Química, UNAM, (1977).
4. Espejo, O., et al Phytochemistry 21,2,413-416 (1982).
5. Matuda, E., Anales del Instituto de Biología UNAM XXIV (1953).
6. Pigman, W., The Carbohydrates, Academic Press Inc. 1957.
7. Ballow, C.E. Advances in Carbohydrate Chem. 9, 59 (1954).
8. Dische, Z., Biochem. Analysis II, 313 (1967).
9. Wall M.E., Seruta and I.P. Witanaver, J. Am. Chem. Soc. 77, 3080 (1955).
10. Nelson, N., J. Bio. Chem. 153, 375 (1944).
11. Toshio Kawasaki and Tatsuo Yamauchi  
Chem. Pharm. Bull. 16 (6) 1070-1075 (1968).
12. Kasai R., et al Tetrahedron Letters 2, 179 (1977).
13. Tori K., et al Tetrahedron Letters 2, 179 (1977).
14. Lonioux, R.U., Ratcliffe, R.M., Arreguin, L.B.,  
Romo de Vivar, A., Castillo, M.J. Carbohydr. Res, 35.  
113-20 (1977).

15. Klyne W., *Biochem. J.*, 47, XII (1950).
16. Storer T.I., R.L. Usinger, *Zoología General 2a Edición*  
Ed. Omega S.A. Barcelona 1961.
17. Ross H.H., *Introducción a la Entomología General y*  
*Aplicada (t.Inglés 2a Ed.)* Ed. Omega Barcelona 1973.
18. Rosas M.A., *Mecanismos de Defensa en Datura sp Tesis*  
*Profesional, Facultad de Ciencias, UNAM (1983).*
19. Rosenthal and Janzen, *Herbivores their interaction*  
*with secondary plant metabolites.* Academic Press 1979.
20. Riegel K., *Química Industrial, Ed.Grijalbo México.1964*
21. Richards J.H., *The Biosynthesis of Steroids, Terpenes*  
*and Acetogeninas., W.A.Benjamin, Inc. New York 1964.*
22. Rothman E.S., E.Monroe Wall, C.R.Eddy, *J.Am.Chem.Soc.*  
74, 4013 (1952).
23. Kaufmann S.T., and G. Rosenkranz *J. Am. Chem. Soc.*  
70, 3502 (1948).
24. Cruz D.C., *Resonancia Magnética Nuclear de Glucósidos,*  
*Tesis Profesional, Facultad de Química, UNAM (1981).*
25. Joly R.A., J. Bonner and E. Heftman, *Phytochemistry,*  
8, 857 (1969).
26. Kurosawa S., and M. Hutioh, *Chem. Pharm. Bull*  
16, 1162 (1968).
27. Schireber K. and H. Ripperger, *Tetrahedron Letters,*  
8, 857 (1969).
28. Tal D.M., F.H. Patrich and W.E. Elliott *J. Liquid*  
*Chromatography* 7, 13, 1984.