

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

2
20.

FACULTAD DE QUIMICA

**ESTRUCTURA DE LA TRICOLORINA A, UN GLICOLIPIDO MODULADOR
DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PROTEINA CINASA C Y
PRINCIPAL AGENTE ALELOPATICO DE IPOMOEA TRICOLOR CAV.
(CONVOLVULACEAE).**

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS QUIMICAS (FARMACIA)
P R E S E N T A
ROGELIO G. PEREDA MIRANDA

MEXICO, D. F.

1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

JURADO ASIGNADO

Presidente	Dra. Estela Sánchez Quintanar
Primer Vocal	Dra. Ana Luisa Anaya Lang
Segundo Vocal	Dra. Rosalinda Contreras Theurel
Tercer Vocal	Dr. Robert Bye Buttler
Secretario	Dr. Rafael Castillo Bocanegra
Primer Suplente	Dra. Carmen Rivera Muñóz
Segundo Suplente	Dr. Luis Angel Maldonado Graniel

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, División de Bioquímica y Farmacia.
Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor


Dra. Rachel Mata Essayag

Sustentante


M. en C. Rogelio G. Pereda Miranda

CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	VI
ABSTRACT.....	VIII
LISTA DE CUADROS.....	X
LISTA DE FIGURAS.....	XI
AGRADECIMIENTOS.....	XVII
PROLOGO.....	XVIII
1. ANTECEDENTES	
1.1 Generalidades sobre las especies de <i>Ipomoea</i>	
1.1.1 El género <i>Ipomoea</i> y la medicina tradicional mexicana.....	1
1.1.2 Las resinas glicosídicas del género <i>Ipomoea</i>	5
1.1.3 Farmacología del género <i>Ipomoea</i>	24
1.2 Generalidades sobre los sistemas de transducción de señales	
1.2.1 Transducción de señales y la proteína cinasa C (PKC).....	25
1.2.2 Fármacos y productos naturales moduladores de la PKC.....	30
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	
2.1 Consideraciones generales.....	35
2.2 Objetivo general.....	37
2.3 Objetivos específicos.....	38

3. PARTE EXPERIMENTAL

3.1 Procedimientos experimentales generales

3.1.1 Métodos cromatográficos..... 39

3.1.2 Determinación de las constantes físicas..... 39

3.2 Material vegetal..... 40

3.3 Extracción

3.3.1 Preparación de los extractos orgánicos totales

3.3.1.1 Extracción de *Ipomoea tricolor*..... 41

3.3.1.2 Preparación de las resinas glicosídicas de

Ipomoea purga, *Ipomoea tryianthina* e

Ipomoea pes-caprae..... 41

3.3.2 Preparación del crudo alcaloideo de *Ipomoea tricolor*..... 42

3.4 Cuantificación y caracterización de los constituyentes mayoritarios del
crudo alcaloideo de *Ipomoea tricolor*..... 43

3.5 Procedimientos para la evaluación del potencial alelopático..... 46

3.6 Fraccionamiento biodirigido..... 47

3.7 Aislamiento y purificación de la tricolorina A

3.7.1 Cromatografía de partición centrífuga..... 49

3.7.2 Cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC)..... 49

3.7.3 Caracterización de la tricolorina A..... 51

3.8 Evaluación del potencial biológico de la tricolorina A

3.8.1 Evaluación del potencial alelopático..... 52

3.8.2 Evaluación del potencial modulador de la tricolorina A sobre la actividad enzimática de la proteína cinasa C	
3.8.2.1 Evaluación del potencial antagonista de la tricolorina A en el ensayo de unión de los ésteres de forbol y la estaurosporina a la proteína cinasa C.....	52
3.8.2.2 Evaluación del potencial modulador de la tricolorina A sobre la actividad enzimática de la proteína cinasa C.....	54
3.8.3 Evaluación del potencial antimicrobiano	
3.8.3.1 Preparación de los inóculos.....	55
3.8.3.2 Preparación de la muestra de prueba.....	56
3.8.3.3 Procedimientos del ensayo de difusión.....	56
3.8.3.4 Procedimientos del ensayo de dilución.....	56
3.8.4 Evaluación del potencial citotóxico	
3.8.4.1 Toxicidad para el crustáceo <i>Artemia salina</i>	
3.8.4.1.1 Preparación de las muestras.....	57
3.8.4.1.2 Procedimientos del bioensayo.....	57
3.8.4.2 Ensayos de citotoxicidad	
3.8.4.2.1 Medios y cultivos "stock".....	58
3.8.4.2.2 Preparación de las muestras de prueba.....	60
3.8.4.2.3 Preparación de la suspensión celular para el bioensayo	60
3.8.4.2.4 Bioensayos	
3.8.4.2.4.1 Método A.....	60
3.8.4.2.4.2 Método B.....	61
3.8.4.2.5 Determinación de la dosis efectiva media (DE ₅₀).....	62

4.4 Determinación del contenido alcaloideo de las partes aéreas de <i>Ipomoea tricolor</i> mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas.....	140
5. CONCLUSIONES.....	145
BIBLIOGRAFIA.....	148

RESUMEN

La presente disertación describe la investigación llevada a cabo para poner en evidencia el potencial alelopático de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), una planta utilizada en la agricultura tradicional mexicana para controlar el crecimiento de las plantas nocivas. En esta investigación se realizó la evaluación de la actividad inhibidora de los extractos orgánicos (hexánico, clorofómico y metanólico) y del crudo alcaloideo preparados a partir de las partes aéreas de esta especie sobre la germinación de semillas y el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crus-galli*. El fraccionamiento biodirigido del extracto activo (CHCl₃) mediante los ensayos antes mencionados permitió el aislamiento de los principios alelopáticos que correspondieron a la mezcla de resinas glicosídicas característica del metabolismo secundario de las especies de la familia de las convolvuláceas.

La estructura de la tricolorina A, el constituyente bioactivo mayoritario presente en la fracción alelopática, se elucidó como el 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-{2-*O*-(2*S*-metilbutiril)-4-*O*-(2*S*-metilbutiril)}-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido (1*S*)-hidroxihexadecanoico-(1,3"-lactona) {1} mediante la aplicación de diversas técnicas de alta resolución en la resonancia magnética nuclear que incluyeron experimentos SINEPT, COSY, HETCOR, COLOC, HOHAHA y ROESY.

En el estudio de la actividad inhibidora de la tricolorina A sobre el crecimiento vegetal, los bioensayos de la germinación de semillas demostraron una inhibición significativa para las dos especies de plantas arvenses utilizadas como organismos de prueba. La tricolorina A {1} inhibió la germinación de semillas de *E. crus-galli* con un valor para la concentración inhibidora media (CI₅₀) de 36.1 μ M, en tanto que *A. leucocarpus* fue menos sensible con una CI₅₀ de 149.9 μ M. La concentración de la tricolorina A {1} que provoca la inhibición del crecimiento radicular de las dos especies de prueba correspondió a un intervalo de 12 a 37 μ M. Estos resultados demuestran

ABSTRACT

The allelopathic potential of *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), used in Mexican traditional agriculture as a weed controller, has been demonstrated by measuring the inhibitory activity of organic extracts on seedling growth of *Amaranthus leucocarpus* and *Echinochloa crus-galli*. Screening of alkaloidal fraction and organic-solvent-soluble extracts (hexane, CHCl₃, and MeOH) of *I. tricolor* on seedling growth bioassays detected noteworthy activity in the CHCl₃ solution. Bioactivity-directed fractionation of the active CHCl₃ extract led to the isolation of the allelopathic principle, which turned out to be a mixture of the so-called "resin glycosides" of convolvulaceous plants.

The structure of tricolorin A, the major phyto-growth inhibitor present in the active fraction, was elucidated as (11*S*)-hydroxyhexadecanoic acid 11-*O*- α -L-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-(2-*O*-(2*S*-methylbutyryl)-4-*O*-(2*S*-methylbutyryl))-rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopyranoside-(1,3"-lactone) **{1}**, based on chemical methods and spectral analysis including ¹H-¹H COSY, ¹H-¹³C HETCOR, ROESY, long range ¹H-¹H HOHAHA and ¹H-¹³C COLOC, and selective INEPT experiments.

Phyto-growth-inhibitory activity bioassays with tricolorin A **{1}** showed significant inhibition of seed germination in both weed plants tested. Analysis indicated a concentration value required to cause 50% inhibition (IC₅₀) of 36.1 μ M for *E. crus-galli*. Seed germination of *A. leucocarpus* was less sensitive to compound **1**, with an IC₅₀ value of 149.4 μ M. Bioassays showed that the radicle elongation of the two weed seedling tested was inhibited by tricolorin A **{1}** with IC₅₀ values ranging from 12 to 37 μ M. These results clearly demonstrate that the *Ipomoea* resin glycosides are potent inhibitors of plant growth that are primarily responsible for the allelopathic interference exhibited by these species. Additional biological evaluation procedures for tricolorin A **{1}** were performed. Quantitative antimicrobial assays against *Staphylococcus aureus* allowed the

determination of an MIC of 1.5 $\mu\text{g/ml}$ for compound 1. The crude resin glycosides and pure tricolorin A {1} showed comparable lethality to brine shrimp with an LC_{50} of 36.8 and 18.2 $\mu\text{g/ml}$, respectively. In spite of this larvicidal activity, compound 1 displayed only marginal cytotoxicity with ten human cancer cell lines and murine lymphocytic leukemia in cell culture (P-388). The most intense cytotoxic activity was observed with cultured P-388 and human breast cancer cells (ED_{50} 2.2 $\mu\text{g/ml}$).

Finally, competitive antagonism of phorbol 12,13-dibutyrate binding to partially purified protein kinase C (PKC) was analyzed. Tricolorin A was found to demonstrate a dose-dependent inhibition of the specific binding of [^3H]-PDBu with an IC_{50} of 43.2 μM . This effect was further evidenced by the fact that tricolorin A {1} inhibited PKC activity with a half-maximal inhibition of this kinase at 55.8 μM . The results presented in this dissertation demonstrate the effects of a new PKC inhibitor which interacts directly with the regulatory domain of PKC. Consequently, the broad spectrum of biological activities displayed *in vitro* by tricolorin A {1} might be due at least in part to inhibition of PKC.

Tricolorin A {1}, as well as the resin glycosides from the Convolvulaceae family, may therefore prove to be a biological tool for examining the physiological role of phosphorylation by PKC and serve as an important lead -a putative pharmacological modulator of PKC *in vivo*- for further chemical modifications to produce more potent and specific PKC inhibitors.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Principales productos de la hidrólisis ácida de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas.....	5
Cuadro 2. Actividad moduladora de algunos fármacos antitumorales y productos naturales citotóxicos sobre la proteína cinasa C.....	32
Cuadro 3. Sistemas y tiempos de elución utilizados para la cromatografía en capa fina del crudo alcaloide de <i>Ipomoea tricolor</i>	43
Cuadro 4. Fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de <i>Ipomoea tricolor</i>	48
Cuadro 5. Efectos de los extractos, las resinas glicosídicas y la tricolorina A obtenidos a partir de <i>Ipomoea tricolor</i> sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus leucocarpus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	72
Cuadro 6. Efecto de la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus leucocarpus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	75
Cuadro 7. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹ H de la tricolorina A (1) y del ácido tricolórico (2).....	92
Cuadro 8. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹³ C de la tricolorina A (1) y del ácido tricolórico (2).....	100
Cuadro 9. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹ H y ¹³ C del núcleo oligosacárido del acetónido (3) derivado de la tricolorina A.....	110
Cuadro 10. Desplazamientos químicos en la RMN- ¹ H y ¹³ C del núcleo oligosacárido del derivado peracetilado (4) de la tricolorina A.....	114
Cuadro 11. Efectos nucleares de Overhauser (NOEs) intrarresiduales e interglicosídicos observados en el espectro de RMN- ¹ H bidimensional ROESY.....	118

	Página
Cuadro 12. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos de <i>Ipomoea tricolor</i> , <i>I. pes-caprae</i> , <i>I. purga</i> e <i>I. tryianthina</i>	127
Cuadro 13. Actividad citotóxica de la resina de <i>Ipomoea tricolor</i> , de la tricolorina A, del ácido tricolórico y de la peracetiltricolorina A.....	128
Cuadro 14. Afinidad de las resinas glicosídicas por el dominio regulatorio de la PKC.....	130
Cuadro 15. Inhibición de la unión del PDBu-[³ H] a la proteína cinasa C por la tricolorina A y las resinas glicosídicas de <i>Ipomoea tricolor</i>	132
Cuadro 16. Efecto de la tricolorina A sobre la actividad de la proteína cinasa C.	135
Cuadro 17. Composición del extracto alcaloideo de las partes aéreas de <i>Ipomoea tricolor</i>	143

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estructura de las resinas glicosídicas de <i>Exogonium purga</i> Benth. (<i>Ipomoea purga</i>) de acuerdo con Mannich & Schumann (1938).....	7
Figura 2. Estructura de las orizabinas I-IV, constituyentes mayoritarios de los tubérculos de <i>Ipomoea orizabensis</i> (Pelletan) Ledenois.....	10
Figura 3. Estructura de las muricatinas I-VII, constituyentes de la jalapina de <i>Ipomoea muricata</i> (L.) Jacq.....	12
Figura 4. Estructura de la muricatina VIII, constituyente minoritario de la jalapina de <i>Ipomoea muricata</i> (L.) Jacq.....	13
Figura 5. Estructura de las operculinas I, II, VII, VIII, XIII, XIV y XV, constituyentes de la jalapina de los tubérculos de <i>Ipomoea operculata</i> (Gomes) Mart.....	14

	Página
Figura 6. Estructura de la operculina V, jalapina de <i>Ipomoea opercula</i>	16
Figura 7. Estructura de las operculinas III, IV, IX, X, XVI, XVII y XVIII, resinas glicosídicas de <i>Ipomoea operculata</i> (Gomes) Mart.....	17
Figura 8. Estructura de la operculina VI, constituyente minoritario de la resina de <i>Ipomoea operculata</i> (Gomes) Mart.....	18
Figura 9. Estructura de las operculinas XI y XII, constituyentes minoritarios de la resina de <i>Ipomoea operculata</i> (Gomes) Mart.....	19
Figura 10. Estructura de la simonina I aislada de <i>Ipomoea batatas</i> (cv. Simon), único ejemplo de una resina glicosídica con un ácido alifático insaturado con un sustituyente aromático (ácido <i>trans</i> cinámico) como uno de los grupos acilantes del núcleo sacárido.....	20
Figura 11. Estructura de las simoninas II-V, constituyentes mayoritarios de la resina de <i>Ipomoea batatas</i> (cv. Simon).....	22
Figura 12. Estructura del constituyente mayoritario de la resina glicosídica de <i>Ipomoea stans</i> Cav.....	23
Figura 13. Principales sistemas de transducción de señales que operan en las células eucarióticas.....	27
Figura 14. Ciclo del fosfatidilinositol.....	29
Figura 15. Productos naturales moduladores de la actividad enzimática de la PKC.....	34
Figura 16. Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta presión del constituyente alelopático mayoritario de <i>Ipomoea tricolor</i> Cav.....	50
Figura 17. Porcentajes de inhibición de las fracciones I-IX sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus leucocarpus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	73

	Página
Figura 18. Bioensayo de la germinación de semillas de <i>Amaranthus leucocarpus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i> tratadas con diferentes concentraciones de la tricolorina A.....	74
Figura 19. Efecto de la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de <i>Amaranthus leucocarpus</i> y <i>Echinochloa crus-galli</i>	76
Figura 20. Estructura de la sorgoleona y su dihidroquinona, constituyentes alelopáticos de los exudados radiculares de las especies de <i>Sorghum</i>	77
Figura 21. Análisis mediante cromatografía de gases de la fracción recuperada a partir de la fase orgánica durante la saponificación de la tricolorina A.....	80
Figura 22. Espectro de masas por impacto electrónico (70 eV) del ácido 2-metilbutanoico.....	82
Figura 23. Separación de los derivados sililados (TMS-éteres) de los monosacáridos presentes en la mezcla de hidrólisis ácida de la tricolorina A mediante cromatografía de gases.....	83
Figura 24. Cromatografía de gases resultado de la coelución de los monosacáridos (TMS-éteres) presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A con el estándar de glucosa (TMS-éter).....	84
Figura 25. Cromatografía de gases resultado de la coelución de los monosacáridos (TMS-éteres) presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A con el estándar de fucosa (TMS-éter).....	85
Figura 26. Cromatografía de gases resultado de la coelución de los monosacáridos (TMS-éteres) presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A con el estándar de ramnosa (TMS-éter).....	86

Figura 27. Separación de los dietilditioacetales derivados de las aldosas trimetilsililadas presentes en la mezcla de hidrólisis ácida de la tricolorina A mediante cromatografía de gases.....	88
Figura 28. Espectro de masas FAB-negativo del ácido tricolórico.....	89
Figura 29. Espectro de masas FAB-negativo de la tricolorina A.....	90
Figura 30. Espectro de RMN- ¹ H (300 MHz) de la región de campo bajo (δ 3.5-6.5) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido de la tricolorina A y del ácido tricolórico.....	91
Figura 31. Espectro de RMN- ¹ H bidimensional homonuclear con filtro de doble coherencia cuántica (DQF-COSY) de la tricolorina A.....	94
Figura 32. Espectro de RMN- ¹ H bidimensional homonuclear HOHAHA de la tricolorina A.....	95
Figura 33. Ampliación del espectro de RMN bidimensional homonuclear DQF-COSY de la región de campo bajo (δ 3.2-5.9) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido de la tricolorina A.....	96
Figura 34. Espectro de RMN- ¹ H (500 MHz) de la región de campo bajo (δ 4.60-5.85) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido de la tricolorina A.....	98
Figura 35. Ampliación del espectro de RMN bidimensional homonuclear DQF-COSY de la región de campo bajo (δ 3.5-5.3) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido del ácido tricolórico.....	99
Figura 36. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ¹³ C- ¹ H (HETCOR) de la porción oligosacárida de la tricolorina A.....	101

	Página
Figura 37. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H (HETCOR) de la porción oligosacárida del ácido tricolórico.....	102
Figura 38. Experimentos de intensificación nuclear selectiva mediante transferencia de polarización ("SINEPT") en la RMN- ^{13}C de la tricolorina A.....	104
Figura 39. Espectro de RMN bidimensional heteronuclear vía acoplamiento a larga distancia ^1H - ^{13}C (COLOC) de la porción oligosacárida de la tricolorina A.....	107
Figura 40. Experimentos de intensificación nuclear selectiva mediante transferencia de polarización ("SINEPT") en la RMN- ^{13}C del acetónido derivado de la tricolorina A.....	108
Figura 41. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear con filtro de doble coherencia cuántica (DQF-COSY) del acetónido derivado de la tricolorina A.....	111
Figura 42. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C (HETCOR) de la porción oligosacárida del acetónido derivado de la tricolorina A.....	112
Figura 43. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear DQF-COSY del peracetato derivado de la tricolorina A.....	115
Figura 44. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear ROESY de la porción oligosacárida de la tricolorina A.....	117
Figura 45. Principales efectos nucleares de Overhauser (NOEs) intraglicosídicos observados en los piranosidos del núcleo tetrasacárido de la tricolorina A.....	119

	Página
Figura 46. Principales efectos nucleares de Overhauser (NOEs) interglucosídicos observados en el núcleo tetrasacárido de la tricolorina A.....	120
Figura 47. Relación entre el tamaño de la zona de inhibición (mm) y el log de la concentración ($\mu\text{g/ml}$) de la resina glicosídica.....	122
Figura 48. Relación entre el tamaño de la zona de inhibición (mm) y el log de la concentración ($\mu\text{g/ml}$) de la tricolorina A.....	123
Figura 49. Inhibición por el extracto clorofórmico de <i>Ipomoea tricolor</i> de la unión del PDBu- $[\text{}^3\text{H}]$ a la proteína cinasa C parcialmente purificada.....	131
Figura 50. Inhibición por la tricolorina A de la unión del PDBu- $[\text{}^3\text{H}]$ y la estaurosporina- $[\text{}^3\text{H}]$ a la proteína cinasa C parcialmente purificada.....	133
Figura 51. (A) Complejo PKC-forbol asociado a la membrana celular. (B) Complejo PKC-diacilglicerol.....	136
Figura 52. Inhibición de la proteína cinasa C (PKC) por la tricolorina A.....	137
Figura 53. Complejo PKC-tricolorina A hipotético.....	139
Figura 54. Análisis mediante cromatografía de gases del extracto alcaloideo de <i>Ipomoea tricolor</i>	140
Figura 55. Cromatograma de gases resultado de la coelución de la fracción alcaloidea de <i>Ipomoea tricolor</i> con el estándar de chanoclavina-I...	141

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la Coordinación General de Estudios de Posgrado de la Universidad Nacional Autónoma de México por el apoyo financiero otorgado para la realización del presente trabajo a través del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudios de Posgrado: Proyectos PADEP DFQ-9145 y 9246. Al Dr. Douglas Kinghorn, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, EE.UU., por haber proporcionado las facilidades espectroscópicas utilizadas en el presente estudio. Al Dr. John M. Pezzuto, College of Pharmacy, University of Illinois at Chicago, EE.UU., en cuyo laboratorio realicé algunas de las evaluaciones biológicas incluidas en este trabajo. Al Dr. Robert Bye, director del Jardín Botánico del Instituto de Biología (UNAM), por su colaboración en la colecta e identificación de algunas de las plantas estudiadas. A todos los miembros del jurado comisionado para la revisión de este manuscrito, por sus comentarios que enriquecieron sustancialmente la discusión de los resultados experimentales.

Agradezco a la Dra. Ana Luisa Anaya, investigadora del Instituto de Fisiología Celular (UNAM), quien fungió como coasesora del presente trabajo, su diligente colaboración en las evaluaciones de fitotoxicidad y su constante interés por las investigaciones fitoquímicas del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (UNAM) que ha permitido canalizar nuestros esfuerzos conjuntos en un enfoque interdisciplinario de la investigación de los productos naturales.

De manera muy especial, expreso mi profundo agradecimiento a la Dra. Rachel Mata, investigadora de la Facultad de Química (UNAM), por su invaluable dirección de la presente investigación, a quien deseo hacer patente mi reconocimiento por su loable labor docente y constante ejemplo de superación académica que constituye un incentivo para todos sus alumnos.

PROLOGO

En las últimas dos décadas se ha observado el desarrollo de un nuevo campo de las ciencias naturales de carácter interdisciplinario que investiga el papel biológico de los metabolitos secundarios en las interacciones entre plantas y animales en su medio ambiente y que ha recibido el nombre de ecología química. Este desarrollo se ha logrado en gran medida a la posibilidad de identificar moléculas orgánicas en cantidades micromolares y, evidentemente, a la aplicación de técnicas de análisis químico a los sistemas biológicos para entender la función de los metabolitos secundarios en las complejas interacciones planta-planta, planta-animal y animal-animal. La posibilidad de aplicación de estos nuevos conocimientos ecológicos para el control de las plagas y la conservación de las comunidades bióticas constituye un factor adicional que ha permitido difundir el interés por esta disciplina.

La presente disertación surgió dentro de este contexto de investigación de la ecología química y como parte de la propuesta de investigación titulada "Potencialidad Farmacológica del Género *Ipomoea*", la cual constituyó uno de los requisitos para mi ingreso al Doctorado en Ciencias Químicas (Farmacia) que ofrece la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los resultados de la investigación reunidos en esta tesis han quedado integrados en dos partes: la primera incluye el estudio fitoquímico de *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae) que permitió el aislamiento y la caracterización estructural del principio alelopático de esta especie utilizada para el control de las plantas nocivas en los agroecosistemas tradicionales de México; la segunda parte se refiere a la evaluación del potencial farmacológico de posible utilidad terapéutica de cuatro especies medicinales del género *Ipomoea*, i.e. *I. tricolor*, *I. pes-caprae*, *I. purga* e *I. tryianthina*. Esta investigación constituye una contribución al conocimiento del papel biológico de este género de plantas de gran importancia en la medicina y la agricultura tradicionales de nuestro país, como una fuente potencial de principios biodinámicos.

1. ANTECEDENTES.

1.1 GENERALIDADES SOBRE LAS ESPECIES DE *IPOMOEA*.

1.1.1 EL GENERO *IPOMOEA* Y LA MEDICINA TRADICIONAL MEXICANA.

De acuerdo con la clasificación de Hegnauer (1964), la familia Convolvulaceae se divide en dos subfamilias, Cuscutioideae y Convolvuloideae. Siete tribus pertenecen a la subfamilia Convolvuloideae y de éstas la Ipomoeae y la Convolvuleae incluyen a los géneros más numerosos e importantes desde el punto de vista económico-medicinal. Dentro de esta familia, existen aproximadamente 1100 especies agrupadas en 53 géneros. El nombre de la familia se deriva del latín *convolvere* que significa entrelazarse y se refiere, en términos generales, a la forma de su crecimiento ya que un gran número de estas plantas son volubles, es decir enredaderas que trepan por un soporte enroscándose a él (Grieve, 1982).

Uno de los rasgos anatómicos más sobresalientes de las convolvuláceas es la presencia de hileras de células secretoras de resinas glicosídicas en los tejidos foliares y, en especial, en sus raíces. Estas resinas glicosídicas constituyen una de las características quimiotaxonómicas de esta familia y el empleo en la medicina tradicional de algunos géneros (*e.g.* *Convolvulus*, *Exogonium*, *Ipomoea*, *Merremia* y *Operculina*) se asocia con las propiedades laxantes de sus resinas. Esta práctica se encuentra ampliamente difundida en todo el mundo e incluso figura de manera oficial en numerosas farmacopeas (Millspaugh, 1974).

De la gran riqueza florística mexicana, el género *Ipomoea* constituye un grupo de plantas económicamente importantes para la vida cotidiana de nuestro pueblo y su uso es muy antiguo. Algunas especies han sido utilizadas desde épocas prehispánicas con fines medicinales, *e.g.*, el "tolómpatí" de los aztecas (Martínez, 1979) es un potente catártico que se obtiene de los tubérculos desecados de *Ipomoea purga* (Wender) Hayne, y debido a las propiedades analgésicas y alucinógenas de las semillas del "tlitiltzin", éstas se utilizaron en los rituales religiosos adivinatorios (Schultes, 1976). Se ha sugerido que este

narcótico de los antiguos aztecas fueron las semillas de *Ipomoea tricolor* Cav. (*Ipomoea violacea* L.) que en la actualidad es utilizada por los indios zapotecas y chatines del estado de Oaxaca, donde se le conoce con el nombre de badoh negro, o en zapoteco como "badungás" (Martínez, 1979; Schultes, 1976; Schultes y Hofmann, 1979). Algunas variedades de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. deben su importancia económica a las propiedades alimenticias de sus tubérculos, conocidos en la culinaria nacional como camotes. Se supone que esta especie derivó de *Ipomoea tiliacea* (Willd.) Choisy, como resultado del cultivo y la selección por los pueblos aborígenes de América (Roig y Mesa, 1974).

En diversas regiones del mundo, también son de uso común en la medicina popular las resinas obtenidas de las raíces y partes aéreas de numerosas especies del género *Ipomoea* que se utilizan como catárticos (Alzugaray y Alzugaray, 1984; Díaz, 1977; Millspaugh, 1974; Roig y Mesa, 1974; Wagner, 1973). Los tubérculos de las convolvuláceas con propiedades purgantes se introdujeron en Europa hacia el año de 1565 y, desde entonces, han constituido una de las materias primas con propiedades laxantes de mayor comercio. La jalapa está constituida por los tubérculos de *Ipomoea purga* que se exporta de la costa este de nuestro país con el nombre de raíz de jalapa "mexicana" o "de Veracruz" (Trease y Evans, 1988; Tyler *et al.*, 1988) y se utiliza como laxante, emético, antihelmíntico y emenagogo. El extracto acuoso tiene propiedades diuréticas (Martínez, 1989) y se emplea también para curar llagas y úlceras cutáneas (Linajes Palacios, 1991). Desde el punto de vista farmacológico, la jalapa se clasifica como un catártico drástico hidragogo (Wallis, 1966) y se utiliza para el tratamiento de las hidrocefalias, las fiebres gastroneuróticas, la enteromeningitis e incluso la disentería (Martínez, 1989). Asimismo, se le atribuyen propiedades curativas para padecimientos cardíacos, hemorragias cerebrales y de los estados congestivos e inflamatorios. La jalapa de Orizaba es la raíz desecada de *Ipomoea tyrianthina* Lindley [*Ipomoea orizabensis* (Pelletan) Ledenois] y se utiliza para la preparación de la resina de su nombre. Se parece a la jalapa en cuanto a sus propiedades

medicinales y se exportó en un principio como sustituto o adulterante de la jalapa (Singh y Stacey, 1973; Trease y Evans, 1988).

Según la medicina popular nacional, la resina de la raíz de Michoacán, *Ipomoea jalapa* (L.) Pursh y de los rizomas de *Ipomoea stans* Cav., conocida en los mercados del Valle de México como la tumbavaqueros (Martínez, 1979), actúan como purgantes drásticos y colecínicos (Díaz, 1977). Los cocimientos de la tumbavaqueros se recomiendan para malestares cardíacos (Díaz, 1977; Martínez, 1989), en el tratamiento de desórdenes neurológicos como la epilepsia e histeria (González Elizondo, 1984; Martínez, 1989) y se dice que se emplean para curar enfermedades de los riñones y trastornos biliares (Matuda, 1963) como la inflamación de los riñones y el exceso de bilis (Martínez, 1989). Las infusiones preparadas con estas raíces, mezcladas con flores del limón (*Citrus* spp.), la flor de la manita (*Chiranthodendron pentadactylon*) y la tila (*Ternstroemia* spp.) se beben para tratar el insomnio y la presión arterial irregular. Para curar los nervios (Linares *et al.*, 1990), también se toma este té adicionado con flores de magnolia (*Talauma mexicana*) y el palo del Brasil (*Haematoxylon brasiletto*). Según Martínez (1989), el principal uso del cocimiento de esta raíz (ca. 3% en peso seco) es contra el mal de San Vito y los ataques epilépticos. En el estado de Durango, en donde se conoce con el nombre de quiebraplatos, se toma la infusión de la raíz durante la menstruación para evitar el embarazo (González Elizondo, 1984). En Pahuatlán, en el estado de Puebla, las mujeres toman el cocimiento de las hojas, conocidas con el nombre de "soyoquiltil", para la producción de leche durante la lactancia (Castro Ramírez, 1988). Díaz (1977) menciona también propiedades antiespasmódicas y sedantes para las infusiones de esta planta. Estas bondades medicinales también se atribuyen en el estado de Durango a los cocimientos del manto, *Ipomoea purpurea* (L.) Roth, que además se emplean para el tratamiento de la diabetes y por sus apreciadas propiedades antihistaminicas y diuréticas (González Elizondo, 1984).

Las semillas del amolillo, *Ipomoea nil* (L.) Roth, son un efectivo catártico y se aplican al cabello en forma de enjuagues para promover su crecimiento (Soto Nuñez, 1987) y para el tratamiento de enfermedades del tejido capilar (Roig y Mesa, 1974). Las flores y brácteas de la trompetilla, *Ipomoea bracteata* Cav., se usan en forma de infusiones que se toman para curar la tos en la medicina tradicional de la cuenca del río Balsas, en los estados de Michoacán y Guerrero (Soto Nuñez, 1987). Las infusiones de la riñonina, *Ipomoea pes-caprae* (L.) Sweet, planta rastrera común de las playas secas y arenosas, son efectivas para algunas afecciones renales (Martínez, 1989), contra las visceralgias y útiles al exterior contra los dolores artríticos (Roig y Mesa, 1974). Una especie afín es la *Ipomoea stolonifera* (Cyrill) Gmelin que en la región caribeña se recomienda en casos de disentería (Roig y Mesa, 1974).

La corteza del cazahuate, *Ipomoea pauciflora* Martens *et* Galeotti se emplea en cocimiento en administración oral, como agua de uso y en forma de baños para curar tumores cancerosos. Las hojas de este árbol, también conocido con el nombre de palo flojo o palo bobo en los estados de Michoacán y Guerrero, se cuecen en agua y con el cocimiento se dan baños a quienes picó la araña capulina. Se recomienda que, para que surta efecto la curación, el paciente se bañe repetidas veces con dicho cocimiento cuando aún esté caliente o tibio (Soto Nuñez, 1987). Para el tratamiento de tumores también se recomienda el empleo de las partes aéreas de *Ipomoea batatas* e *Ipomoea pes-caprae* en forma de fomentos, emplastos y cataplasmas (Hartwell, 1968). El cocimiento del palo del muerto, *Ipomoea murucoides* Roem., se utiliza en forma de baños contra la parálisis. En los mercados, los indígenas recomiendan el cocimiento contra la hidropesía (Martínez, 1989).

1.1.2 LAS RESINAS GLICOSIDICAS DEL GENERO *IPOMOEA*.

Un grupo distintivo de glicolípidos de estructura compleja se encuentra ampliamente distribuido en las especies pertenecientes a la familia de las convolvuláceas (Wagner, 1973). Se han utilizado dos procedimientos para establecer la existencia de las resinas glicosídicas en esta familia: (1) a través del uso generalizado de numerosas especies en la medicina tradicional como purgantes, ya que la mayoría de las resinas poseen un fuerte efecto laxante; y (2) mediante el aislamiento de las resinas y la identificación de sus productos de hidrólisis. La complejidad en la composición de las resinas ha dificultado la purificación de los constituyentes individuales y, por lo tanto, su completa caracterización. Sin embargo, estos glicolípidos presentan rasgos estructurales que los unifican; cuando se someten a hidrólisis alcalinas, estos compuestos liberan ácidos alifáticos volátiles de cadena corta. Al mismo tiempo, se forma un ácido glicosídico, el cual se hidroliza en condiciones ácidas para generar un ácido graso hidroxilado, correspondiente a la porción de la aglicona, y varios azúcares (Cuadro 1).

Cuadro 1. Principales productos de la hidrólisis ácida de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas.

Acidos volátiles	Acidos grasos hidroxilados	Azúcares
Acido acético	7-OH-C ₁₀	D-glucosa
Acido propiónico	11-OH-C ₁₄ (ácido convolvulínico)	L-ramnosa
Acido isobutírico	11-OH-C ₁₆ (ácido jalapinólico)	D-fucosa
Acido 2-metilbutanoico	3,12- di-OH-C ₁₆ (ácido operculínico)	D-quinovosa
Acido 3-hidro-2-metilbutanoico	3-11-di-OH-C ₁₄ (ácido ipurólico)	6-deoxigulosa
Acido tíglico	tri-OH-C ₁₄ (ácido brasiliólico)	
Acido caproico		
Acido decanoico		
Acido dodecanoico		
Acido exogónico		

De acuerdo con este comportamiento observado en soluciones ácidas y alcalinas, se propuso una estructura general para todas las resinas glicosídicas de las convolvuláceas, la cual representaba un polímero con un peso molecular entre 500 y 10 000 unidades de masa atómica de una unidad liposacárida, la cual correspondía al ácido glicosídico liberado por la acción de una base (Wagner, 1973). La figura 1 ilustra la propuesta estructural de Mannich y Schumann (1934) para las resinas de *Exogonium purga* Benth. (*Ipomoea purga*). Los azúcares en estos complejos se encuentran en forma de di, tri, tetra, penta y hexasacáridos de un ácido graso hidroxilado, este núcleo liposacárido representaría la unidad monomérica que se obtiene como producto de la saponificación del crudo resinoso total y la cual se encuentra parcialmente acilada por diferentes ácidos volátiles. Los nombres comunes con que se designan a las agliconas (ácidos grasos hidroxilados) de estos liposacáridos se han derivado del género o de la especie de la cual se han obtenido (Wagner, 1973). En el cuadro 1 se enumeran los azúcares y los ácidos grasos que constituyen el núcleo oligosacárido de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas. El ácido exogónico (ácido 3,6:6,9-diepoxicanoico) merece una mención especial entre los ácidos volátiles que esterifican a los núcleos oligosacáridos de las resinas debido a su estructura excepcional. La principal diferencia entre la resina de la jalapa brasileña, *I. operculata* (Gomes) Martin, de la mexicana (*I. purga*) es la presencia de este ácido como uno de los productos de la hidrólisis alcalina de las resinas de la jalapa brasileña (Wagner, 1973; Ono *et al.*, 1989a).

La complejidad de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas y su alto peso molecular constituyen factores que han dificultado, y en la mayoría de los casos impedido, el aislamiento de sus constituyentes individuales. Los productos de la hidrólisis alcalina de las resinas, es decir los ácidos glicosídicos y los ácidos volátiles, han constituido la única información utilizada por los farmacognostas para fines de identificación y clasificación de las especies medicinales utilizadas como materias primas para la preparación de las resinas laxantes.

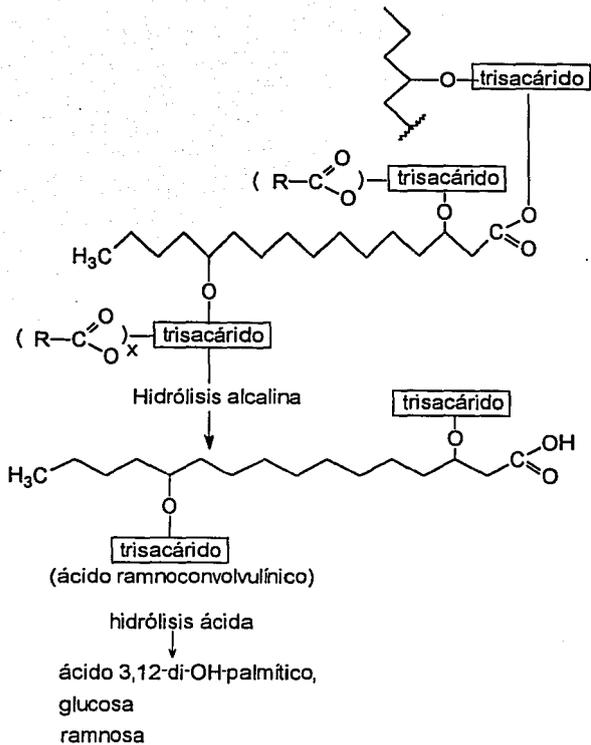


Figura 1. Estructura de las resinas glicosídicas de *Exogonium purga* Benth. (*Ipomoea purga*) de acuerdo con Mannich & Schumann (1938).

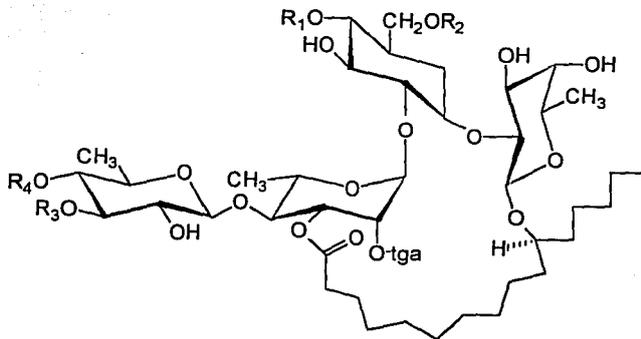
Las investigaciones relacionadas con la química de las resinas glicosídicas de algunas especies de interés medicinal de los géneros *Convolvulus*, *Ipomoea*, *Merremia*, *Operculina* y *Pharbitis* durante las décadas de los sesenta y setenta corresponden a los trabajos de Auterhoff y Demleitner (1955); Shellard (1961a; 1961b); Okabe y Kawasaki (1970; 1971) y Wagner (1973). Estos trabajos fitoquímicos se enfocaron únicamente a la preparación de los ácidos glicosídicos mediante hidrólisis alcalina de las resinas totales y a la caracterización de sus componentes obtenidos por hidrólisis, la cual se realizó a través de la identificación por espectrometría de masas de las agliconas y de los ácidos volátiles, en tanto que la secuencia de glicosidación de los azúcares se determinó mediante: (1) la permethylación e identificación de los azúcares metilados y sus correspondientes alditol-acetatos utilizando la cromatografía de gases (Wagner y Schwarting, 1977; Wagner *et al.*, 1978); (2) hidrólisis parciales para generar di, tri o tetrasacáridos (Singh y Stacey, 1973; Wagner y Kazmaier, 1977) y (3) síntesis de los oligosacáridos resultantes (Wagner, 1973; Wagner *et al.*, 1978). Ninguna de estas investigaciones pioneras en la química de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas se dedicó a la purificación de los constituyentes individuales de estas mezclas de glicolípidos y todas ellas, sin excepción alguna, consideraron como verdadera la propuesta estructural de Mannich y Schumann (1938) para las resinas de *I. purga*.

Las resinas glicosídicas se han agrupado en dos categorías de acuerdo con su solubilidad; aquellas solubles en éter y conocidas como la jalapina y la porción del crudo resinoso insoluble en este disolvente o convolvulina (Trease y Evans, 1987; Ono *et al.*, 1989a). A partir del final de la década pasada, las investigaciones conducidas por Kawasaki y Miyahara han proporcionado importantes contribuciones al conocimiento de la compleja estructura molecular de los constituyentes individuales de las resinas de algunas especies de los géneros *Ipomoea* (Noda *et al.*, 1987; 1988b; 1992b; *inter alia*), *Convolvulus* (Noda *et al.*, 1992a), *Quamoclit* (Ono *et al.*, 1992b) y *Pharbitis* (Ono *et al.*, 1992c). Estas investigaciones han demostrado que los constituyentes individuales de las

resinas representan monómeros de un liposacárido cuya aglicona corresponde a cualquiera de los ácidos grasos incluidos en el cuadro 1 y que para las resinas pertenecientes al grupo de la jalapina en las especies de *Ipomoea* es el ácido jalapínico, ácido 11(*S*)-hidroxihexadecanoico. El núcleo oligosacárido se encuentra parcialmente acilado en la mayoría de los casos y se combina con el grupo carboxilo de la aglicona para formar un éster macrocíclico (Noda *et al.*, 1987). El éxito en la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas ha dependido exclusivamente del empleo de la cromatografía de líquidos de alta presión. La elucidación estructural se ha realizado mediante la aplicación de las metodologías modernas espectroscópicas, en especial la resonancia magnética nuclear de alta resolución (300 y 500 MHz). A continuación se enumeran los glicolípidos aislados del género *Ipomoea* y cuya estructura se ha establecido totalmente.

(1) Orizabinas I-IV.

Los primeros constituyentes aislados a partir de un crudo resinoso fueron las orizabinas I-IV (Fig. 2), las cuales corresponden a la porción soluble en éter de las resinas glicosídicas de la raíz de *I. orizabensis* (Noda *et al.*, 1987). La estructura del núcleo liposacárido de las orizabinas se caracterizó como el 11-*O*- β -D-quinovopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido hidroxihexadecanoico, y en el cual el éster macrocíclico se estableció entre la aglicona y el grupo hidroxilo en C-3 de la unidad de ramnosa. Por primera ocasión, se intentó establecer la configuración absoluta del centro quiral C-11 del ácido jalapínico mediante el empleo del método de Horeau (1977). Sin embargo, el escaso exceso enantiomérico obtenido en esta reacción de esterificación no constituyó un argumento definitivo para la configuración 11-*R* originalmente propuesta, la cual posteriormente se revisó y estableció de manera inequívoca mediante la síntesis del ácido (11*S*) (+)-jalapínico (Shibuya *et al.*, 1989) y, recientemente, a través del empleo del método de Mosher (Ono *et al.*, 1993).



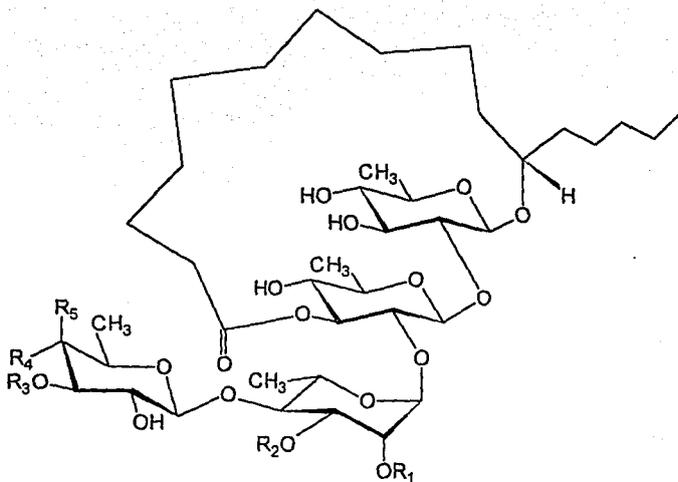
Orizabina I: R₁ = R₃ = H, R₂ = nla, R₄ = mba
 Orizabina II: R₁ = R₃ = H, R₂ = nla, R₄ = iba
 Orizabina III: R₁ = R₃ = H, R₂ = R₄ = nla
 Orizabina IV: R₁ = R₄ = H, R₂ = nla, R₃ = iba

Figura 2. Estructura de las orizabinas I-IV, constituyentes mayoritarios de los tubérculos de *Ipomoea orizabensis* (Pelletan) Ledenois. Abreviaciones: nla = niloilo (3-hidroxi-2-metilbutiroilo); mba = 2-metilbutiroilo; iba = isobutiroilo; tga = tigloilo.

(2) Muricatinas I-VIII.

Las semillas de *Ipomoea muricata* (L.) Jacq. se utilizan como laxantes y carminativos en la medicina tradicional de la India, y junto con las semillas de *I. hederacea* Jacq. se incluyen de manera oficial en la farmacopea de este país (Kirtiker, *et al.*, 1935). Khanna y Gupta (1967) investigaron mediante hidrólisis alcalina la composición de la muricatina A, principal glicósido de estas semillas. Este procedimiento proporcionó los ácidos caproico, palmítico y esteárico junto con la muricatina B, un biósido del ácido jalapínolico. En una segunda investigación, la hidrólisis alcalina de la fracción glicosídica proporcionó tres ácidos, denominados muricáticos A-C, junto con los ácidos volátiles isobutírico, 2S-metilbutanoico y (2R,3R)-3-hidroxi-2-metilbutanoico (Noda, *et al.*, 1988a). Al igual que las jalapinas de *I. orizabensis*, las muricatinas I-VIII corresponden a macrolactonas monoméricas de un tetrasacárido del ácido jalapínolico (Noda *et al.*, 1988b). El núcleo liposacárido de las muricatinas I-V y VII (Fig. 3) se designó con el nombre de ácido muricático A y cuya estructura se caracterizó como el 11-O-β-D-fucopiranosil-(1→4)-O-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-O-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-β-D-quinovopiranosido del ácido jalapínolico. El éster macrocíclico en estas muricatinas se establece entre el carboxilo de la aglicona y el grupo hidroxilo de la posición C-3 en la tercera unidad del tetrasacárido.

La estructura del ácido muricático B, constituyente del núcleo liposacárido de la muricatina VI (Fig. 3), se caracterizó como el 11-O-β-D-quinovopiranosil-(1→4)-O-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-O-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-β-D-quinovopiranosido del ácido jalapínolico (Noda *et al.*, 1988a; 1988b). La estructura del ácido muricático C se estableció como el 11-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-O-β-D-quinovopiranosil-(1→3)-O-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-β-D-quinovopiranosido del ácido jalapínolico (Noda *et al.*, 1988c), el cual se esterifica intramolecularmente en la posición C-2 de la quinovosa externa para generar la macrolactona del producto natural del cual deriva, la muricatina VIII (Fig. 4).



Muricatina I: $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{Omba}$
 Muricatina II: $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{Oiba}$
 Muricatina III: $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_2 = \text{mba}$, $R_5 = \text{Omba}$
 Muricatina IV: $R_1 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_2 = \text{mba}$, $R_5 = \text{Oiba}$
 Muricatina V: $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{OH}$
 Muricatina VI: $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = R_5 = \text{H}$, $R_4 = \text{OH}$
 Muricatina VII: $R_1 = \text{mba}$, $R_2 = R_3 = R_4 = \text{H}$, $R_5 = \text{Onla}$

Figura 3. Estructura de las muricatinas I-VII, constituyentes de la jalapina de *Ipomoea muricata* (L.) Jacq. Abreviaciones: mba = 2-metilbutiroilo; Omba = 2-metilbutiroato; Oiba = isobutirato; Onla = nilato (3-hidroxil-2-metilbutiroato).

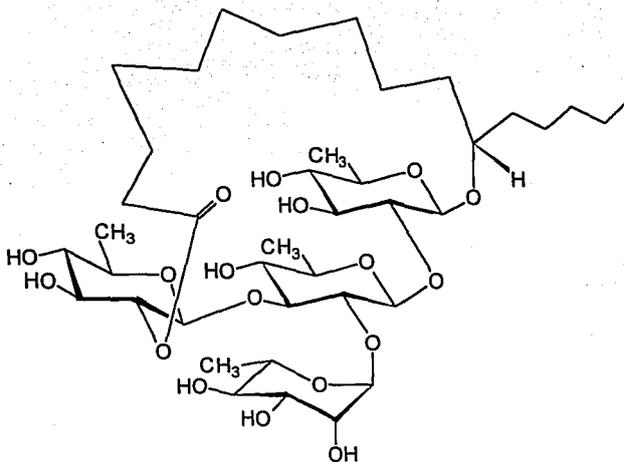
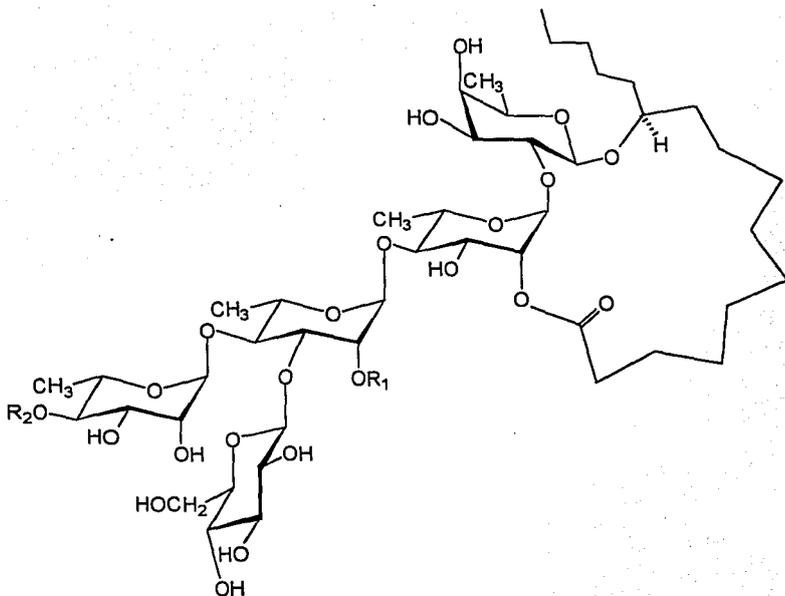


Figura 4. Estructura de la muricata VIII, constituyente minoritario de la jalapina de *Ipomoea muricata* (L.) Jacq.

(3) Operculinas I -XVIII.

Las raíces de *I. operculata* (*Operculina macrocarpa* L.), *rhizoma jalapae braziliensis*, y su extracto etanólico (*resina operculina*), conocido como la resina brasileña, se utilizan por sus propiedades laxantes como un sustituto de la jalapa mexicana (*resina jalapae*) obtenida de la *I. purga*. La hidrólisis alcalina de la porción soluble en éter (jalapina) de estas resinas proporcionó los ácidos acético, tíglico, *n*-valérico, trimetilacético, α -metilbutírico, isovalérico y propiónico como los componentes de la porción orgánica volátil, en tanto que la fracción insoluble en éter (convolvulina) de estas resinas generó, junto con los constituyentes antes mencionados, los ácidos 4-oxo-decanoico y exogónico (Ono *et al.*, 1989a).



- Operculina I: $R_1 = R_2 =$ dodecanoilo
 Operculina II: $R_1 = R_2 =$ decanoilo
 Operculina VII: $R_1 =$ dodecanoilo, $R_2 =$ decanoilo
 Operculina VIII: $R_1 =$ decanoilo, $R_2 =$ dodecanoilo
 Operculina XIII: $R_1 =$ dodecanoilo, $R_2 =$ H
 Operculina XIV: $R_1 =$ decanoilo, $R_2 =$ H
 Operculina XV: $R_1 =$ H, $R_2 =$ dodecanoilo

Figura 5. Estructura de las operculina I, II, VII, VIII, XIII, XIV y XV, constituyentes de la jalapina de los tubérculos de *Ipomoea operculata* (Gomes) Mart.

La estructura del ácido glicosídico mayoritario obtenido durante la hidrólisis alcalina de la convolvulina de la resina brasileña, y denominado como el ácido operculínico o ramnoconvolvulínico, se caracterizó como el 12-*O*- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 6)]-*O*- α -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]- β -D-glucopiranosido del ácido 3,12-dihidroxipalmitico (Wagner y Kazmaier, 1977).

Las investigaciones químicas conducidas recientemente por el grupo de Miyahara han permitido el aislamiento de dieciocho constituyentes a partir de las resinas glicosídicas de la jalapina de esta especie, las cuales fueron denominadas con el nombre trivial de operculinas I-XVIII (Ono *et al.*, 1990; 1991; 1992a). Estos constituyentes poseen una estructura macrocíclica análoga a la de las orizabinas y las muricatinas y presentan, en lugar de los ácidos isobutírico, α -metilbutírico, tíglico y nilico, a los ácidos dodecanoico y decanoico como los componentes orgánicos que esterifican el núcleo oligosacárido.

Las operculinas I, II, V, VII y VIII fueron los primeros constituyentes individuales purificados a partir de la fracción soluble en éter de la resina brasileña y cuya estructura se estableció totalmente (Ono *et al.*, 1990). Estos compuestos proporcionaron al someterse a una hidrólisis alcalina el mismo 11-*O*-glicósido del ácido jalapínico, denominado con el nombre de ácido operculínico A, y cuya estructura se caracterizó como el 11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico (Ono *et al.*, 1989b).

Es importante destacar que las operculinas I y II (Fig. 5) presentan dos moles de un mismo ácido graso, los ácidos dodecanoico y decanoico, respectivamente, esterificando las posiciones C-4 de ramnosa externa y C-2 de la segunda unidad de metilpentosa (la primera ramnosa interna) del núcleo oligosacárido. Por otra parte, la formación del éster macrocíclico intramolecular se establece en la posición C-2 de la segunda ramnosa interna en el oligosacárido (Ono *et al.*, 1989a). La estructura de la operculina V (Fig. 6) representó un diastereoisómero de la operculina I en el cual el éster intramolecular se

localiza en la posición C-3 de la segunda ramnosa interna (Ono *et al.*, 1990). En las operculinas VII y VIII (Fig. 5) uno de los residuos del ácido dodecanoico presente en la operculina I se reemplaza por el ácido decanoico. Por lo tanto, se estableció que los ácidos dodecanoico y decanoico en la operculina VII esterificaban las posiciones C-4 y C-2 de las unidades Ramnosa' y Ramnosa'', en tanto que en la operculina VIII los grupos ésteres se encuentran invertidos (Ono *et al.*, 1990).

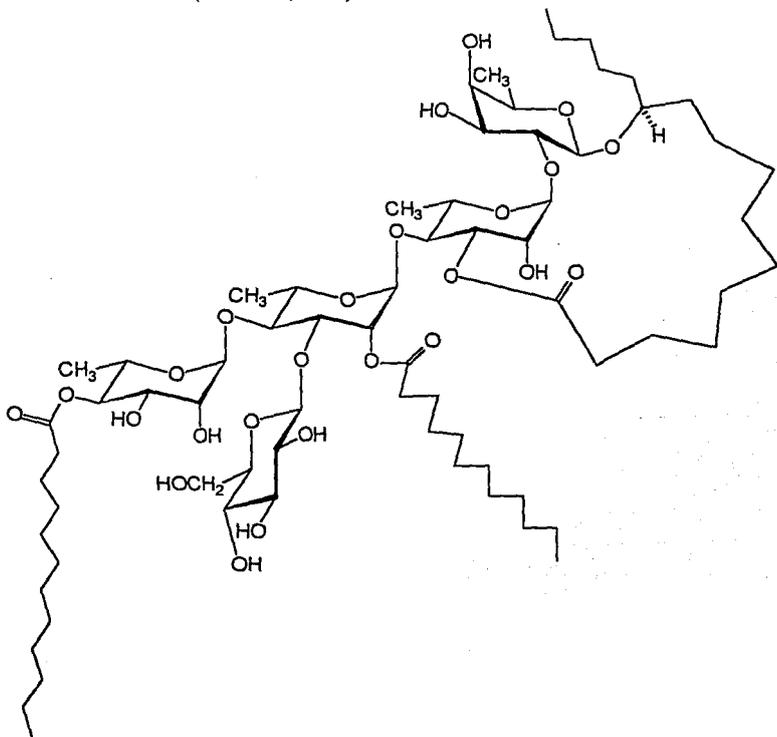
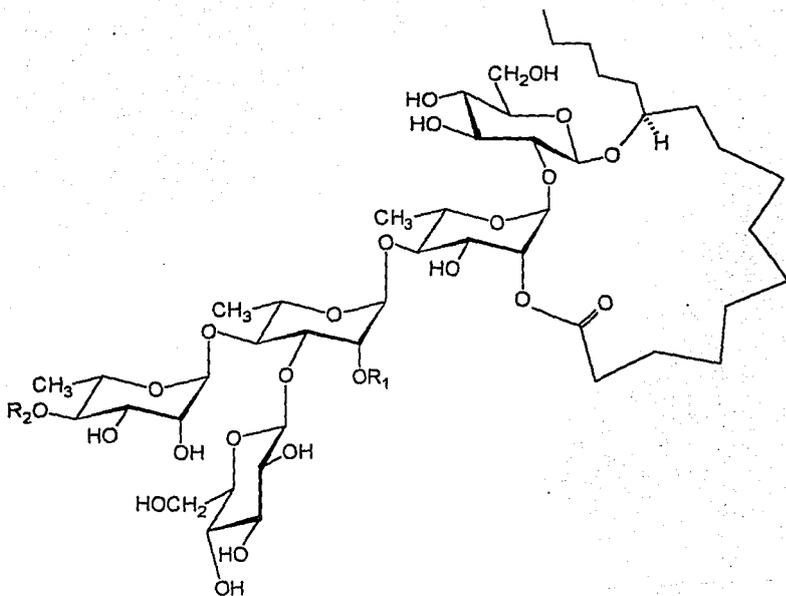


Figura 6. Estructura de la operculina V, constituyente de *Ipomoea operculata* (Gomes) Mart.



- Operculina III: $R_1 = R_2 =$ dodecanoilo
 Operculina IV: $R_1 = R_2 =$ decanoilo
 Operculina IX: $R_1 =$ dodecanoilo, $R_2 =$ decanoilo
 Operculina X: $R_1 =$ decanoilo, $R_2 =$ dodecanoilo
 Operculina XVI: $R_1 =$ dodecanoilo, $R_2 =$ H
 Operculina XVII: $R_1 =$ decanoilo, $R_2 =$ H
 Operculina XVIII: $R_1 =$ H, $R_2 =$ dodecanoilo

Figura 7. Estructura de las operculinas III, IV, IX, X, XVI, XVII y XVIII, resinas glicosídicas de *Ipomoea operculata* (Gomes) Mart.

Las operculinas XIII y XV (Fig. 5) generan por hidrólisis alcalina una mol del ácido dodecanoico y una del ácido operculínico A. Por otra parte, la operculina XIV (Fig. 5) proporcionó una mol de ácido decanoico y el mismo ácido glicosídico obtenido a partir de la operculina I. De esta manera, sus estructuras correspondieron a los derivados desacilados parciales de las operculinas I y/o II (Ono *et al.*, 1992a).

Las operculinas III, IV, IX, X, XVI, XVII y XVIII (Fig. 7) producen mediante hidrólisis alcalina el mismo ácido glicosídico denominado con el nombre de ácido operculínico B y cuya estructura corresponde al 11-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido del ácido jalapinólico (Ono *et al.*, 1991).

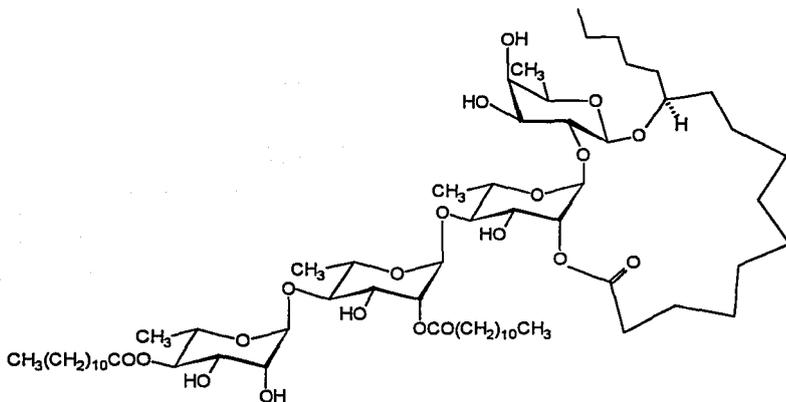
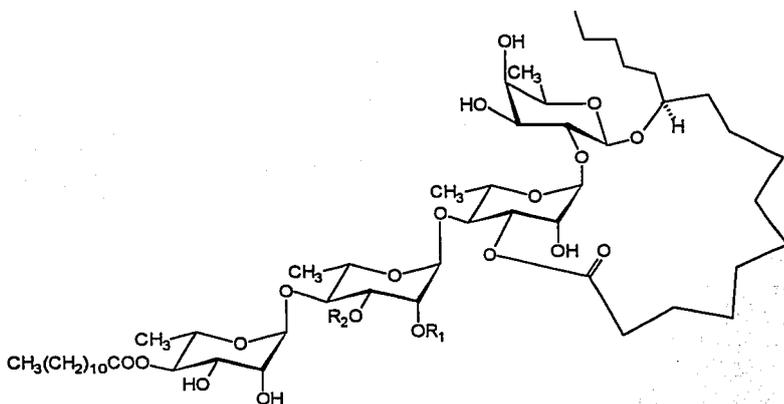


Figura 8. Estructura de la operculina VI, constituyente minoritario de la resina de *Ipomoea operculata* (Gomes) Mart.

Las operculinas VI (Fig. 8), XI y XII (Fig. 9) proporcionaron durante su reacción de hidrólisis alcalina los ácidos dodecanoico y operculínico C. Este ácido glicosídico corresponde a un tetrasacárido a diferencia del núcleo pentasacárido de los ácidos operculínicos A y B. Su estructura se caracterizó como el 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico (Ono *et al.*, 1992a).



Operculina XI: $\text{R}_1 = \text{dodecanoilo}$, $\text{R}_2 = \text{H}$
 Operculina XII: $\text{R}_1 = \text{H}$, $\text{R}_2 = \text{dodecanoilo}$

Figura 9. Estructura de las operculinas XI y XII, constituyentes minoritarios de la resina de *Ipomoea operculata* (Gomes) Mart.

(4) Simoninas I-V.

De las raíces de *I. batatas* (L.) Lam. cv. Simon se han aislado cinco resinas glicosídicas de la porción soluble en éter, las simoninas I-V (Noda *et al.*, 1992b). La simonina I (Fig. 10) constituye el primer ejemplo de una jalapina sustituida con el ácido *trans*cinámico, como uno de los componentes de la fracción orgánica ácida que esterifica al núcleo oligosacárido. Este constituyente también generó por hidrólisis alcalina los ácidos decanoico y operculínico C, de tal suerte que su estructura se caracterizó como el 11-*O*-(2-*O-trans*cinamoil)-[(4-*O-n*-decanoil)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O-n*-decanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapinólico (1,2"-lactona).

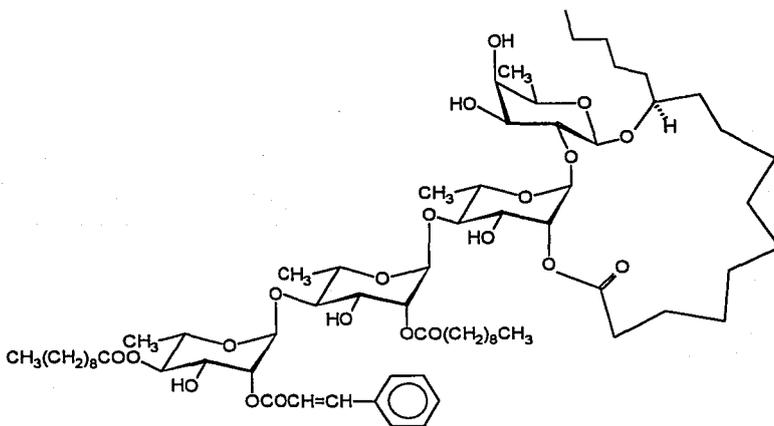
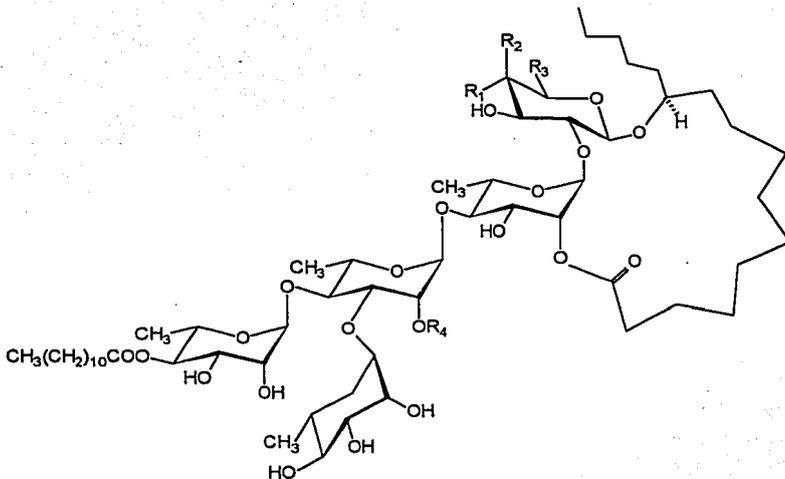


Figura 10. Estructura de la simonina I aislada de *Ipomoea batatas* (cv. Simon), único ejemplo de una resina glicosídica con un ácido alifático insaturado sustituido con un residuo aromático (ácido *trans*-cinámico) como uno de los grupos acilantes del núcleo sacárido.

La hidrólisis alcalina de la simonina II (Fig. 11) permitió identificar los ácidos 2-metilbutanoico, dodecanoico y un nuevo ácido glicosídico, denominado ácido simónico A y cuya estructura se estableció como el 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosido del ácido jalapínico. La lactona intramolecular se estableció en la posición C-2" al igual que en las operculinas, en tanto que la acilación del núcleo oligosacárido sucedió en la posición C-4^m de la unidad de ramnosa externa para el ácido dodecanoico y en C-2' de la segunda metilpentosa del núcleo oligosacárido para el ácido metilbutírico. Las simoninas III-V (Fig. 11) comparten el mismo núcleo liposacárido, el cual se denominó con el nombre de ácido simónico B y cuya estructura se caracterizó como el 3^m-*O*- α -L-ramnopiranosido del ácido operculínico C (Noda *et al.*, 1992b).

(5) Tetrasacárido de *Ipomoea stans*.

A partir de la *I. stans*, se aisló una mezcla compleja de resinas glicosídicas que contienen, al igual que todas las jalapinas purificadas de las convolvuláceas, un oligosacárido del ácido jalapínico. La hidrólisis básica del crudo resinoso proporcionó un sólo ácido glicosídico caracterizado como el 11-*O*- β -quinovopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-quinovósido del ácido 11-hidroxi-hexadecanoico. El constituyente mayoritario de esta resina contiene una molécula del ácido 3-hidroxi-2-metilbutanoico unido a la posición C-6 de glucosa y dos moléculas del ácido 2-metilbutanoico esterificando las posiciones C-4 de la quinovosa terminal y la C-2 de la ramnosa. La aglicona se lactoniza con el hidroxilo de la posición C-3 de la ramnosa (Fig. 12). Un análisis detallado mediante resonancia magnética nuclear demostró que este compuesto representaba en realidad una mezcla de diastereoisómeros que involucraban diferentes enantiómeros [(2R,3R) y (2S,3S)] del ácido 3-hidroxi-2-metilbutanoico (Enríquez *et al.*, 1992).



Simonina II: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{CH}_2\text{OH}$, $R_4 = \text{mba}$

Simonina III: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{mba}$

Simonina IV: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{deca}$

Simonina V: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{CH}_3$, $R_4 = \text{octa}$

Figura 11. Estructura de las simoninas II-V, constituyentes mayoritarios de la resina de *Ipomoea batatas* (cv. Simon). Abreviaciones: mba = 2-metilbutirolilo, deca = decanoilo, octa = octanoilo.

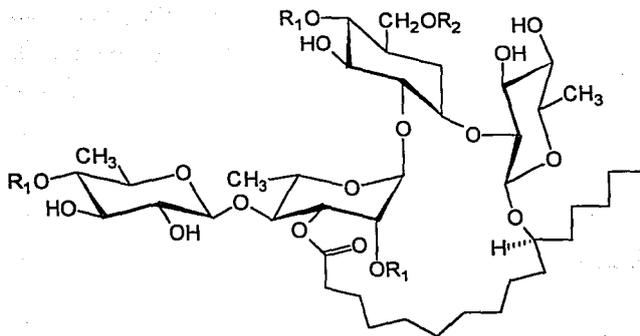


Figura 12. Estructura del constituyente mayoritario de la resina glicosídica de *Ipomoea stans* Cav. R_1 = 2-metilbutiroilo, R_2 = 3-hidroxi-2-metilbutiroilo.

1.1.3 FARMACOLOGIA DEL GENERO IPOMOEA.

A pesar del uso ampliamente difundido de las resinas glicosídicas como purgantes en la medicina tradicional de diversas culturas en todo el mundo, no existen numerosas referencias bibliográficas relacionadas con su potencial farmacológico. Estudios previos han descrito efectos antimicrobianos (Bieber *et al.*, 1986; Carlson *et al.*, 1948), antiinflamatorios (Pongprayoon *et al.*, 1992), espasmogénicos (Matin *et al.*, 1969), espasmolíticos (Pongprayoon *et al.*, 1992), citotóxicos (Harrison *et al.*, 1985; Sarin *et al.*, 1973) y antitumorales (Bieber *et al.*, 1986) para los extractos de algunas especies medicinales del género *Ipomoea*. Ninguno de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas, *i.e.* los glicolípidos hasta ahora purificados, ha sido evaluado con el objetivo de investigar su potencialidad biológica.

De manera especial ha sido la atención prestada al contenido de alcaloides alucinógenos de tipo ergolina presentes en algunos géneros de convolvuláceas (Der Marderosian, 1967). Estudios etnobotánicos demostraron el uso que los zapotecas dan a las semillas de *Ipomoea violacea* (*Ipomoea tricolor*), conocida como "badoh negro" y del "ololiuqui", *Rivea corymbosa* (L.) Hall. f. [*Turbina corymbosa* (L.) Raf.], en las regiones montañosas de Oaxaca y por los nativos de otras regiones de América Central con fines adivinatorios y alucinógenos durante sus ceremonias religiosas (Schultes, 1941). Esta información constituyó el punto de partida para las investigaciones fitoquímicas que permitieron el descubrimiento de los alcaloides del tipo ergolina en las plantas superiores (Hofmann y Tschertter, 1960). Los primeros alcaloides aislados de estas semillas fueron la amida del ácido lisérgico, principal responsable de la actividad alucinógena del "ololiuqui", la amida del ácido isolisérgico y la chanoclavina (Hofmann, 1963; Stoll y Hofmann, 1965). Posteriormente, se identificó a la elimoclavina y al lisergol (Hofmann, 1961). A partir de estos hallazgos, numerosas investigaciones fitoquímicas han demostrado que la distribución de las ergolinas en las plantas superiores está limitada a algunos géneros de la familia Convolvulaceae (Stoll y Hofmann, 1965; Stadler y Stütz, 1975). De los géneros

que han sido evaluados para determinar la presencia de indoles alucinógenos destacan las especies de *Ipomoea*, *Rivea*, *Argyreia* y *Stictocardia* por su alto contenido alcaloideo (Der Marderosian, 1967; Chao y Der Marderosian, 1973). Un hallazgo sumamente interesante fue la identificación en *Ipomoea argyrophylla* Vatke (Stauffer et al., 1965) de alcaloides peptídicos, la ergosina y la ergosinina, los cuales constituyen los productos metabólicos de varias especies de hongos del género *Claviceps* (Floss, 1976).

La actividad psicotomimética de los alcaloides del tipo ergolina se conocía con anterioridad a su aislamiento a partir de las semillas de las convolvuláceas y la farmacología de algunos de ellos se investigó ampliamente durante los estudios efectuados al LSD y compuestos relacionados (Der Marderosian, 1967). La literatura sobre las investigaciones farmacológicas y clínicas relacionadas con el uso terapéutico de las ergolinas es sumamente extensa, y tanto la actividad alucinógena como las otras acciones farmacológicas observadas para esta clase de alcaloides se explican mediante sus interacciones con los receptores triptaminérgicos, dopaminérgicos y α -adrenérgicos (Goodman Gilman *et al.*, 1986; Rehacek y Sajdl, 1990).

1.2 GENERALIDADES SOBRE LOS SISTEMAS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES.

1.2.1 TRANSDUCCION DE SEÑALES Y LA PROTEÍNA CINASA C (PKC).

Los sistemas de transducción de señales que permiten establecer una comunicación intercelular, en especial los sistemas proteicos involucrados en esas complejas redes de comunicación, y que son mediadoras de los efectos provocados por los factores de crecimiento sobre la diferenciación celular, representan una nueva clase de objetivos de investigación para el diseño y el desarrollo de nuevos agentes anticancerígenos (Powis, 1991). En este sentido, uno de los aspectos tradicionales de la investigación en la química farmacéutica de los productos naturales ha sido su empleo en la identificación del papel fisiológico de receptores y enzimas (Hardie, 1991). Ejemplos clásicos de este tipo de

estrategia son las investigaciones del sistema colinérgico, en donde destacan la importancia de los alcaloides como el curare y la nicotina para la identificación de los receptores nicotínicos y los alcaloides tropánicos y la muscarina sobre la extensa investigación de los receptores muscarínicos (Drummond y Hughes, 1987). La unión de un neurotransmisor, una hormona o un fármaco a su receptor en la superficie celular representa sólo el primer paso en una cascada de eventos moleculares que resulta en la transducción de la señal portada por estos agonistas al interior de la célula para el inicio de una respuesta fisiológica o farmacológica. La mayoría de los agonistas extracelulares ejercen sus efectos mediante la activación o la inhibición de los sistemas de transducción de señales transmembranales que controlan la producción de los segundos mensajeros. Estos a su vez median la acción de los agonistas a través de la modulación de la actividad de sistemas enzimáticos y, de esta manera, amplifican la señal portada al interior de la célula. En muchos casos, la estimulación de estos receptores resulta en una activación fosforilación o desfosforilación de residuos de serina, treonina y tirosina en las proteínas efectoras (*e.g.* enzimas o canales de iones), la cual provoca cambios conformacionales en estos complejos proteicos y así se alteran sus propiedades fisicoquímicas reguladoras para el inicio de la respuesta fisiológica (Alberts *et al.*, 1983; Cohen, 1992).

En la mayoría de los casos, los receptores se encuentran presentes en la membrana celular como entidades independientes, las cuales al ser activadas pueden acoplarse de manera transitoria a otros elementos de transducción conocidos como las proteínas G (Hepler y Gilman, 1992). Estas proteínas acoplan los receptores de la superficie celular a uno o a varios de los efectores proteicos involucrados en los sistemas de transducción de señales conocidos: (1) el sistema de adenilato ciclasa-AMP cíclico (Alberts *et al.*, 1983); (2) la fosfolipasa C y el ciclo del fosfatidilinositol (Liscovitch, 1992); y, por último, (3) la regulación de canales de iones (Barnard, 1992; Taylor y Marshall, 1992). La diversidad en las respuestas provocadas por los agonistas puede explicarse mediante los efectos pleiotrópicos de las proteína-quinasas y fosfatasa que son reguladas por éstos y por la

presencia (o ausencia) del sustrato proteico sobre el cual actúan (Cohen, 1992). Los principales segundos mensajeros que operan en las células eucarióticas y las proteínas-quinasas que activan se ilustran en la figura 13.

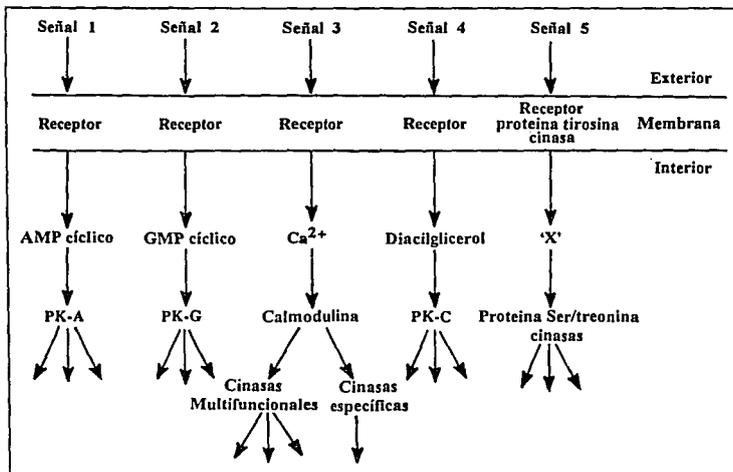


Figura 13. Principales sistemas de transducción de señales que operan en las células eucarióticas. Abreviaciones: PKA, proteína quinasas dependiente del AMP-cíclico; PKG, proteína quinasas dependiente del GMP-cíclico; PKC, proteína quinasas C; 'X' segundo mensajero hipotético (Adaptado de Cohen, 1992).

En la actualidad, se conocen numerosos fármacos de origen sintético y productos naturales que actúan como moduladores de la actividad enzimática de los efectores proteicos involucrados en la transducción de señales transmembranales mediadas por los factores de crecimiento y sobre la proliferación celular, los cuales incluyen agentes moduladores de la actividad de las proteínas-quinasas que fosforilan residuos de serina-

treonina (Hannun, *et al.*, 1991; Hidaka *et al.*, 1991; Tamaoki, 1991), de las proteína cinasas que fosforilan tirosina (Akiyama y Ogawara, 1991; Geahlen *et al.*, 1989; Levitzki *et al.*, 1991; Uehara y Fukazawa, 1991; Umezawa e Imoto, 1991) y de las fosfolipasas C (Powis, 1991). Diversos ejemplos de proteína-cinasas específicas se han determinado como productos de la expresión de oncogenes y, de manera general, se piensa que éstas se asocian con las causas que generan cáncer en las células de mamíferos (Hardie, 1991; Weinberg, 1985). De esta manera, a medida que se incrementa el conocimiento de los mecanismos de transducción de señales involucrados en el control del crecimiento celular, se descubrirán nuevos sitios para la intervención de productos farmacológicos de posible utilidad en la terapéutica del cáncer (Angerhofer y Pezzuto, 1993).

La proteína cinasa C (PKC), una cinasa dependiente de fosfolípidos y activada por Ca^{2+} , desempeña un papel crucial en la transducción de señales involucradas en los procesos de proliferación, regulación y diferenciación celular, la promoción de tumores y la oncogénesis (Nishizuka, 1984; 1986). La regulación hormonal mediada por la actividad enzimática de la PKC en una gran variedad de procesos metabólicos está asociada con la fosforilación reversible de sustratos proteicos (Fig. 14). En este sistema el agonista se une a su receptor en la membrana celular e induce, vía las proteínas G, la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-difosfato para producir los segundos mensajeros, el 1,2-diacilglicerol y el inositol-1,4,5-trifosfato, mediante la activación de la fosfolipasa C o fosfodiesterasa. El segundo de estos mensajeros es responsable de la movilización de iones calcio en el citoplasma celular, mientras que el diacilglicerol activa a la PKC al incrementar su afinidad por Ca^{2+} (Aitken, 1987; Evans, 1991). La activación de la PKC produce la translocación de la enzima del citoplasma a la membrana celular, en donde expone su sitio hidrofílico y, en este estado de asociación, esta enzima dependiente de iones calcio induce la fosforilación de un gran número de sustratos proteicos (Fig. 14). Esta actividad enzimática da como resultado la regulación de canales de iones y la secreción de mediadores mitogénicos e inflamatorios, incluyendo las prostaglandinas (Evans, 1991).

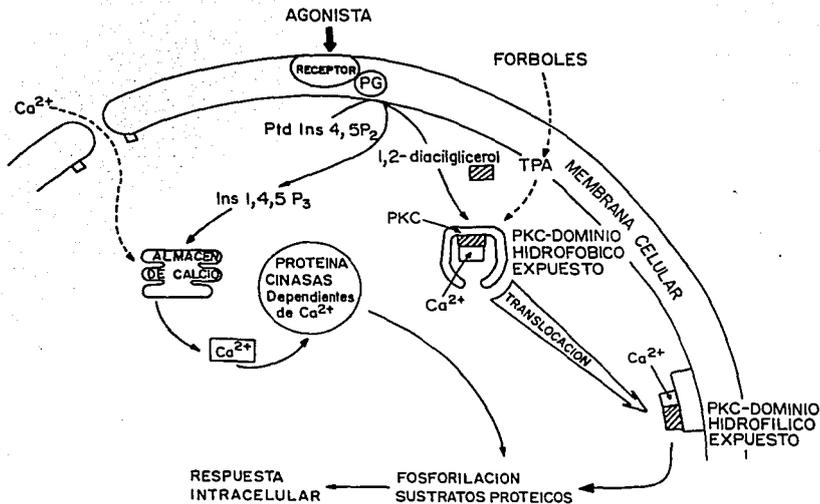


Figura 14. Ciclo del fosfatidilinositol. La unión del agonista con su receptor membranal estimula la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-difosfato (PtdIns 4,5P₂) vía la activación de proteínas G (PG) para generar el inositol-1,4,5-trifosfato (Ins 1,4,5P₃) y el 1,2-diacilglicerol. Este último constituye el activador fisiológico de la proteína cinasa C (PKC). Los ésteres de forbol (TPA), metabolitos secundarios de la familia Euphorbiaceae y promotores de tumores, actúan como antagonistas del diacilglicerol provocando la activación de esta enzima.

La PKC se purificó por primera ocasión por el grupo de Nishizuka (Takai *et al.*, 1977) y, posteriormente, fue copurificada como el "receptor" de los ésteres de forbol (Kikkawa *et al.*, 1983). Esta proteína se reconoció como una enzima monomérica de M_r 79 000. La PKC se acompleja con una molécula del dibutirato de forbol [³H] y esta unión es inhibida de manera competitiva por el diacilglicerol (Sharkey, 1984; Evans, 1991). En la actualidad, el interés de la PKC como un ensayo molecular para el desarrollo de nuevos productos farmacológicamente activos y de utilidad en la terapéutica del cáncer surgió de

las siguientes observaciones experimentales. En primer lugar, los niveles elevados del diacilglicerol en muchas de las células transformadas por oncogenes (Powell, 1991). Por otra parte, la PKC es el principal mediador de los efectos pleiotrópicos provocados por los ésteres de forbol, productos naturales promotores de tumores (Blumberg, 1988).

1.2.2 FARMACOS Y PRODUCTOS NATURALES MODULADORES DE LA PKC.

Se han descubierto numerosos activadores e inhibidores de la PKC, tanto de naturaleza sintética como productos de origen natural. La identificación de compuestos moduladores de la actividad enzimática de la PKC permite su empleo como una herramienta de investigación bioquímica para la elucidación de su mecanismo de regulación *in vitro*, explorar sus actividades celulares y determinar su papel en la mediación de respuestas biológicas (Evans, 1991).

El aislamiento de la PKC como el "receptor" de los ésteres de forbol, metabolitos secundarios característicos de las familias Euphorbiaceae y Thymelaeaceae (Evans y Taylor, 1983), y las diferencias observadas en la actividad biológica (*e.g.*, actividad proinflamatoria y ausencia de actividad promotora de tumores) de varios de estos forboles condujeron a una extensa investigación sobre la capacidad de los ésteres de forbol para activar y para unirse al dominio regulatorio de esta enzima (Ellis *et al.*, 1987). El 12-*O*-tetradecanoil-13-*O*-acetilforbol (Fig. 15) constituye el ejemplo clásico de un éster de forbol promotor de tumores y con actividad proinflamatoria (DE₅₀ 0.007 µg), es un agonista (CI₅₀ 32 nM) del diacilglicerol en la activación de la PKC y, por lo tanto, incrementa la afinidad de esta enzima por Ca²⁺ y fosfolípidos (Ellis *et al.*, 1987). Se ha demostrado que la actividad de los ésteres de forbol *in vivo* depende de la estimulación de proteínas cinasas con diferente especificidad de sustratos y, por lo tanto, producen la activación preferencial de isoenzimas (Evans, 1991).

Un ejemplo adicional de la activación de la PKC provocada por un producto natural lo proporciona una nueva clase de macrolactonas, aisladas del briozoario marino

Bugula neritina, y denominadas como las briostatinas (Kraft, 1993; Pettit *et al.*, 1982). Estos productos naturales presentan una actividad antineoplásica de interés terapéutico por su limitado potencial citotóxico, ya que muestran una especificidad de acción en contra de los sistemas de leucémicos tanto *in vitro* como *in vivo* (Berkow y Karft, 1985). Las briostatinas se unen a la región regulatoria de la PKC y producen su activación a una concentración efectiva media de 1-10 nM y, al igual que los ésteres de forbol, presentan la actividad farmacológica característica de un agonista parcial (De Vries *et al.*, 1988). Estos activadores de la PKC bloquean la diferenciación celular inducida por los ésteres de forbol y también pueden bloquear o mimetizar los efectos de los ésteres de forbol sobre la proliferación celular. La briostatina I (Fig. 15) se encuentra en la fase I de evaluación clínica como un agente anticancerígeno (Philip *et al.*, 1993; Powis, 1991).

Se han identificado numerosos inhibidores de la PKC (Cuadro 2), entre los que se incluyen fármacos con actividad antineoplásica de naturaleza sintética como las fenotiazinas (Wise *et al.*, 1982), el tamoxifen (O'Brien *et al.*, 1985), la suramina (Hannun, 1991), los lisofosfolípidos [ET18-OCH₃] (Helfman, 1983) y las aminoacridinas (Hannun y Bell, 1988) y agentes citotóxicos y antitumorales de origen natural (Fig. 15) como la doxorubicina (Hannun, 1989), la estaurosporina (Vegesna *et al.*, 1988; Tamaoki, 1991), la calfostina C (Tamaoki, 1991), el verbascósido (Herbert *et al.*, 1991) y la esfingosina (Hannun *et al.*, 1991).

La estaurosporina, un alcaloide indólico antifúngico aislado de diversas especies de *Streptomyces*, es el inhibidor *in vitro* de la PKC más poderoso que se conoce (Cuadro 2). El sitio de acción de este agente citotóxico es el dominio catalítico de la PKC (Tamaoki, 1991). La calfostina C aislada del hongo *Cladosporium cladosporioides* posee actividad citotóxica sobre el crecimiento de líneas celulares derivadas de tumores cancerosos de mamíferos. Esta actividad está asociada con su capacidad inhibidora de la actividad enzimática de la PKC, la cual se produce mediante una interacción antagonista de los ésteres de forbol con el dominio modulador enzimático (Tamaoki, 1991).

Cuadro 2. Actividad moduladora de algunos fármacos antitumorales y productos naturales citotóxicos sobre la proteína cinasa C .^a

	Actividad ^b	Sito de acción	IC ₅₀ (µM) ^c
Lisofosfolípidos	-	dominio regulatorio	40
Briostatinas	+/-	dominio regulatorio	0.005-0.010 ^d
Calfostina C	-	dominio regulatorio	0.05 ^e
Doxorrubicina	-	dominio regulatorio	15
Esfingosina	-	dominio regulatorio	1-5 ^f
Estaurosporina	-	dominio catalítico	0.003-0.02
Suramina	-	dominio catalítico	30
Tamoxifen	-	desconocido	50-250
Verbascósido	-	dominio catalítico	25 ^g

^a Adaptado de Powis (1991).

^b - inhibidor; + activador.

^c Valores dependientes de las condiciones del bioensayo.

^d Constante de disociación.

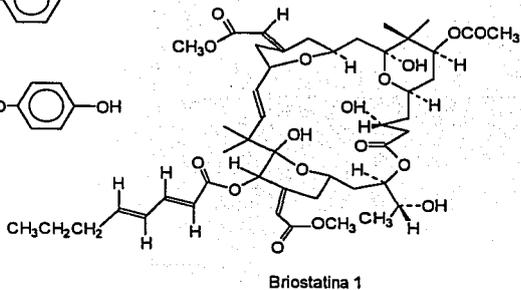
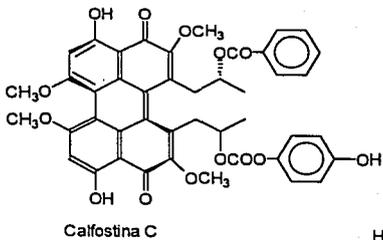
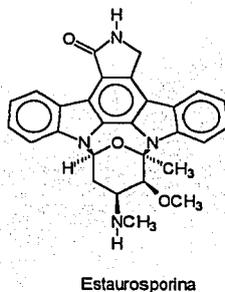
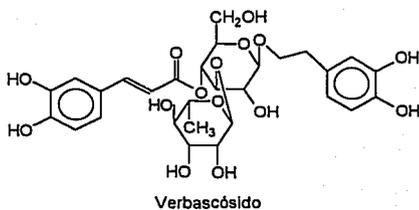
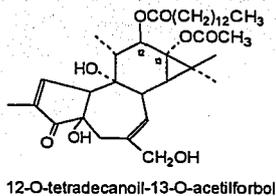
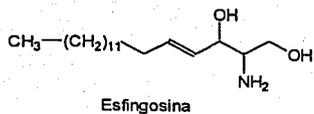
^e Tamaoki, 1991.

^f Hannun *et al.*, 1991.

^g Herbert *et al.*, 1991.

La actividad inhibidora de la PKC observada para el verbascósido (Cuadro 2), aislado de *Lantana camara* L. (Verbenaceae), es la responsable de los efectos antimicrobianos, inmunosupresores y antitumorales descritos para este glicósido fenólico (Herbert *et al.*, 1991). Las especies medicinales del género *Polygonum* (Polygonaceae) son fuentes de compuestos con una poderosa actividad citotóxica, la cual se ha correlacionado con la presencia de glicósidos inhibidores de proteína cinasas (Jayatilake *et al.*, 1993). Recientemente, se describió la actividad inhibidora de la PKC para los vanicósidos A (CI₅₀ 44 µg/ml) y B (CI₅₀ 31 µg/ml), dos glicósidos fenólicos de estructura

relacionada con el verbascósido y que constituyen la fracción citotóxica del extracto etanólico de *Polygonum pennsylvanicum* (Snedden y Zimmermann, 1993). El fraccionamiento biodirigido de *P. cuspidatum* permitió el descubrimiento de un hidroxiestilbeno, el resveratrol, como el responsable de la actividad inhibidora de la PKC (CI_{50} 40 $\mu\text{g/ml}$) y de la proteína-tirosina cinasa (CI_{50} 60 $\mu\text{g/ml}$) desarrollada por la fracción metanólica de las raíces de esta especie (Jayatilake *et al.*, 1993). Por último, la esfingosina es una base nitrogenada con propiedades antifúngicas aislada de los tunicados marinos del género *Didemnum* (Ireland *et al.*, 1988). Este compuesto inhibe a la PKC *in vitro* actuando como un antagonista del diacilglicerol (Cuadro 2) y constituye el aminoalcohol de los lipoides localizados en las vainas de mielina de los nervios en los animales.



12,13-Dibutirato de forbol

Figura 15. Productos naturales moduladores de la actividad enzimática de la PKC.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

2.1 CONSIDERACIONES GENERALES.

En diversos estudios se ha descrito la naturaleza alelopática de algunas especies del género *Ipomoea* (Convolvulaceae) (Shinghvi y Sharma, 1984; Villamayor y Perez, 1983), en especial los efectos inhibitorios de *I. batatas* sobre el crecimiento vegetal de las malezas (Harrison y Peterson, 1986; Peterson y Harrison, 1991). Estas especies pueden competir agresivamente por la humedad, la luz y los nutrimentos del suelo en los agroecosistemas, debido a su gran capacidad de propagación, la cual puede complementarse con el potencial alelopático que poseen. Esta interferencia ecológica ha sido de un gran valor en la agricultura tradicional y, por lo tanto, este aspecto de la alelopatía representa una fuente alternativa para el descubrimiento de nuevos agentes herbicidas selectivos. A pesar de estas evidencias experimentales que han demostrado el potencial alelopático de las especies de importancia económica del género *Ipomoea*, no se había realizado hasta este momento ninguna investigación química para la caracterización estructural de los constituyentes responsables de sus efectos alelopáticos.

En las zonas tropicales y templadas de México, los policultivos constituyen un manejo eficiente de los recursos naturales en los agroecosistemas tradicionales en donde el cultivo de algunas especies semidomesticadas de leguminosas, *e.g. Sorghum vulgare* y *Stizolobium pruriens*, entre las más utilizadas, así como el empleo de cultivos de especies del género *Ipomoea*, constituye una práctica eficiente para el control natural de las plantas nocivas (Einhellig y Souza, 1992; Anaya *et al.*, 1987a). La planta don Diego de día, *I. tricolor*, se utiliza en la época de barbecho durante los meses de agosto a octubre en los cañaverales del estado de Morelos como un cultivo de cobertura. El potencial alelopático de esta especie se demostró en un estudio inicial mediante la evaluación de la actividad inhibitoria de los lixiviados acuosos y de extractos orgánicos preparados a partir de toda la planta sobre la germinación de semillas y el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* Watts. y *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Los resultados de esta

investigación demostraron un fuerte efecto inhibitor de los lixiviados acuosos sobre el crecimiento radicular (60-70 %) de las dos especies de prueba. Los extractos orgánicos totales preparados con CHCl_3 y AcOEt también desarrollaron una inhibición del crecimiento radicular del 60-80 % (Anaya *et al.*, 1990). De esta manera, el propósito fundamental de la presente propuesta de investigación consistió en el aislamiento y la determinación de la naturaleza química de los constituyentes responsables de la actividad inhibitora del crecimiento vegetal observada para los extractos de *I. tricolor*.

El estudio químico y farmacológico de las convolvuláceas, con excepción de la investigación de su contenido alcaloideo, ha sido sumamente parcial y, por lo tanto, la información disponible relacionada con el contenido metabólico de esta familia y su posible importancia farmacológica constituye un punto de partida de gran interés para la planeación y el desarrollo de diversos proyectos interdisciplinarios que contribuyan al conocimiento de la composición química y la actividad biológica de la flora mexicana de interés medicinal y económico.

La selección del material vegetal para cualquier estudio farmacognóstico con base en sus antecedentes etnobotánicos ha permitido el descubrimiento de nuevos e interesantes productos naturales y la literatura científica contemporánea da una vasta información a este respecto (Cordell *et al.*, 1991; Hamburger y Hostettmann, 1991; Mata, 1993; Vlietinck y Vanden Berghe, 1991; *inter alia*). En la actualidad, el estudio de la medicina tradicional y de las plantas medicinales ha entrado en una etapa de difundido interés en el medio médico y científico nacional e internacional provocando un "renacimiento" de la herbolaría y un cambio en los procedimientos de investigación (farmacológicos, químicos y toxicológicos) involucrados en el descubrimiento de las propiedades curativas de las materias primas vegetales y de sus principios farmacodinámicos (Elisabetsky, 1991; Reuter, 1991; Sévenet, 1991). En la actualidad, el aspecto de mayor importancia en el que se concentran las investigaciones farmacognósticas se refiere al aislamiento de los constituyentes bioactivos de las materias

primas mediante el empleo de procedimientos de evaluación biológica (fraccionamiento biodirigido) que permitan detectar la actividad deseada en los extractos crudos y monitorearla a lo largo de todo el estudio químico. En la última década, el desarrollo de bioensayos simples y reproducibles, tanto a nivel celular como a nivel molecular, ha tomado un auge que ha hecho posible el aislamiento de principios con actividades biológicas selectivas, muchas de ellas de interés terapéutico (McLaughlin, 1991; Phillipson, 1991; Samuelsson, 1991; Suffness y Pezzuto, 1991; Vanden Berghe y Vlietinck, 1991; *inter alia*). En este sentido, la segunda parte de la investigación desarrollada en la presente disertación doctoral consistió en la evaluación del potencial farmacológico de interés en la terapéutica del cáncer de algunas especies del género *Ipomoea* de importancia en la medicina tradicional de nuestro país con el propósito de seleccionar candidatos potenciales para el aislamiento y el desarrollo de nuevos compuestos farmacodinámicos.

2.2 OBJETIVO GENERAL.

El objetivo fundamental de la presente disertación doctoral fue la investigación de la naturaleza química de los metabolitos secundarios responsables de la actividad alelopática desarrollada por los extractos de *Ipomoea tricolor* como una fuente de nuevos agentes herbicidas selectivos para el control de plantas nocivas. Esta propuesta se concentró en el aislamiento y la caracterización del principio bioactivo mayoritario y en la determinación de su toxicidad relativa como un agente alelopático. De manera adicional, se evaluó el potencial de la actividad farmacológica del género *Ipomoea* de posible utilidad terapéutica mediante la determinación de la citotoxicidad en cultivos de células tumorales *in vitro* y de la capacidad moduladora de la actividad enzimática de la proteína cinasa C de extractos orgánicos preparados a partir de cuatro especies de amplio uso en la herbolaria mexicana, *i.e.* *Ipomoea pes-caprae*, *I. purga*, *I. tryianthina* e *I. tricolor*.

2.3 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

2.3.1. Realizar el estudio fitoquímico biodirigido del extracto orgánico alelopático de *Ipomoea tricolor* mediante el empleo de los bioensayos de germinación de semillas y de crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crus-galli* para el monitoreo de la actividad biológica a lo largo de todos los procedimientos utilizados para el aislamiento y la purificación del principio activo.

2.3.2 Determinar la toxicidad relativa como un agroquímico potencial del principio alelopático de *Ipomoea tricolor* utilizando los bioensayos mencionados en el inciso anterior.

2.3.3 Realizar la elucidación estructural del agente alelopático de *Ipomoea tricolor*, mediante el empleo de métodos químicos tradicionales y el análisis de la información proporcionada por las diferentes técnicas instrumentales contemporáneas, en especial experimentos en la resonancia magnética nuclear de alta resolución: ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^{13}C HETCOR, ^1H - ^{13}C COLOC, HOHAHA, ROESY y SINEPT.

2.3.4 Evaluar el potencial farmacológico de las resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor* y de los extractos orgánicos (CHCl_3 y MeOH) de tres especies adicionales, i.e., *I. pes-caprae*, *I. purga* e *I. tryianthina*, mediante la determinación de la actividad antimicrobiana y la citotoxicidad en cultivos celulares derivados de tumores cancerosos.

2.3.5 Evaluar el potencial modulador de las resinas glicosídicas del género *Ipomoea* sobre la actividad enzimática de la proteína cinasa C como un bioensayo molecular para la identificación de nuevos productos naturales farmacodinámicos.

3. PARTE EXPERIMENTAL.

3.1 PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES GENERALES.

3.1.1 METODOS CROMATOGRAFICOS.

La cromatografía de adsorción en columna, bajo condiciones normales de gravedad, se realizó en soportes de vidrio empacados con gel de sílice 60 Merck (gránulos de 0.2-0.5 mm y de 0.063-0.2 mm).

Se utilizaron para las cromatografías en capa fina (CCF) placas de vidrio recubiertas con gel de sílice 60 F₂₅₄ (20 × 20 cm, 0.2 mm de espesor; Merck). Esta técnica permitió monitorear el desarrollo de las cromatografías en columna abierta, realizar purificaciones a nivel preparativo, verificar el desarrollo de las reacciones químicas efectuadas y comprobar la pureza de los productos obtenidos.

3.1.2 DETERMINACION DE LAS CONSTANTES FISICAS.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. Los espectros de IR se corrieron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 337 o en un aparato Nicolet FT-5X; en general, sólo las absorciones "intensas" se registraron. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) protónica (¹H) y de carbono-13 (¹³C) se generaron en un aparato Varian XL-300, el cual se operó a una frecuencia de 300 MHz y 75.44 MHz, respectivamente. Todos los espectros se obtuvieron en C₃D₃N y los desplazamientos químicos se asignaron en unidades δ (ppm) referidos al tetrametilsilano (TMS) como una referencia interna. Se utilizaron secuencias de pulso estándares Varian para el registro de los espectros de RMN bidimensional homonuclear (¹H-¹H COSY y DQ-COSY) y heteronuclear (HETCOR y ¹H-¹³C COLOC). Los experimentos de intensificación nuclear selectiva mediante transferencia de polarización (SINEPT) se realizaron en un espectrómetro Nicolet NMC-360 y se utilizó una frecuencia de 90.8 MHz. Los espectros de RMN-¹H bidimensional de fase sensible HOHAHA y ROESY se

obtuvieron en un espectrómetro General Electric Ω 500 a una frecuencia de 500.12 MHz utilizando las secuencias de pulsos estándares. Los espectros de masas se registraron en un aparato Hewlett-Packard 5985-B mediante introducción directa a 70 eV. En tanto que los espectros de masas generados mediante bombardeo rápido de átomos (FAB) se obtuvieron en un aparato Finnigan MAT-90. Las secuencias analíticas que utilizaron la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masa (CG-EM) se realizaron en un cromatógrafo de gases/espectrómetro de masas Varian MAT 112S. Las rotaciones específicas se midieron en un polarímetro Perkin-Elmer 241.

3.2 MATERIAL VEGETAL.

Las partes aéreas del badoh negro o don Diego de día, *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae), se recolectaron en febrero de 1990 en el Cañón de Lobos, estado de Morelos, México. Un ejemplar se depositó en el Herbario Nacional (MEXU, Voucher: Anaya 90-I), Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México y la identificación de esta especie estuvo a cargo de la Dra. Ana Luisa Anaya (Instituto de Fisiología Celular, UNAM).

Los tubérculos de la raíz de Jalapa, *Ipomoea purga* (Wender.) Hayne, y los de la escamonea o raíz de Orizaba, *Ipomoea tryianthina* Lindl se adquirieron directamente de los campesinos productores del municipio de Xico, estado de Veracruz, en agosto de 1992. Un ejemplar de herbario de *I. purga* (Voucher: Bye 17761) y de *I. tryianthina* (Voucher: Bye 17762) se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional. La identificación de este material vegetal estuvo a cargo del Dr. Robert Bye (Jardín Botánico, Instituto de Biología, UNAM).

Las partes aéreas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) Sweet se recolectaron en la bahía de Las Salinas, municipio de La Huerta, Chameía, estado de Jalisco, en el mes de noviembre de 1989. Un ejemplar de herbario se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional (Bye:17707).

3.3 EXTRACCION.

3.3.1 PREPARACION DE LOS EXTRACTOS ORGANICOS TOTALES.

3.3.1.1 EXTRACCION DE *Ipomoea tricolor*.

Se realizó el desgrase del material vegetal (1.2 Kg) mediante un proceso de maceración exhaustivo con hexano (8 litros) a temperatura ambiente. La solución resultante se concentró a presión reducida obteniéndose un extracto resinoso y amarillento (8.2 g). Posteriormente, el material vegetal se sometió a tres extracciones sucesivas con CHCl_3 (12 litros en cada ocasión). La evaporación del disolvente proporcionó 27.3 g de un residuo pastoso de color verde. Por último, el material vegetal se sometió a una percolación con MeOH (8 litros). Este último proceso de extracción proporcionó 76.3 g de un residuo marrón de consistencia resinosa.

3.3.1.2 PREPARACION DE LAS RESINAS GLICOSIDICAS DE *Ipomoea purga*, *Ipomoea tryianthina* E *Ipomoea pes-caprae*.

Para la extracción de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) y de la escamonea o raíz de orizaba (*Ipomoea tryianthina*), se utilizó una maceración exhaustiva con CHCl_3 (500 ml) de 100 g de los tubérculos secos y pulverizados con el propósito de obtener la jalapina. La raíz de jalapa proporcionó 14.6 g de un extracto sólido de consistencia vitrea. La jalapina preparada de la raíz de orizaba (18.2 g) presentó una consistencia pastosa de color amarillento.

Por otra parte, la preparación de la convolvulina, requirió de una maceración con MeOH (500 ml) de 100 g del material vegetal. La preparación de la convolvulina de la raíz de jalapa proporcionó 24.8 g de un residuo marrón resinoso, y la extracción metanólica de la escamonea un residuo (20.7 g) pastoso de color ámbar.

Las partes aéreas de *Ipomoea pes-caprae* (500 g) se sometieron a los mismos procedimientos de maceración aplicados para la preparación de los extractos orgánicos

totales de *I. tricolor*. El desgrase del material vegetal con hexano proporcionó un extracto resinoso con un peso total de 5.6 g. De la percolación con cloroformo se obtuvo un extracto (15.6 g) de una consistencia pastosa y de color verde oscuro. Por último, la extracción metanólica produjo un residuo (32.6 g) resinoso de color castaño.

3.3.2 PREPARACION DEL CRUDO ALCALOIDEO DE *Ipomoea tricolor*.

Se pulverizaron 300 g de las partes aéreas y se alcalinizaron con 150 ml de una solución de CHCl_3 -MeOH- NH_4OH (2:2:1). Posteriormente, se realizó la maceración del material vegetal con 300 ml de CHCl_3 . El extracto clorofórmico se extrajo con ácido tartárico al 1% (50 ml \times 3). La solución ácida se alcalinizó con NH_4OH hasta alcanzar un $\text{pH} = 9$ y se extrajo con CHCl_3 (50 ml \times 3). La fase orgánica se secó sobre Na_2SO_4 anhidro y se evaporó el disolvente mediante destilación a presión reducida. Este procedimiento de partición proporcionó 95.3 mg del crudo alcaloideo (0.0317 % peso seco). Una porción de este extracto (5 mg) se disolvió en MeOH (0.25 ml) y una alícuota de esta solución (1 μl) se analizó mediante CG-EM (David y Sandra, 1992).

El extracto alcaloideo (90 mg) se resolvió mediante CCF a nivel preparativo. Se aplicaron 45 mg del crudo alcaloideo disueltos en MeOH (1 ml) en cada cromatoplaqa. El cuadro 3 incluye las mezclas de disolventes utilizadas en la elución cromatográfica y los valores de R_f para los constituyentes mayoritarios detectados. Una vez desarrollados los cromatogramas, la localización de las bandas se efectuó mediante exposición a la luz UV (λ 254 y 366 nm) y, de esta manera, se observaron una serie de bandas fluorescentes. La parte central de la placa se cubrió con una pieza de vidrio (15 \times 20 cm) y las zonas laterales descubiertas se rociaron con una solución del reactivo de Van Urk (100 mg de *p*-dimetilaminobenzaldehído en 10 ml de EtOH y 1 ml de HCl). Los alcaloides aparecieron en forma de pequeñas bandas de color azul en ambos lados de la placa y las áreas del adsorbente comprendidas entre las regiones expuestas al cromógeno fueron separadas del soporte cromatográfico. Se utilizó una extracción con 20 ml de una mezcla de CHCl_3 -

MeOH (3:1) para recuperar los alcaloides presentes en cada una de las bandas detectadas. Las suspensiones se reposaron durante 2 hrs y se filtraron a través de papel Whatman No.1. Se evaporó el disolvente hasta un volumen de 0.5 ml y una alícuota (5 µl) de cada una de las soluciones se analizó mediante CG-EM.

Cuadro 3. Sistemas y tiempos de elución utilizados para la cromatografía en capa fina del crudo alcaloide de *Ipomoea tricolor*.

Sistema de elución ^a	Elución (min)	R _f	R _f ^b
CHCl ₃ -EtOH (9:1)	60	0.65	8.01
	60	0.35	8.33
CHCl ₃ -MeOH (4:1)	30	0.80	5.43
	30	0.40	7.05
	30	0.35	7.31
	30	0.25	8.19
	30	0.10	11.07

^aWeber y Ma, 1976.

^bTiempo de retención (CG-EM).

3.4 CUANTIFICACION Y CARACTERIZACION DE LOS CONSTITUYENTES MAYORITARIOS DEL CRUDO ALCALOIDEO DE *Ipomoea tricolor*.

La cuantificación de los constituyentes individuales del crudo alcaloide se efectuó mediante un análisis por CG-EM (David y Sandra, 1992; Flieger *et al.*, 1991). Las condiciones instrumentales utilizadas incluyeron una columna capilar de sílica fundida de 25 m de longitud (0.23 mm de diámetro interno) y una fase estacionaria de metilsilicón (DB-1) de 0.11 µm de espesor de película. El flujo del gas acarreador (He) fue de 1

ml/min. El gradiente de temperatura se programó en el rango de 150-280 °C, con una velocidad de calentamiento de 5 °C/min e isotérmico a 280 °C. La temperatura del inyector fue de 300 °C. Cada uno de los espectros de masas se registraron con una energía de ionización de 70 eV y con una temperatura de la fuente iónica de 260 °C.

El cuadro 3 incluye los tiempos de retención en la CG para los alcaloides aislados de *Ipomoea tricolor*. La caracterización de los constituyentes individuales se realizó mediante la comparación de los espectros de masas generados por muestras auténticas con aquellos registrados para cada uno de los picos observados en los cromatogramas de gases.

AGROCLAVINA (Rt 5.43 min): EM-IE m/z (int. rel.): 236 {M}⁺ (75), 235 {M-1}⁺ (100), 224 (6.5), 223 (8.29), 222 (10.1), 221 (6.9), 220 (5.8), 209 (7.7), 208 (9.6), 207 (12.1), 206 (8.2), 205 (10.2), 197 (8.1), 196 (12.2), 193 (8.4), 192 (7.4), 191 (6.5), 180 (13.4), 179 (8.4), 178 (5.7), 168 (7.3), 167 (14.3), 166 (5.3), 165 (7.8), 155 (3.8), 154 (11.6), 153 (4.8), 152 (3.4), 151 (2.4), 139 (4.9), 127 (10.2), 126 (4.7), 111 (13.1), 110 (11.6).

ERGONOVINA (ERGOMETRINA) (Rt 7.05 min): EM-IE m/z (int. rel.): 327 {M+2}⁺ (2.7), 326 {M+1}⁺ (20.6), 325 {M}⁺ (100), 282 (3.2), 268 (3.2), 267 (8.5), 224 (7.3), 223 (29.7), 222 (20.4), 221 (53.4), 220 (6.9), 209 (5.1), 208 (12.7), 207 (34.6), 206 (7.4), 205 (10.2), 197 (4.1), 196 (23.9), 195 (4.9), 194 (4.9), 193 (7.1), 192 (13.2), 191 (4.7), 182 (7.5), 181 (32.2), 180 (16.1), 179 (10.8), 178 (9.9), 168 (5.8), 167 (11.7), 165 (3.4), 155 (3.0), 154 (14.1), 153 (6.2), 152 (1), 151 (6.1), 130 (2.9), 127 (4.9), 111 (7.1), 110 (3.8).

ERGONOVININA (ERGOMETRININA) (Rt 7.31 min): EM-IE m/z (int. rel.): 327 {M+2}⁺ (2.7), 326 {M+1}⁺ (20.6), 325 {M}⁺ (100), 283 (5.3), 282 (10.4), 281 (2.3), 224 (5.2), 223 (25.6), 222 (23.9), 221 (63.2), 220 (7.9), 219 (2.8), 209 (8.5), 208 (16.9), 207 (43.8), 206 (11.2), 205 (17.8), 197 (5.8), 196 (29.8), 195 (4.86), 194 (6.7), 193 (9.4), 192 (15.3), 191 (92.8),

182 (8.4), 181 (36.8), 180 (18.9), 179 (11.2), 178 (9.6), 168 (8.4), 167 (17.2), 165 (4.3), 155 (5.2), 154 (19.6), 153 (8.7), 152 (5.9), 151 (4.8), 129 (2.9), 127 (6.9), 114 (7.3), 113 (8.3), 111 (3.9).

ERGONA (Rt 8.01 min): EM-IE m/z (int. rel.): 269 $\{M+2\}^+$ (3.0), 268 $\{M+1\}^+$ (17.6), 267 $\{M\}^+$ (100), 225 (16.8), 224 (61.8), 223(28.3), 222 (10.1), 221 (23.7), 220 (5.9), 209 (7.7), 208 (9.6), 207 (30.4), 206 (8.2), 205 (12.1), 195 (12.2), 194 (9.8), 193 (19.8), 192 (32.9), 191 (6.6), 182 (7.3), 181 (15.6), 180 (35.1), 179 (21.3), 178 (13.3), 168 (7.7), 167 (16.5), 166 (5.4), 165 (7.9), 155 (7.8), 154 (24.6), 153 (11.5), 152 (14.2), 151 (11.1), 139 (4.9), 127 (12.1), 126 (4.8), 111 (13.1), 110 (11.3).

ELIMOCLAVINA (Rt 8.19 min): EM-IE m/z (int. rel.): 255 $\{M+1\}^+$ (2.8), 254 $\{M\}^+$ (85.4), 253 $\{M-1\}^+$ (100), 239 (6.4), 238 (5.1), 237 (2.4), 236 (4.3), 235 (8.0), 225 (16.8), 224 (64.0), 223(25.4), 222 (10.4), 221 (27.6), 220 (5.9), 209 (6.6), 208 (8.7), 207 (33.5), 206 (9.3), 205 (16.1), 195 (12.5), 194 (10.8), 193 (17.8), 192 (34.0), 191 (8.3), 182 (5.8), 181 (16.1), 180 (34.0), 179 (25.3), 178 (12.3), 168 (7.9), 167 (16.5), 166 (5.4), 165 (9.7), 155 (6.9), 154 (4.5), 153 (12.5), 152 (13.2), 151 (11.1), 139 (7.9), 127 (11.1), 126 (7.8), 111 (12.9), 110 (9.3).

ERGININA (Rt 8.33 min): EM-IE m/z (int. rel.): 269 $\{M+2\}^+$ (2.9), 268 $\{M+1\}^+$ (17.6), 267 $\{M\}^+$ (100), 225 (13.5), 224 (58.6), 223(24.8), 222 (6.4), 221 (19.3), 220 (2.5), 209 (4.3), 208 (6.7), 207 (25.4), 206 (4.2), 205 (10.3), 195 (13.2), 194 (10.8), 193 (13.8), 192 (28.6), 191 (3.5), 182 (7.3), 181 (16.5), 180 (33.7), 179 (22.3), 178 (11.3), 168 (9.7), 167 (16.4), 166 (5.9), 165 (8.9), 155 (7.3), 154 (14.5), 153 (14.9), 152 (16.6), 151 (12.9), 139 (5.6), 127 (11.8), 126 (5.8), 111 (15.1), 110 (11.4).

CHANOCLAVINA (R_t 11.07 min): EM-IE *m/z* (int. rel.): 258 {M+2}⁺ (3.0), 257 {M+1}⁺ (17.6), 256 {M}⁺(100), 255 {M-1}⁺ (73.6), 239 (24.8), 238 (13.0) {M-H₂O}⁺, 209 (7.7), 208 (9.6), 207 (30.4), 206 (8.2), 205 (12.5), 182 (7.3), 181 (15.6), 180 (35.1), 179 (21.3), 178 (13.3), 168 (7.7), 167 (16.5), 166 (5.4), 165 (7.9), 155 (7.8), 154 (4.6), 153 (11.5), 152 (16.2), 151 (14.2), 139 (5.8), 127 (10.2), 126 (8), 111 (17.1), 110 (13.6).

3.5 PROCEDIMIENTOS PARA LA EVALUACION DEL POTENCIAL ALELOPATICO.

La actividad inhibidora del crecimiento vegetal (potencial alelopático) se determinó mediante el empleo de los bioensayos de germinación de semillas y de crecimiento radicular de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Anaya *et al.*, 1987a; 1990).

La actividad de los extractos preparados a partir de *I. tricolor*, de cada una de las fracciones cromatográficas y de las resinas glicosídicas se evaluó con semillas de *Amaranthus leucocarpus* Watts. y *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv. Los bioensayos se realizaron en cajas Petri de 6 cm de diámetro interno con cuatro réplicas por tratamiento. Cada una de las muestras de prueba se disolvió en MeOH-H₂O (1:1) y se preparó a una concentración final de 100 µg/ml. Estas soluciones se vertieron en las cajas Petri sobre un disco de papel filtro (Whatman No. 1) y el disolvente se evaporó mediante una corriente de aire.

Posteriormente, se inició la germinación de veinte semillas de cada una de las especies vegetales de prueba, humedeciendo el papel filtro con 1.5 ml de agua destilada y desionizada. Se utilizó ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D, Sigma) como un control positivo. El mismo protocolo se utilizó para los controles negativos que contenían únicamente disolvente. Las cajas Petri se mantuvieron en la oscuridad a 27 °C y la actividad alelopática se registró calculando el porcentaje de germinación y midiendo la longitud de las radículas después de 24 h para *A. leucocarpus* y 48 h para *E. crus-galli*.

3.6 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO.

La resolución del extracto clorofórmico de *Ipomoea tricolor* (27.8 g) se efectuó mediante una cromatografía en columna empacada con gel de sílice (700 g) y utilizando en la fase móvil un gradiente de Me₂CO-MeOH en CHCl₃. El volumen de los eluatos fue de 800 ml y se colectó un total de 200 fracciones. Cada una de éstas se concentró al vacío hasta alcanzar un volumen de aproximadamente 10-15 ml. La semejanza y la homogeneidad cromatográfica en capa fina de cada uno de los eluatos permitió su reunión en nueve fracciones concentradas, las cuales se evaluaron de manera independiente mediante el bioensayo de crecimiento radicular para evaluar su potencial alelopático (ver inciso 3.5). El efecto inhibitorio del crecimiento vegetal se concentró en la fracción que contenía la mezcla de resinas glicosídicas (fracción VIII, 10 g). El cuadro 4 resume el fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico responsable del efecto alelopático de *Ipomoea tricolor*.

La mezcla de resinas glicosídicas (fracción VIII) se recromatografió sobre una columna de gel de sílice (400 g) utilizando como sistema de elución una mezcla compuesta por CHCl₃-Me₂CO-MeOH (5:5:1). Se colectaron un total de 180 fracciones de 100 ml cada una. Este procedimiento cromatográfico concentró la actividad alelopática en las subfracciones combinadas 140-146 (6 g), que correspondieron al constituyente mayoritario de la mezcla de resinas. Con el objetivo de eliminar la consistencia pastosa de color ámbar de esta fracción, se realizó una decoloración de la muestra disuelta en MeOH con carbón activado. Después de una hora de reposo, la suspensión se filtró al vacío a través de celita. El filtrado se concentró a presión reducida hasta sequedad obteniéndose un residuo sólido (5.3 g), el cual se precipitó con MeOH para proporcionar 4.8 g (0.4 % peso seco) de una resina sólida de color blanco. El análisis mediante cromatografía en capa fina de alta resolución (HP TLC, Merck) de este producto, utilizando como eluyente CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:1), proporcionó una banda mayoritaria con un R_f = 0.45 y una banda minoritaria de menor polaridad (R_f = 0.52).

Cuadro 4. Fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico de *Ipomoea tricolor*.

Fracción ^a	Eluatos ^b	Elución	Peso (g)	Crecimiento radicular (mm) ^c		Inhibición del crecimiento (%) ^d	
				<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>	<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>
I	1-33	CHCl ₃	2.7	7.6 ± 1.1 (9.7 ± 0.5)	9.3 ± 2.4 (10.0 ± 1.0)	21.7 ^e	7.0
II	34-49	CHCl ₃	1	8.8 ± 1.0 (10.2 ± 0.8)	10.5 ± 0.7 (10.6 ± 0.8)	13.8 ^e	19.0 ^e
III	50-79	CHCl ₃ -Me ₂ CO (4:1)	1.8	8.6 ± 0.9 (10.2 ± 0.8)	10.0 ± 4.5 (10.6 ± 0.8)	15.7 ^e	5.7
IV	80-90	CHCl ₃ -Me ₂ CO (4:1)	1.5	7.9 ± 1.1 (10.2 ± 1.6)	11.2 ± 2.3 (11.8 ± 2.2)	22.6 ^e	5.1
V	91-113	CHCl ₃ -Me ₂ CO (1:1)	1.3	7.8 ± 1.6 (10.4 ± 1.3)	10.3 ± 2.9 (12.8 ± 2.5)	25.0 ^e	19.6 ^e
VI	114-128	CHCl ₃ -Me ₂ CO (1:1)	2.3	5.2 ± 0.7 (6.6 ± 1.4)	8.1 ± 1.6 (11.4 ± 2.4)	21.2 ^e	29.0 ^e
VII	129-141	CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH (1:1:0.1)	2.5	9.7 ± 1.6 (13.5 ± 2.7)	8.7 ± 1.6 (14.5 ± 0.5)	28.2 ^e	40.0 ^e
VIII	142-162	CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH (1:1:0.2)	10	6.8 ± 1.0 (14.0 ± 0.8)	6.7 ± 7.4 (24.3 ± 7.4)	51.4 ^e	72.4 ^e
IX	163-180	CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH (1:1:0.5)	1.2	9.2 ± 2.8 (13.5 ± 2.7)	8.9 ± 1.8 (14.5 ± 0.5)	24.5 ^e	38.6 ^e

^a Concentración de prueba: 100 µg/ml.

^b Cada eluato con un volumen de 800 ml.

^c Cada valor representa el promedio de 4 réplicas (± D.E.); 20 plántulas cada una. Controles negativos entre paréntesis.

^d Porcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo.

^e P ≤ 0.05 (ANOVA).

3.7 AISLAMIENTO Y PURIFICACION DE LA TRICOLORINA A.

3.7.1 CROMATOGRAFIA DE PARTICION CENTRIFUGA.

El residuo obtenido de la decoloración de la subfracción 140-146 se sometió a un proceso de purificación adicional utilizando una cromatografía de partición centrifuga líquido-líquido (Marston *et al.*, 1988; Marston *et al.*, 1990) en un aparato de cromatografía a contracorriente (P.C. Inc., Potomac, Maryland, EE.UU.).

En este procedimiento de separación se utilizó como sistema de disolventes la mezcla ternaria $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$ (7:13:8), la cual generó dos fases al reposarse en un embudo de separación. La capa de mayor densidad se utilizó como la fase móvil a una velocidad rotacional de 800 rpm. El tamaño de la muestra fue de 550 mg/10 ml. Se utilizó un flujo de 3 ml/min y se colectaron fracciones de 20 ml cada una. Las fracciones 20-28 proporcionaron 480 mg del compuesto bioactivo en forma de un sólido amorfo blanquecino (R_f 0.48; HPTLC: $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$, 7:3:1)

3.7.2 CROMATOGRAFIA DE LIQUIDOS DE ALTA PRESION (HPLC).

La purificación final del agente alelopático se efectuó mediante HPLC utilizando un sistema cromatográfico ISCO integrado por una bomba modelo 2350, un detector de ultravioleta V^4 (λ_{max} 216 nm) y una columna semipreparativa de fase reversa C18 (spherisorb®; 250×10.0 mm, diámetro de partícula = 10 μm). En este análisis la fase móvil consistió de un sistema isocrático de $\text{MeOH-H}_2\text{O}$ (95:5) con un flujo de 5 ml/min a una presión de 1780 lb/pulg² durante 8 min (Fig. 16).

Se inyectaron alícuotas (100 μl) de una solución metanólica de las fracciones 20-28 obtenidas de la cromatografía de partición centrifuga (ver sección 3.7.1) a una concentración de 50 mg/ml. Este procedimiento repetido en sucesivas ocasiones permitió la obtención de 100 mg de la tricolorina A (R_t 4.2 min) con una pureza del 100%, la cual se verificó en un análisis cromatográfico adicional utilizando una fase normal. Las condiciones instrumentales utilizadas en esta segunda ocasión fueron las siguientes: una

columna de gel de sílice (μ Porasil; 300 X 3.9 mm, diámetro de partícula = 10 μ m) con un flujo de la fase móvil (MeOH, 100%) de 1 ml/min y a una presión de 1100 lb/pulg² durante 8 min. La concentración de la muestra correspondió a 2.5 mg/ml y se inyectaron alícuotas de 10 μ l. El tiempo de retención obtenido para la tricolorina A en el sistema analítico de fase normal fue de 3 min.

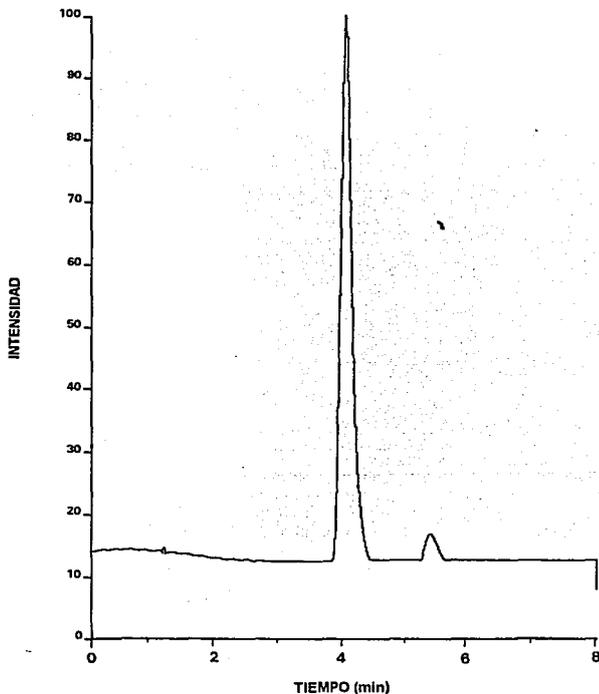


Figura 16. Análisis mediante cromatografía de líquidos de alta presión del constituyente alelopático mayoritario de *Ipomoea tricolor* Cav. Condiciones instrumentales: columna, spherisorb® C18 (ISCO; 250 × 4.6 mm, 5 μ m); fase móvil, MeOH (95 %), 1 ml/min; presión 1110 lb/pulg²; detector, UV (216 nm); concentración de la muestra, 2.5 mg/ml. Tricolorina A (Rt 4.2 min); impureza (Rt 5.5 min).

3.7.3 CARACTERIZACION DE LA TRICOLORINA A.

La tricolorina A se obtuvo en forma de pequeños cristales incoloros después de una recristalización con MeOH y presentó las siguientes propiedades físicas y espectroscópicas: pf 118-120°; $\{\alpha\}_D -30.32^\circ$ ($c = 1.5$, MeOH); IR ν max (KBr) 3420, 2930, 1740, 1470, 1390, 1240, 1130, 1060 cm^{-1} ; RMN 1H (500 MHz, C_3D_3N , TMS): δ 5.84 (1H, *dd*, $J = 9.3, 9.3$ Hz, Glc-3), 5.81 (1H, *dd*, $J = 1.5, 2.9$ Hz, Ram-2), 5.77 (1H, *d*, $J = 7.2$ Hz, Glc-1), 5.71 (1H, *dd*, $J = 9.9, 9.9$ Hz, Ram-4), 5.56 (1H, *d*, $J = 1.1$ Hz, Ram-1), 5.51 (1H, *d*, $J = 1.1$ Hz, Ram'-1), 4.95 (1H, *dc*, $J = 6.0, 9.9$ Hz, Ram-5), 4.79 (1H, *dd*, $J = 3.0, 9.9$ Hz, Ram-3), 4.73 (1H, *dd*, $J = 7.8, 8.0$ Hz, Fuc-2), 4.66 (1H, *d*, $J = 7.8$ Hz, Fuc-1), 4.52 (1H, *dd*, $J = 1.0, 3.0$ Hz, Ram'-2), 4.41 (1H, *dd*, $J = 3.0, 10.0$ Hz, Ram'-3), 4.35 (1H, *dd*, $J = 9.3, 9.3$ Hz, Glc-4), 4.26-4.22 (3H, *m*, Fuc-3, Ram'-4, Ram'-5), 4.14 (1H, *dd*, $J = 2.7, 12.0$ Hz, Glc-6'), 4.12 (1H, *dd*, $J = 7.2, 8.0$ Hz, Glc-2), 4.04 (1H, *d*, $J = 3.2$ Hz, Fuc-4), 3.92 (1H, *dd*, $J = 1.9, 12.0$ Hz, Glc-6''), 3.86-3.82 (2H, *m*, Fuc-5, Jal-11), 3.48 (1H, *dt*, $J = 1.9, 9.3$ Hz, Glc-5), 3.01 (1H, *ddd*, $J = 3.0, 8.0, 16.0$ Hz, Jal-2'), 2.47 (1H, *ddd*, $J = 3.0, 10.0, 16.0$ Hz, Jal-2''), 2.39 (1H, *ddc*, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, amb-2), 2.33 (1H, *ddc*, $J = 7.0, 7.0, 7.0$ Hz, amb'-2) 1.72 (1H, *d*, $J = 6.0$ Hz, Ram'-6), 1.65 (1H, *d*, $J = 6.0$ Hz, Ram-6), 1.59 (1H, *d*, $J = 6$ Hz, Fuc-6), 1.18 (3H, *d*, $J = 7.0$ Hz, amb-2Me), 1.11 (3H, *d*, $J = 7.0$ hz, amb-2Me), 0.93 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, amb-3Me), 0.86 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, Jla-16), 0.83 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, amb'-3Me); RMN ^{13}C (75.4 MHz, C_3D_3N , TMS): δ 103.09 (Fuc-1), 74.62 (Fuc-2), 76.16 (Fuc-3), 73.12 (Fuc-4), 71.24 (Fuc-5), 17.24 (Fuc-6), 99.76 (Glc-1), 80.60 (Glc-2), 78.96 (Glc-3), 69.62 (Glc-4), 76.25 (Glc-5), 61.31 (Glc-6), 98.20 (Ram-1), 72.74 (Ram-2), 75.84 (Ram-3), 73.30 (Ram-4), 67.23 (Ram-5), 18.25 (Ram-6), 104.49 (Ram'-1), 72.25 (Ram'-2), 72.46 (Ram'-3), 73.34 (Ram'-4), 70.44 (Ram'-5), 18.48 (Ram'-6), 172.13 (Jal-1), 34.36 (Jal-2), 81.00 (Jal-11), 14.15 (Jal-16), 175.55 (amb-1), 41.53 (amb-2), 27.92 (amb-3), 11.76 (amb-4), 16.91 (amb-2Me), 175.42 (amb'-1), 41.37 (amb'-2), 27.06 (amb'-3), 11.76 (amb'-4), 16.91 (amb'-2Me); EM-FAB positivo m/z (int. rel.): 1023 {M + H}⁺ (100), 877 (80); EM-FAB negativo m/z (int. rel.): 1021

{M - 1)- (100), 875 (15), 561 (70), 417 (85), 271 (18); Análisis elemental para $C_{50}H_{86}O_{21}$. Calculado: C, 58.70%; H, 8.41%. Encontrado: C, 58.76%; H, 8.45%.

3.8 EVALUACION DEL POTENCIAL BIOLOGICO DE LA TRICOLORINA A.

3.8.1 EVALUACION DEL POTENCIAL ALELOPATICO.

La actividad potencial de la tricolorina A como un inhibidor del crecimiento vegetal se realizó siguiendo los procedimientos descritos en el inciso 3.4. Los ensayos se condujeron utilizando las siguientes concentraciones de prueba para la tricolorina A: 0, 1, 5, 10, 30, 50, 100 y 200 $\mu\text{g/ml}$.

Las diferencias estadísticas entre los diferentes tratamientos se evaluaron mediante análisis de varianza. Las concentraciones inhibitoras medias (CI_{50}) se calcularon mediante análisis de probit (Lieberman, 1983) para los resultados del crecimiento radicular a partir de los porcentajes de inhibición. La regresión lineal se utilizó para el procesamiento de los datos obtenidos para los ensayos de germinación de semillas.

3.8.2 EVALUACION DEL POTENCIAL MODULADOR DE LA TRICOLORINA A SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PROTEINA CINASA C.

3.8.2.1 EVALUACION DEL POTENCIAL ANTAGONISTA DE LA TRICOLORINA A EN EL ENSAYO DE UNION DE LOS ESTERES DE FORBOL Y LA ESTAUROSPORINA A LA PROTEINA CINASA C.

La unión del 12,13-dibutirato de forbol- ^3H (PDBu- ^3H) al dominio regulatorio de la proteína cinasa C se determinó mediante el método descrito por Miyake *et al.*, (1984). La mezcla de reacción contenía 50 μl de una solución 80 mM de Tris/HCl (pH 7.4), 50 μl de CaCl_2 (0.8 mM), 20 μl de una solución acuosa de fosfatidilserina (150 $\mu\text{g/ml}$), 50 μl de la proteína cinasa C (0.5-1 pmol) parcialmente purificada a partir de un

homogeneizado de cerebro de becerro, 9 μ l de albúmina sérica bovina (2 mg/ml), 1 μ l de una solución 20 nM de PDBu- 3 H] diluida con 0.05 mM de PDBu ($1-3 \times 10^4$ cpm/pmol), 10 μ l de la solución del compuesto de prueba en DMSO y 10 μ l de H₂O.

Las concentraciones evaluadas de la tricolorina A correspondieron a 200.0, 40.0, 8.0, 1.6 y 0.32 μ g/ml y se ensayaron cuatro réplicas de cada una de las diluciones. La incubación se realizó a 30 °C durante una hora. Cada una de las mezclas de reacción se colectó sobre un disco de celulosa (Whatman DE52) y se filtró a través de fibra de vidrio utilizando un colector celular (Skatron, Sterling, VA, EE.UU.). Los discos se lavaron con 3 ml de Tris-HCl 10 mM, pH 7.5 (25 °C)/CaCl₂ 1 mM a 4 °C, por tres ocasiones. Los discos se colocaron en líquido de centelleo (4 ml) y el grado de unión del éster de forbol a la proteína cinasa C se determinó mediante la radioactividad registrada por un contador Packard Minaxi β 4000.

La unión de la estaurosporina- 3 H] al dominio catalítico de la PKC (Tamaoki, 1991) se realizó bajo las mismas condiciones experimentales descritas anteriormente para el ensayo del PDBu- 3 H] utilizando una solución 30 nM de la estaurosporina- 3 H] (15.8 Ci/mmol).

Se calculó el porcentaje de la unión inespecífica mediante el total de radioactividad no desplazable por un exceso no radioactivo (100 veces) de PDBu o estaurosporina (Sweetnam *et al.*, 1993). Se utilizó el análisis mediante regresión lineal en los gráficos semilogarítmicos obtenidos entre la dosis ensayada de la tricolorina A y el porcentaje de unión específico de los compuestos radioactivos para calcular la concentración de la tricolorina A que produce el 50% de inhibición (CI₅₀).

Los mismos procedimientos experimentales se realizaron para evaluar la actividad de los extractos orgánicos preparados a partir de *Ipomoea tricolor*, *I. purga*, *I. pes-caprae* e *I. tryianthina*.

3.8.2.2 EVALUACION DEL POTENCIAL MODULADOR DE LA TRICOLORINA A SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PROTEINA CINASA C.

La evaluación de la actividad enzimática de la proteína cinasa C (PKC) se determinó de acuerdo con los protocolos descritos por Yasuda *et al.* (1990). La actividad de la PKC se evaluó mediante la transferencia de ^{32}P a partir del $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ al sustrato peptídico.

La reacción se realizó a 30 °C durante 5 min en un volumen final de 50 μl . La mezcla de reacción contenía 10 ng de la PKC α (GIBCO BRL, Research Products Life Technologies, INC., Gaithersburg, MD, EE.UU.) en una solución amortiguadora de Tris 20 mM (pH 7.5), EDTA 0.5 mM, EGTA 0.5 mM, β -mercaptoetanol 10 nM, MgCl_2 20 mM, CaCl_2 1 mM y NaCl 0.2 M, la cual se suplementó con una solución lipídica (10 $\mu\text{g/ml}$ de fosfatidilserina, 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de dioleína y 10% de Tritón X-100).

La reacción se inició adicionando el sustrato constituido por 10 μM de histona (Tipo III-S; Sigma) en una solución de 10 μM ATP/ATP- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]$ $3\text{-}6 \times 10^5$ cpm/ml [20-25 $\mu\text{Ci/ml}$], CaCl_2 5 mM, MgCl_2 100 mM y Tris 20 mM (pH 7.5). La fosforilación se detuvo mediante la remoción de una alícuota (25 μl) de la mezcla de reacción, la cual se depositó en un disco de fosfocelulosa (Whatman DE52), se sumergió en una solución (10 ml \times 2) de ácido fosfórico al 1% durante 5 min y, posteriormente, se lavó dos veces con agua destilada (10 ml). Por último, el disco se colocó en 4 ml de líquido de centelleo y la incorporación de ^{32}P al sustrato se determinó mediante un contador Beckman LS 6000IC. Estas condiciones experimentales permitieron establecer la actividad basal de la PKC (Tamaoki, 1991; Yasuda *et al.*, 1990).

Se evaluaron seis réplicas de cada una de las soluciones (EtOH- H_2O , 1:1) de prueba de la tricolorina A preparadas a una concentración final de 200, 100, 50, 25, 12.5 y 6.25 $\mu\text{g/ml}$. La concentración final de ETOH en el ensayo correspondió a un 3 %. Antes de evaluar la actividad enzimática, la mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la unión de la muestra de prueba a la proteína cinasa C.

En cada experimento se incluyó una determinación por duplicado suplementada con 5 nM del 12-miristato-13-acetato de forbol (GIBCO BRL) en lugar de la tricolorina A como un control positivo. Estas condiciones resultan en la activación de la PKC en un 30-50% de su actividad basal (Jayatilake *et al.*, 1993; Miyake *et al.*, 1984), y se utilizaron para garantizar la calidad de la enzima utilizada. Los duplicados preparados sin lípidos y CaCl_2 se evaluaron y sus valores de radioactividad se restaron de los obtenidos para todos los ensayos con el compuesto de prueba. La CI_{50} para la tricolorina A se determinó como la concentración calculada mediante interpolación logarítmica que provoca el 50% de la inhibición de la actividad enzimática de la PKC.

3.8.3 EVALUACION DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO.

El análisis cuantitativo antimicrobiano en contra de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Candida albicans* (10231) y *Aspergillus niger* (ATCC 16888) se condujo utilizando las técnicas microbiológicas de difusión en agar (Barry y Thornsberry, 1991) y de dilución en caldo nutritivo (Hufford *et al.*, 1975).

3.8.3.1 PREPARACION DE LOS INOCULOS.

Los microorganismos de prueba se prepararon mediante incubación en caldo nutritivo (Merck) durante 24 horas a 37 °C. La concentración final de los organismos en el cultivo se ajustó mediante dilución con una solución salina isotónica (NaCl 0.9%) o con caldo nutritivo hasta obtener la turbidez visualmente comparable a la del estándar preparado mediante la mezcla de 0.5 ml de BaCl_2 0.048 M (BaCl_2 [1.75%]· $2\text{H}_2\text{O}$) y 99.5 ml de H_2SO_4 0.36 N (1%). Esta turbidez equivale a la mitad de la densidad del estándar de McFarland No. 1 y corresponde a un número aproximado de 1.5×10^8 células/ml (Barry y Thornsberry, 1991). La densidad óptica de esta turbidez se monitoreó con un espectrofotómetro y correspondió a 0.08-0.10 a una longitud de onda de 625 nm.

3.8.3.2 PREPARACION DE LA MUESTRA DE PRUEBA.

Las resinas glicosídicas y la tricolorina A se disolvieron en MeOH y se prepararon concentraciones finales de 100, 70, 40, 20, 10 y 5 $\mu\text{g/ml}$. Cada una de las soluciones de prueba se depositó en un disco de papel filtro y se evaporó mediante una corriente de aire. Los controles positivos (10 μg) se prepararon en solución acuosa utilizando 1 mg/ml de la sal sódica de la ampicilina para las bacterias y 1 mg/ml de anfotericina B para la levaduras y el hongo.

3.8.3.3 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO DE DIFUSION.

Un mililitro de la suspensión bacteriana se sembró de manera uniforme en cada caja Petri (100-mm), conteniendo 15-20 ml de agar Mueller-Hinton (Difco) para las bacterias o agar-Sabouraud (Glucosa 4%, Difco) para la levadura y el hongo. Las cajas se dejaron secar durante 3-5 min y, posteriormente, los discos impregnados con el antibiótico de prueba se aplicaron manualmente con una pinza estéril sobre la superficie de agar inoculada. Las placas así preparadas se mantuvieron a una temperatura de 5 °C durante 30 min para facilitar la difusión de las muestras. Transcurrido este tiempo, las cajas se incubaron por 24 horas a 37 °C para las bacterias y durante 48 horas a 28 °C para la levadura y el hongo. El ensayo se realizó por triplicado para cada una de las muestras de prueba.

La actividad antimicrobiana se registró midiendo el diámetro (mm) de la zona de inhibición que circundó a cada uno de los discos. La concentración crítica mínima inhibidora de la tricolorina A sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus* se calculó mediante el método estadístico de mínimos cuadrados (Barry, 1986).

3.8.3.4 PROCEDIMIENTOS DEL ENSAYO DE DILUCION.

Para la determinación de la concentración mínima inhibidora (MIC) de la tricolorina A sobre el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, se preparó una serie de 10

tubos de ensayo conteniendo caldo nutritivo. El primer tubo de esta serie contenía 4.5 ml de caldo nutritivo y los restantes 2.5 ml cada uno. El compuesto de prueba se disolvió a una concentración de 1 mg/ml en una mezcla de MeOH-H₂O (1:1) y 0.5 ml de esta solución se transfirieron al primer tubo con agitación vigorosa. Se transfirieron 2.5 ml de esta suspensión del primer tubo al segundo mezclando cuidadosamente. Esta misma operación se realizó con el tubo siguiente y así sucesivamente, resultando en una serie de diluciones que correspondieron a las concentraciones de 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78, 0.39 y 0.19 µg/ml.

Cada tubo se inoculó con 10 µl de la suspensión del microorganismo de prueba (10⁹ células/ml). Posteriormente, se incubaron a 37 °C durante 24 horas. La concentración mínima que inhibió completamente la proliferación del organismo de prueba se registró como la concentración mínima inhibidora, MIC (µg/ml).

3.8.4 EVALUACION DEL POTENCIAL CITOTOXICO.

3.8.4.1 TOXICIDAD PARA EL CRUSTACEO *Artemia salina*.

3.8.4.1.1 PREPARACION DE LAS MUESTRAS.

Se preparó una solución "stock" de la tricolorina A y de las resinas glicosídicas disolviendo 20 mg de la muestra de prueba en 2 ml de MeOH. De esta solución se transfirieron 5, 50 y 500 µl a viales de manera independiente y por triplicado. Se dejó evaporar el disolvente a sequedad y posteriormente se aforó cada vial con 5 ml de salmuera, obteniéndose así concentraciones de 10, 100 y 1000 µg/ml, respectivamente (Anderson *et al.*, 1991).

3.8.4.1.2 PROCEDIMIENTOS DEL BIOENSAYO.

Después de incubar los huevecillos de *Artemia salina* en salmuera a 25 °C y durante 48 horas, se transfirieron 10 larvas a cada uno de los viales conteniendo las muestras de

prueba. Transcurridas 24 horas, se registró el número de organismos sobrevivientes. Los resultados se procesaron mediante un análisis de probit (Lieberman, 1983) para calcular la concentración letal media (CL_{50}).

3.8.4.2 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.

Los procedimientos para el establecimiento de los cultivos celulares de las líneas cancerosas utilizadas se fundamentaron en los protocolos previamente descritos en la literatura (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993; Novelo *et al.*, 1993; Skehan *et al.*, 1990). Las líneas celulares P-388 (leucemia de móridos), HT-1080 (fibrosarcoma humano), KB (carcinoma nasofaríngeo), A-431 (carcinoma epidermoide humano), ZR-75-1 (cáncer mamario humano), LNCaP (cáncer de próstata humano) y U-373 (glioblastoma humano) se adquirieron de la Colección Norteamericana de Cultivos Tipo ("American Type Culture Collection"), Rockville, Maryland, EE.UU. Las restantes líneas cancerosas humanas que incluyeron el melanoma (Mel-2) y los carcinomas mamario (BC-1), de colon (Col-2) y de pulmón se establecieron a partir de tumores primarios por el Dr. John M. Pezzuto en el Colegio de Farmacia de la Universidad de Illinois, EE.UU. La línea celular KB-V1 resistente a vinblastina se desarrolló a partir de células KB mediante un tratamiento prolongado con dosis subletales de este agente anticancerígeno (Shen *et al.*, 1986).

3.8.4.2.1 MEDIOS Y CULTIVOS "STOCK".

Las líneas celulares BC-1 y Col-2 se establecieron en el medio esencial mínimo de Eagle con sales de Earle (MEME) (Ham y Mckeehan, 1979) y suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (AAN) y con suero bovino fetal (SBF) inactivado al calor (56 °C durante 30 min). El fibrosarcoma HT-1080 y la línea de cáncer pulmonar LU-1 se mantuvieron en MEME suplementado con 1% de AAN y 10% de SBF. El carcinoma epidermoide oral (KB; KBV1) y las células A-431 se establecieron en el medio esencial mínimo modificado por Dulbecco (MEM-D) (Ham y Mckeehan, 1979) conteniendo 10%

de SBF. El medio para las células KB-V1 se suplementó con 1 $\mu\text{g/ml}$ de vinblastina. El cultivo celular de melanoma (Mel-2) se estableció en el medio esencial mínimo con sales de Hank (MEMH) y suplementado con 10% de SBF inactivado. Los linfocitos de móridos P-388 se mantuvieron en el medio de Fisher conteniendo 10% de SBF. Las líneas celulares ZR-75-1 y LNCaP se cultivaron en el medio RPMI-1640 ("Rosewell Park Memorial Institute 1640 medium") (Ham y Mckeehan, 1979) suplementado con 10% de SBF inactivado.

En todos los medios se administró penicilina (100 unidades/ml), estreptomocina (100 $\mu\text{g/ml}$), 0.25 $\mu\text{g/ml}$ de fungizona, con excepción de los cultivos P-388 y U-373, y 1.5-3% de una solución de NaHCO_3 al 75%. El pH de los medios se ajustó a 7.1-7.2. Los medios se esterilizaron mediante filtración por membranas inmediatamente después de su preparación.

Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37 °C en una atmósfera húmeda conteniendo 4% CO_2 con excepción del melanoma, el cual se mantuvo en frascos de cultivo cerrados. Todos los cultivos "stock", con excepción de los linfocitos P-388, se mantuvieron en botellas para cultivo de tejidos con una capacidad de 75 cm^3 .

Una vez que las células en cada cultivo alcanzaron un 80% de confluencia, misma que se determina cuando la base de las botellas de cultivo se encuentran cubiertas con células, éstas se subcultivaron mediante una suspensión con una solución de tripsina y dilución a $5-10 \times 10^4$ células/ml en medio fresco. El cultivo "stock" de células P-388 (50 ml en un recipiente de cultivo de 125 ml) se ajustó a una concentración de 5×10^4 células/ml mediante la remoción de una alícuota del cultivo y dilución con medio fresco. Después de tres días de incubación, las células alcanzan un 60-70% de confluencia, momento en el cual el medio original de subcultivo se reemplaza por medio fresco (20 ó 30 ml) 24 horas antes del inicio del bioensayo.

El cultivo "stock" de células P-388 se diluyó a 35×10^4 células/ml. Después de 24 hrs de incubación, la concentración celular se duplica a un número aproximado de $70-80 \times 10^4$ células/ml. Todos los medios de cultivo se precalentaron a 37°C antes de su empleo.

3.8.4.2.2 PREPARACION DE LAS MUESTRAS DE PRUEBA.

Las muestras de prueba se disolvieron en dimetilsulfóxido (DMSO) y se prepararon diluciones con 10% DMSO en agua destilada y desionizada para alcanzar una concentración final en la suspensión celular correspondiente a 20.0, 4.0, 0.8, 0.16 y 0.032 $\mu\text{g/ml}$ de muestra.

3.8.4.2.3 PREPARACION DE LA SUSPENSION CELULAR PARA EL BIOENSAYO.

Después de 24 h de haber realizado el subcultivo de las células "stock", el medio se elimina y la monocapa de células cancerosas se dispersó con una solución de tripsina y se suspendió en medio fresco para obtener una concentración de $2-10 \times 10^4$ células/ml. Las células P-388 no se sometieron al proceso de tripsinización (Ham y Mckeehan, 1979) y su concentración se ajustó directamente por dilución con el medio fresco.

3.8.4.2.4 BIOENSAYOS.

3.8.4.2.4.1 METODO A.

En el método A, las muestras se evaluaron en tubos de ensayo de acuerdo con los procedimientos descritos en la literatura (Jayasuriya *et al.*, 1989; Ngassapa, 1992). La suspensión celular (2.85 ml) se adicionó a cada uno de los tubos de ensayo conteniendo la solución de la muestra de prueba (0.15 ml) y se agitó vigorosamente con un vortex. Se prepararon tubos control conteniendo 10% de DMSO acuoso (0.15 ml) y la suspensión celular (2.85 ml). Los tubos control que contenían únicamente la suspensión celular (2.85 ml) se centrifugaron para recuperar las células, las cuales se lavaron con una solución

amortiguadora de fosfatos y se centrifugaron de nueva cuenta por dos ocasiones. El sobrenadante se eliminó y cada uno de los aglomerados celulares en los tubos de ensayo se almacenó a 0-5 °C hasta el término del bioensayo para obtener la concentración basal en la determinación de proteínas. Cada experimento se realizó en duplicado.

Los cultivos en cada bioensayo se incubaron a 37 °C durante 72 hrs o 48 hrs para las células P-388. Transcurrido este periodo, se procedió a determinar el contenido celular mediante conteo visual (P-388) o un análisis colorimétrico para determinar el contenido proteico (Lowry *et al.*, 1951). Los medios de los tubos que contenían las células humanas cancerosas se drenaron y las capas celulares se lavaron dos veces con solución de fosfatos amortiguadora. La determinación del contenido proteico se realizó para todos los tubos de ensayo, incluyendo los tubos de control, mediante el método modificado de Lowry (Lowry *et al.*, 1951). Las lecturas de los valores de absorbancia se determinaron con un espectrómetro modelo "Spectronic 25" (Bausch and Lomb, New Jersey, EE.UU.) a una longitud de onda de 660 nm. Después de 48 hrs de incubación, la concentración de las células P-388 se determinó mediante conteo con un hemacitómetro. Diez conteos celulares se realizaron para los bioensayos de control y cinco para cada uno de los ensayos conteniendo las muestras de prueba.

3.8.4.2.4.2 METODO B.

En este método, la evaluación del potencial citotóxico se realizó en microplacas de plástico con 96-cavidades de acuerdo con los procedimientos descritos por Skehan, *et al.*, (1990). Las suspensiones celulares (190 µl) se depositaron en cada una de las cavidades de la placa junto con 10 µl de la solución conteniendo la muestra de prueba. Se prepararon ensayos de control a los cuales sólo se adicionó la suspensión de células cancerosas y 10 µl de DMSO al 10%. Las muestras de prueba se evaluaron a las concentraciones de 20.0, 4.0, 0.8, 0.16 y 0.032 µg/ml por triplicado. La suspensión celular se depositó en ocho de las cavidades (190 µl) de una microplaca adicional, las cuales no contenían muestra de

prueba y serían utilizadas para determinar la densidad óptica inicial. Este ensayo se designó con el nombre de control del punto cero. Los ensayos de citotoxicidad que utilizaron las células KB-V1 se realizaron tanto en la presencia de vinblastina (1 µg/ml) en el medio de cultivo como en la ausencia de ésta. Las placas se incubaron a una temperatura de 37 °C durante 72 hrs, o durante 48 hrs en el caso de los linfocitos P-388. Las placas de control se incubaron a 37 °C durante 30 minutos.

Una vez concluido el periodo de incubación, las monocapas celulares, con excepción de los linfocitos P-388, se sometieron a un proceso de fijación mediante la adición de 50-100 µl de ácido tricloroacético al 50% en cada una de las réplicas del bioensayo. Posteriormente, se incubaron a 4 °C durante una hora.

Las células P-388, tanto de las placas de control como de las soluciones que contenían las muestras de prueba, se centrifugaron a 2000 rpm durante 10 minutos. Para el proceso de fijación, se utilizaron 100 µl de ácido tricloroacético al 50% por cada bioensayo, y una incubación a 4°C durante una hora. Después de este proceso, las placas se lavaron con agua de hielo por cinco ocasiones, se secaron con una corriente de aire y se tñieron con 100 µl de una solución de sulforodamina B (0.4%) en ácido acético (1%) durante 30 minutos. Se eliminó el exceso de tinción antes de proceder con el registro de la densidad óptica para cada uno de los bioensayos. La tinción ligada a las proteínas se solubilizó con 200 µl de Tris base 10 mM [tris(hidroximetil)aminometano] a un pH 10 durante cinco minutos y mediante una agitación moderada. La densidad óptica se determinó en un espectro-fotómetro Beckman DU-70 a una longitud de onda de 564 nm.

3.8.4.2.5 DETERMINACION DE LA DOSIS EFECTIVA MEDIA (DE₅₀).

En el método A, los valores de absorbancia (A_{660}) para cada una de las soluciones de prueba se promediaron y se expresaron en términos de concentraciones de proteínas. El porcentaje del crecimiento celular para cada una de las diluciones se determinó mediante la siguiente fórmula $(T-Co/C-Co) \times 100$, donde T representa la concentración media de

proteínas para cada una de las diluciones de prueba, C_0 es la concentración de proteínas basal, y C es la concentración proteica en los tubos de control.

Se utilizó el análisis mediante regresión lineal en los gráficos semilogarítmicos obtenidos entre la dosis y el porcentaje de crecimiento celular para determinar la dosis efectiva del compuesto de prueba necesaria para inhibir el crecimiento celular en un 50% (DE_{50} $\mu\text{g/ml}$).

El porcentaje del crecimiento celular para cada dilución en el bioensayo con linfocitos P-388 se determinó mediante la ecuación utilizada para el cálculo de las DE_{50} de las líneas celulares cancerosas humanas, donde T es el promedio del conteo celular en los tubos experimentales, C_0 es el conteo celular inicial (5×10^4) y C es el promedio del conteo en los tubos de control.

En el método B, se promediaron las lecturas de la densidad óptica (DO_{564}) para cada una de las concentraciones de la muestra de prueba y de los controles. El porcentaje de la sobrevivencia celular se determinó mediante la fórmula empleada en el método A, donde T representa el promedio de la densidad óptica de las concentraciones de prueba, C es el promedio de la densidad óptica en los ensayos de control y C_0 es el promedio de la densidad óptica inicial. Los valores de la dosis efectiva media (DE_{50}) se obtuvieron utilizando el análisis de regresión lineal.

3.9 PREPARACION DE DERIVADOS

3.9.1 HIDROLISIS ALCALINA DE LA TRICOLORINA A.

Una solución de la tricolorina A (500 mg) en 5% $\text{KOH}/\text{H}_2\text{O}$ (10 ml) se sometió a un calentamiento a reflujo durante una hora a una temperatura de 95 °C. Posteriormente, se ajustó el pH de la mezcla de reacción con HCl 4N (pH 4) y se extrajo con Et_2O (2×10 ml). La capa orgánica se lavó con H_2O , se secó con Na_2SO_4 anhidro y se evaporó bajo presión reducida. El residuo se analizó directamente mediante cromatografía de gases-

espectrometría de masas, utilizando las siguientes condiciones analíticas: una columna capilar DB-5 [5% fenil-95% metilpolisiloxano] (30 m, 0.25 mm D.I., 0.25 μ m; Varian); helio a una velocidad de 30 cm/sec con un flujo de 1 ml/min; la temperatura de la columna se mantuvo a 80 °C por un minuto y se programó un calentamiento de 10 °C/min hasta alcanzar 280 °C. De esta manera, se obtuvo un cromatograma constituido por un solo pico (R_f 3.57 min), el cual se identificó como el ácido 2*S*-metilbutanoico: $\{\alpha\}_D +17^\circ$ ($c = 4.3$, MeOH); EM-IE m/z (int. rel.) $\{M\}^+$ 102 (1), 101 (1), 87 (22), 85 (1), 75 (4), 74 (100), 73 (16), 69 (7), 57 (62), 56 (18), 55 (17), 45 (25), 41 (91), 26 (15), 15 (7).

La fase acuosa se extrajo con *n*-BuOH (2 \times 10 ml) y la capa orgánica se evaporó al vacío para proporcionar 325.9 mg de un polvo cristalino incoloro, al cual se le asignó el nombre de ácido tricolorico: pf 104-106°; $\{\alpha\}_D -61.92^\circ$ ($c = 0.86$, MeOH); IR ν max (KBr) 3400, 1710, 1130, 1060 cm^{-1} ; RMN 1H (300 MHz, C_2D_2N , TMS): δ 6.41 (1H, *d*, $J = 1.3$ Hz, Ram-1), 6.07 (1H, *d*, $J = 1.0$ Hz, Ram'-1), 5.65 (1H, *d*, $J = 7.6$ Hz, Glc-1), 5.16 (1H, *dc*, $J = 6.0, 9.4$ Hz, Ram-5), 5.03 (1H, *dd*, $J = 1.3, 2.9$ Hz, Ram-2), 4.94 (1H, *dd*, $J = 2.9, 9.4$ Hz, Ram-3), 4.85 (1H, *d*, $J = 7.4$ Hz, Fuc-1), 4.78 (2H, *m*, Ram'-2, -5), 4.67 (1H, *dd*, $J = 3.4, 9.2$ Hz, Ram'-3), 4.59 (1H, *dd*, $J = 7.4, 9.0$ Hz, Fuc-2), 4.52 (1H, *dd*, $J = 9.4, 9.4$ Hz, Ram-4), 4.45 (1H, *dd*, $J = 3.4, 9.0$ Hz, Fuc-3), 4.33 (1H, *dd*, $J = 2.7, 12.0$ Hz, Glc-6'), 4.30 (1H, *dd*, $J = 7.6, 9.0$ Hz, Glc-2), 4.29 (1H, *dd*, $J = 9.2, 9.2$ Hz, Ram'-4), 4.23 (1H, *dd*, $J = 5.0, 12.0$ Hz, Glc-6), 4.19 (1H, *dd*, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Glc-3), 4.09 (1H, *dd*, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Glc-4), 3.94 (1H, *m*, Jla-11), 3.92 (1H, *d*, $J = 3.4$ Hz, Fuc-4), 3.80 (1H, *c*, $J = 6.5$ Hz, Fuc-5), 3.66 (1H, *ddd*, $J = 2.7, 5.0, 9.0$ Hz, Glc-5), 2.52 (2H, *t*, $J = 7.0$ Hz, Jla-2), 1.85 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, Ram-6), 1.55 (3H, *d*, $J = 6.2$ Hz, Ram'-6), 1.48 (3H, *d*, $J = 6.5$ Hz, Fuc-6), 0.84 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, Jla-16); RMN ^{13}C (75.4 MHz, C_2D_2N , TMS): δ 102.71 (Fuc-1), 78.32 (Fuc-2), 76.00 (Fuc-3), 72.82 (Fuc-4), 70.91 (Fuc-5), 17.18 (Fuc-6), 102.35 (Glc-1), 78.38 (Glc-2), 79.10 (Glc-3), 72.59 (Glc-4), 76.94 (Glc-5), 63.13 (Glc-6), 101.93 (Ram-1), 71.93 (Ram-2), 80.47 (Ram-3), 72.96 (Ram-4), 69.68 (Ram-5), 18.89 (Ram-6), 104.17 (Ram'-1), 72.36 (Ram'-2), 72.66 (Ram'-3), 74.17 (Ram'-4), 69.88

(Ram'-5), 18.50 (Ram'-6), 176.15 (J1a-1), 34.92 (J1a-2), 80.55 (J1a-11), 14.20 (J1a-16); EM-fab negativo m/z (int. rel.) $\{M-H\}^-$ 871 (100), 725 (18), 579 (16), 417 (19), 271 (5), 268 (9), 142 (8); Análisis elemental para $C_{40}H_{72}O_{20}$. Calculado: C, 55.03%; H, 8.31%. Encontrado: C, 55.05%; H, 8.32%.

3.9.2 ACETILACION DE LA TRICOLORINA A.

La tricolorina A (100 mg) se disolvió en 2.5 ml de una mezcla de Ac_2O/C_3H_5N (3:2) y se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo, se adicionaron a la mezcla de reacción 20 ml de agua fría y se continuó la agitación durante 30 min. Posteriormente, se adicionaron 10 ml de agua destilada y se realizaron dos extracciones sucesivas utilizando, en cada ocasión, volúmenes de 20 ml de AcOEt. Las fases orgánicas se reunieron y trataron con 20 ml de HCl (15%) seguido de un tratamiento alcalino con una solución de $NaHCO_3$. Por último, la fase orgánica se lavó dos veces con volúmenes de 10 ml de agua en cada ocasión, se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida, obteniéndose 85.9 mg de un sólido cristalino de color blanco: pf 74-76°; $\{\alpha\}_D -31.92^\circ$ (c = 1.7, MeOH); IR ν max (KBr): 2930, 1740, 1440, 1370, 1230, 1070 cm^{-1} ; RMN 1H (300 MHz, C_3D_3N , TMS): δ 5.59 (1H, *dd*, J = 9.0, 9.0 Hz, Glc-3), 5.53 (1H, *dd*, J = 1.5, 3.4 Hz, Ram-2), 5.47 (1H, *dd*, J = 10.0, 10.0 Hz, Ram-4), 5.43 (1H, *dd*, J = 3.2, 9.8 Hz, Ram-3), 5.38 (1H, *d*, J = 3.4 Hz, Fuc-4), 5.33 (1H, *dd*, J = 9.8, 9.8 Hz, Ram'-4), 5.29 (1H, *dd*, J = 1.0, 3.2 Hz, Ram'-2), 5.25 (1H, *d*, J = 1.5 Hz, Ram-1), 5.24 (1H, *dd*, J = 9.0, 9.0, Glc-4), 5.18 (1H, *d*, J = 1.0 Hz, Ram'-1), 5.13 (1H, *dd*, J = 3.4, 10.2 Hz, Fuc-3), 5.05 (1H, *d*, J = 7.6 Hz, Glc-1), 4.47 (1H, *d*, J = 7.8 Hz, Fuc-1), 4.32-4.37 (3H, *m*, Fuc-2, Glc-6, Ram-5), 4.28 (1H, *dd*, J = 3.4, 10.0, Hz, Ram-3), 4.09 (1H, *dd*, J = 2.1, 12.2 Hz, Glc-6), 4.03 (1H, *c*, J = 6.4 Hz, Fuc-5), 3.89 (1H, *dd*, J = 7.6, 9.0 Hz, Glc-2), 3.79 (1H, *dt*, J = 2.0, 9.0 Hz, Glc-5), 3.76 (1H, *dc*, J = 6.0, 9.8 Hz, Ram'-5), 3.58 (1H, *m*, J1a-11), 2.68 (1H, *ddd*, J = 3.0, 9.0, 16.0 Hz, J1a-2), 2.57 (1H, *tc*, J = 7.0, 7.0 Hz, mba'-2), 2.26 (1H, *ddd*, J = 3.0, 9.0, 16.0 Hz, J1a-2'), 2.21 (1H, *tc*, J = 7.0,

7.0 Hz, mba-2), 1.74-1.97 (3H, *s* × 7), 1.40 (3H, *d*, *J* = 6.1 Hz, Ram-6), 1.17 (3H, *d*, *J* = 6.4 Hz, Fuc-6), 1.13 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, mba-2Me), 1.04 (3H, *d*, *J* = 6.0 Hz, Ram'-6), 0.99 (3H, *d*, *J* = 7.0 Hz, mba'-2Me), 0.81 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, mba-3Me), 0.80 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, mba'-3Me), 0.59 (3H, *t*, *J* = 7.0 Hz, Jla-16); RMN ¹³C (75.4 MHz, C₆D₆N, TMS): δ 102.05 (Fuc-1), 72.24 (Fuc-2), 75.16 (Fuc-3), 71.14 (Fuc-4), 69.51 (Fuc-5), 17.15 (Fuc-6), 99.96 (Glc-1), 78.26 (Glc-2), 70.15 (Glc-3), 69.07 (Glc-4), 71.14 (Glc-5), 61.98 (Glc-6), 98.50 (Ram-1), 72.19 (Ram-2), 76.33 (Ram-3), 75.51 (Ram-4), 67.73 (Ram-5), 18.24 (Ram-6), 100.51 (Ram'-1), 72.28 (Ram'-2), 69.56 (Ram'-3), 71.09 (Ram'-4), 69.51 (Ram'-5), 17.38 (Ram'-6), 171.83 (Jla-1), 34.85 (Jla-2), 81.01 (Jla-11), 14.16 (Jla-16), 176.39 (mba-1), 41.39 (mba-2), 27.88 (mba-3), 11.93 (mba-4), 16.67 (mba-2Me), 175.97 (mba'-1), 41.33 (mba'-2), 27.04 (mba'-3), 11.93 (mba'-4), 16.45 (mba'-2Me).

3.9.3. PREPARACION DEL ACETONIDO DE LA TRICOLORINA A.

A una solución de la tricolorina A (100 mg) en Me₂CO anhidra (3 ml) y 2,2-dimetoxipropano (3 ml) se adicionaron trazas del ácido *p*-toluensulfónico monohidratado y 300 mg de una malla molecular (4Å, Merck). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 36 hrs. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se filtró y el disolvente se evaporó a sequedad. Se adicionó agua destilada al residuo sólido y se extrajo con AcOEt (3 × 5 ml). Las fases orgánicas se combinaron y el disolvente se eliminó mediante destilación a presión reducida. El producto mayoritario de menor polaridad (*R_f* 0.5; CHCl₃-AcOEt-Me₂CO, 8:1:1) se purificó mediante cromatografía en capa fina para proporcionar 70.52 mg de un producto sólido cristalino e incoloro; *mp* 73-75°; {α}_D -21.2° (*c* = 0.2, MeOH); RMN ¹H (300 MHz, C₆D₆N, TMS): δ 5.72 (1H, *dd*, *J* = 9.0, 9.0 Hz, Glc-3), 5.67 (1H, *dd*, *J* = 1.5, 3.0 Hz, Ram-2), 5.62 (1H, *dd*, *J* = 9.8, 9.8 Hz, Ram-4), 5.58 (1H, *d*, *J* = 1.0 Hz, Ram'-1), 5.52 (1H, *d*, *J* = 1.0 Hz, Ram-1), 5.51 (1H, *d*, *J* = 7.8 Hz, Glc-1), 4.68 (2H, *m*, Ram-3, Fuc-3), 4.55 (2H, *m*, Fuc-1, Ram-5), 4.40-4.55 (2H, *m*, Ram'-2,-3), 4.35 (1H, *dd*, *J* = 9.0, 9.0 Hz, Fuc-2), 4.08-4.15 (4H, *m*, Fuc-4,

Glc-2, Glc-4, Ram'-5), 3.90 (2H, m, Fuc-5, Gluc-6), 3.82 (1H, *dd*, $J = 9.8, 9.8$ Hz, Ram'-4), 3.75 (2H, m, Glc-6', Jla-11), 3.55 (1H, *ddd*, $J = 3.0, 5.0, 9.0$ Hz, Glc-5), 2.70 (1H, m, Jla-2), 2.38-2.55 (3H, m, Jla-2', mba-2, mba'-2), 1.71 (3H, *d*, $J = 6.5$ Hz, Fuc-6), 1.54 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, Ram-6), 1.44 (3H, *d*, $J = 6.0$ Hz, Ram'-6), 1.43-1.56 (3H, *s* × 6), 1.23 (3H, *d*, $J = 7.0$ Hz, mba-2Me), 1.17 (3H, *d*, $J = 7.0$ Hz, mba'-2Me), 0.96 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, mba-3Me), 0.93 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, mba'-3Me), 0.83 (3H, *t*, $J = 7.0$ Hz, Jla-16); RMN ^{13}C (75.4 MHz, $\text{C}_2\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 102.66 (Fuc-1), 75.83 (Fuc-2), 80.22 (Fuc-3), 77.72 (Fuc-4), 68.33 (Fuc-5), 98.98 (Glc-1), 82.63 (Glc-2), 74.86 (Glc-3), 72.82 (Glc-4), 66.97 (Glc-5), 62.84 (Glc-6), 97.96 (Ram-1), 73.12 (Ram-2), 76.75 (Ram-3), 73.58 (Ram-4), 68.25 (Ram-5), 101.49 (Ram'-1), 77.35 (Ram'-2), 80.27 (Ram'-3), 75.21 (Ram'-4), 69.50 (Ram'-5), 82.35 (Jla-11).

3.9.4. HIDROLISIS ACIDA DE LA TRICOLORINA A: ANALISIS DE CARBOHIDRATOS.

3.9.4.1 ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA.

Una solución de la tricolorina A (90 mg) en HCl 2N (10 ml) se calentó a reflujo (90 °C) durante 2 hrs. La mezcla de reacción se diluyó con agua destilada (5 ml) y se extrajo con Et_2O (2 × 10 ml). La fase acuosa se neutralizó con KOH al 10% y se extrajo con *n*-BuOH (2 × 10 ml). La fase orgánica resultante se lavó con agua destilada y se evaporó mediante destilación al alto vacío. Este procedimiento proporcionó 42 mg de una mezcla de mososacáridos, la cual se analizó mediante cromatografía en capa fina utilizando cromatoplasmas de gel de sílice 60 F_{254} (10 × 10 cm, Merck) y, como sistema de elución, la mezcla ternaria de CHCl_3 -MeOH- H_2O (6:4:1). Este análisis permitió detectar tres bandas con R_f 0.24 (glucosa), 0.45 (fucosa) y 0.51 (ramnosa).

De manera alternativa, se utilizaron placas de gel de sílice impregnadas con una solución acuosa de H_3BO_3 0.036 N (Ghebregabher *et al.*, 1976) y el sistema de elución

antes mencionado. Se utilizaron muestras auténticas (Sigma) de 6-deoxi- β -D-glucosa (quinovosa, R_f 0.51), α -L-ramnosa (R_f 0.48), α -D-fucosa (R_f 0.44) y β -D-glucosa (R_f 0.29) como referencias de elución. Los monosacáridos detectados en la hidrólisis ácida de la tricolorina A correspondieron a los R_f 0.29, 0.44 y 0.48.

3.9.4.2 ANALISIS MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES.

3.9.4.2.1. CONDICIONES INSTRUMENTALES.

Los análisis mediante cromatografía de gases (CG) se realizaron en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas modelo Varian MAT 112S (Varian MAT, Florham Park, NJ) mediante la inyección de 1 μ l de cada una de las muestras de prueba en una columna capilar DB-1 (100 % metilpolisiloxano, 30 m de longitud, 0.25 mm de diámetro interno y 0.25 μ m de espesor de la película; J & W Scientific, Folsom, CA). La identificación y la cuantificación de los carbohidratos presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A se realizó mediante el análisis de sus derivados sililados por cromatografía de gases-espectrometría de masas de acuerdo con dos procedimientos alternativos para la sililación (Sección 3.9.4.2.2) descritos en la literatura (Kakehi y Honda, 1989; Hussain *et al.*, 1990). Se utilizó como gas acarreador al helio a una presión manométrica de 0.6 Kg/cm², con una velocidad lineal de 30 cm/sec y con un flujo de 2 ml/min. La temperatura del inyector se mantuvo a 220 °C, en tanto que la temperatura de la columna fue isotérmica a 120 °C durante el primer minuto y, posteriormente, se programó para alcanzar 280 °C con un calentamiento gradual de 4 °C/min.

Se utilizaron las siguientes condiciones instrumentales para el registro de los espectros de masas: un voltaje de 70 eV para el impacto electrónico, una corriente de emisión de 0.25 mA y un voltaje de 1200 V para el multiplicador electrónico. Cada uno de los espectros se registró con un barrido de 50 a 700 unidades de masa/carga (m/z) por segundo.

3.9.4.2.2 PROCEDIMIENTOS PARA LA SILLACION.

3.9.4.2.2.1 PROCEDIMIENTO GENERAL.

La siliación de la mezcla de monosacáridos (1.5 mg) obtenida de la hidrólisis ácida de la tricolorina A (Sección 3.9.4.1) se realizó mediante un tratamiento con 0.1 ml del reactivo SIGMA SIL-A, una mezcla de trimetilclorosilano-hexametildisilazano-piridina (1:3:9), a una temperatura de 70 °C durante 5 min (Hussain *et al.*, 1990). De manera adicional, se prepararon los derivados *O*-siliados de muestras estándares (0.5 mg) de ramnosa, fucosa, quinovosa y glucosa (Sigma) siguiendo el mismo procedimiento. Los tiempos de retención (R_t) en la CG para estos derivados siliados correspondieron a 14.80, 16.07, 17.60 y 24.15 min, respectivamente.

3.9.4.2.2.2 PROCEDIMIENTO PARA LA MERCAPTALACION-SILILACION.

Se adicionaron 30 μ l de una mezcla de etanotiol y ácido trifluoroacético (2:1) a la mezcla de monosacáridos (1.5 mg) obtenida de la hidrólisis ácida de la tricolorina A (Sección 3.9.4.1). La mezcla de reacción se mantuvo a 25 °C durante 10 min y, posteriormente, se adicionaron 300 μ l del reactivo SIGMA SIL-A (Kakehi y Honda, 1989). Esta solución se calentó a 50 °C durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la mezcla de reacción se centrifugó a una velocidad de 3000 rpm durante 5 min para eliminar los sobrenadantes sólidos y una alícuota de la solución resultante (1 μ l) se analizó mediante CG-EM. Este análisis utilizó los mismos procedimientos analíticos descritos para la siliación directa y permitió la identificación y la cuantificación de los picos correspondientes a la ramnosa (R_t 14.97 min), la fucosa (R_t 16.67 min) y la glucosa (R_t 21.87 min).

3.9.5 HIDROLIS DEL ACIDO TRICOLORICO.

Una solución del ácido tricolórico (100 mg) en la mezcla de 1,4-dioxano-H₂O (1:10) (5 ml) se trató con H₂SO₄ al 10% (2 ml). La mezcla de reacción se mantuvo a

reflujo durante 2 hrs. Posteriormente, se dejó enfriar y se extrajo con Et₂O (3 × 2.5 ml). La fase orgánica se lavó con H₂O, se secó con Na₂SO₄ y se concentró a sequedad. El residuo sólido se purificó mediante CCF (CHCl₃-MeOH, 4:1) para proporcionar 20.5 mg de la aglicona (R_f 0.62): pf 60-63°; {α}_D +0.7° (c = 0.9, CHCl₃). Este producto se metiló con un exceso de CH₂N₂ y mediante una recrystalización con Et₂O se obtuvieron 19.8 mg de un sólido incoloro en forma de pequeñas agujas: pf 40-43°; {α}_D = 1.0° (c = 0.9, MeOH); IR ν max (KBr) 3325, 2920, 2850, 1740, 1460, 1210, 1165 cm⁻¹; RMN ¹H (300 MHz, CDCl₃, TMS): δ 0.90 (3H, t, J = 7 Hz, Me-16), 1.20-1.35 (16H, m), 1.43 (4H, m), 1.60 (4H, m), 2.32 (2H, t, J = 7.0 Hz, H-2), 3.58 (1H, m, H-11), 3.68 (3H, s, -CO₂Me); EM-IE *m/z* (int. rel.): {M}⁺ 286 (0.4), 255 (2), 229 (10), 215 (15), 186 (18), 183 (63), 157 (10), 143 (30), 101 (56), 95 (38), 87 (87), 83 (74), 81 (40), 74 (32), 69 (22), 67 (15), 59 (36), 57 (30), 55 (100), 43 (40), 41 (50).

Por otra parte, la fase acuosa se neutralizó con KOH al 10 % y se concentró mediante una destilación al alto vacío hasta alcanzar un volumen de 0.5 ml. Esta solución se diluyó con 1 ml de MeOH y se adicionó a una columna de sefadex LH-20. La elución se realizó con 19 ml de MeOH. Este procedimiento facilitó la eliminación de las sales y permitió la obtención de 47.3 mg de una mezcla de monosacáridos, la cual se analizó siguiendo los procedimientos descritos anteriormente (Sección 3.9.4).

4. RESULTADOS Y DISCUSION.

4.1 FRACCIONAMIENTO BIODIRIGIDO DEL EXTRACTO CLOROFORMICO DE *Ipomoea tricolor* Y EVALUACION DEL POTENCIAL ALELOPATICO DE LA TRICOLORINA A.

El potencial alelopático de *Ipomoea tricolor* se evaluó en un estudio preliminar (Anaya *et al.*, 1990) y los resultados de esta investigación demostraron la aplicación potencial de este cultivo de cobertura como un herbicida natural para el control de las plantas nocivas en los agroecosistemas tradicionales de nuestro país (Anaya *et al.*, 1987a; 1987b).

El objetivo de la presente investigación se concentró en el aislamiento del constituyente activo mayoritario y en la determinación de su toxicidad relativa como un agente alelopático. El aspecto más importante en la presente investigación consistió en el empleo de los bioensayos de germinación de semillas y de crecimiento radicular para detectar el potencial de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal (Anaya *et al.*, 1987a; 1990) de los extractos preparados a partir de las partes aéreas de *I. tricolor*. Al mismo tiempo, estos ensayos permitieron realizar el monitoreo de la actividad biológica a lo largo de todo el estudio fitoquímico.

De esta manera, la evaluación del potencial alelopático del crudo alcaloideo y de los extractos orgánicos totales (hexano, CHCl_3 y MeOH) de esta especie permitió detectar que la actividad inhibidora del crecimiento vegetal se concentraba en el extracto clorofórmico. El cuadro 5 incluye el efecto de los extractos de *I. tricolor* sobre la germinación y el crecimiento radicular de *A. leucocarpus* y *E. crus-galli*. El extracto activo se sometió a una separación cromatográfica en columna de gel de sílice y, durante el desarrollo del proceso de fraccionamiento, todos los eluatos resultantes se ensayaron para evaluar su potencial alelopático (ver Experimental: sección 3.6). La figura 17 ilustra los porcentajes de inhibición del crecimiento radicular de *A. leucocarpus* y *E. crus-galli*

provocados por las fracciones (I-IX) obtenidas durante el fraccionamiento del extracto clorofórmico de *I. tricolor*.

Cuadro 5. Efectos de los extractos, las resinas glicosídicas y la tricolorina A obtenidos a partir de *Ipomoea tricolor* sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crus-galli*.

Muestra ^a	Crecimiento radicular ^b		Inhibición del crecimiento (%) ^c	
	<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>	<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>
Control	6.4 ± 0.25	11.3 ± 0.98		
Crudo alcaloideo	5.3 ± 1.90	9.1 ± 1.50	17.2 ^d	19.5 ^d
Control	12.8 ± 0.41	22.8 ± 0.89		
Extracto hexánico	11.7 ± 0.85	22.6 ± 1.44	8.6	0.9
Control	7.9 ± 1.08	13.4 ± 1.83		
Extracto MeOH	5.5 ± 1.71	9.0 ± 2.80	30.4 ^d	32.8 ^d
Control	8.2 ± 0.71	9.5 ± 1.31		
Extracto CHCl ₃	4.2 ± 1.25	3.5 ± 0.17	48.8 ^d	63.2 ^d
Control	14.0 ± 0.78	24.3 ± 7.40		
Resinas glicosídicas	6.8 ± 1.01	6.7 ± 0.52	51.4 ^d	72.4 ^d
Control	10.4 ± 1.16	17.0 ± 1.04		
Tricolorina A	3.3 ± 0.12	3.6 ± 0.12	68.3 ^d	78.8 ^d

^aConcentración de prueba: 100 µg/ml.

^bCada valor representa el promedio de 4 réplicas (± D.E.); 20 plántulas cada una.

^cPorcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo.

^dP ≤ 0.05 (ANOVA).

La actividad inhibidora del crecimiento vegetal se concentró en el crudo de las resinas glicosídicas, el cual se recromatografió para conseguir la purificación del constituyente mayoritario bioactivo. El cuadro 5 también incluye la actividad inhibidora del crecimiento vegetal de la mezcla de resinas glicosídicas y de la tricolorina A, con este nombre se designó al constituyente bioactivo aislado en forma pura de la mezcla compleja de glicolípidos responsable de la actividad alelopática de *I. tricolor*.

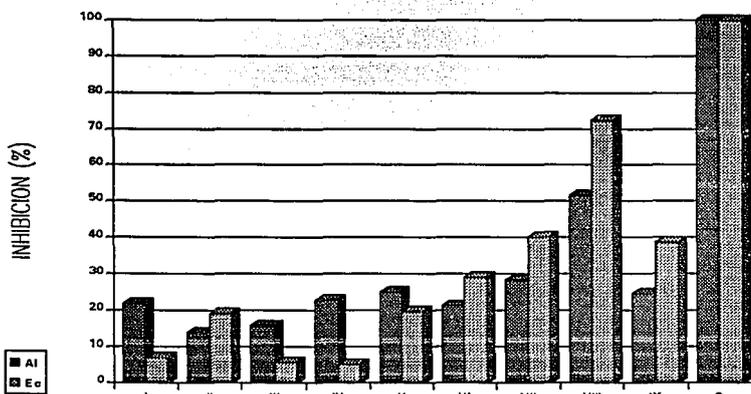


Figura 17. Porcentajes de inhibición de las fracciones I-IX sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* (Al) y *Echinochloa crus-galli* (Ec). La concentración de prueba de cada una de las fracciones fue de 100 µg/ml. Se utilizó el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (100 µg/ml) como un control positivo (C). Cada valor representa el promedio de 4 réplicas: 20 plántulas cada una. Los procedimientos del bioensayo se describen en la Parte Experimental (Sección 3.5).

Se estudió con detalle el potencial inhibitor del crecimiento vegetal de la tricolorina A (Ver Experimental: sección 3.8.1) y en la figura 18 se ilustran los resultados de los bioensayos de la germinación de semillas en las dos especies de prueba, *A. leuocarpus* y *E. crus-galli*. El análisis de regresión lineal permitió calcular un valor de la concentración inhibitora media (CI_{50}) para la tricolorina A de 36.9 $\mu\text{g/ml}$ (36.1 μM) sobre la germinación de semillas de *E. crus-galli*. La germinación de *A. leuocarpus* resultó menos sensible a la tricolorina A con un valor para la CI_{50} de 152.7 $\mu\text{g/ml}$ (149.4 μM). La tricolorina A inhibe totalmente la germinación de las semillas de *E. crusgalli* a una concentración de 200 $\mu\text{g/ml}$. En tanto que la germinación de *A. leuocarpus* se inhibe en un 75% a una concentración aproximada de 560 $\mu\text{g/ml}$.

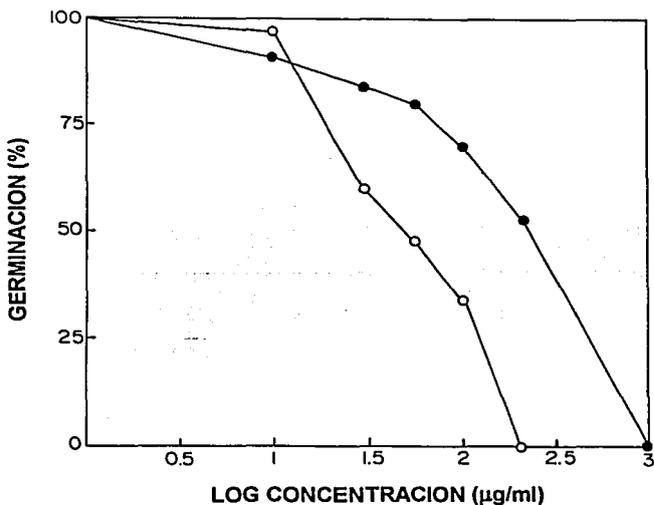


Figura 18. Bioensayo de la germinación de semillas de *Amaranthus leuocarpus* (●) y *Echinochloa crus-galli* (○) tratadas con diferentes concentraciones de la tricolorina A. Cada valor representa el promedio de 4 réplicas: 20 plántulas cada una. Los procedimientos del bioensayo se describen en la Parte Experimental (Sección 3.8.1).

El cuadro 6 presenta los resultados del efecto inhibitorio de la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de *E. crus-galli* y *A. leuocarpus*. La elongación de la radícula en las dos especies de prueba se inhibió totalmente en las concentraciones superiores a 200 μM de la tricolorina A. La longitud radicular de las semillas germinadas en una concentración de 30 $\mu\text{g/ml}$ (29.35 μM) de la tricolorina A correspondió a la mitad registrada para el control negativo (ver Parte Experimental: sección 3.5).

Cuadro 6. Efecto de la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leuocarpus* y *Echinochloa crus-galli*.

Dosis ^a	Crecimiento Radicular (mm) ^b		Inhibición (%) ^c	
	<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>	<i>Amaranthus</i>	<i>Echinochloa</i>
0	10.4 ± 1.2	17.0 ± 1.0	0	0
1	14.1 ± 0.9	18.2 ± 0.7	-8.6	-7.0
5	8.7 ± 1.4	17.8 ± 0.9	16.4 ^d	-4.0
10	7.7 ± 0.5	8.2 ± 0.4	27.4 ^d	51.2 ^d
30	6.1 ± 0.4	6.2 ± 0.6	41.3 ^d	63.5 ^d
50	3.7 ± 0.2	5.0 ± 0.8	64.4 ^d	70.5 ^d
100	3.3 ± 0.1	3.6 ± 0.3	68.3 ^d	79.0 ^d
200	2.6 ± 0.1	0	75.0 ^d	100

^aConcentración de prueba ($\mu\text{g/ml}$).

^bCada valor representa el promedio de 4 réplicas (\pm D.E.): 20 plántulas cada una.

^cPorcentajes expresados en relación al crecimiento del control negativo.

^d $P \leq 0.05$ (ANOVA).

La figura 19 presenta las curvas concentración-respuesta para la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de *E. crus-galli* y *A. leuocarpus*. El valor de la CI_{50} calculado mediante análisis de probit para el crecimiento radicular de *E. crus-galli*

correspondió a 12.6 $\mu\text{g/ml}$ (12.3 μM), con un 95% de confianza en el intervalo correspondiente a las concentraciones 7.8-17.4 $\mu\text{g/ml}$. Para el crecimiento radicular de *A. leucocarpus*, el valor de la CI_{50} resultó de 37.0 $\mu\text{g/ml}$ (36.2 μM), con un intervalo de confianza (95%) en las concentraciones de 29.3-46.8 $\mu\text{g/ml}$.

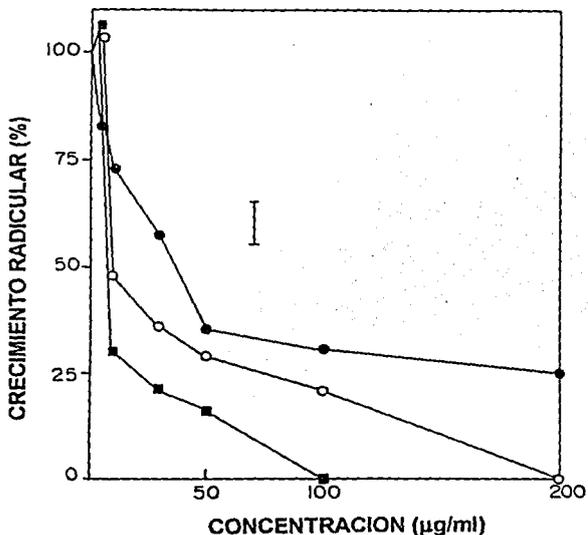


Figura 19. Efecto de la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* (●) y *Echinochloa crus-galli* (○). La inhibición del crecimiento radicular inducida en las dos especies de prueba por el 2,4-D (■), fitorregulador utilizado como un control positivo, fue similar en los bioensayos realizados en las concentraciones de prueba superiores a 1 $\mu\text{g/ml}$. La barra representa la desviación estándar máxima (ver Parte Experimental: sección 3.8.1).

Es importante reconocer que las concentraciones de prueba para la tricolorina A que provocaron un efecto inhibitor sobre el crecimiento radicular fueron sumamente bajas en comparación con las descritas en la literatura para diferentes agentes alelopáticos que

han sido evaluados en diseños experimentales similares a los descritos en la presente investigación. La inhibición del crecimiento radicular inducida por la tricolorina A para *E. crus-galli* en la concentración de 10 μM corresponde a uno o dos órdenes de magnitud inferiores a las concentraciones requeridas para provocar este efecto por la mayoría de los productos de origen vegetal cuya actividad alelopática se ha demostrado, la cual corresponde al intervalo de las concentraciones de 100 a 1000 μM (Einhellig, 1986; 1989; Scholes, 1987; Haar, 1990). La inhibición del crecimiento radicular inducida por la tricolorina A en las concentraciones micromolares de prueba (10-50 μM) resulta aún más sorprendente si se considera que este glicolípido es prácticamente insoluble en agua. Esta marcada actividad alelopática sólo es comparable con la fitotoxicidad observada para los exudados radiculares de las especies de *Sorghum*, los cuales consisten principalmente de una hidroquinona que se oxida rápidamente a la *p*-benzoquinona fitotóxica, denominada sorgoleona (Fig. 20). Al parecer, el exudado original estimula la germinación, en contraste con la pronunciada actividad herbicida de sus quinonas derivadas (Einhellig y Souza, 1992).

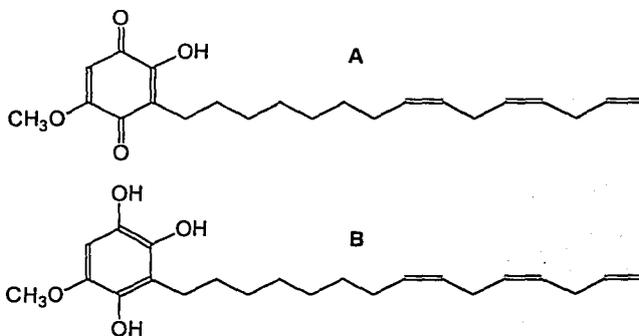


Figura 20. Estructuras de la sorgoleona (A) y su dihidroquinona (B), constituyentes alelopáticos de los exudados radiculares de las especies de *Sorghum*.

El alto rendimiento de las resinas glicosídicas (0.5% peso seco) y la presencia de la tricolorina A como el constituyente mayoritario (0.4% peso seco) de éstas se asocian con la notoria actividad alelopática de *Ipomoea tricolor*. Por lo tanto, se puede postular que las resinas glicosídicas de las convolvuláceas son potentes inhibidores del crecimiento vegetal y constituyen los principales agentes responsables de las interacciones alelopáticas observadas en las especies de *Ipomoea*.

En relación con los posibles efectos de los glicolípidos de las convolvuláceas sobre la fisiología vegetal sólo se pueden establecer meras especulaciones. Las resinas glicosídicas probablemente interfieran con las funciones de las membranas vegetales, en especial con los procesos de permeabilidad, mediante su posible actividad ionofórica. Se demostró que esta actividad transportadora de iones está asociada con la estructura macrocíclica de las resinas glicosídicas (Kitagawa *et al.*, 1989). Sin embargo, a pesar de desconocerse el mecanismo de acción de la tricolorina A resulta evidente que este producto natural es un poderoso inhibidor del crecimiento vegetal.

4.2 ESTRUCTURA DE LA TRICOLORINA A.

El componente bioactivo mayoritario aislado de las partes aéreas de *Ipomoea tricolor* se denominó con el nombre de tricolorina A {1} y corresponde a la fórmula molecular de $C_{30}H_{86}O_{21}$, la cual se estableció mediante análisis elemental. El espectro de masas FAB-negativo de este producto natural presentó un ión cuasimolecular de m/z 1021 $\{M - H\}^-$, el cual corroboró la fórmula molecular propuesta (Dell, 1987; Wolfender *et al.*, 1992). Este metabolito secundario se aisló como un sólido incoloro y ópticamente activo ($[\alpha]_D -30.32^\circ$). Su espectro de IR presentó absorciones asociadas con la presencia de los grupos hidroxilo (ν_{max} 3420 cm^{-1}) y carbonilo (ν_{max} 1740 cm^{-1}).

La saponificación de la tricolorina A liberó una fracción soluble en un disolvente orgánico junto con una segunda porción recuperada de la fase acuosa. El análisis de la primera fracción orgánica mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (CG-EM) proporcionó un pico único con un tiempo de retención de 3.57 min (Fig. 21).

El espectro de masas generado por esta fracción permitió observar el ión molecular en una m/z de 102, el cual correspondió a la fórmula $C_5H_{10}O_2$. Los fragmentos de m/z 74 $\{M - 28\}^+$, pico base del espectro que corresponde a la ruptura multicéntrica de McLafferty, m/z 57 $\{M - CO_2H\}^+$ y m/z 45 $\{CO_2H\}^+$ identificaron a este residuo como el ácido 2-metilbutanoico (Budzikiewicz *et al.*, 1964). En la figura 21 se compara el espectro de masas generado mediante la secuencia instrumental CG-EM (Fig. 22A) para el derivado volátil de la saponificación de la tricolorina A con el espectro de referencia del ácido 2-metilbutanoico (Fig. 22b). La propiedad dextrorrotatoria ($[\alpha]_D + 17^\circ$) mostrada por este derivado confirmó que pertenecía a la serie configuracional 2(S) (Noda *et al.*, 1987).

Por otra parte, la porción soluble en agua de la hidrólisis alcalina de la tricolorina A proporcionó un residuo sólido de naturaleza oligosacárida, el cual se denominó con el nombre de ácido tricolórico {2}. La hidrólisis ácida de este derivado produjo un ácido graso saturado, como la porción correspondiente a la aglicona, y una mezcla de

monosacáridos. La caracterización de la aglicona se efectuó mediante la preparación de su éster metílico cuyas constantes físicas (p.f. 40-43°; $[\alpha]_D + 1.0^\circ$) y propiedades espectroscópicas, en especial la RMN- ^1H y la EM (ver Parte Experimental: sección 3.9.5), correspondieron con las descritas en la literatura para el 11-hidroxihexadecanoato de metilo (Noda *et al.*, 1987). De nueva cuenta, el signo positivo de la rotación óptica permitió identificar la configuración absoluta (S) para el centro quiral C-11 (Shibuya *et al.*, 1989). Esta evidencias permitieron comprobar que la aglicona presente en la tricolorina A correspondía al ácido jalapínico, ácido 11S-hidroxihexadecanoico (Wagner, 1973).

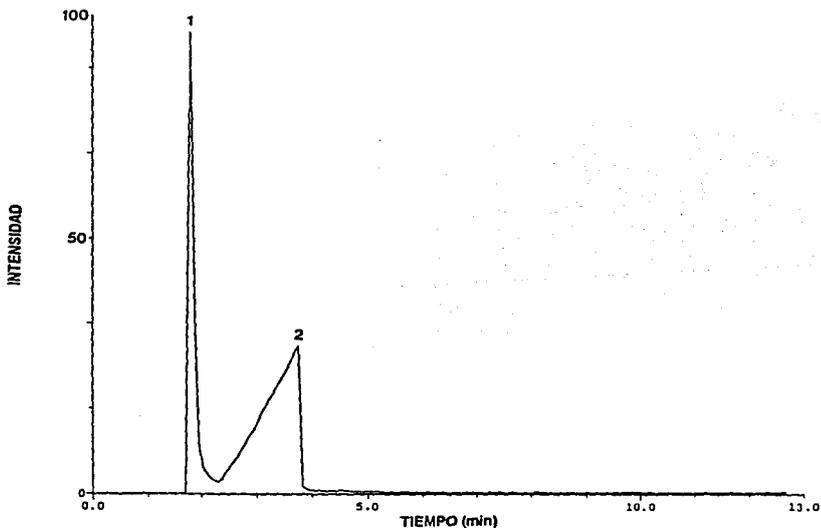
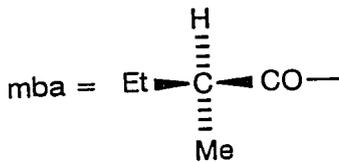
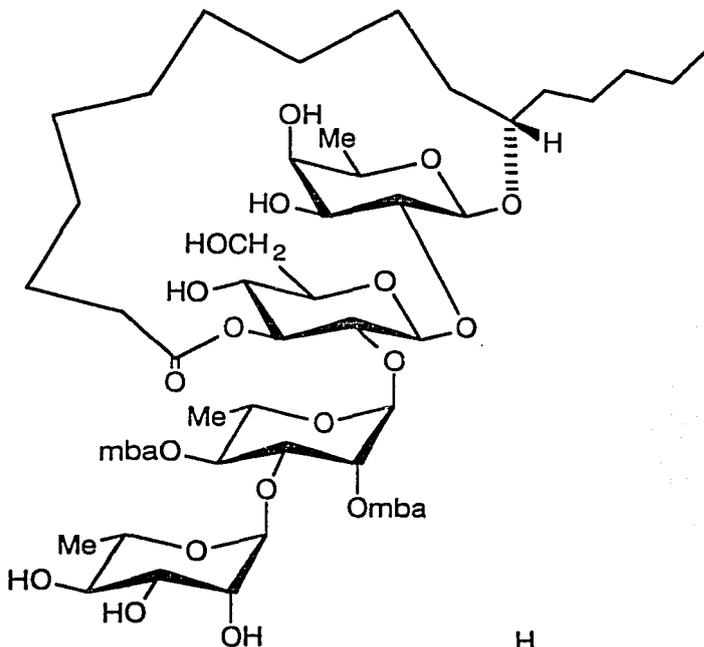
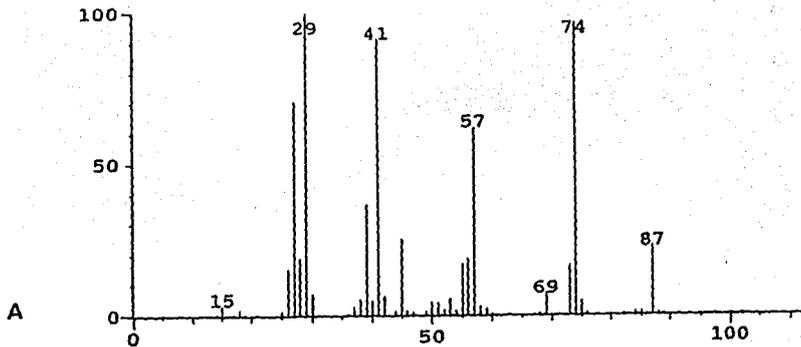


Figura 21. Análisis mediante cromatografía de gases de la fracción recuperada a partir de la fase orgánica durante la saponificación de la tricolorina A. Condiciones instrumentales: columna capilar, DB-5 (30 m, 0.25 mm D.I., 0.25 μm); temperatura de la columna, 80 \rightarrow 280 $^\circ\text{C}$ a 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$; gas acarreador, helio (1 ml/min). Asignación de los picos: 1, disolvente; 2, ácido 2-metilbutanoico (Rt = 3.57 min).



1



BUTANOIC ACID, 2-METHYL-
 C₅H₁₀O₂ MW=102

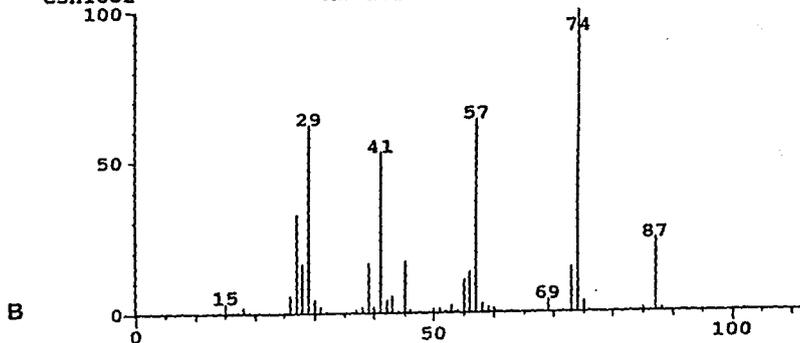


Figura 22. Espectro de masas por impacto electrónico (70 eV) del ácido 2-metilbutanoico y que corresponde al pico con un tiempo de retención de 3.57 min obtenido durante la cromatografía de gases de la fracción volátil liberada por la hidrólisis alcalina de la tricolorina A (Fig. 21). El espectro superior (A) corresponde al generado por la secuencia instrumental CG-EM a partir de la muestra problema. El espectro inferior (B) corresponde al generado por una muestra estándar.

La identificación y la cuantificación de los carbohidratos individuales presentes en las mezclas de hidrólisis ácida de la tricolorina A y del ácido tricolórico se realizó mediante el análisis de sus derivados sililados (TMS-éteres) por CG (Kakehi y Honda, 1989) de acuerdo con los procedimientos descritos en la parte experimental (Sección 3.9.4.2). La figura 23 muestra el cromatograma obtenido durante la separación de los TMS-derivados de la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A. El análisis de la mezcla de carbohidratos del ácido tricolórico proporcionó un cromatograma idéntico al obtenido para la tricolorina A, tanto en el número de sus componentes como en los correspondientes tiempos de retención (Rt).

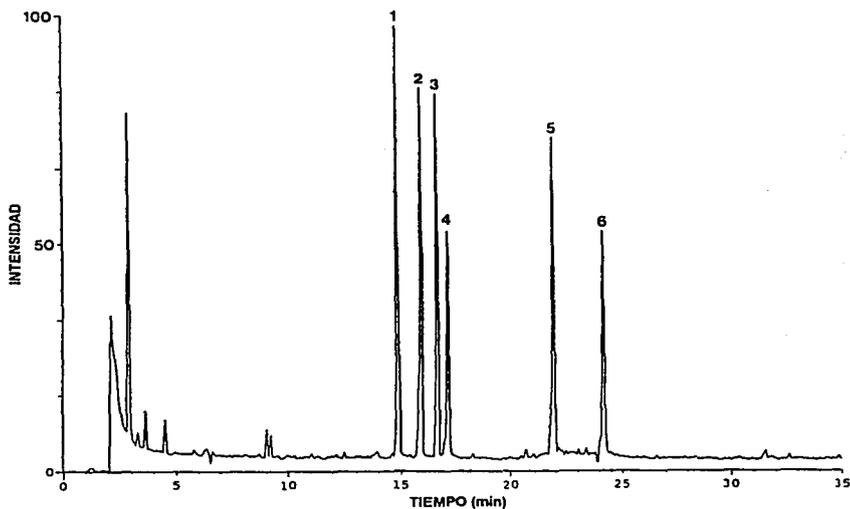


Figura 23. Separación de los derivados sililados (TMS-éteres) de los monosacáridos presentes en la mezcla de hidrólisis ácida de la tricolorina A mediante cromatografía de gases. Asignación de los picos: 1, α -ramnosa; 2, α -fucosa; 3, β -ramnosa; 4, β -fucosa; 5, α -glucosa; 6, β -glucosa. Condiciones cromatográficas: columna capilar, DB-1 (30 m, 0.25 mm D.I., 0.25 μ m); temperatura de la columna, 120 \rightarrow 280 $^{\circ}$ C a 4 $^{\circ}$ C/min; gas acarreador, helio (30 cm/sec; 2 ml/min); tamaño de la muestra, 0.015 mg/ μ l.

Con el objeto de identificar a cada uno de los constituyentes individuales de esta mezcla, se realizaron experimentos de coelución con muestras estándares sililadas. La figura 24 ilustra el cromatograma obtenido de la coelución de la mezcla de monosacáridos con el estándar de glucosa. En este experimento se observó un incremento en la intensidad del pico con el Rt de 24.07 min y no se presentó ninguna alteración en el número de picos que originalmente constituían el cromatograma de la mezcla. La coelución de la fucosa y la mezcla de hidrólisis provocó la exaltación del pico con el Rt de 16.07 min y, de nueva cuenta, no se observó ninguna alteración en la complejidad del cromatograma (Fig. 25).

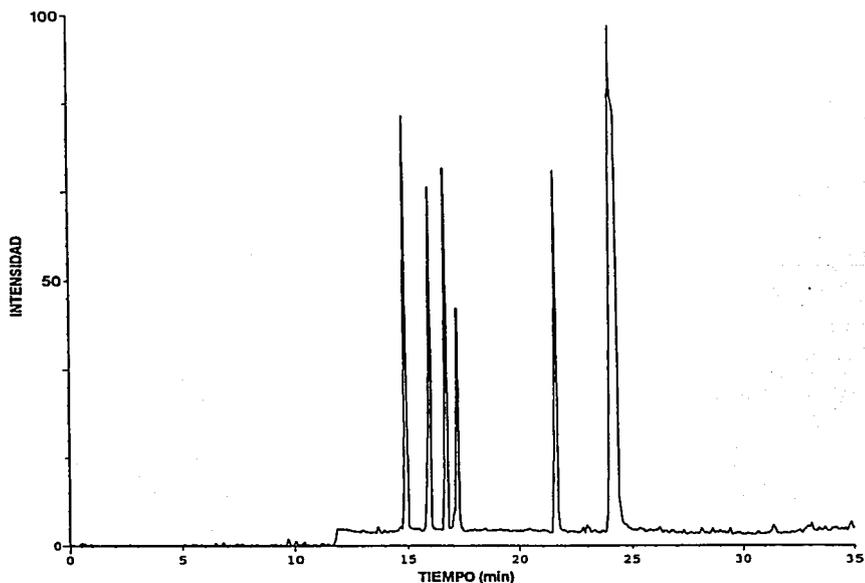


Figura 24. Cromatograma de gases resultado de la coelución de los monosacáridos (TMS-éteres) presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A con el estándar de glucosa (TMS-éter). La identificación de los picos y las condiciones instrumentales son idénticas a las descritas en la Figura 23.

La identificación de la ramnosa se realizó en un experimento similar, el cual permitió detectar a este monosacárido en la mezcla de hidrólisis a través de la coelución con la muestra estándar con un R_t de 14.83 min (Fig. 26). Por último, el experimento de coelución con la quinovosa verificó la ausencia de este carbohidrato como un constituyente de la porción oligosacárida de la tricolorina A. El cromatograma generado en esta ocasión presentó un pico adicional, a los seis originales de la mezcla, con un R_t de 17.69 min.

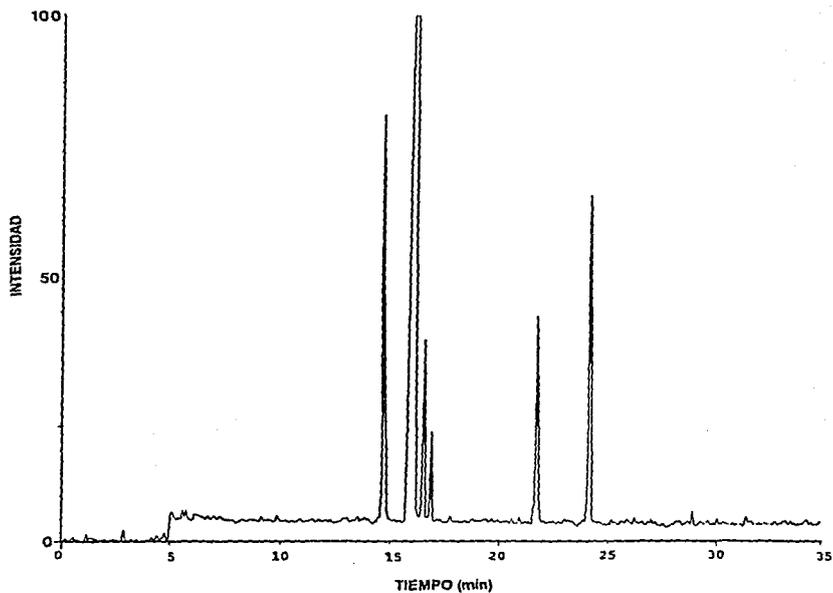


Figura 25. Cromatograma de gases resultado de la coelución de los monosacáridos (TMS-éters) presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A con el estándar de fucosa (TMS-éter). La identificación de los picos y las condiciones instrumentales son idénticas a las descritas en la Figura 23.

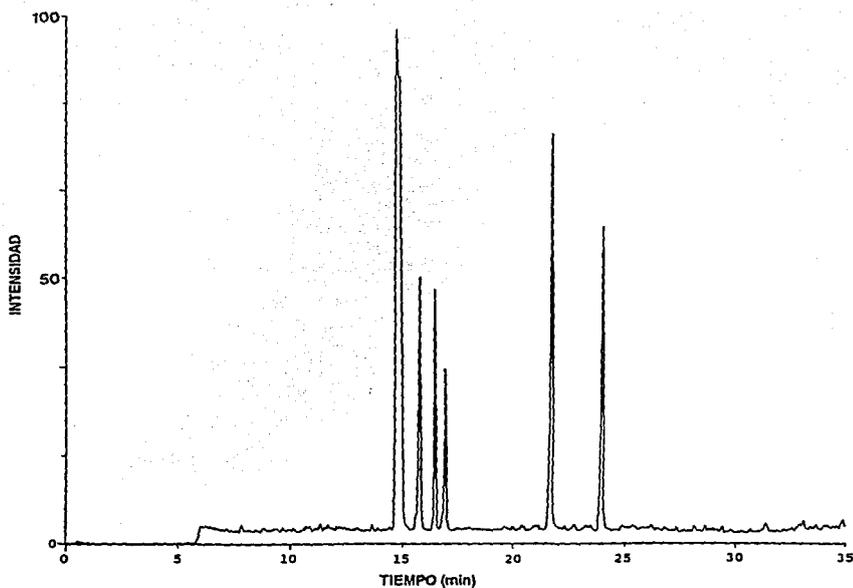


Figura 26. Cromatograma de gases resultado de la coelución de los monosacáridos (TMS-éteres) presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A con el estándar de ramnosa (TMS-éter). La identificación de los picos y las condiciones instrumentales son idénticas a las descritas en la Figura 23.

Las condiciones experimentales utilizadas para la hidrólisis de la tricolorina A favorecieron la anomerización de los monosacáridos presentes en la mezcla de reacción, dado que las aldosas existen en un equilibrio dinámico entre las formas acíclica y las piranosas epiméricas en solución acuosa (Pigman, 1957). Por esta razón, en los cromatogramas de gases se observó una duplicación de los picos para cada uno de los carbohidratos presentes en la mezcla de hidrólisis, los cuales corresponden a las formas isoméricas α y β de la piranosa en cuestión (Fig. 23). De tal suerte que la asignación

individual de las formas anoméricas para los derivados sililados de cada uno de los monosacáridos presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A necesitó de la preparación de estos dos isómeros a partir de las muestras estándares.

El tratamiento prolongado de la α -L-ramnosa con el agente sililante (70 °C; 30-45 min), previa equilibración de la solución de este carbohidrato en piridina (0.5 ml) durante 120 min (cf. Parte Experimental: sección 3.9.4.2.2), produjo tres productos volátiles mayoritarios (Kakehi y Honda, 1989), los cuales corresponden a los derivados sililados en la forma acíclica (Rt 12.08 min) y a las dos piranosas anoméricas (Rt 14.88 min [α -piranosa] y 16.59 min [β -piranosa]). La sililación directa de la α -D-fucosa bajo las condiciones de reacción antes descritas permitió la identificación de tres derivados, los cuales representaron a las formas isoméricas cíclicas de la α -piranosa (Rt 15.99 min) y de la β -piranosa (Rt 16.67 min) y al derivado acíclico (Rt 13.44 min). Los tres derivados sililados para la muestra estándar de la β -D-glucosa se detectaron con los Rt de 20.39 (forma acíclica), 21.67 (α -piranosa) y 23.11 min (β -piranosa).

Con el objetivo de cuantificar la proporción relativa de cada una de las piranosas presentes en la mezcla de hidrólisis de la tricolorina A, se decidió proceder con la derivatización del grupo aldehído para evitar la posibilidad de anomerización y, por lo tanto, conseguir la simplificación del cromatograma de gases. La mercaptalación de las aldosas con una mezcla de etanotiol y ácido trifluoroacético, seguido del procedimiento de sililación con TMCS-HMDS, proporcionó de manera cuantitativa los dietilditioacetales derivados de las aldosas trimetilsililadas (Kakehi y Honda, 1989). La figura 27 muestra el cromatograma de gases generado por la mezcla de hidrólisis después del procedimiento de mercaptalación-sililación. Este análisis permitió la identificación y la cuantificación de los picos correspondientes a la ramnosa (Rt 14.97 min), constituyente presente en la proporción relativa de un 50 %, la fucosa (Rt 16.67 min), carbohidrato que representó un cuarto de la mezcla total, y la glucosa (Rt 21.87 min) que constituía el 25 % restante.

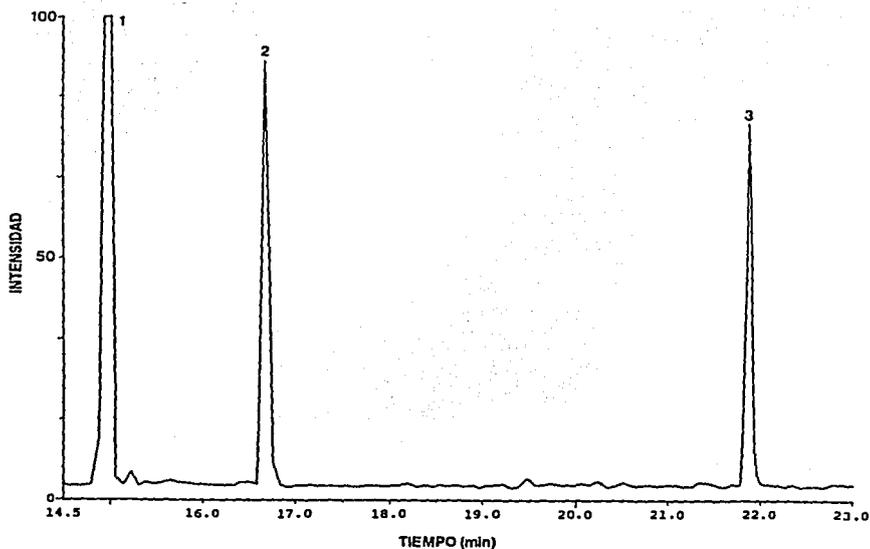


Figura 27. Separación de los dietilditioacetales derivados de las aldosas trimetilsililadas presentes en la mezcla de hidrólisis ácida de la tricolorina A mediante cromatografía de gases. Asignación de los picos: 1, ramnosa; 2, fucosa; 3, glucosa. Condiciones cromatográficas: columna capilar, DB-1 (30 m, 0.25 mm D.I., 0.25 μ m); temperatura de la columna, 120 \rightarrow 280 $^{\circ}$ C a 4 $^{\circ}$ C/min; gas acarreador, helio (30 cm/sec; 2 ml/min); tamaño de la muestra, 0.05 mg/ μ l.

El espectro de masas FAB-negativo del ácido tricolorico (Fig. 28) confirmó que su estructura correspondía a un tetrasacárido lineal del ácido jalapinólico constituido por una mol de una hexosa y tres moles de metilpentosas (Dell, 1987), mediante el ión cuasimolecular $\{M - H\}^-$ de m/z 871 y los fragmentos de m/z 725 $\{M - H - 146$ (unidad de metilpentosa) $\}^-$, 579 $\{725 - 146$ (unidad de metilpentosa) $\}^-$, 417 $\{579 - 162$ (unidad de hexosa) $\}^-$ y 271 $\{417 - 146$ (unidad de metilpentosa); ácido jalapinólico -H $\}^-$.

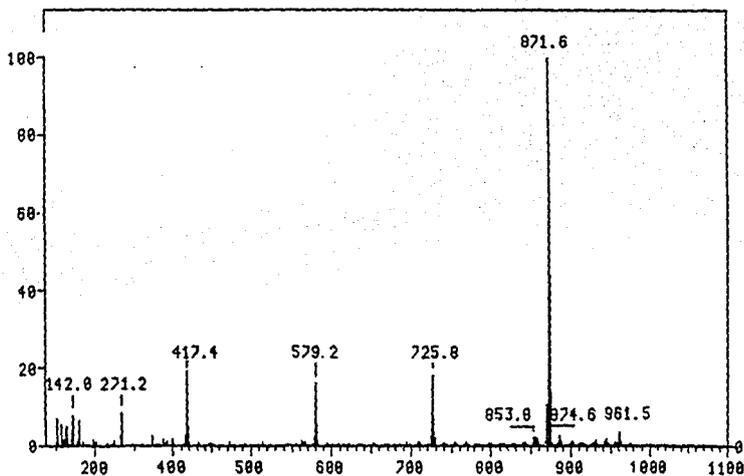


Figura 28. Espectro de masas FAB-negativo del ácido tricolórico.

En el espectro de masa FAB-negativo de la tricolorina A (Fig. 29), además de los picos correspondientes a los fragmentos de m/z 271 y 471 presentes también en el ácido tricolórico, se observó un fragmento de m/z 561 en lugar del pico de m/z 579 detectado en su derivado de hidrólisis alcalina (Fig. 28). La diferencia observada de 18 unidades de masa ($-H_2O$) indicó que el grupo carboxilo de la aglicona en el ácido tricolórico se encontraba esterificando a uno de los grupos hidroxilos de la unidad de hexosa para establecer un éster macrocíclico en la tricolorina A. Esta propuesta se fundamentó, de manera alternativa, por la intensa absorción en 1740 cm^{-1} detectada en el espectro de infrarrojo del producto natural y, especialmente, por las dos señales múltiples generadas en el espectro de RMN- ^1H de la tricolorina A por los protones no equivalentes del grupo metileno en C-2 de la aglicona, las cuales se observaron centradas en δ 2.48 y 3.02 (ver Cuadro 6). Esta señales se colapsaron y generaron un triplete centrado en δ 2.52 ($J = 7$

Hz) en el espectro del ácido tricolórico (ver Cuadro 7), debido a su equivalencia magnética en este derivado acíclico. Estas evidencias espectroscópicas indicaron que la estructura general del constituyente bioactivo de *Ipomoea tricolor*, la tricolorina A, correspondía a una resina glicosídica similar a las previamente aisladas a partir de otras especies de este género (Noda *et al.*, 1990; Ono *et al.*, 1991; *inter alia*).

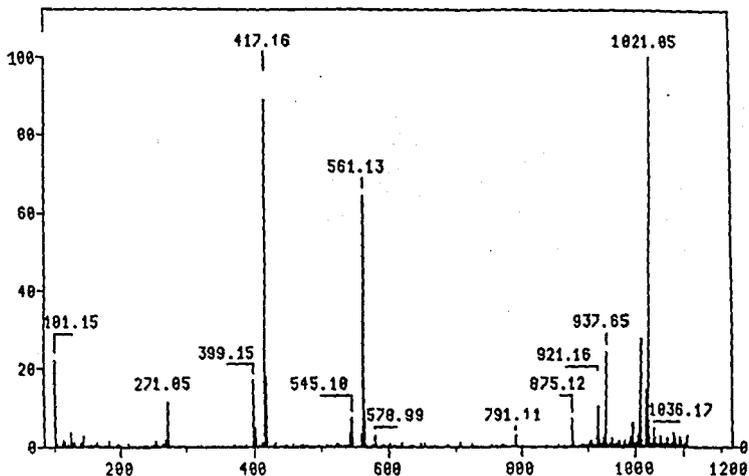


Figura 29. Espectro de masas FAB-negativo de la tricolorina A.

La comparación de los espectros de masa (FAB-negativo) de la tricolorina A (Fig. 29) y su derivado de saponificación, el ácido tricolórico (Fig. 28), también permitió establecer que dos residuos del ácido 2S-metilbutírico se encontraban esterificando la tercera unidad de carbohidrato presente en el núcleo oligosacárido mediante el fragmento de m/z 875 $\{M - H - 146$ (unidad de metil pentosa) $\}$ detectado en el producto natural. Las señales para estos residuos se identificaron fácilmente en el espectro de RMN- 1H (Cuadro 7) mediante la resonancia para el grupo metino de la posición C-2 de estos

ésteres, el cual apareció en forma de un sexteto centrado en δ 2.39 y 2.33 para cada una de las unidades.

Las resonancias de los protones anoméricos de las dos unidades de ramnosa se observaron en forma de señales dobles ($J = 1$ Hz) centradas en δ 5.58 (Ram-1) y 5.54 (Ram'-1) en el espectro de RMN- ^1H (Fig. 30A). De la misma manera, el hidrógeno anomérico de la fucosa se asignó a la señal doble centrada en δ 4.68 ($J = 7.8$ Hz). La señal para la resonancia del protón anomérico de la glucosa se asignó al doblete centrado en δ 5.81 ($J = 7.2$ Hz), el cual se encontraba colapsado con el multiplete que integró para tres protones ubicado en el intervalo de δ 5.79-5.88. Por lo tanto, las dos señales adicionales con este desplazamiento paramagnético deberían corresponder a los protones geminales a dos de las tres funciones acilantes detectadas en la tricolorina A y, así, el triplete centrado en 5.74 ($J = 9.9$ Hz) representaría la señal para el tercer protón base a una de las funciones acilo.

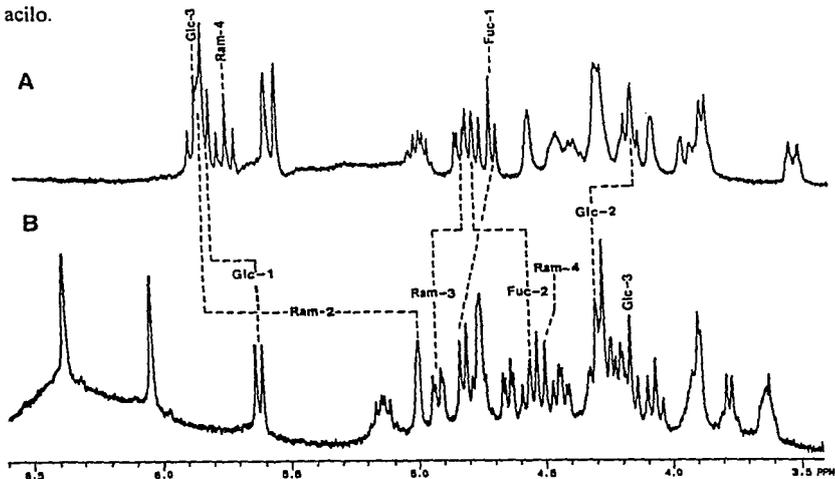


Figura 30. Espectro de RMN- ^1H (300 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) de la región de campo bajo (δ 3.5-6.5) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido de la tricolorina A (figura superior, A) y del ácido tricolórico (figura inferior, B).

Cuadro 7. Desplazamientos químicos en la RMN-¹H de la tricolorina A (1) y del ácido tricolórico (2)^a.

Unidad	Compuesto	
	1	2
Fucosa-1	4.68 d (7.8)	4.85 d (7.4)
2	4.78 dd (7.8, 8.0)	4.59 dd (7.4, 9.0)
3	4.26-4.28 m ^b	4.45 dd (3.4, 9.0)
4	4.06 d (3.2)	3.92 d (3.4)
5	3.84-3.86 m ^c	3.80 c (6.5)
6	1.60 d (6.0)	1.48 d (6.5)
Glucosa-1	5.81 d (7.2)	5.65 d (7.6)
2	4.15 dd (7.2, 8.0) ^d	4.30 dd (7.6, 9.0)
3	5.85 ^e	4.19 dd (9.0) ^g
4	4.38 dd (9.3) ^g	4.09 dd (9.0) ^g
5	3.50 dt (1.9, 9.3)	3.66 ddd (2.7, 5.0, 9.0)
6	3.93 dd (1.9, 11.0)	4.23 dd (5.0, 12.0)
	4.16 ^d	4.33 dd (2.7, 12.0)
Ramnosa-1	5.58 d (1.1)	6.41 d (1.3)
2	5.85 ^e	5.03 dd (1.3, 2.9)
3	4.81 dd (3.0, 9.9)	4.94 dd (2.9, 9.4)
4	5.74 dd (9.9) ^g	4.52 dd (9.4) ^g
5	4.98 dc (6.0, 9.9)	5.16 dc (6.0, 9.4)
6	1.68 d (6.0)	1.85 d (6.0)
Ramnosa'-1	5.54 d (1.0)	6.07 d (1.0)
2	4.55 dd (1.0, 3.0)	4.78 ^b
3	4.44 dd (3.0, 10.0)	4.67 dd (3.4, 9.2)
4	4.26-4.28 m ^b	4.29 dd (9.2) ^g
5	4.26-4.28 m ^b	4.78 ^b
6	1.72 d (6.0)	1.55 d (6.2)
Aglicona -2	2.48 ddd (3.0, 10.0, 16.0)	2.52 t (7.0)
	3.02 ddd (3.0, 8.0, 16.0)	
11	3.84-3.86 m ^c	3.94 m
16	0.87 t (7.0)	0.84 t (7.0)
amb-2	2.25-2.45 m ^f	-
2-Me	1.22 d (7.0)	-
3-Me	0.95 t (7.0)	-
amb'-2	2.25-2.45 m ^f	-
2-Me	1.15 d (7.0)	-
3-Me	0.85 t (7.0)	-

^a300 MHz, C₂D₅N, TMS. Constantes de acoplamiento (Hz) en paréntesis.

^{b-h}Señales sobrepuestas.

^cTriplete aproximado.

El espectro de RMN-¹H del ácido tricolórico (Cuadro 7) permitió identificar las señales anoméricas de la unidad tetrasacárida: el doblete para el protón anomérico de la unidad de glucosa en δ 5.66 ($J = 7.4$ Hz), la señal doble centrada en δ 4.85 para el protón anomérico de la fucosa y las señales anoméricas de las dos unidades de ramnosa en δ 6.41 y 6.07 en forma de singuletes anchos (Fig. 30B).

El espectro de RMN-¹H del núcleo oligosacárido de la tricolorina A (Cuadro 7) se asignó mediante el empleo de las correlaciones bidimensionales homonucleares ¹H-¹H. Para tal efecto, se registraron los espectros de RMN-2D utilizando las secuencias de pulsos DQF-COSY (Fig. 31), "Double-Quantum-Filtered COSY" (Bax *et al.*, 1986) y HOHAHA (Fig. 32), "Homonuclear Hartmann-Hahn" (Davis y Bax, 1985).

La figura 33 ilustra los cuadros de conectividad establecidos por las resonancias del núcleo de ramnosa interno. El protón anomérico de esta unidad sacárida (δ 5.58) presentó una interacción ($J = 1.1$ Hz) con la señal múltiple centrada en δ 5.85 y, por lo tanto, permitió asignar la resonancia para la señal H-2. El desplazamiento químico de esta señal indicó la esterificación de esta posición por una de las dos unidades del ácido metilbutírico. Esta resonancia a su vez correlacionó con el doblete de dobletes centrado en δ 4.81 ($J = 3.0, 9.9$ Hz) y que correspondía a la resonancia de la posición H-3, el cual establecía una interacción adicional con el triplete centrado en δ 5.74 ($J = 9.9$ Hz). El desplazamiento paramagnético de esta última señal confirmó la segunda posición de esterificación para el residuo adicional del ácido metilbutírico. El cuadro de conectividad adicional que estableció H-4 permitió asignar la señal para H-5 en δ 4.98. Esta última señal en forma de un doblete de cuartetos ($J = 6.0, 9.9$ Hz) debido a la interacción con el metilo de la posición C-6 (δ 1.68) de esta metilpentosa (Fig. 31).

El protón anomérico de la glucosa (δ 5.81) estableció un cuadro de conectividad con el doblete de dobletes en δ 4.15 ($J = 7.2, 8.0$ Hz), el cual interaccionó de nueva cuenta con las señales colapsadas en δ 5.79-5.88. Así, se logró la asignación de las resonancias para los protones H-2 y H-3 (δ 5.85) de la glucosa.

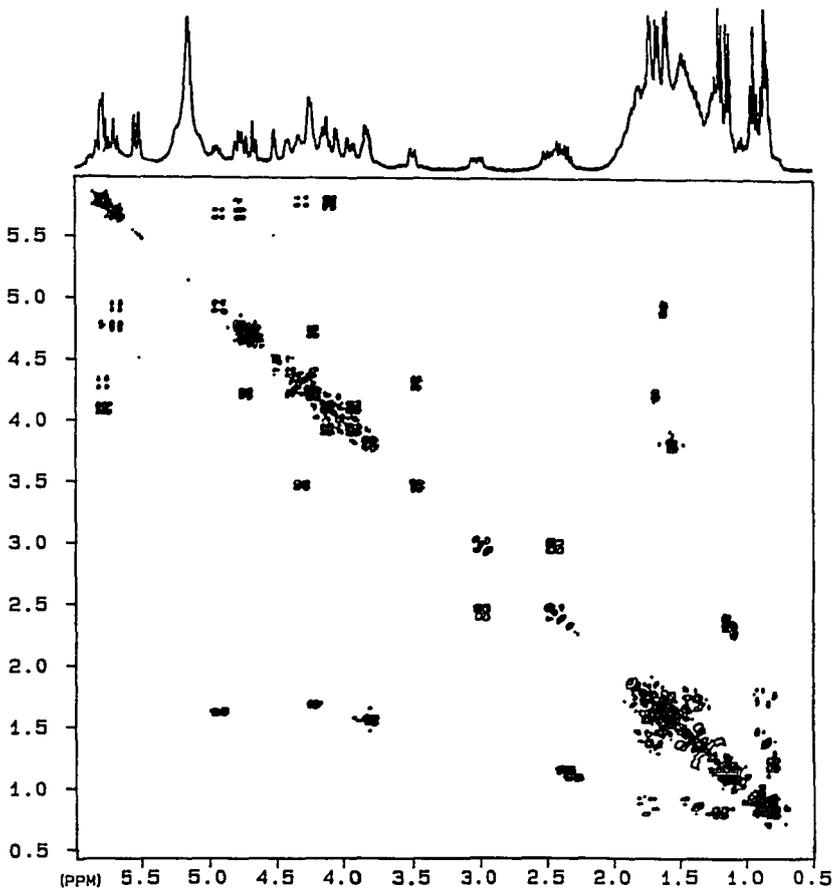


Figura 31. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear con filtro de doble coherencia cuántica (DQF-COSY) del acetónido derivado de la tricolorina A. El espectro se registró a una temperatura de 25 °C con 70 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 . Se utilizó una frecuencia de 360 MHz con una amplitud espectral de 5319.15 Hz y 512 incrementos con 16 oscilaciones transitorias por cada valor de t_1 . A lo largo del eje superior se muestra la resonancia convencional (1D).

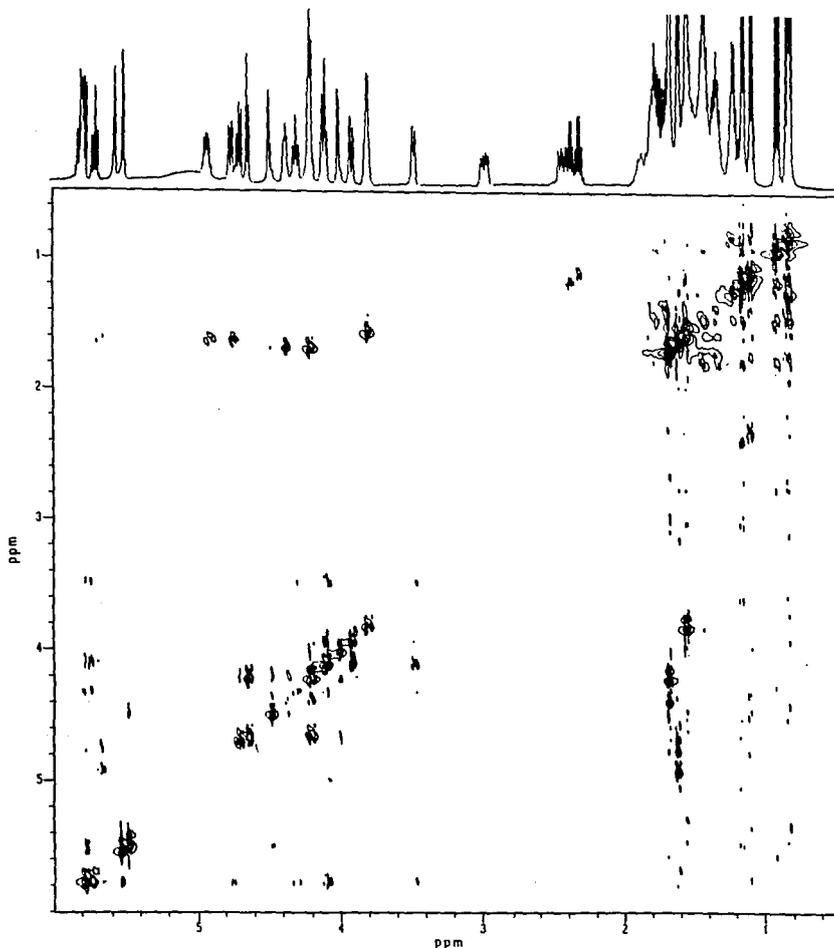


Figura 32. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear HOHAHA de la tricolorina A. El espectro se registró a una temperatura de 25 °C con 70 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 . Se utilizó una frecuencia de 500.12 MHz, con una amplitud en la ventana espectral de 4000.0 Hz y 512 incrementos con 32 oscilaciones transitorias por cada valor de t_1 . A lo largo del eje superior se muestra la resonancia convencional (1D).

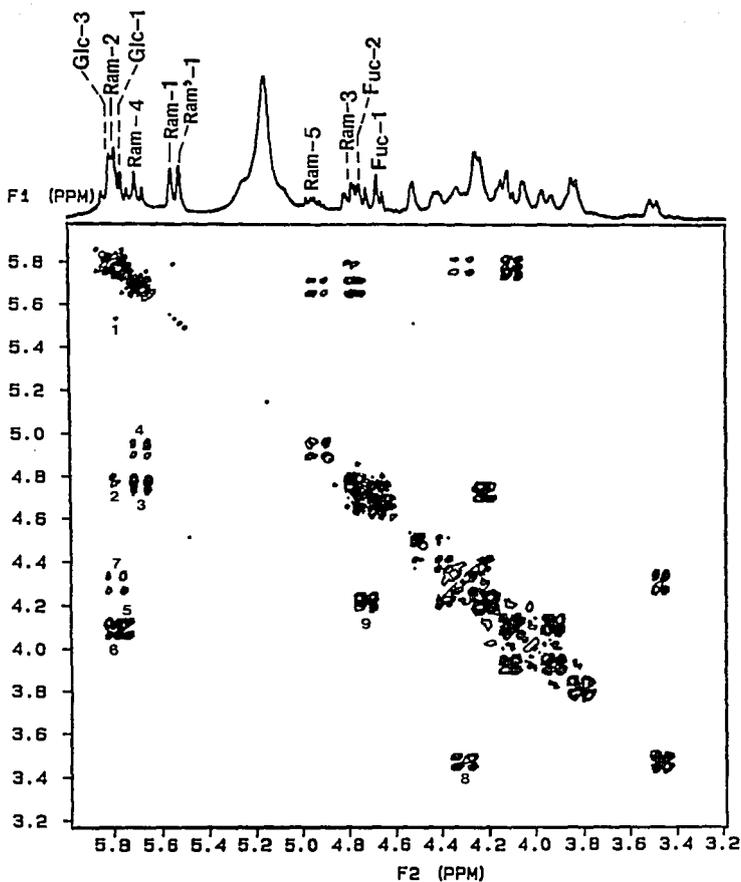


Figura 33. Ampliación del espectro de RMN bidimensional homonuclear DQF-COSY de la región de campo bajo (δ 3.2-5.9) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido de la tricolorina A. Las condiciones instrumentales para el registro del espectro se describen en la Figura 30. Principales correlaciones ^1H - ^1H (3J): 1, Ram H₁-H₂; 2, Ram H₂-H₃; 3, Ram H₃-H₄; 4, Ram H₄-H₅; 5, Glc H₁-H₂; 6, Glc H₂-H₃; 7, Glc H₃-H₄; 8, Glc H₄-H₅; 9, Fuc H₂-H₃.

El desplazamiento paramagnético observado para H-3 de esta aldohexosa confirmó la posición de lactonización para el establecimiento del éster macrocíclico con el grupo carboxilo de la aglicona. La interacción adicional observada para H-3 con el doblete de dobletes centrado en δ 4.38 ($J = 9.3$ Hz) permitió asignar la resonancia para la posición H-4 de la glucosa. Esta última, al mismo tiempo, establecía un cuadro de conectividad con el doblete de tripletes centrado en δ 3.50 ($J = 1.9, 9.3$ Hz), el cual se asignó a la señal para H-5 de la hexosa.

La figura 33 también muestra los cuadros de conectividad establecidos por las resonancias de las dos metilpentosas restantes. Para la resonancia del protón anomérico de la fucosa (δ 4.68) se observó una clara interacción con el doblete de dobletes centrado en δ 4.78 (H-2; $J = 7.8, 8.0$ Hz), el cual estableció un segundo cuadro de conectividad con la señal múltiple centrada en δ 4.26-4.28 (3H) y, de esta manera, se asignó el desplazamiento químico para la resonancia H-3. Las conectividades observadas para las resonancias centradas en δ 5.54 (H-1'), 4.55 (H-2') y 4.44 (H-3') permitieron identificar las señales para la segunda unidad de ramnosa presente en el núcleo tetrasacárido de la tricolorina A. La figura 34 ilustra el espectro de RMN- ^1H (500 MHz) de la tricolorina A en la región comprendida entre δ 4.60-5.90, el cual mostró una buena resolución para las señales del protón anomérico de la glucosa (δ 5.77), del hidrógeno H-2 de la unidad interna de ramnosa (δ 5.81) y del hidrógeno H-3 (δ 5.84) en la hexosa.

Las resonancias para los hidrógenos de las posiciones H-5 de la fucosa y de la segunda unidad de ramnosa se identificaron mediante las conectividades observadas con los grupos metilo que sustituyen el núcleo C-5 de estas pentosas (Fig. 31). Por último, la señal doble centrada en δ 4.06 ($J = 3.2$ Hz) se asignó a la resonancia para el hidrógeno H-4 de la fucosa ya que la multiplicidad que debería observarse para el protón equivalente en el núcleo de la ramnosa restante correspondería a un doblete de dobletes con una constante de acoplamiento de aproximadamente 9-10 Hz (Noda *et al.*, 1987). Por lo tanto, esta última se encontraba colapsada en el multiplete centrado en δ 4.26-4.28.

Las asignaciones para la resonancia protónica del derivado de saponificación de la tricolorina A, el ácido tricolórico (Cuadro 7), se realizaron mediante el empleo de la correlación homonuclear bidimensional. La figura 35 presenta la región de campo bajo del espectro comprendida entre δ 3.5-5.3 que resultó del empleo de la secuencia de pulsos DQ-COSY e ilustra las principales conectividades para las resonancias del núcleo tetrasacárido de este producto. Los efectos diamagnéticos observados en la RMN- ^1H para las señales de Glu-3 ($\Delta\delta$ -1.66), Ram-2 ($\Delta\delta$ -0.82) y Ram-4 ($\Delta\delta$ -1.22) del ácido tricolórico, cuando se compararon con las correspondientes señales de la tricolorina A (Fig. 30), verificaron las posiciones de la acilación en el núcleo tetrasacárido. Los valores de los desplazamientos químicos de la RMN- ^{13}C para la tricolorina A y el ácido tricolórico (Cuadro 8) se asignaron mediante el empleo de las correlaciones heteronucleares ^1H - ^{13}C (Edwards y Bax, 1986). Los espectros HETCOR generados por el producto natural y su derivado de saponificación se muestran en las figuras 36 y 37, respectivamente. La RMN- ^{13}C del ácido tricolórico evidenció los efectos paramagnéticos provocados por la glicosilación de los núcleos C-2 de la fucosa ($\Delta\delta$ 6.3), C-2 de la glucosa ($\Delta\delta$ 3.6) y C-3 de la ramnosa interna ($\Delta\delta$ 8.0), al compararlos con los desplazamientos químicos de sus correspondientes metilpiranosidos (Bock *et al.*, 1984; Seo *et al.*, 1978).

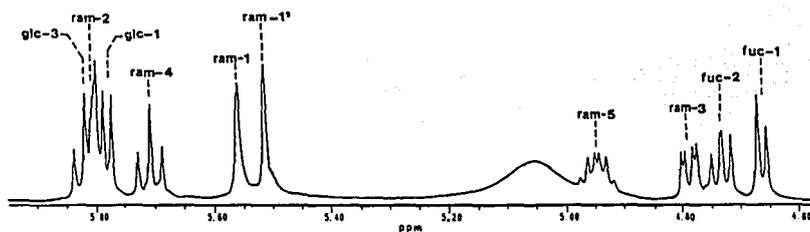


Figura 34. Espectro de RMN- ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS) de la región de campo bajo (δ 4.60-5.85) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido de la tricolorina A [glc = glucosa; ram = ramnosa; fuc = fucosa].

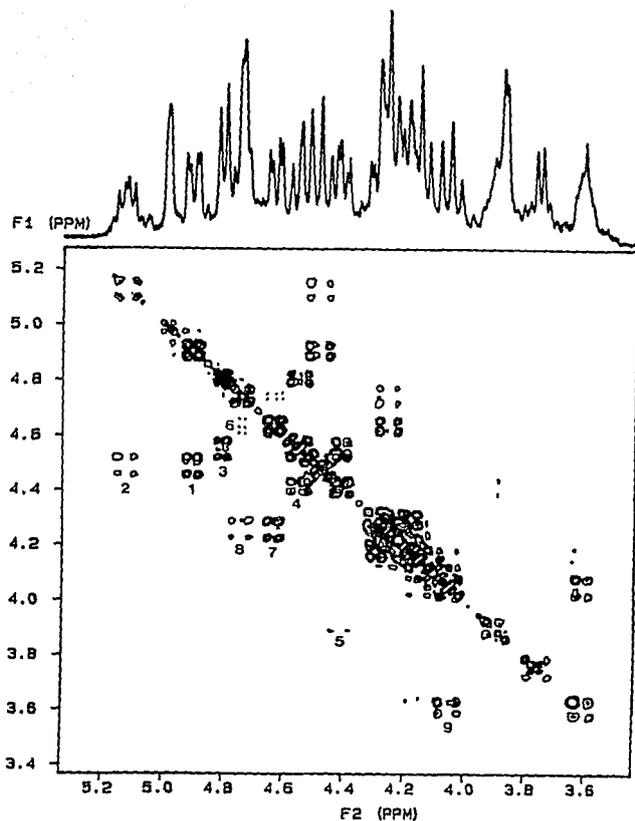


Figura 35. Ampliación del espectro de RMN bidimensional homonuclear DQF-COSY de la región de campo bajo (δ 3.5-5.3) correspondiente a las señales del núcleo oligosacárido del ácido tricloroacético. El espectro se registró a una temperatura de 25 °C con 80 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 . Se utilizó una frecuencia de 299.944 MHz, con una amplitud en la ventana espectral de 3148.6 Hz y 256 incrementos con 16 oscilaciones transitorias por cada valor de t_1 . Principales correlaciones ^1H - ^1H (3J): 1, Ram H_3 - H_4 ; 2, Ram H_4 - H_5 ; 3, Fuc H_1 - H_2 ; 4, Fuc H_2 - H_3 ; 5, Fuc H_3 - H_4 ; 6, Ram' H_2 - H_3 ; 7 Ram' H_3 - H_4 ; 8, Ram H_4 - H_5 ; 9, Glc H_4 - H_5 .

Cuadro 8. Desplazamientos químicos en la RMN-¹³C (75.4 MHz, C₂D₃N, TMS) de la tricolorina A (1) y del ácido tricolórico (2).

Unidad	Compuesto				
	1	2	β-D-Fuc	β-D-Glc	α-L-Ram
Fuc-1	103.09	102.71	105.9		
2	74.62	78.32	72.0		
3	76.16	76.00	75.2		
4	73.12	72.82	72.6		
5	71.24	70.91	71.3		
6	17.24	17.18	17.2		
Glc-1	99.76	102.35		105.4	
2	80.60	78.38		74.8	
3	78.96	79.10		78.1	
4	69.62	72.59		71.4	
5	76.25	76.94		78.1	
6	61.31	63.13		62.5	
Ram-1	98.20	101.93			102.4
2	72.74	71.93			71.9
3	75.84	80.47			72.5
4	73.30	72.96			73.6
5	67.23	69.68			69.4
6	18.25	18.89			18.4
Ram'-1	104.49	104.17			
2	72.25	72.36			
3	72.46	72.66			
4	73.34	74.17			
5	70.44	69.88			
6	18.48	18.50			
Aglicona-1	172.13	176.15			
2	34.36	34.92			
11	81.00	80.55			
16	14.15	14.20			
amb-1	175.55				
2	41.53				
3	27.92				
4	11.76				
2-Me	16.91				
amb'-1	175.42				
2	41.37				
3	27.06				
4	11.76				
2-Me	16.91				

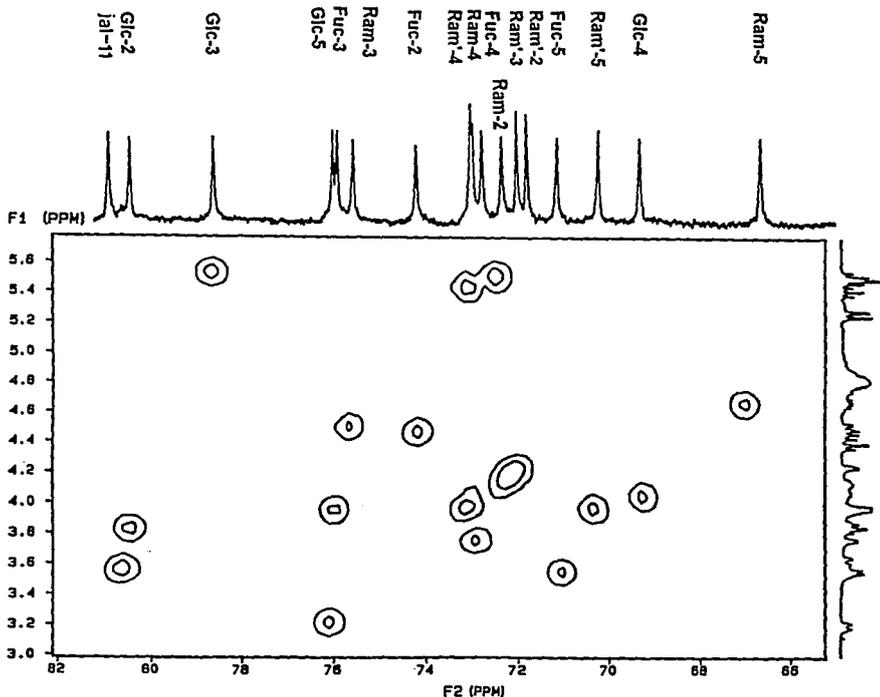


Figura 36. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H (HETCOR) de la porción oligosacárida de la tricolorina A. El espectro se registró a una temperatura de 25°C con 70 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 . Se utilizó una frecuencia de 75.429 MHz para el núcleo de ^{13}C , con una amplitud en la ventana espectral F_1 de 3592.0 Hz (^1H) y de 16501.7 Hz en la dimensión F_2 (^{13}C), con 256 incrementos y 96 repeticiones. Cada experimento utilizó un intervalo de relajación de 3 s y 3.45 ms ($1/2 J_{\text{CH}}$) y con un tiempo de adquisición de 31 ms. El espectro es el resultado de 7 h de acumulación de pulsos. El espectro de ^{13}C mostrado a lo largo del eje horizontal se registró en 18 min.

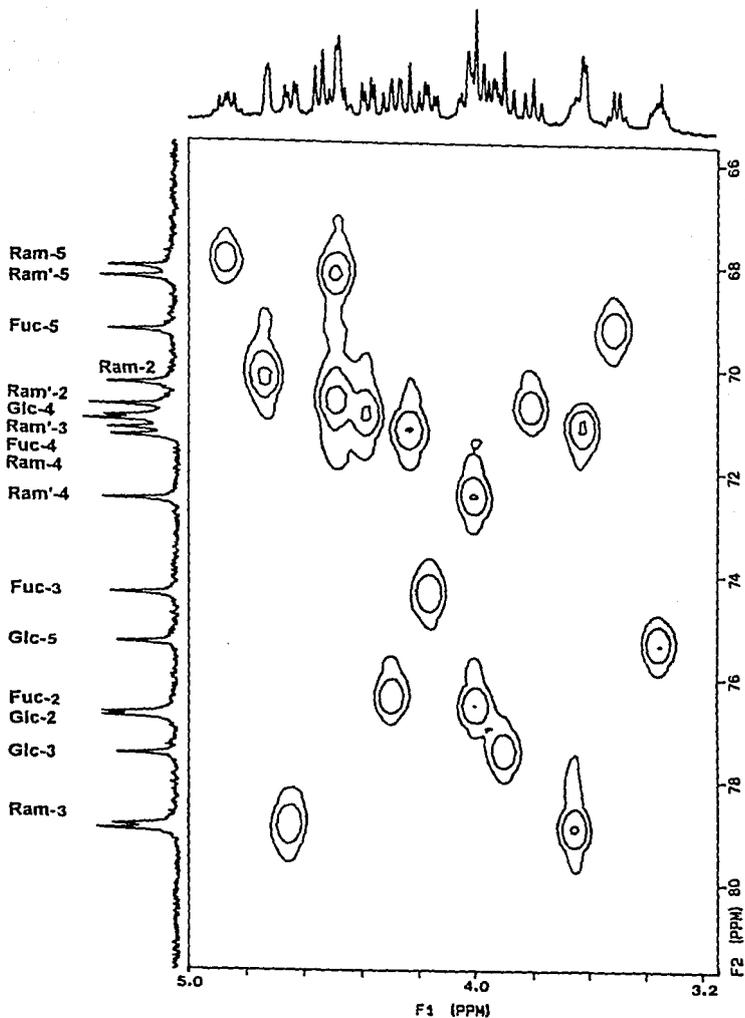


Figura 37. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H (HETCOR) de la porción oligosacárida del ácido tricolórico. Las condiciones instrumentales para el registro del espectro se describen en la Figura 36.

Estas observaciones permitieron ubicar a la fucosa como la primera unidad de aldopentosa del núcleo oligosacárido de la tricolorina A. Al mismo tiempo, los desplazamientos paramagnéticos observados en una de las unidades de ramnosa, permitieron establecer la tercera unidad de carbohidrato presente en el núcleo oligosacárido del producto natural.

Los experimentos de intensificación nuclear selectiva mediante transferencia de polarización, "SINEPT" (Bax, 1984; Cordell y Kinghorn, 1991), realizados en la tricolorina A confirmaron la secuencia de la sustitución en el núcleo tetrasacárido de este producto natural (Fig. 38). De esta manera, la irradiación del protón anomérico H-1 de la fucosa en δ 4.68 ($^3J_{CH} = 6$ Hz) provocó la exaltación selectiva del carbono C-11 (δ 80.76) de la aglicona (Fig. 38B). La irradiación ($^3J_{CH} = 6$ Hz) de la resonancia del hidrógeno H-2 (δ 4.78) de la fucosa produjo una clara intensificación del carbono anomérico C-1 (δ 99.76) de la glucosa (Fig. 38C). Subsecuentemente, la transferencia de magnetización al irradiar el protón anomérico H-1 de la unidad de ramnosa interna en δ 5.58 ($^3J_{CH} = 4$ Hz) resultó en una exaltación del carbono C-2 (δ 80.60) de la glucosa y de los núcleos ubicados a tres ligaduras en esta metilpentosa, es decir, los carbonos C-3 (δ 75.84) y C-5 (δ 67.23) de la ramnosa interna (Fig. 38D). Por último, la irradiación del protón H-3 de la ramnosa interna centrado en δ 4.81 ($^3J_{CH} = 6$ Hz) indujo una transferencia de polarización en el carbono anomérico C-1' (δ 104.49) de la ramnosa terminal (Fig. 38E). Este experimento también provocó la exaltación de las resonancias de los carbonos C-1 (δ 98.20) y C-4 (δ 73.30) de la ramnosa interna, mediante los acoplamientos $^1H-^{13}C$ a tres y dos enlaces, respectivamente.

El espectro de RMN heteronuclear registrado para la tricolorina A mediante la secuencia de pulsos COLOC (Kessler *et al.*, 1984a; 1984b) permitió detectar las conectividades a tres enlaces $^1H-^{13}C$ (Agrawal, 1992) y verificar, de nueva cuenta, la secuencia de glicosilación propuesta para el núcleo oligosacárido de este producto natural.

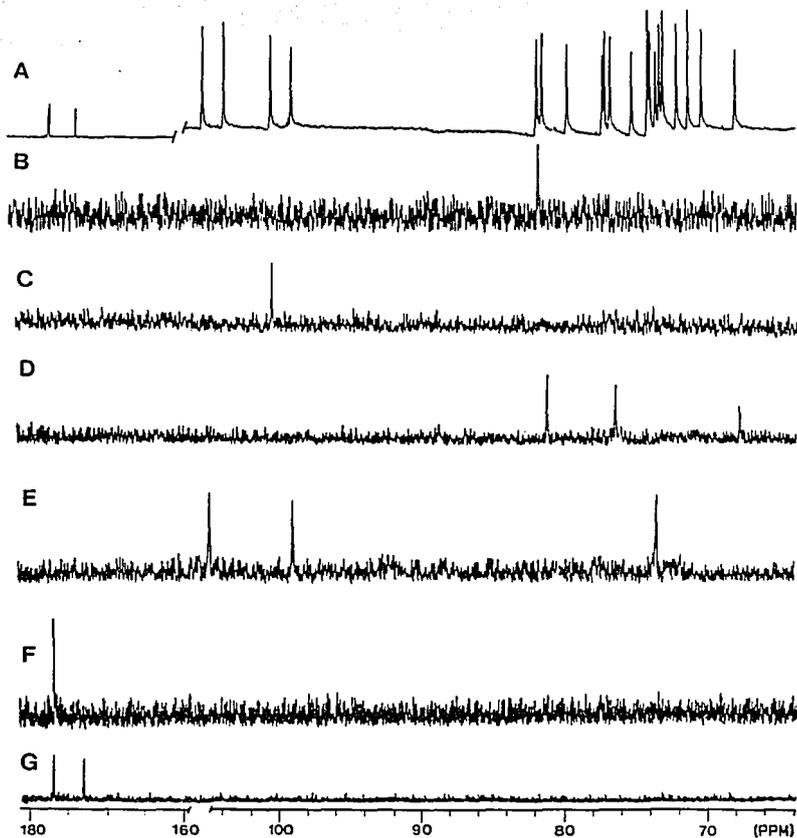
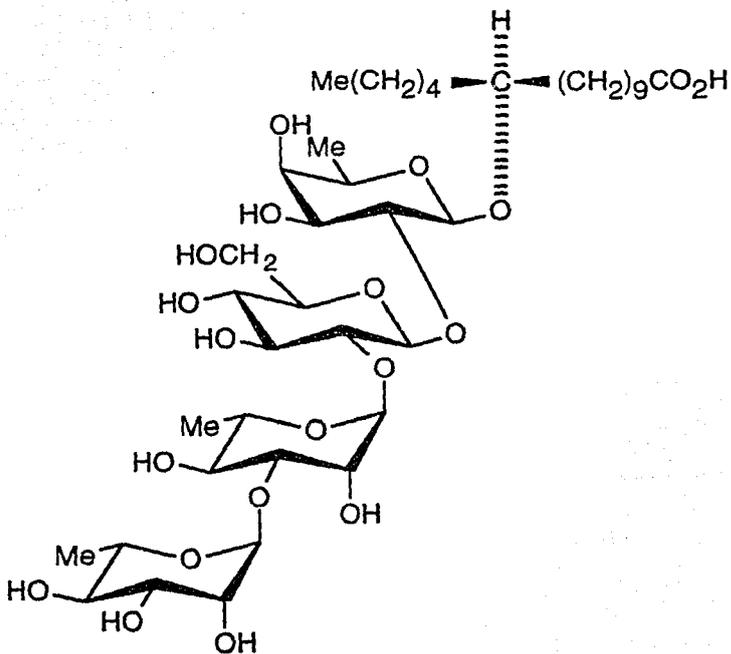


Figura 38. Experimentos de intensificación nuclear selectiva mediante transferencia de polarización ("SINEPT") en la RMN- ^{13}C de la tricolorina A. Espectro totalmente desacoplado (A); (B)-(G) experimentos "SINEPT" obtenidos mediante la irradiación de los protones centrados en δ 4.68 (Fuc H-1), 4.78 (Fuc H-2), 5.58 (Ram H-1), 4.81 (Ram H-3), 5.74 (Ram H-4) y 5.85 (Ram H-2 y Glu H-3), respectivamente. Los espectros se registraron en un aparato Nicolet NT-360 operando a una frecuencia de 90.8 MHz con 100 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 , una amplitud en la ventana espectral de 10,000 Hz y una resolución digital de 0.5 Hz. El tiempo mínimo total de adquisición requerido para cada experimento fue de 5 h.

La figura 39 muestra la expansión del espectro ^1H - ^{13}C COLOC para la unidad tetrasacárida de la tricolorina A y se indican las conectividades a larga distancia observadas para los carbonos anoméricos. Se observaron correlaciones ($^3J_{\text{CH}}$) entre el núcleo C-1 (δ 103.09) de la fucosa con el protón H-11 (δ 3.85) de la aglicona, el carbono anomérico C-1 (δ 99.76) de la glucosa con el protón H-2 (δ 4.78) de la fucosa, el carbono C-1 (δ 98.20) de la ramnosa interna con el protón H-2 (δ 4.15) de la glucosa y el carbono anomérico C-1' (δ 104.49) de la ramnosa terminal con el protón H-3 (δ 4.81) de la ramnosa interna. Por lo tanto, la estructura del ácido tricolórico correspondía al 11- O - α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- O - α -L-ramnopiranosil- (1 \rightarrow 2) - O - β -D-glucopiranosil- (1 \rightarrow 2) - β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico {2}.

La confirmación del sitio de lactonización intramolecular con la aglicona en la posición C-3 de la glucosa y la localización inequívoca de las dos posiciones de esterificación con los residuos del ácido metilbutírico en las posiciones C-2 y C-4 de la ramnosa interna se realizaron mediante los siguientes experimentos "SINEPT". La transferencia de polarización que se produjo en la tricolorina A al irradiar el protón H-4 de la ramnosa interna centrado en δ 5.74 ($^3J_{\text{CH}} = 4$ Hz) provocó la exaltación de la resonancia en δ 175.42 (Fig. 38F), la cual corresponde al grupo carbonilo de uno de los ésteres. Por lo tanto, este resultado permitía concluir que uno de los ácidos esterificaba al grupo hidroxilo geminal a esta posición y corroboró las conclusiones que previamente se emitieron como resultado de los análisis mediante espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear unidimensional homonuclear (RMN- ^1H y ^{13}C). La irradiación del protón H-3 de la glucosa en δ 5.85 ($^3J_{\text{CH}} = 4$ Hz), la cual se encontraba superpuesta con la señal H-2 de la ramnosa en el producto natural, provocó la polarización de los dos grupos carbonilo restantes centrados en δ 175.46 y 172.03 (Fig. 38G). Por lo tanto, se procedió a realizar estos experimentos de RMN con el acetónido preparado a partir de la tricolorina A, designado como el derivado 3.



2

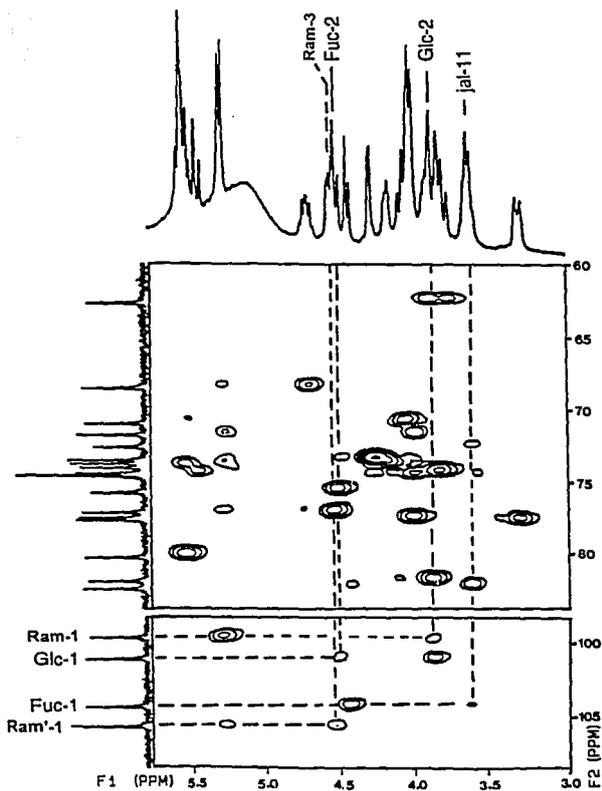


Figura 39. Espectro de RMN bidimensional heteronuclear vía acoplamiento a larga distancia ^1H - ^{13}C (COLOC) de la porción oligosacárida de la tricolorina A. Se utilizó una frecuencia de 75.429 MHz para el núcleo de ^{13}C , con una amplitud en la ventana espectral F_1 de 3275.5 Hz (^1H) y de 14771.1 Hz en la dimensión F_2 (^{13}C), con 256 incrementos y 128 repeticiones. Cada experimento utilizó un intervalo de relajación de 1.5 y 3.4 ms ($1/2 J_{\text{CH}}$) y con un tiempo de adquisición de 50 ms ($1/2 J_{\text{CH}}$). El espectro es el resultado de 10 h de acumulación de pulsos a una temperatura de 25 °C con 70 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 . Se indican las conectividades ($^3J_{\text{CH}}$) para los carbonos anoméricos.

El protón H-3 de la glucosa se observó claramente como un triplete centrado en δ 5.72 en el espectro de RMN- ^1H del acetónido, el cual al irradiarse ($^3J_{\text{CH}} = 6$ Hz) produjo la exaltación de la resonancia en δ 172.07 correspondiente al grupo carbonilo de la aglicona (Fig. 40B). De igual manera, la irradiación individual de los protones H-2 (δ 5.67) y H-4 (δ 5.62) de la unidad de ramnosa interna utilizando un valor de $^3J_{\text{CH}} = 3$ Hz dió como resultado la máxima exaltación de los carbonilos de las dos unidades de ácido metilbutírico, cuyas resonancias correspondieron a las señales centradas en δ 175.65 (Fig. 40C) y 175.84 (Fig. 40D).

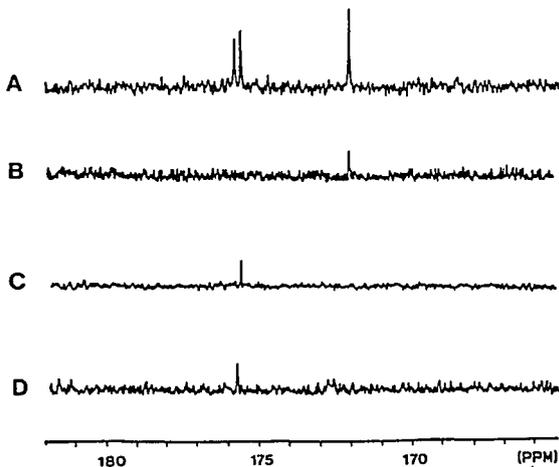
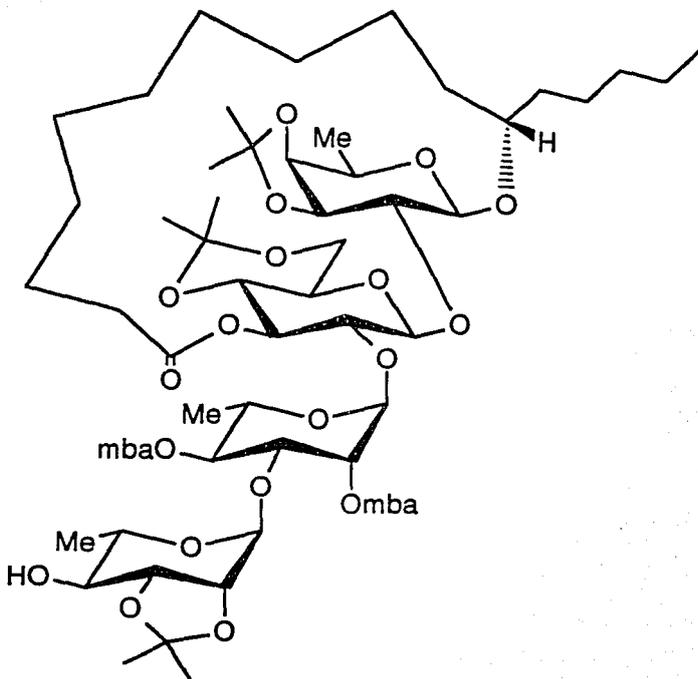


Figura 40. Experimentos de intensificación nuclear selectiva mediante transferencia de polarización ("SINEPT") en la RMN- ^{13}C del acetónido derivado de la tricolorina A. Espectro totalmente desacoplado de la región correspondiente a las absorciones de los grupos carbonilo (A); (B)-(D) experimentos "SINEPT" obtenidos mediante la irradiación de los protones centrados en δ 5.72 (Glu H-3), 5.67 (Ram H-2) y 5.62 (Ram H-4), respectivamente. Las condiciones instrumentales para el registro del espectro se describen en la Figura 38.



3

Cuadro 9. Desplazamientos químicos en la RMN-¹H y ¹³C del núcleo oligosacárido del acetónido (3) derivado de la tricolorina A.

Unidad	¹ H ^a	¹³ C ^b
Fucosa-1	4.55 ^c	102.66
2	4.35 dd (9.0) ⁱ	75.83
3	4.68 m ^d	80.22
4	4.08-4.15 m ^e	77.72
5	3.90 ^f	68.33
6	1.71 d (6.5)	
Glucosa-1	5.51 d (7.8)	98.98
2	4.08-4.15 m ^e	82.63
3	5.72 dd (9.0) ⁱ	74.86
4	4.08-4.15 m ^e	72.82
5	3.55 ddd (3.0, 5.0, 9.0)	66.97
6	3.75 m ^s 3.90 ^f	62.84
Ramnosa-1	5.52 d (1.0)	97.96
2	5.67 dd (1.5, 3.0)	73.12
3	4.68 m ^d	76.75
4	5.62 dd (9.8) ⁱ	73.58
5	4.55 ^c	68.25
6	1.54 d (6.0)	
Ramnosa ^a -1	5.58 d (1.0)	101.49
2	4.40-4.55 m ^h	77.35
3	4.40-4.55 m ^h	80.27
4	3.82 dd (9.8) ⁱ	75.21
5	4.08-4.15 m ^e	69.50
6	1.44 d (6.0)	

^a300 MHz, C₅D₅N, TMS. Constantes de acoplamiento (Hz) en paréntesis. Las asignaciones se realizaron mediante ¹H-¹H DQ-COSY.

^b75.4 MHz, C₅D₅N, TMS. Las asignaciones se realizaron mediante ¹H-¹³C HETCOR.

^{c-h}Señales sobrepuestas.

ⁱTriplete aproximado.

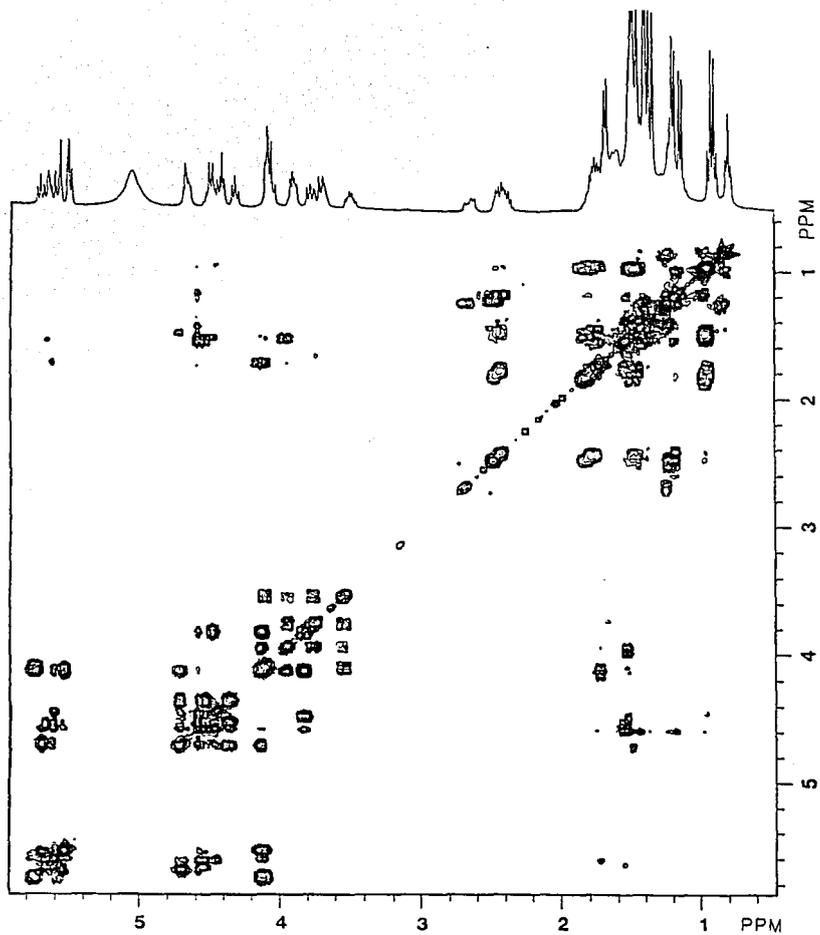


Figura 41. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear con filtro de doble coherencia cuántica (DQF-COSY) del acetónido derivado de la tricolorina A. El espectro se registró a una temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ con 70 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_3 . Se utilizó una frecuencia de 360 MHz con una amplitud espectral de 5319.15 Hz y 512 incrementos con 16 oscilaciones transitorias por cada valor de t_1 . A lo largo del eje superior se muestra la resonancia convencional (1D).

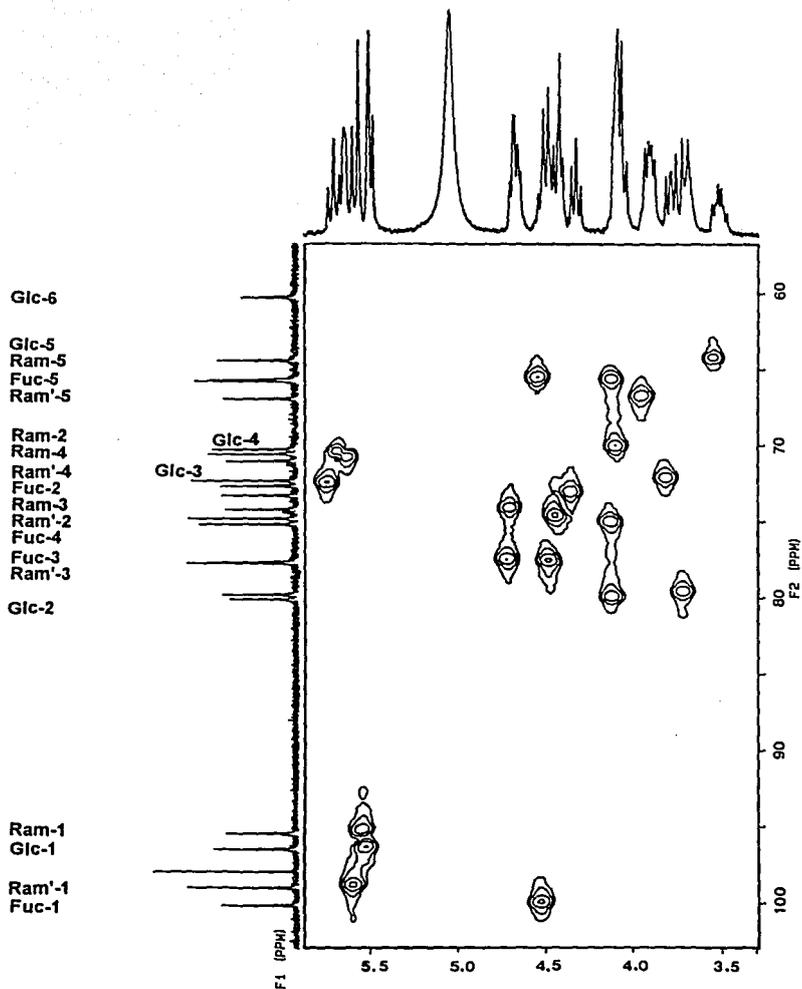


Figura 42. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C (HETCOR) de la porción oligosacárida del acetónido derivado de la tricolorina A. Las condiciones instrumentales para el registro del espectro se describen en la Figura 36.

Las asignaciones inequívocas de la RMN- ^1H y de ^{13}C (Cuadro 9) para el acetónido **3** se realizaron mediante experimentos bidimensionales homonucleares, ^1H - ^1H DQ-COSY y (Fig. 41) heteronucleares ^1H - ^{13}C HETCOR (Fig. 42).

Con el objeto de confirmar la propuesta estructural de la tricolorina A se realizó la acetilación de la tricolorina A para la generación del correspondiente derivado heptacetilado (4). Las señales en la RMN- ^1H y ^{13}C del núcleo oligosacárido del peracetato (Cuadro 10) de la tricolorina A se asignaron, de nueva cuenta, mediante el empleo de la espectroscopía ^1H - ^1H COSY (Fig. 43) y ^1H - ^{13}C HETCOR.

Por último, sólo resta por discutir las evidencias espectroscópicas que permitieron establecer la configuración de los carbonos anoméricos de las aldopiranosas del núcleo tetrasacárido de la tricolorina A. La constante de acoplamiento vecinal *trans* diaxial observada entre H-1 y H-2 con un valor de $^3J_{\text{HH}} = 7.9$ Hz (ángulo dihedro *ca* 180°) en los piranósidos de la serie D es característica del anómero con la configuración β (Agrawal, 1992). En la configuración alternativa, la orientación α -axial del enlace glicosídico origina un valor pequeño en la constante de acoplamiento $^3J_{\text{HH}} = 2.4$ Hz como un resultado de la conformación *gauche* entre H-1 y H-2 (ángulo dihedro *ca* 60°). Por lo tanto, los enlaces glicosídicos de las unidades de glucopiranososa ($^3J_{1,2} = 7.2$ Hz) y fucopiranososa ($^3J_{1,2} = 7.8$ Hz) en la tricolorina A corresponden a la configuración β -ecuatorial (Ono *et al.*, 1989b; Lin, *et al.*, 1992) en la conformación $^4\text{C}_1$ (Boeyens, 1978). Por otra parte, la orientación ecuatorial del hidrógeno H-2 en la L-ramnosa resulta en un ángulo dihedro pequeño en relación al protón anomérico H-1 con valores de $^3J_{\text{HH}} < 4$ Hz para ambos anómeros, situación que dificulta la asignación de la configuración en C-1 (Agrawal, 1992). Con el objeto de resolver esta ambigüedad, se utilizó el valor de la constante de acoplamiento geminal ^{13}C - ^1H como un criterio para determinar la configuración anomérica de las unidades de L-ramnosa, ya que la diferencia en los acoplamientos entre las dos configuraciones anoméricas es generalmente de 10 Hz con el valor mayor para el acoplamiento ecuatorial ^{13}C - ^1H , *i.e.* el anómero α (Agrawal, 1992).

Cuadro 10. Desplazamientos químicos en la RMN-¹H y ¹³C del núcleo oligosacárido del derivado peracetilado (4) de la tricolorina A.

Unidad	¹ H ^a	¹³ C ^b
Fucosa-1	4.47 d (7.8)	102.05
2	4.32-4.37 m ^c	72.24
3	5.13 dd (3.4, 10.2)	75.16
4	5.38 d (3.4)	71.14
5	4.30 c (6.4)	69.51
6	1.17 d (6.4)	17.15
Glucosa-1	5.05 d (7.6)	99.96
2	3.89 dd (7.6, 9.0)	78.26
3	5.59 dd (9.0) ^d	70.15
4	5.24 dd (9.0) ^d	69.07
5	3.79 dt (2.0, 9.0)	71.14
6	4.09 dd (2.1, 12.2)	61.98
	4.32-4.37 m ^c	
Ramnosa-1	5.25 d (1.5)	98.50
2	5.53 dd (1.5, 3.4)	72.19
3	4.28 dd (3.4, 10.0)	76.33
4	5.47 dd (10.0)	75.51
5	4.32-3.37 m ^c	67.73
6	1.40 d (6.1)	18.24
Ramnosa'-1	5.18 d (1.0)	100.51
2	5.29 dd (1.0, 3.2)	72.28
3	5.43 dd (3.2, 9.8)	69.56
4	5.33 dd (9.8) ^d	71.09
5	3.76 dc (6.0, 9.8)	69.51
6	1.04 d (6.0)	17.38

^a300 MHz, C₃D₃N, TMS. Constantes de acoplamiento (Hz) en paréntesis. Las asignaciones se realizaron mediante ¹H-¹H DQ-COSY.

^b75.4 MHz, C₃D₃N, TMS. Las asignaciones se realizaron mediante ¹H-¹³C HETCOR.

^cSeñales superpuestas.

^dTriplete aproximado.

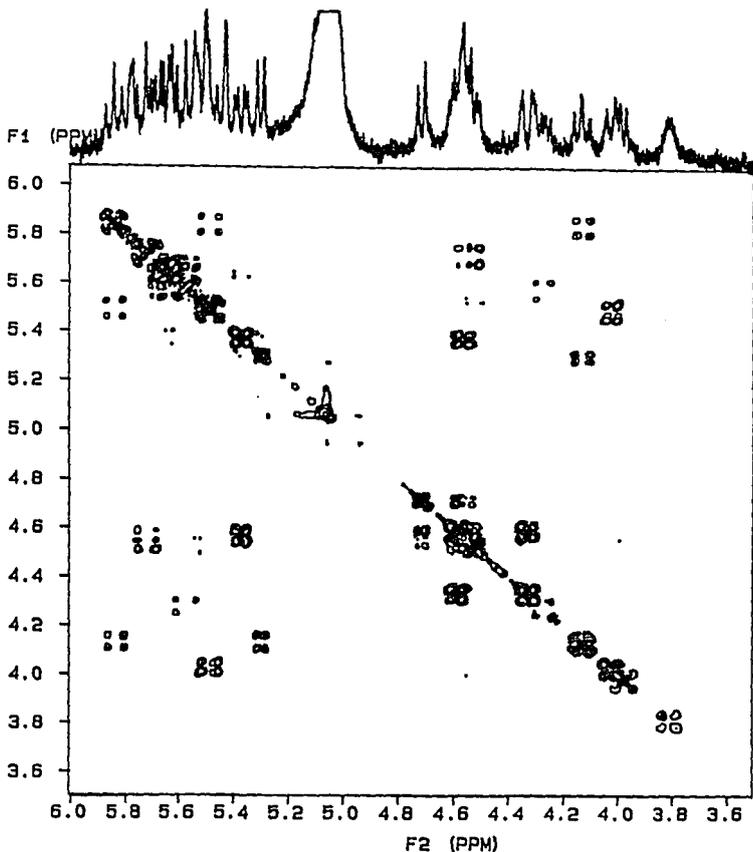


Figura 43. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear DQF-COSY del peracetato derivado de la tricolorina A. El espectro se registró a una temperatura de 25°C con 70 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 . Se utilizó una frecuencia de 299.944 MHz, con una amplitud en la ventana espectral de 3155.6 Hz y 256 incrementos con 16 oscilaciones transitorias por cada valor de t_1 . A lo largo del eje superior se muestra la resonancia convencional (1D).

Los valores promedio descritos en la literatura para las constantes de acoplamiento $^1J_{CH}$ para los anómeros α y β corresponden a 170 y 160 Hz, respectivamente (Ono, *et al.*, 1990; Agrawal, 1992). La resonancia del carbono anomérico de la unidad de ramnosa interna en la tricolorina A centrada en δ 98.20 presentó una constante de acoplamiento $^1J_{CH}$ con un valor de 172.0 Hz. El valor registrado para el acoplamiento geminal $^{13}C-^1H$ de la resonancia del carbono anomérico de la ramnosa terminal en δ 104.49 fue de 169.4 Hz. Así, estos resultados indicaron que los enlaces glicosídicos en las dos unidades de ramnopiranosas correspondían a la configuración α -axial en la conformación 1C_4 (Boeyens, 1978). En contraste con estos valores, la resonancia del carbono anomérico de la glucosa en δ 99.76 presentó un valor de $^1J_{CH} = 163.3$ Hz y el de la fucosa en δ 103.09 un valor de $^1J_{CH} = 158.6$ Hz. De esta manera, se confirmó de nueva cuenta las configuración β -ecuatorial para estas piranosas de la serie D.

El efecto nuclear de Overhauser (NOE), el cual depende de la proximidad de los protones, constituye una valiosa herramienta de asignación para establecer la configuración anomérica y la conformación molecular, *i.e.* la estructura tridimensional, de los oligosacáridos (Agrawal, 1992). Esta técnica se utilizó de manera conveniente para detectar los efectos nucleares de Overhauser generados entre los protones de una misma unidad de carbohidrato (NOE-intrarresidual) y aquellos que se generan entre las diferentes unidades del núcleo oligosacárido (NOE-interresidual) de la tricolorina A mediante el empleo de la resonancia bidimensional con la secuencia de pulsos ROESY (Bothner-By *et al.*, 1984). En este procedimiento, los NOEs-intrarresiduales observados se utilizaron esencialmente para la determinación de la configuración de las unidades monosacáridas, en tanto que los NOEs-interresiduales se emplearon principalmente como una evidencia adicional para verificar la secuencia de las unidades monosacáridas y determinar la posición de glicosilación (Agrawal, 1992). La figura 44 muestra el espectro ROESY generado por la tricolorina A y el cuadro 11 resume los efectos NOEs intrarresiduales e interresiduales observados para la tricolorina A.

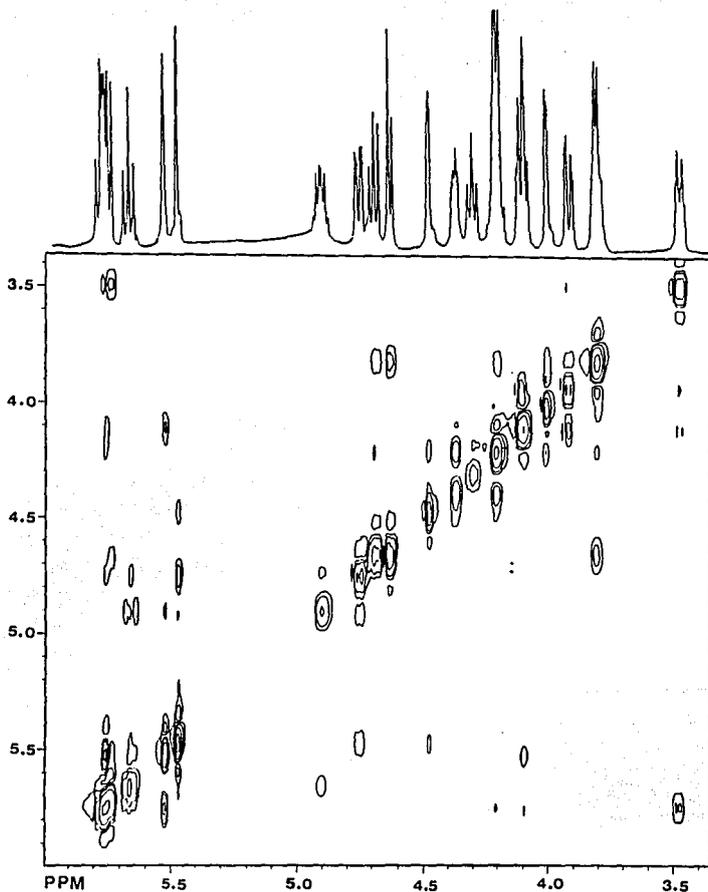


Figura 44. Espectro de RMN- ^1H bidimensional homonuclear ROESY de la porción oligosacárida de la tricolorina A. El espectro se registró a una temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ con 70 mg de muestra disueltos en 0.3 ml de piridina- d_5 . Se utilizó una frecuencia de 500.12 MHz, con una amplitud espectral de 4000.0 Hz, 512 incrementos con 64 oscilaciones transitorias por cada valor de t_1 , y una amplitud del pulso de $50\text{ }\mu\text{s}$ 90° . El tiempo total de adquisición fue de 10 h.

Cuadro 11. Efectos nucleares de Overhauser (NOEs) intrarresiduales e interglucosídicos observados en el espectro de RMN-¹H bidimensional ROESY^a.

¹ H-señal (δ)	NOE (¹ H-δ)
Fuc-1 (4.66)	Fuc-5; Jal-11 (3.82-3.86)
Fuc-2 (4.73)	Jal-11 (3.82-3.86)
Fuc-4 (4.04)	Fuc-3 (4.22-4.26); Fuc-5 (3.82-3.86)
Glu-1 (5.77)	Glu-3 (5.84); Glu-5 (3.48); Ram-1 (5.56)
Glu-2 (4.12)	Glu-6" (3.92); Ram-1 (5.56)
Ram-1 (5.56)	Glu-1 (5.77); Glu-2 (4.12); Ram-2 (5.81)
Ram-3 (4.79)	Ram-5 (4.95); Ram ¹ -1 (5.51)
Ram ¹ -1 (5.51)	Ram-1 (5.56); Ram ¹ -2 (4.52)
Ram ¹ -3 (4.41)	Ram ¹ -2 (4.52); Ram ¹ -5 (4.22-4.26)

^aLas condiciones instrumentales para el registro del espectro se describen en la figura 44.

En el espectro ROESY se observaron los cuadros de conectividad intrarresiduales establecidos entre los protones 1,3-diaxiales y los pares vecinales ecuatorial-axial y ecuatorial-ecuatorial. Así, por ejemplo, para el residuo interno de α-L-ramnosa se observaron NOEs entre los protones H-1 y H-2, además de una fuerte interacción NOE entre H-3 y H-5, en tanto que ninguno de estos dos protones provocó la exaltación de la señal del hidrógeno anomérico. De esta manera, se discriminó alternativamente entre los anómeros α y β de cada uno de los monosacáridos. La figura 45 ilustra las principales conectividades NOE intrarresiduales. Al mismo tiempo, se observaron las conectividades interglucosídicas (Fig. 46) entre H-1 de la fucosa con H-11 de la aglicona, H-2 de la fucosa con H-11 de la aglicona, H-1 de la ramnosa externa con H-3 de la ramnosa interna y, por último, el protón anomérico H-1 de la ramnosa interna estableció conectividades NOE interresiduales con H-1 y H-2 de la unidad de glucosa (δ 4.12).

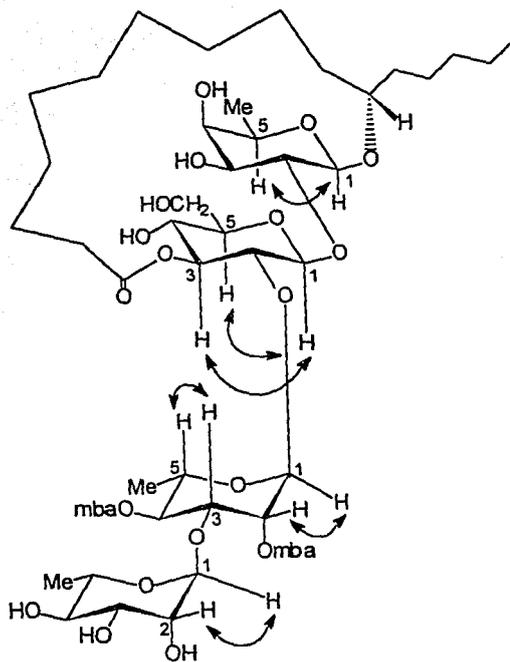


Figura 45. Principales efectos nucleares de Overhauser (NOEs) intraglicosídicos observados en los piranosidos del núcleo tetrasacárido de la tricolorina A.

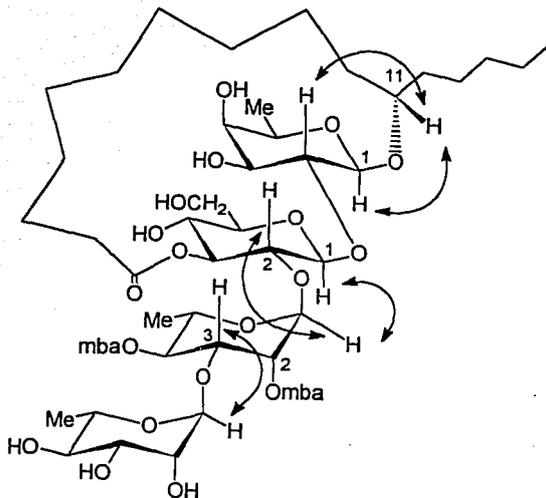


Figura 46. Principales efectos nucleares de Overhauser (NOEs) interglucosídicos observados en el núcleo tetrasacárido de la tricolorina A.

En consecuencia, la estructura de la tricolorina A {1}, principal inhibidor del crecimiento vegetal de *Ipomoea tricolor* Cav., se estableció como el 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-(2-*O*-[2*S*-metilbutiril]-4-*O*-[2*S*-metilbutiril])-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -fucopiranosido del ácido 11(*S*)-hidroxihexadecanoico (1,3"-lactona).

4.3 EVALUACION DEL POTENCIAL FARMACOLOGICO DE LA TRICOLORINA A.

Numerosas especies del género *Ipomoea* se utilizan especialmente como poderosos catárticos en la medicina tradicional de diversas culturas en todo el mundo (Wagner, 1973). Estudios farmacológicos previos han descrito efectos alucinógenos (Floss, 1976), antimicrobianos (Bieber *et al.*, 1986; Carlson *et al.*, 1948), analgésicos (Barghav y Varma, 1978), antiinflamatorios (Pongprayoon, *et al.*, 1992), espasmogénicos (Matin *et al.*, 1969), espasmolíticos (Pongprayoon *et al.*, 1992), hipotensores (Matin *et al.*, 1969), citotóxicos (Harrison *et al.*, 1985) y antitumorales (Bieber *et al.*, 1986; Bilkin *et al.*, 1952) para los extractos de algunas especies medicinales de *Ipomoea*.

Con el objetivo de explorar el potencial farmacológico de la mezcla de resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor*, así como el correspondiente a la tricolorina A, se decidió evaluar su potencial antimicrobiano y citotóxico. La evaluación del potencial antimicrobiano se efectuó mediante el análisis cuantitativo antimicrobiano en contra de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Candida albicans* (ATCC 10231) y *Aspergillus niger* (ATCC 16888) utilizando las técnicas microbiológicas de difusión en agar (Barry y Thornsberry, 1991) y de dilución en caldo nutritivo (Hufford *et al.*, 1975).

Los bioensayos para evaluar el potencial citotóxico incluyeron la toxicidad para el crustáceo *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1991) y estudios con cultivos celulares derivados de leucemia de múridos y de tumores cancerosos humanos (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993). De manera adicional, se evaluó la capacidad moduladora *in vitro* de la tricolorina A sobre la actividad enzimática de la proteína cinasa C (Nishizuka, 1984), como un ensayo molecular para la identificación de principios bioactivos de interés en la terapéutica del cáncer (Suffness y Pezzuto, 1991).

4.3.1. EVALUACION DEL POTENCIAL ANTIMICROBIANO.

Las resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor* y la tricolorina A desarrollaron un efecto inhibitor del crecimiento microbiano específico sobre la bacteria gram-positivo *Staphylococcus aureus*. No se observó ningún efecto inhibitor del crecimiento sobre los microorganismos de prueba adicionales que fueron ensayados (ver Parte Experimental 3.8.3). La figura 47 ilustra la relación entre el tamaño de la zona de inhibición (mm) del crecimiento de *Staphylococcus aureus* y el logaritmo de la concentración de la mezcla de resinas glicosídicas en los ensayos de difusión en agar. Se obtuvo una línea recta al graficar el cuadrado de las zonas de inhibición observadas, es decir, la distancia a partir de la fuente del compuesto de prueba al borde de la zona de inhibición (Barry, 1986). Mediante extrapolación se calculó una concentración inhibitora crítica igual a 1.5 µg/ml.

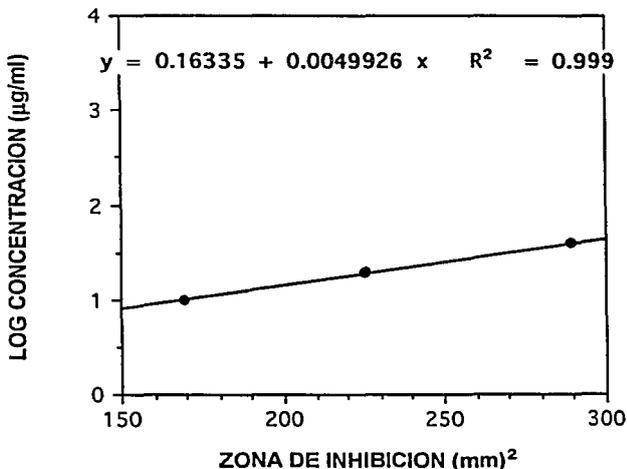


Figura 47. Relación entre el tamaño de la zona de inhibición (mm) y el log de la concentración (µg/ml) de la resina glicosídica. En los experimentos de difusión, se utilizaron para la determinación de la concentración inhibitora crítica las concentraciones de 40, 20 y 10 µg/ml de la mezcla de glicorresinas y un inóculo (10^9 células ml^{-1}) de *Staphylococcus aureus*, como el microorganismo de prueba a 37 °C.

Por otra parte, la actividad inhibidora desarrollada por la tricolorina A en los ensayos cuantitativos de difusión permitieron calcular una concentración inhibidora crítica de 5.5 $\mu\text{g/ml}$ (Fig. 48). Para la determinación de la concentración mínima inhibidora (MIC) de este producto natural puro, se utilizó el ensayo cuantitativo en caldo nutritivo con una serie de diluciones de mitades progresivas en el intervalo de concentración para la tricolorina A de 100 a 0.19 $\mu\text{g/ml}$ (Hufford *et al.*, 1975). La concentración mínima que inhibió completamente la proliferación del microorganismo de prueba correspondió a 1.56 $\mu\text{g/ml}$.

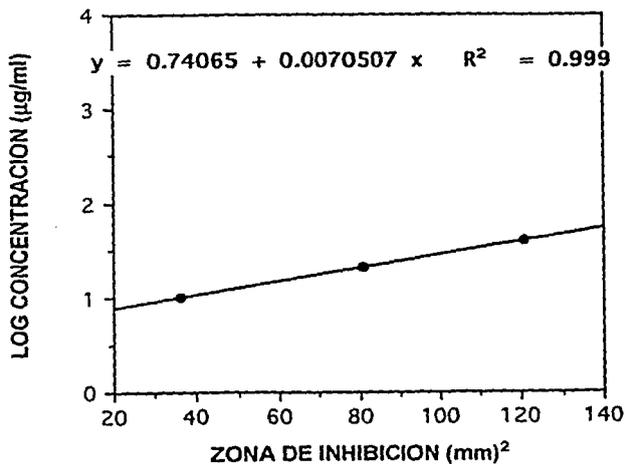


Figura 48. Relación entre el tamaño de la zona de inhibición (mm) y el log de la concentración ($\mu\text{g/ml}$) de la tricolorina A. En los experimentos de difusión, se utilizaron para la determinación de la concentración inhibidora crítica las concentraciones de 40, 20, 10 $\mu\text{g/ml}$ del producto natural puro y un inóculo (10^9 células ml^{-1}) de *Staphylococcus aureus*, como el microorganismo de prueba a 37 °C.

Estos resultados son consistentes con observaciones previas relacionadas con la actividad antimicrobiana desarrollada por las resinas de *Ipomoea bahiensis* (Bieber *et al.*, 1986), las cuales al igual que las resinas de *I. tricolor* inhiben el crecimiento de las bacterias gram-positivo y presentan una actividad moderada, o carecen totalmente de ella, contra *Candida albicans* y bacterias gram-negativo (e.g. *Escherichia coli*). La alta especificidad de la actividad demostrada por la tricolorina A la coloca, entre los antimicrobianos de origen vegetal, como un candidato idóneo para su posible desarrollo como un agente terapéutico en contra de cepas resistentes de *Staphylococcus aureus*.

4.3.2 EVALUACION DEL POTENCIAL CITOTOXICO.

Los compuestos antitumorales son, casi sin excepción, tóxicos cuando se administran en dosis elevadas. De esta manera, la letalidad *in vivo* para las larvas del crustáceo *Artemia salina* (Meyer *et al.*, 1982; Anderson *et al.*, 1991) se ha utilizado como un bioensayo primario de fácil y rápida implementación para la detección de la actividad citotóxica y su monitoreo durante el fraccionamiento de extractos vegetales (McLaughlin, 1991; Mata, 1993). Estudios recientes han demostrado que este bioensayo es lo suficientemente preciso para predecir la actividad antitumoral (*in vivo* P-388) y la citotoxicidad de agentes anticancerígenos en una serie de cultivos celulares derivados de tumores cancerosos humanos (Anderson *et al.*, 1991; Solis *et al.*, 1993).

La evaluación de la toxicidad para *A. salina* puede ser aplicada para la detección de productos naturales bioactivos en donde este crustáceo responde de manera similar a los sistemas celulares de mamíferos. Por ejemplo, este bioensayo es de gran utilidad para la detección de compuestos antimitóticos que actúen mediante la inhibición de la formación de microtúbulos (Novelo *et al.*, 1993). Se ha descrito que las RNA-polimerasas dependientes de DNA de *A. salina* son similares a las de mamíferos y, al igual que en todas las células animales, sus ATPasas transportadoras de Na^+ y K^+ son sensibles a la ouabaina, un glicósido utilizado en la medicina como un estimulante cardíaco (Pedersen y

Carafoli, 1987). Por lo tanto, es posible utilizar este ensayo para el descubrimiento de compuestos farmacodinámicos que regulen estos sistemas enzimáticos e interfieran en procesos vitales.

Un ejemplo reciente de la aplicación de este ensayo para la detección de principios biodinámicos ha sido la identificación de acetogeninas como los principales agentes citotóxicos de las anonáceas, cuyo aislamiento biodirigido ha dependido del empleo del ensayo con *A. salina* (McLaughlin, 1991). Se demostró que la alta toxicidad de estos productos naturales es un resultado de la inhibición de la respiración mitocondrial (Arnason *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1993).

La aplicación de este ensayo en la selección ("screening") de plantas medicinales para su investigación farmacognóstica ha permitido el aislamiento de numerosas sustancias bioactivas, en especial, productos naturales con una elevada actividad citotóxica (McLaughlin, 1991), antimitótica (Novelo *et al.*, 1993), antihelmíntica (Mata, 1993) y antipalúdica (Mata, 1993; Solis *et al.*, 1993).

Durante la investigación fitoquímica del extracto clorofórmico de *Ipomoea tricolor*, se utilizó el bioensayo de toxicidad para *A. salina* como una evaluación preliminar para la detección y el monitoreo de la actividad citotóxica durante los procedimientos de fraccionamiento del extracto y la purificación de la tricolorina A. La mezcla de resinas glicosídicas y la tricolorina A demostraron una letalidad comparable al evaluarse en este bioensayo. El valor de la concentración letal media (CL_{50}) correspondió a 36.8 $\mu\text{g/ml}$ con un 95% de intervalo de confianza entre 60.5-20.5 $\mu\text{g/ml}$ calculado mediante análisis de probit (Lieberman, 1983). La tricolorina A demostró un efecto tóxico para *A. salina* con una CL_{50} de 18.2 $\mu\text{g/ml}$ con un 95% de intervalo de confianza de 37.1-5.8 $\mu\text{g/ml}$.

El cuadro 12 presenta los resultados de la evaluación citotóxica de los extractos orgánicos (CHCl_3 y MeOH) de *I. tricolor* y se comparan con los valores obtenidos para los extractos preparados a partir de otras especies medicinales del género *Ipomoea*, i.e. *I.*

purga, *I. pes-caprae* e *I. tryianthina*. Estas evaluaciones utilizaron la leucemia linfocítica de mûridos (P-388) y diez líneas celulares derivadas de tumores humanos, las cuales incluyen el carcinoma epidermoide (A-431), el cáncer mamario (BC-1 y ZR-75-1), el cáncer de colon (Col-2), el fibrosarcoma (HT-1080), el carcinoma nasofaringeo (KB y KB resistente a vinblastina), el cáncer de próstata (LNCaP), el cáncer pulmonar (Lu-1) y el melanoma (Mel-2). Los resultados se expresaron en forma de dosis efectivas medias (DE_{50}) y representan la concentración requerida para inhibir el crecimiento celular en un 50%.

Los protocolos establecidos por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos de Norteamérica consideran como una actividad significativa aquellos valores para la dosis efectiva media (DE_{50}) < 20 $\mu\text{g/ml}$ para extractos y < 4 $\mu\text{g/ml}$ para compuestos puros (Suffness y Pezzuto, 1991). Por lo tanto, la evaluación del extracto clorofórmico de *I. tricolor* permitió confirmar una actividad citotóxica general no específica para todas las líneas celulares ensayadas y un efecto significativo para el cáncer de próstata (LNCaP; DE_{50} 2.6 $\mu\text{g/ml}$). Por otra parte, se observó un efecto citotóxico significativo para los extractos clorofórmicos de *I. purga* contra la leucemia de mûridos P-388 (DE_{50} 2.2 $\mu\text{g/ml}$) y los sistemas tumorales humanos A-431 (carcinoma epidermoide; DE_{50} 2.8 $\mu\text{g/ml}$) y BC-1 (cáncer mamario; DE_{50} 2.4 $\mu\text{g/ml}$). El extracto metanólico de *I. purga* también desarrolló una actividad no específica y sólo se observó un efecto tóxico importante para la leucemia de mûridos (DE_{50} 2.9 $\mu\text{g/ml}$). El extracto metanólico de *I. tryianthina* presentó una actividad citotóxica general con un efecto significativo para las líneas celulares LNCaP (DE_{50} 2.9 $\mu\text{g/ml}$) y Lu-1 (cáncer de pulmón; DE_{50} 2.4 $\mu\text{g/ml}$). Los extractos de *I. pes-caprae* no desarrollaron ningún efecto citotóxico en las concentraciones de prueba (< 20 $\mu\text{g/ml}$).

Cuadro 12. Actividad citotóxica de los extractos orgánicos de *Ipomoea tricolor*, *I. pes-caprae*, *I. purga* e *I. tryianthina*.

Muestra ^a	AS ^b	LINEA CELULAR ^c										
		A431	BC-1	Col-2	HT1080	KB	KB-VI	LNCaP	Lu-1	Mel-2	ZR-75-1	P-388
IT-1	68.4	>20	5.7	11.6	8.9	12.1	12.1	2.6	10.5	8.8	8.8	5.8
IT-2	85.3	9.2	>20	>20	8.9	11.7	>20	5.3	11.1	8.9	8.9	5.0
IPu-1	82.4	2.8	2.4	9.5	8.9	7.7	8.1	4.2	7.7	6.0	6.5	2.2
IPu-2	300	4.6	5.5	5.9	6.7	7.9	6.3	4.1	8.5	8.7	9.1	2.9
IPE-1	>500	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
IPE-2	>500	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
ITr-1	110	9.2	>20	>20	8.9	11.7	>20	5.3	11.1	8.9	8.9	5.3
ITr-2	65.6	8.5	8.4	6.4	5.1	6.1	7.0	2.9	2.4	5.7	5.7	2.8

^aAbreviaciones utilizadas para los extractos orgánicos ensayados: 1, clorofórmico; 2, metanólico. Abreviaciones para las especies de prueba: IT, *Ipomoea tricolor*; IPu, *I. purga*; IPE, *I. pes-caprae*; ITr, *I. tryianthina*.

^bAS = letalidad para *Artemia salina* (CL₅₀ ppm).

^cLos resultados se expresan en dosis efectiva media (DE₅₀ µg/ml). Abreviaciones: A-431, carcinoma epidermoide; BC-1, cáncer mamario; Col-2, cáncer de colon; HT-1080, fibrosarcoma; KB, carcinoma nasofaríngeo; KB-VI, KB resistente a vinblastina; LNCaP, cáncer de próstata, Lu-1, cáncer pulmonar; Mel-2, melanoma, ZR-75-1 cáncer mamario; P-388, leucemia de múridos.

A pesar de la notoria actividad larvícida desarrollada por las resinas glicosídicas (Cuadro 12), la tricolorina A sólo demostró una citotoxicidad marginal cuando se evaluó su potencial *in vitro* (Cuadro 13). Se observó una importante actividad citotóxica (DE_{50} 2.2 $\mu\text{g/ml}$) con el cáncer mamario y las células P-388. No se observó ningún efecto citotóxico contra las líneas celulares de prueba para el ácido tricolórico y la peracetiltricolorina A. Estos resultados son congruentes con la actividad farmacológica asociada a las resinas glicosídicas intactas. Los ácidos glicosídicos derivados de la hidrólisis alcalina de estos complejos están desprovistos del poder laxativo de los productos naturales (Wagner, 1973). Por lo tanto, la presencia de la macrolactona y las propiedades hidrofílicas conferidas por los carbohidratos en la tricolorina A, al parecer, son requisitos necesarios para la actividad citotóxica de las resinas glicosídicas.

Cuadro 13. Actividad citotóxica de la resina de *Ipomoea tricolor*, de la tricolorina A, del ácido tricolórico y de la peracetiltricolorina A.

Muestra	LINEA CELULAR (DE_{50} $\mu\text{g/ml}$)										
	A-431	BC-1	Col-2	HT-1080	KB	KB-VI	LNCaP	Lu-1	Mel-2	P-388	ZR75-1
Resina	>20	5.7	11.6	8.9	12.1	12.1	5.8	10.5	8.8	>5	8.8
TA	10.3	2.2	8.9	6.3	>20	>20	5.8	5.5	7.6	2.2	8.1
AT	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20
TA-Ac	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20	>20

Abreviaciones: A-431, carcinoma epidermoide; BC-1, cáncer mamario; Col-2, cáncer de colon; HT-1080, fibrosarcoma; KB, carcinoma nasofaríngeo; KB-VI, KB resistente a vinblastina; LNCaP, cáncer de próstata, Lu-1, cáncer pulmonar; Mel-2, melanoma; U-373, glioblastoma; P-388, leucemia de mûridos; ZR-75-1, cáncer mamario.

TA = tricolorina A; AT = ácido tricolórico; TA-Ac = peracetato de la tricolorina A.

4.3.3 EVALUACION DEL POTENCIAL MODULADOR DE LA TRICOLORINA A SOBRE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PROTEINA CINASA C.

La unión del 12,13-dibutirato de forbol (PDBu) a la proteína cinasa C (PKC) representa un ensayo simple de competencia y evalúa la afinidad del antagonista de prueba para unirse al dominio regulatorio de esta enzima y desplazar al ligando PDBu (De Vries *et al.*, 1988). Este bioensayo no proporciona ninguna información relacionada con los aspectos funcionales de la farmacología del compuesto de prueba como, por ejemplo, su potencial para modular la actividad de la PKC, y se ha utilizado para la detección de antagonistas del diacilglicerol en extractos de especies de euforbiáceas, fuentes de los denominados ésteres de forbol, diterpenoides promotores de tumores (Beutler, 1989).

Con el objetivo de evaluar la afinidad de las resinas glicosídicas por el dominio regulatorio de la PKC, se utilizó el ensayo de unión del PDBu para determinar la capacidad de los extractos preparados a partir de cuatro especies del género *Ipomoea*, *i. e.*, *I. pes-caprae*, *I. purga*, *I. tricolor* e *I. tryianthina*, para acomplejarse con esta cinasa. El cuadro 14 presenta los resultados de la evaluación del desplazamiento del PDBu- $[^3\text{H}]$ por los extractos de prueba. Se calcularon los valores de la concentración inhibidora media (CI_{50}) a partir de experimentos de dosis-respuesta para todos los extractos que presentaron un desplazamiento específico del PDBu- $[^3\text{H}]$ mayor al 60% a una concentración de 0.2 mg/ml.

La actividad se detectó en todos los casos, con excepción del extracto metanólico de *I. pes-caprae* en donde es probable que el alto contenido de pigmentos fotosintéticos presente en las partes aéreas de esta especie produzcan un efecto de enmascaramiento de la actividad mediante la dilución de los constituyentes activos. El extracto clorofórmico de *I. tricolor* desarrolló la mejor actividad (Fig. 49), la cual se reprodujo en los experimentos conducidos para demostrar la afinidad de la resina obtenida a partir de éste. Por lo tanto, estos resultados permiten inferir que la bioactividad detectada es el resultado de la presencia de los glicolípidos característicos de la familia Convolvulaceae.

Cuadro 14. Afinidad de las resinas glicosídicas por el dominio regulatorio de la PKC.

Muestra ^a	Desplazamiento PDBu ^b	CI ₅₀ (µg/ml)
IT-1	80%	76.6
IT-2	55%	-
IPu-1	73%	82.6
IPu-2	64%	96.4
IPe-1	46%	-
IPe-2	0%	-
ITr-1	62%	99.5
ITr-2	55%	-

^aAbreviaciones utilizadas para los extractos orgánicos ensayados: 1, clorofórmico; 2, metanólico. Abreviaciones para las especies de prueba: IT, *Ipomoea tricolor*; IPu, *I. purga*; IPe, *I. pes-caprae*; ITr, *I. tryianthina*.

^bDesplazamiento específico del PDBu-[³H] a la concentración de 0.2 mg/ml del extracto.

La inhibición de la unión del PDBu-[³H] al dominio regulatorio de la PKC en función de la concentración de la resina glicosídica de *I. tricolor* (Cuadro 15) proporcionó un valor de la concentración inhibidora media (CI₅₀) de 49.5 µg/ml. Estos resultados permiten concluir que algunos de los glicolípidos presentes en las resinas glicosídicas de las especies de la familia Convolvulaceae son antagonistas del activador fisiológico de la PKC, el diacilglicerol. De esta manera, esta actividad no sólo se limita a los forboles carcinogénicos de la familia Euphorbiaceae (Beutler *et al.*, 1989) y a los glicósidos

citotóxicos inhibidores de la PKC de las familias Verbenaceae y Polygonaceae (Herbert *et al.*, 1991; Sneden y Zimmermann, 1993; Yakatilake *et al.*, 1993).

La inhibición de la unión del PDBu-[³H] a la PKC por la tricolorina A también demostró una dependencia de la concentración de este glicolípido (Fig. 50). Después de una hora de incubación, tiempo seleccionado para los ensayos rutinarios (De Vries *et al.*, 1988), la tricolorina A compite con el PDBu-[³H] por la unión con el dominio regulatorio de la PKC con un valor para la concentración inhibidora media (CI₅₀) de 44.1 µg/ml (43.2 µM).

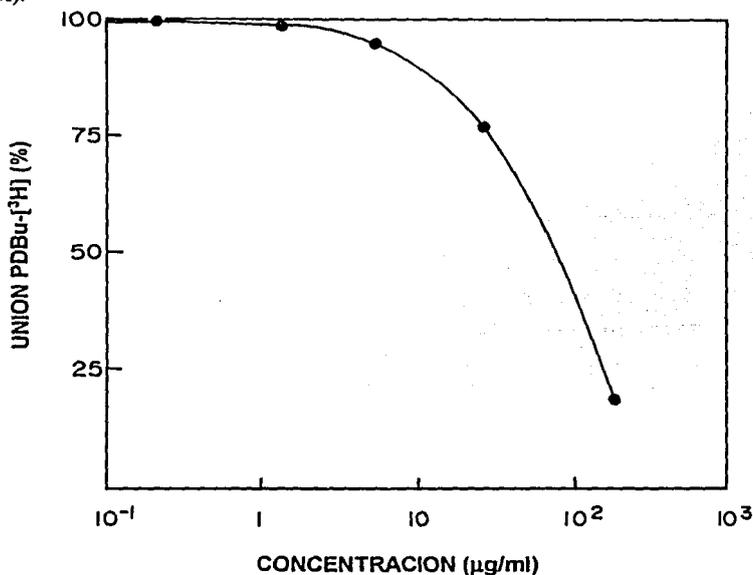


Figura 49. Inhibición por el extracto clorofórmico de *Ipomoea tricolor* de la unión del PDBu-[³H] a la proteína cinasa C parcialmente purificada. La afinidad del PDBu-[³H] por el dominio regulatorio de la PKC en función de la concentración de las resinas glicosídicas se ensayó a una temperatura de 30 °C y utilizando una incubación de 60 min de acuerdo con los procedimientos descritos en la Parte Experimental (Sección 3.8.2.1). Los puntos representan el valor promedio ± D.E. de cuatro réplicas.

La similitud en los valores obtenidos para las concentraciones inhibitorias medias (CI_{50}) en las evaluaciones de la mezcla total de las resinas glicosídicas de *I. tricolor* y de la tricolorina A (Cuadro 15) es un resultado de la presencia de esta última en aproximadamente un 85 % en el crudo total (ver Parte Experimental: sección 3.6). De esta manera, el antagonismo del éster de forbol observado para el crudo resinoso prácticamente representa la actividad de su constituyente mayoritario. Al mismo tiempo, dicha semejanza puede ser una consecuencia de la presencia de glicolípidos minoritarios bioactivos en la mezcla de resinas glicosídicas, los cuales contribuyen al efecto global observado para esta última.

Cuadro 15. Inhibición de la unión del PDBu- $[^3H]$ a la proteína cinasa C por la tricolorina A y las resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor*.

Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	% Inhibición-Resinas ^a	% Inhibición-Tricolorina A ^a
0	0	0
0.06	0	1.3
0.32	0.6	3.8
1.60	1.5	5.6
8.0	16.7	23.1
40.0	42.2	47.3
200.0	82.2	84.1

^aPorcentaje de inhibición = $[1 - (\text{unión del PDBu-}[^3\text{H}] \text{ en presencia del compuesto de prueba} / \text{unión del PDBu-}[^3\text{H}] \text{ en ausencia del compuesto de prueba})] \times 100$.

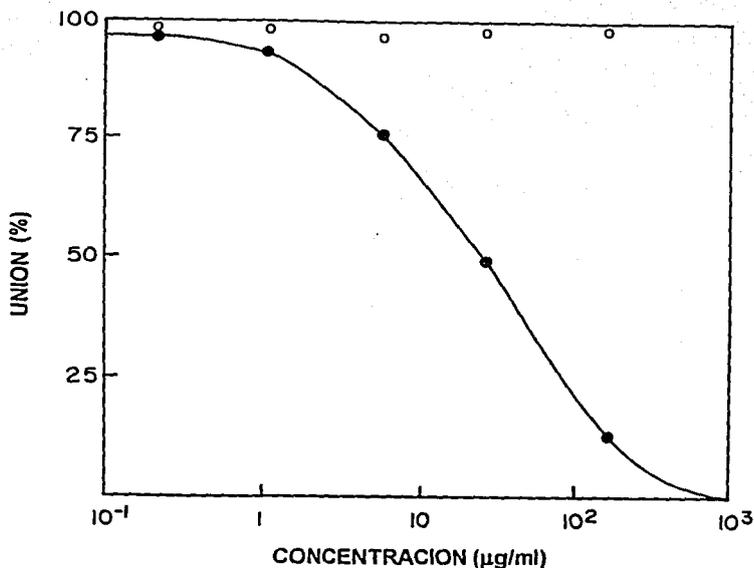


Figura 50. Inhibición por la tricolorina A de la unión del PDBu-[³H] (●) y de la estaurosporina-[³H] (○) a la proteína cinasa C parcialmente purificada. La afinidad del PDBu-[³H] por el dominio regulatorio de la PKC en función de la concentración de las resinas glicosídicas se ensayó a una temperatura de 30 °C y utilizando una incubación de 60 min de acuerdo con los procedimientos descritos en la Parte Experimental (Sección 3.8.2.1). La afinidad de la estaurosporina-[³H] por el dominio catalítico de la PKC se realizó siguiendo los mismos procedimientos experimentales para el bioensayo de los ésteres de forbol. Los puntos representan el valor promedio ± D.E. de cuatro réplicas.

Se ha postulado que los ésteres de forbol actúan como análogos del diacilglicerol con una restricción en su conformación, al compararse con la libertad conformacional del activador fisiológico de la PKC. Esta rigidez en la configuración del núcleo diterpénico provoca una orientación espacial determinada para las regiones de alta densidad electrónica (Fig. 51). Al parecer, la acción moduladora de los forboles sobre esta cinasa resulta del establecimiento de un complejo activador mediante las interacciones vía

puentes de hidrógeno entre los hidroxilos de las posiciones C-4, C-9 y C-20 del esqueleto de forbol y diversos grupos protonados del dominio regulatorio enzimático. En este complejo la región lipóidea de los forboles interactúa con la membrana celular, funcionando a manera de anclaje durante la translocación de la PKC del citosol a la membrana (Wender, 1993) y, es precisamente, en este estado de asociación cuando se activa la catálisis mediada por esta cinasa (Evans, 1991).

Los resultados de la inhibición por la tricolorina A de la unión del PDBu a la PKC indicaron que este producto natural es reconocido como un antagonista del diacilglicerol por el dominio regulatorio de la PKC. De manera adicional, esta conclusión se fundamentó en el experimento de unión de la estaurosporina- ^3H a la PKC, el inhibidor más potente de proteínas cinasas que se conoce (Tamaoki, 1991). La tricolorina A no interfiere con la unión de la estaurosporina en el dominio catalítico de la PKC y, por lo tanto, no actúa como un antagonista de este inhibidor (Fig. 50).

Estos resultados permitieron postular que este glicolípido podría actuar como un posible modulador -activador o inhibidor- de la actividad enzimática de la PKC. Es decir, la interacción de la tricolorina A con el dominio de unión del diacilglicerol (regulatorio) provocaría una activación de la catálisis mediada por esta cinasa, como en el caso de los forboles, o induciría la inhibición de su actividad enzimática como sucede con la calfoestina C (ver Antecedentes: sección 1.2.2).

Con el objeto de verificar esta hipótesis, se procedió a evaluar *in vitro* el efecto provocado por el incremento en la concentración de la tricolorina A sobre la actividad enzimática de la PKC. El cuadro 16 resume los resultados de la actividad enzimática de la PKC, la cual es dependiente de Ca^{2+} y fosfatidilserina (Tamaoki, 1991), en presencia y en ausencia de la tricolorina A.

La figura 52 ilustra el efecto de la tricolorina A sobre la actividad basal de la PKC, la cual se inhibió de manera proporcional a la concentración de este compuesto de prueba con un valor de la CI_{50} de 57 $\mu\text{g/ml}$ (55.8 μM). Esta actividad es comparable con la

observada para todos los inhibidores de origen vegetal descritos en la literatura con valores para la CI_{50} correspondientes a una magnitud de $1-10^2 \mu\text{M}$ (Herbert *et al.*, 1991; Jayatilake *et al.*, 1993; Sneden y Zimmermann, 1993).

Cuadro 16. Efecto de la tricolorina A sobre la actividad de la proteína cinasa C.

FS	DO	Ca ²⁺	EF	Tricolorina A ($\mu\text{g/ml}$)	Actividad PKC (cpm) ^a	% ^b
-	-	-	-	-	416 ^c	
-	+	+	-	-	468 ^c	
+	+	+	-	-	15396 ^d	
+	+	+	-	200	1540	90
+	+	+	-	100	4927	68
+	+	+	-	50	8160	47
+	+	+	-	25	10315	33
+	+	+	-	12.5	11393	26
+	+	+	-	6.25	13087	15
+	+	+	+ ^e	-	20784	- ^f

^aLa actividad de la isoenzima α de la PKC se evaluó de acuerdo con las condiciones experimentales descritas por Yasuda *et al.*, 1990, utilizando la histona tipo III-S ($10 \mu\text{M}$) como sustrato en un volumen de $50 \mu\text{l}$ con $10 \mu\text{M}$ de ATP-[γ -³²P] ($3-6 \times 10^5$ cpm). Cada valor representa el promedio de la actividad específica de seis réplicas. La incubación se realizó en la presencia de fosfatidilserina (FS), dioleína (DO) y Ca²⁺ de acuerdo con los procedimientos descritos en la Parte Experimental (Sección 3.8.2.2).

^bPorcentaje de inhibición de la actividad basal.

^cLa actividad inespecífica se calculó en ausencia de lípidos y CaCl₂.

^dActividad basal de la PKC α (100 %).

^eEF= éster de forbol (12-miristato-13-acetato de forbol; 5 nM) utilizado como un control positivo.

^fLa concentración del éster de forbol utilizada provoca la activación de la PKC en un 30-50 % de su actividad basal (Jayatilake *et al.*, 1993; Miyake *et al.*, 1984).

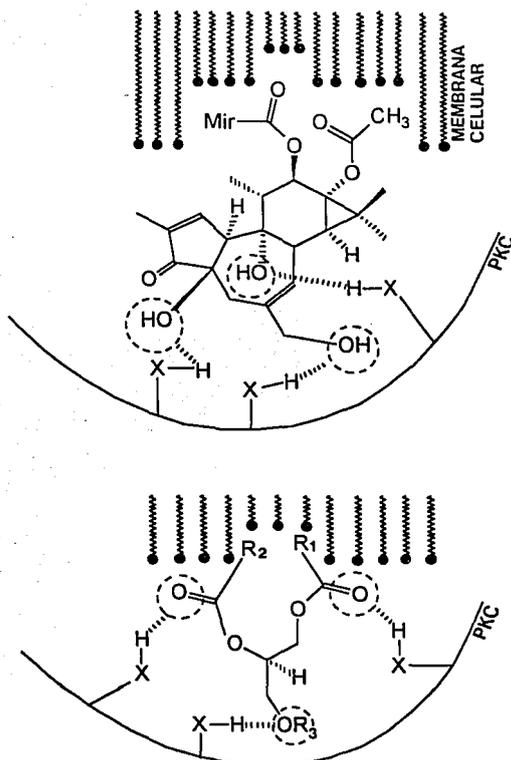


Figura 51. (A) Complejo PKC-forbol asociado a la membrana celular. Seguido de la interacción con Ca^{2+} y los ésteres de forbol, la PKC se transloca a la membrana celular donde expone su sitio hidrofílico convirtiéndose de una apoenzima citosólica en una enzima asociada a la membrana celular. (B) Complejo PKC-diacilglicerol. Los ésteres de forbol comparten una similitud en la distribución de las regiones ricas en densidad electrónica y en sus zonas hidrofóbicas con el diacilglicerol. Abreviaciones: Mir, $-(\text{CH}_2)_{12}\text{CH}_3$; $\text{R}_1 = (\text{CH}_2)_7\text{CH}=\text{CH}(\text{CH}_2)_7\text{CH}_3$; $\text{R}_2 = (\text{CH}_2)_3(\text{CH}=\text{CHCH}_2)_4(\text{CH}_2)_3\text{CH}_3$; $\text{R}_3 = \text{H}$.

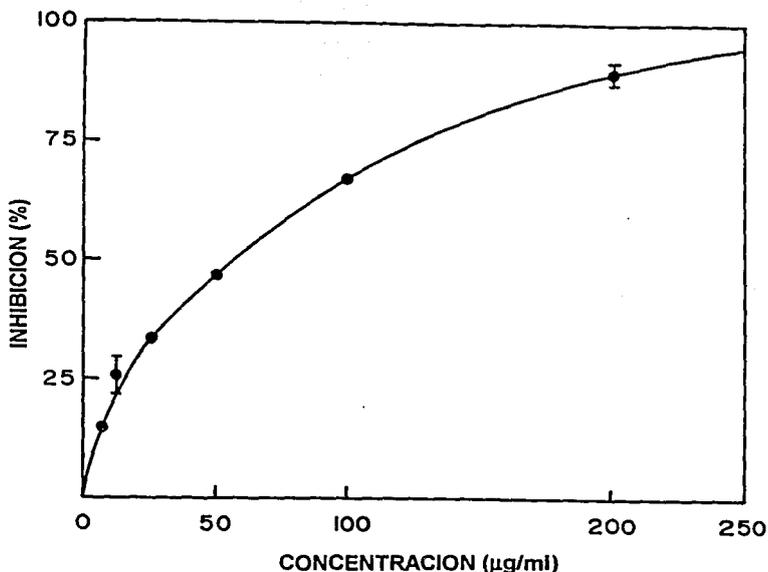


Figura 52. Inhibición de la proteína cinasa C (PKC) por la tricolorina A. El efecto provocado por el incremento en la concentración de la tricolorina A sobre la actividad enzimática de la PKC se evaluó utilizando una incubación de 5 min a 30 °C de acuerdo con los procedimientos descritos en la Parte Experimental (Sección 3.8.2.2). Los puntos representan el valor promedio \pm D.E. de seis réplicas. Porcentaje (%) de inhibición = $[1 - (\text{incorporación observada del } ^{32}\text{P en el sustrato en presencia de la tricolorina A} / \text{incorporación observada del } ^{32}\text{P en el sustrato en ausencia de la tricolorina A})] \times 100$.

Estos resultados ilustran el efecto de la tricolorina A como una nueva clase química de inhibidor de la PKC y demuestran la interacción de las resinas glicosídicas con el dominio regulatorio de esta cinasa. La concentración de la tricolorina A requerida para provocar la inhibición del 50 % de la unión de los ésteres de forbol al dominio regulatorio de la PKC (43.2 μM) fue semejante a la concentración necesaria de este glicolípido que promueve la inhibición del 50 % de la actividad enzimática (55.8 μM). Por lo tanto, la

tricolorina A y las resinas glicosídicas de las convolvuláceas podrían actuar como moduladores farmacológicos de la PKC *in vivo* y, de esta manera, es posible concebir que el amplio espectro de actividades biológicas demostrado *in vitro* en células animales para las resinas glicosídicas de las convolvuláceas (ver Antecedentes: Sección 1.1.3) sea una consecuencia de la modulación de la actividad enzimática de la PKC.

La comparación estructural entre la tricolorina A y los diferentes moduladores de la PKC, en especial los ésteres de forbol, sugiere la presencia de grupos isostéricos en estos compuestos bioactivos (Blumber, 1988; Wender, 1993), los cuales corresponden a las regiones de alta densidad electrónica, representadas por los grupos hidroxilo del núcleo sacárido, y las regiones hidrofóbicas de naturaleza lipoidea, que corresponden a la cadena hidrocarbonada de la aglicona y a los residuos del ácido metilbutírico que esterifican a la porción sacárida en la tricolorina A, cuya orientación espacial depende de la conformación de máxima estabilidad impuesta por los piranosidos del núcleo oligosacárido de este liposacárido.

Estos resultados preliminares relacionados con el potencial modulador de la tricolorina A sobre la actividad de la PKC permiten especular sobre el posible establecimiento de un complejo PKC-tricolorina A análogo a los previamente descritos para el diacilglicerol y los ésteres de forbol (Fig. 51). En este complejo activado, la asociación a la membrana celular se realizaría gracias a las propiedades hidrofóbicas de las regiones lipoideas de la tricolorina A, en tanto que las interacciones con el dominio modulador de la PKC pueden suceder mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno con los grupos hidroxilo del núcleo oligosacárido de la tricolorina A (Fig. 53). Esta asociación provocaría los cambios conformacionales necesarios en la estructura de la cinasa y, de esta manera, se expondría el dominio hidrofílico de la PKC para la fosforilación de un gran número de sustratos proteicos. Es posible que esta actividad *in vivo* podría resultar en la regulación de canales de iones y la secreción de mediadores mitogénicos e inflamatorios (Evans, 1991).

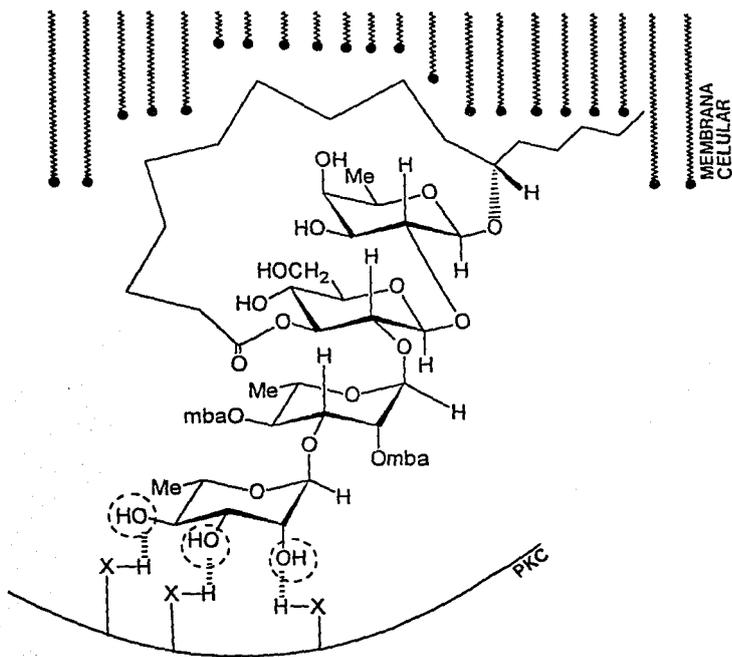


Figura 53. Complejo PKC-tricolorina A hipotético. La interacción de la PKC con iones calcio y la tricolorina A es probable que produzca la translocación de este complejo activado para transformarse de una apoenzima citosólica en una enzima asociada a la membrana celular. Las regiones hidrofóbicas de la tricolorina A (la porción de la aglicona) funcionarían a manera de anclaje para la asociación del complejo PKC-tricolorina A con la membrana. Las regiones con alta densidad electrónica (los grupos hidroxilo) del núcleo oligosacárido de la tricolorina A podrían interactuar vía puentes de hidrógeno con el dominio regulatorio de la PKC.

4.4 DETERMINACION DEL CONTENIDO ALCALOIDEO DE LAS PARTES AEREAS DE *Ipomoea tricolor* MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE GASES-ESPECTROMETRIA DE MASAS.

Aun cuando el crudo alcaloideo de *I. tricolor* no presentó un efecto inhibitorio significativo sobre el crecimiento vegetal en los bioensayos de germinación de semillas y crecimiento radicular (ver cuadro 5), se decidió cuantificar el contenido de alcaloide totales presentes en las partes aéreas y proceder a la identificación de sus constituyentes individuales mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (CG-EM) (David y Sandra, 1992). Este análisis permitiría identificar las ergolinas presentes en las partes aéreas durante el periodo de la floración de este cultivo de cobertura y confirmar la presencia de altas concentraciones de estos alcaloides en los órganos vegetativos (Amor-Prats y Harborne, 1993).

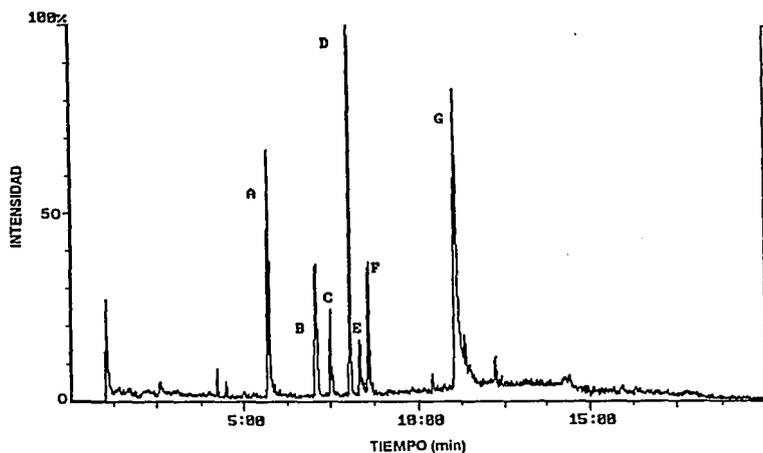


Figura 54. Análisis mediante cromatografía de gases del extracto alcaloideo de *Ipomoea tricolor*. Asignación de los picos: A, agroclavina; B, ergonovina; C, ergonovina; D, ergina; E, elimoclavina; F, erginina; G, chanoclavina-I. Condiciones instrumentales: columna capilar, DB-1 (25 m, 0.23 mm D.I., 0.11 μ m); temperatura de la columna, 150 \rightarrow 280 $^{\circ}$ C a 5 $^{\circ}$ C/min; gas acarreador, helio (1 ml/min); tamaño de la muestra, 0.02 mg/ μ l.

El cromatograma generado por la mezcla alcaloidea demostró la presencia de siete constituyentes mayoritarios (Fig. 54). Los espectros de masas de éstos y sus correspondientes tiempos de retención permitieron identificar a la agroclavina {5} (Rt 5.43 min), la ergonovina {6} (Rt 7.05 min), la ergonovina {7} (Rt 7.31 min), la ergina {8} (Rt 8.01 min), la elimoclavina {9} (Rt 8.19 min) y la ergina {10} (Rt 8.33 min) (Flieger *et al.*, 1991; Weber y Ma, 1976).

La identificación de la chanoclavina-I {11} se realizó mediante un experimento de coelución en la cromatografía de gases (Fig. 55) con una muestra estándar (Rt 11.07 min) aislada de las semillas de *Ipomoea violacea* L. (*I. tricolor* Cav.) (Hernández, 1982). Estos resultados representan la primera descripción de esta secoergolina como uno de los constituyentes mayoritarios de las partes aéreas de *I. tricolor*.

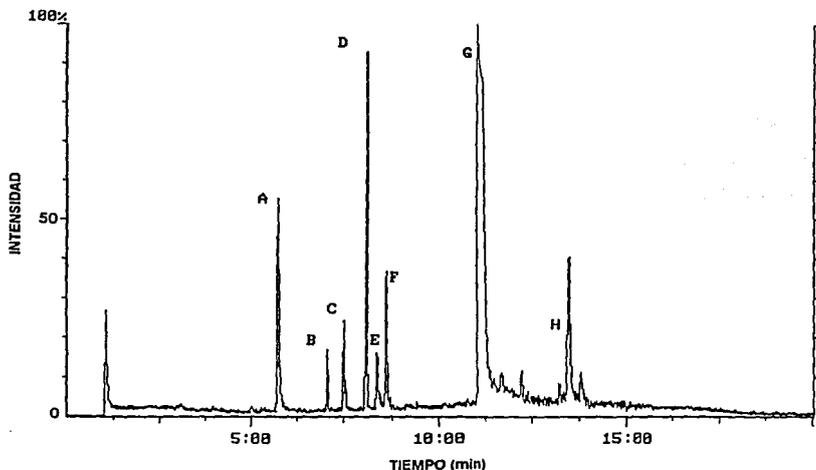
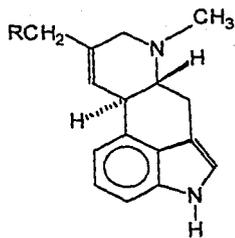
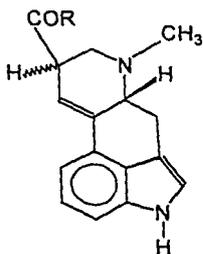


Figura 55. Cromatograma de gases resultado de la coelución de la fracción alcaloidea de *Ipomoea tricolor* con el estándar de chanoclavina-I (Rt 11.07 min). La identificación de los picos A-G y las condiciones instrumentales son idénticas a las descritas en la Figura 54. El pico H es una impureza de la muestra estándar.



6 R = -NHCH (CH₃)CH₂OH; α-H

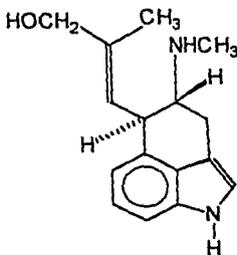
5 R = -H

7 R = -NHCH (CH₃)CH₂OH; β-H

9 R = -OH

8 R = -NH₂; α-H

10 R = -NH₂; β-H



11

El análisis mediante CG-EM de la fracción alcaloidea (Fig. 54) de las partes aéreas de *Ipomoea tricolor* Cav. permitió la cuantificación de sus constituyentes individuales y demostró ser lo suficientemente sensible para el análisis del contenido alcaloideo de tan sólo 100 mg de material vegetal, los cuales corresponderían a un rendimiento total de aproximadamente 30 µg. El empleo de la CG-EM inmediatamente después de la separación cromatográfica en capa fina permitió la identificación inequívoca de las ergolinas presentes en los tejidos vegetativos de *I. tricolor*. El cuadro 17 resume los resultados de la cuantificación de los alcaloides mediante la cromatografía de gases del crudo alcaloideo total e incluye los tiempos de retención obtenidos para cada uno de los constituyentes individuales.

Contrario a lo que se pensaba que las semillas (0.005-0.079 %) representaban los sitios de mayor concentración de alcaloides en *I. tricolor*, el análisis del contenido alcaloideo de los tejidos vegetativos de esta planta demostró una alta concentración de ergolinas (0.03 %).

Cuadro 17. Composición del extracto alcaloideo de las partes aéreas de *Ipomoea tricolor*.

Pico identificado ^a	Nombre	Rt (min) ^a	M ⁺ (m/z) ^b	Concentración ^c
A	Agroclavina	5.43	236	20.7
B	Ergonovina	7.05	325	7.5
C	Ergonovinina	7.31	325	4.8
D	Ergina	8.01	267	31.0
E	Elimoclavina	8.19	254	3.1
F	Erginina	8.33	267	7.2
G	Chanoclavina-I	11.07	256	25.6

^aCromatograma de gases del extracto total (Fig. 54).

^bIón molecular (EM-IE, 70 eV).

^cPorcentaje de rendimiento individual en relación al crudo total.

Estos resultados son similares a los descritos recientemente para *I. parasitica* cuyo patrón en la variación ontogénica de ergolinas permitió postular que la presencia de estos alcaloides tóxicos probablemente proporciona una protección contra la depredación por herbívoros en los diferentes estados del desarrollo vegetal involucrados en la dispersión (semillas), el establecimiento (plántulas) y la reproducción (partes vegetativas durante la floración) de estas especies (Aerts *et al.*, 1991; Amor-Prats y Harborne, 1993).

A pesar de la considerable actividad fisiológica de las ergolinas y de su uso farmacológico, se ha dado escasa atención al papel ecológico de estos alcaloides en las plantas superiores donde se producen, *i.e.* la familia de las convolvuláceas. Sin embargo, se ha demostrado el potencial de interacción aleloquímica de estos alcaloides sobre insectos (Amor-Prats y Harborne, 1993; Clay y Cheplick, 1989; Yates *et al.*, 1989). Por último, se puede concluir que la distribución taxonómica de las ergolinas en *Ipomoea* (presentes en *ca* 20% de las especies del género), su actividad aleloquímica sobre artrópodos, sus efectos neurotóxicos en mamíferos y su alta concentración en los tejidos vegetativos de estas plantas constituyen indicadores, sin lugar a dudas, de su papel ecológico como toxinas vegetales (Harborne, 1988), es decir forman parte de la defensa química de estas plantas.

5. CONCLUSIONES.

1.- La presente investigación se inició con el objetivo de aislar y caracterizar los constituyentes responsables de la actividad inhibidora del crecimiento vegetal demostrada por *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae) y cuyo potencial de actividad alelopática se demostró mediante la evaluación de la actividad inhibidora de los extractos alcaloideos y orgánicos totales (hexánico, clorofórmico y metanólico) preparados a partir de las partes aéreas de esta especie sobre la germinación de semillas y el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* Watts y *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv.

El fraccionamiento biodirigido del extracto activo (CHCl_3) mediante los bioensayos antes mencionados permitió el aislamiento del principio alelopático, el cual correspondió a la mezcla de resinas glicosídicas característica del metabolismo secundario de las especies de convolvuláceas. El constituyente bioactivo mayoritario, denominado con el nombre trivial de tricolorina A {1}, inhibió la germinación de semillas de *E. crus-galli* con un valor para la concentración inhibidora media (CI_{50}) de $36.1 \mu\text{M}$, en tanto que la de *A. leucocarpus* correspondió a $149.4 \mu\text{M}$. El crecimiento radicular de las dos especies de prueba resultó más sensible a la tricolorina A que los efectos provocados sobre la germinación. La concentración de este agente alelopático que provocó la inhibición del crecimiento radicular de *E. crus-galli* en un 50 % fue de $12.3 \mu\text{M}$ y para *A. leucocarpus* de $36.2 \mu\text{M}$. Estos niveles de concentración micromolar para los valores de inhibición inducidos por la tricolorina A corresponden a 1×10^{-2} órdenes de magnitud inferiores a las concentraciones descritas en la literatura para la mayoría de los productos vegetales que intervienen en interacciones alelopáticas.

Estos resultados permiten postular que las glicoresinas de las convolvuláceas representan los principales agentes químicos involucrados en las interacciones alelopáticas de todas las especies de *Ipomoea*, e.g. *I. tricolor* e *I. batatas*, utilizadas como cultivos de cobertura en la agricultura tradicional mexicana.

2.- La estructura de la tricolorina A {1}, el principal agente aleopático de las resinas glicosídicas de *Ipomoea tricolor*, se elucidó como el 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-{2-*O*-(2*S*-metilbutiril)-4-*O*-(2*S*-metilbutiril)}-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glicopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido 11(*S*)-hidroxihexadecanoico-(1,3"-lactona) a través de la aplicación de diversas técnicas de alta resolución en la resonancia magnética nuclear que incluyeron experimentos SINEPT, COSY, HETCOR, COLOC, HOHAHA y ROESY.

3.- La tricolorina A {1} desarrolla un fuerte efecto inhibitor del crecimiento de *Staphylococcus aureus* con un valor para la concentración inhibitora mínima de 1.5 μ g/ml. Esta pronunciada actividad permite seleccionar a las resinas glicosídicas de las convolvuláceas como candidatos potenciales para el desarrollo de nuevas sustancias de interés quimioterapéutico para el tratamiento de infecciones de la piel, ojos, heridas y del sistema urinario-genital ocasionadas por cepas resistentes a los antibióticos de *S. aureus*.

4.- La tricolorina A {1} muestra una importante actividad citotóxica (DE_{50} 2.2 μ g/ml) en los cultivos celulares derivados de tumores mamarios y de leucemia de móridos (P-388). Esta actividad se pierde en sus derivados de saponificación, el ácido tricolónico {2}, y de acetilación, la peracetiltricolorina A {3}. Por lo tanto, estos resultados sugieren que la actividad citotóxica debe estar asociada a la macrolactona presente en el producto natural y, al parecer, las propiedades hidrofílicas conferidas por los grupos hidroxilos del núcleo oligosacárido son necesarias para que las resinas glicosídicas puedan desarrollar citotoxicidad. La actividad citotóxica observada para todos los extractos de las especies de *Ipomoea* evaluadas indica que las convolvuláceas de uso en la medicina tradicional son fuentes potenciales de agentes de utilidad en la terapéutica del cáncer.

5.- Las resinas glicosídicas de las convolvuláceas actúan en experimentos *in vitro* como antagonistas del activador fisiológico de la proteína cinasa C, el diacilglicerol. La inhibición de la unión del PDBu- $[^3\text{H}]$ al dominio regulatorio de la PKC por la tricolorina A {1} demostró una dependencia de la concentración de este liposacárido (CI_{50} 43.2 μM). Este acomplejamiento entre la tricolorina A y la PKC provoca la inhibición de la actividad enzimática de esta cinasa (CI_{50} 55.8 μM). Estos resultados ilustran el efecto de una nueva clase de inhibidor de la PKC y, por lo tanto, es posible explicar el amplio espectro de actividades biológicas demostrado *in vitro* para las resinas glicosídicas de las convolvuláceas como una consecuencia de la modulación de la actividad enzimática de la PKC. La identificación de las resinas glicosídicas como moduladores potenciales de la actividad enzimática de la PKC permite su empleo como una herramienta de investigación para la exploración del papel de estos productos biodinámicos en la mediación de respuestas biológicas de interés farmacológico.

6.- En tanto que la necesidad para el empleo en el futuro de las plantas medicinales como una fuente de principios farmacodinámicos continúa siendo una controversia y tema de acaloradas discusiones en el ambiente científico; los resultados de la presente disertación constituyen una contribución al conocimiento de la naturaleza química de las glicorresinas de las convolvuláceas y ponen de manifiesto el potencial farmacológico de las mismas como una fuente de nuevos principios biodinámicos de posible utilidad terapéutica.

BIBLIOGRAFIA

- Aerts, R.J., Snolijer, W., Aerts-Teerlink, O., Van der Meijden, E. y Verpoorte, R. (1991) Control and biological implications of alkaloid synthesis in *Cinchona* seedlings. *Phytochemistry* 30, 3571-3577.
- Agrawal, P.K. (1992) NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry* 31, 3307-3330.
- Aitken, A. (1987) The activation of protein kinase C by daphnane, ingenane and tiglane diterpenoid esters. *Botanical Journal of the Linnean Society* 94, 247-263.
- Akiyama, T. y Ogawara, H. (1991) Use and specificity of genistein as inhibitor of protein-tyrosine kinases. En: T. Hunter y B.M. Sefton (eds.), *Protein Phosphorylation. Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, Protein Phosphatases. Methods in Enzymology*, Vol. 201. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 362-370.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. (1983) *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc., New York, pp. 717-745.
- Alzugaray, D. y Alzugaray, C. (1984) *Plantas que Curan*. Grupo de Comunicação Três, São Paulo, S.P., Brasil, Vol.3, p. 264.
- Amor-Prats, D. y Harborne, J.B. (1993) Allelochemical effects of ergoline alkaloids from *Ipomoea parasitica* on *Heliothis virescens*. *Chemoecology* 41, 55-61.
- Anaya, A.L., Ramos, L., Cruz, R., Hernández, J.G. y Nava V. (1987a) Perspectives on allelopathy in Mexican traditional agroecosystems: A case study in Tlaxcala. *Journal of Chemical Ecology* 13, 2083-2101.
- Anaya, A.L., Ramos, L., Hernández, J.G. y Cruz, R. (1987b) Allelopathy in Mexico. En: G.R. Waller (ed.), *Allelochemicals: Role in Agriculture and Forestry*. American Chemical Society Symposium series 330, Washington, D.C., pp. 89-101.
- Anaya, A.L., Calera, M.R., Mata, R. y Pereda-Miranda, R. (1990) Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology* 16, 2145-2152.
- Anderson, J.E., Goetz, C.M., McLaughlin, J.L. y Suffness, M. (1991) A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumor cell cytotoxicities as antitumor prescreens. *Phytochemical Analysis* 2, 107-111.

- Angerhofer, C.K. y Pezzuto, J.M. (1993) Applications of biotechnology in drug discovery and evaluation. En: J.M. Pezzuto, M.E. Johnson y H.R. Manasse (eds.), *Biotechnology and Pharmacy*. Chapman & Hall, New York, pp. 312-365.
- Arnason, J.T., MacKinnon, S., Durst, A., Philogène, B.J.R., Hasbun, C., Sánchez, P., Poveda, L., San Román, L., Isman, M.B., Satasook, C., Towers, G.H.N., Wiriayachitra, P. y McLaughlin, J.L. (1993) Insecticides in tropical plants with non-neurotoxic modes of action. En: K.R. Downum, J.T. Romeo y H.A. Sattford (eds.), *Phytochemical Potential of Tropical Plants. Recent Advances in Phytochemistry*, Vol. 27. Plenum Press, New York, pp.107-131.
- Auterhoff, H. y Demleitner, H. (1955) Comparative studies on convolvulaceous resins. *Arzneimittel-Forschung: Drug Research* 5, 402-407.
- Barnard, E.A. (1992) Receptor classes and the transmitter-gated ion channels. *Trends in Biochemical Sciences* 17, 368-374.
- Barry, A.L. (1986) Procedures for testing antimicrobial agents in agar media: theoretical considerations. En: V. Lorian (ed.), *Antibiotic in Laboratory Medicine*. 2a. ed., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Maryland, pp. 1-26.
- Barry, A.L. y Thornsberrry, C. (1991) Susceptibility test: diffusion test procedures. En: A. Balows, W.J. Hausler, Jr., K.L. Herrmann, H.D. Isenberg, H.J. Shadomy (eds.), *Manual of Clinical Microbiology*. 5a ed., American Society for Microbiology, Washington, D.C., pp. 1117-1125.
- Bax, A. (1984) Structure determination and spectral assignment by pulsed polarization transfer via long-range ^1H - ^{13}C coupling. *Journal of Magnetic Resonance* 57, 314-318.
- Bax, A., Aszalos, A., Dinya, Z. y Sudo, K. (1986) Structure elucidation of the antibiotic desertomycin through the use of new two-dimensional NMR techniques. *Journal of American Chemical Society* 108, 8056-8063.
- Berkow, R.L. y Kraft, A.S.. (1985) Bryostatin, a non-phorbol macrocyclic lactone, activates intact human polymorphonuclear leukocytes and binds to the phorbol ester receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 131, 1109-1116.
- Beutler, J.A., Alvarado, A.B., McCloud. T.G. y Cragg, G.M. (1989) Distribution of phorbol ester bioactivity in the Euphorbiaceae. *Phytotherapy Research* 3, 188-192.
- Bieber, L.W., Alves da Silva filho, A., Corrêa Lima, R.M.O., De Andrade Chiappeta, A., Carneiro do Nascimento, S., De Souza, I.A., De Mélo, J.F. y Jürgen Veith, H.

- (1986) Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry* **25**, 1077-1081.
- Blumberg, P.M. (1988) Protein kinase C as the receptor for the phorbol ester tumor promoters: Sixth Rhoads Memorial Award Lecture. *Cancer Research* **48**, 1-8.
- Bock, K., Pedersen, C. y Pedersen, H. (1984) Carbon-13 nuclear magnetic resonance data for oligosaccharides. *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry* **42**, 193-225.
- Boeyens, J.C.A. (1978) The conformation of six-membered rings. *Journal of Crystal and Molecular Structure* **8**, 317-320.
- Bothner-By, A.A., Stephens, R.L. y Lee, J.-M. (1984) Structure determination of a tetrasaccharide: transient nuclear Overhauser effects in the rotating frame. *Journal of American Chemical Society* **106**, 811-813.
- Budzikiewicz, H., Djerassi, C. y Williams, D.H. (1964) *Interpretation of Mass Spectra of Organic Compounds*. Holden-Day, Inc., San Francisco, California, pp.10-14.
- Carlson, H.J., Douglas, H.G. y Robertson, J. (1948) Antibacterial substances separated from plants. *Journal of Bacteriology* **55**, 241-248.
- Castro Ramirez, A.E. (1988) Estudio comparativo del conocimiento sobre plantas medicinales utilizadas por dos grupos étnicos del municipio de Pahuatlán, Puebla. San Juan Iztacala, México. Tesis Licenciatura. Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Cohen, P. (1992) Signal integration at the level of protein kinases, protein phosphatases and their substrates. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 408-413.
- Cordell, G.A., Beecher, C. y Pezzuto, J.M. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of a new anticancer drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 117-133.
- Cordell, G.A. y Kinghorn, A.D. (1991) One-dimensional proton-carbon correlations for the structure determination of natural products. *Tetrahedron* **47**, 3521-3534.
- Chao, J.-M. y Der Marderosian, A. (1973) Identification of ergoline alkaloids in the genus *Argyreia* and related genera and their chemotaxonomic implications in the convolvulaceae. *Phytochemistry* **12**, 2435-2440.
- David, F. y Sandra, P. (1992) Capillary gas chromatography-spectroscopic techniques in natural products analysis. *Phytochemical Analysis* **3**, 145-152.

- Davis, D.G. y Bax, A. (1985) Assignment of complex ^1H NMR spectra via two-dimensional homonuclear Hartmann-Hahn spectroscopy. *Journal of American Chemical Society* **107**, 2820-2821.
- De Vries, D.J., Herald, C.L., Pettit, G.R. y Blumber, P.M. (1988) Demonstration of subnanomolar affinity of bryostatin 1 for the phorbol ester receptor in rat brain. *Biochemical Pharmacology* **37**, 4069-4073.
- Dell, A. (1987) F.A.B.-Mass spectrometry of carbohydrates. En: R.S. Tipson y D. Horton (eds.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*. Academic Press, vol. 45, pp. 19-72.
- Der Marderosian, A. (1967) Hallucinogenic indole compounds from higher plants. *Lloydia* **30**, 23-38.
- Díaz, J.L. (1977) *Usos de las Plantas Medicinales de México*. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A.C., México, p. 66.
- Drummond, A.H. y Hughes, P.J. (1987) The interaction of natural products with cellular signalling mechanisms. *Phytotherapy Research* **1**, 1-16.
- Edwards, M.W. y Bax, A. (1986) Complete proton and carbon-13 NMR assignment of the alkaloid gephyrotoxin through the use of homonuclear Hartmann-Hahn and two-dimensional NMR spectroscopy. *Journal of American Chemical Society* **108**, 918-923.
- Einhellig, F.A. (1986) Mechanisms and modes of action of allelochemicals. En: A.R. Putnam y C.S. Tang (eds.), *The Science of Allelopathy*. John Wiley & Sons, New York, pp.171-188.
- Einhellig, F.A. (1989) Interactive effects of allelochemicals and environmental stress. En C.H. Chou y G.R. Waller (eds.), *Phytochemical Ecology: Allelochemicals, Mycotoxins and Insect Pheromones and Allomones*. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No.9. Taipei, Taiwan, pp. 101-118.
- Einhellig, F.A. y Souza, I.F. (1992) Phytotoxicity of sorgoleone found in grain sorghum root exudates. *Journal of Chemical Ecology* **18**, 1-11.
- Elisabetsky, E. (1991) Sociopolitical, economical and ethical issues in medicinal plant research. *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 235-239.
- Ellis, C.A., Brooks, S.F., Brooks, G., Evans, A.T., Morrice, N., Evans, F.J. y Aitken, A. (1987) The effects of phorbol esters with different biological activities on protein kinase C. *Phytotherapy Research* **1**, 187-190.

- Enriquez, R.G., León, I., Pérez, F., Walls, F., Carpenter, K.A., Puzzuoli, F.V. y Reynolds, W.F. (1992) Characterization, by two-dimensional NMR spectroscopy, of a complex tetrasaccharide glycoside isolated from *Ipomoea stans*. *Canadian Journal of Chemistry* **70**, 1000-1008.
- Evans, F.J. (1991) Natural products as probes for new drug target identification. *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 91-101.
- Evans, F.J. y Taylor, S.E. (1983) Pro-inflammatory, tumour-promoting and anti-tumor diterpenes of the plant families Euphorbiaceae and Thymelaeaceae. *Fortschritte der Chemie Organischer Naturstoffe* **44**, 1-99.
- Flieger, M., Sedmera, P., Novák, Cvak, L., Zapletal, J. y Stuchlik, J. (1991) Degradation products of ergot alkaloids. *Journal of Natural Products* **54**, 390-395.
- Floss, H.G. (1976) Biosynthesis of ergot alkaloids and related compounds. *Tetrahedron* **32**, 873-912.
- Geahlen, R.L., Koonchanok, N. M., McLaughlin, J.L. y Pratt, D.E. (1989) Inhibition of protein-tyrosine kinase activity by flavonoids and related compounds. *Journal of Natural products* **52**, 982-986.
- Ghebrezabher, M., Rufini, S., Monaldi, B. y Lato, M. (1976) Thin-layer chromatography of carbohydrates. *Journal of Chromatography* **127**, 133-162.
- González Elizondo, M. (1984) *Las Plantas Medicinales de Durango. Inventario Básico*. CIIDIR-Instituto Politécnico Nacional, México, p. 34.
- Goodman Gilman, A., Goodman, L.S., Rall, T.W. y Murad, F. (1986) *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 7a. ed. Editorial Médica Panamericana, México, pp. 890-897.
- Grieve, M. (1982) *A Modern Herbal*. 2a. ed. Dover Publications, New York, p. 220.
- Haar, M.J. (1990) Allelopathic effects of several sesquiterpene lactones. MA thesis. University of South Dakota, Vermillion, South Dakota, p. 73.
- Ham, R.G. y McKeehan, W.L. (1979) Media and growth requirements. En: W.B. Jakoby y I.H. Pastan (eds.), *Cell Culture. Methods in Enzymology*, Vol. LVIII. Academic Press, San Diego, California, pp. 44-93.
- Hamburger, M. y Hostettmann, K. (1991) Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. *Phytochemistry* **30**, 3864-3874.

- Hannun, Y.A. y Bell, R.M. (1988) Aminoacridines, potent inhibitors of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **263**, 5124-5131.
- Hannun, Y.A., Foglesong, R.J. y Bell, R.M. (1989) The adriamycin-iron (III) complex is a potent inhibitor of protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* **264**, 9960-9966.
- Hannun, Y.A., Merrill, Jr., A.H. y Bell, R.M. (1991) Use of sphingosine as inhibitor of protein kinase C. En: T. Hunter y B.M. Sefton (eds.), *Protein Phosphorylation. Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, Protein Phosphatases. Methods in Enzymology*, Vol. 201. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 316-328.
- Harborne, J.B. (1988) *Introduction to Ecological Biochemistry*. 3a. ed., Academic Press, Cambridge, 353 pp.
- Hardie, D.G. (1991) *Biochemical Messengers. Hormones, Neurotransmitters and Growth Factors*. Chapman & Hall, Cambridge, pp.191-277.
- Harrison, D.A., Madhusudan, K.P. y Kulshreshtha, D.K. (1985) Structure of dichroside D, a fatty acid glycoside from *Ipomoea dichroa*. *Carbohydrate Research* **143**, 207-220.
- Harrison Jr., H.F. y Peterson, J.K. (1986) Allelopathic effects of sweet potatoes (*Ipomoea batatas*) on yellow nutsedge (*Cyperus esculentus*) and alfalfa (*Medicago sativa*). *Weed Science* **34**, 623-627.
- Hartwell, J.L. (1968) Plants Used Against cancer. A Survey. *LLoydia* **31**, 71-170.
- Hegnauer, R. (1964) *Chemotaxonomie der Pflanzen*. Birkhäuser Verlag, Stuttgart, Vol.3, p. 547-561.
- Helfman, D.M., Barnes, K., Kinkade Jr., J.M., Vogler, W.R., Shoji, M., y Kuo, J.F. (1983) Phospholipid-sensitive Ca²⁺ dependent protein phosphorylation system in various types of leukemic cells from human patients and in human leukemic cell lines HL60 and K562, and its inhibition by alkyl-lysophospholipids. *Cancer Research* **43**, 2955-2960.
- Hepler, J.R. y Gilman, A.G. (1992) G proteins. *Trends in Biochemical Sciences* **17**, 383-387.
- Herbert, J.M., Maffrand, J.P., Taoubi, K., Augereau, J.M., Fouraste, I. y Gleye, J. (1991) Verbascoside isolated from *Lantana camara*, an inhibitor of protein kinase C. *Journal of Natural Products* **54**, 1595-1600.

- Hernández, L. (1982) Estudio de los componentes alucinógenos de semillas de *Ipomoea*. Tesis Licenciatura. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Instituto Politécnico Nacional. México.
- Hidaka, H., Watanabe, M. y Kobayashi, R. (1991) Properties and use of H-series compounds as protein kinase inhibitors. En: T. Hunter y B.M. Sefton (eds.), *Protein Phosphorylation. Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, Protein Phosphatases. Methods in Enzymology*, Vol. 201. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 328-339.
- Hofmann, A. (1963) The active principles of seeds of *Rivea corymbosa* and *Ipomoea violacea*. *Botanical Museum Leaflets Harvard University* 20, 194-212.
- Hofmann, A. y Tschertter, H. (1960) Isolierung von Lysergsaure-Alkaloide aus der mexikanischen Zauberdroge Ololiuqui (*Rivea corymbosa* (L.) Hall. f.) *Experientia* 16, 414.
- Horeau, A. (1977) Determination of configuration of secondary alcohols by partial resolution. En: H.B. Kagan (ed.), *Stereochemistry*. Vol. 3, Georg Thieme Publishers, Stuttgart, pp. 51-94.
- Hufford, C.D., Funderburk, M.J., Morgan, J.M. y Robertson, L.W. (1975) Two antimicrobial alkaloids from heartwood of *Liriodendron tulipifera* L. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 64, 789-792.
- Hussain, R.A., Lin, Y.-M., Poveda, L.J., Bordas, E., Chung, B.S., Pezzuto, J.M., Soejarto, D.D. y Kinghorn, A.D. (1990) Plant-derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *Journal of Ethnopharmacology* 28, 103-115.
- Ireland, C.M., Roll, D.M., Molinski, T.F., McKee, T.C., Zabriskie, T.M., Swersey, J.C. (1988) En: D.G. Fautin, *Biomedical Importance of Marine Organisms*, Vol. 13. Academy of Sciences, San Francisco, California, pp. 41-57.
- Jayasuriya, H., McChesney, J.D., Swanson, S.M. y Pezzuto, J.M. (1989) Antimicrobial and cytotoxic activity of rottlerin-type compounds from *Hypericum drummondii*. *Journal of Natural Products* 52, 325-331.
- Jayatilake, G.S., Jayasuriya, H., Lee, E.-S., Koonchanok, N.M., Geahlen, R.L., Ashendel, C.L., McLaughlin, J.L. y Chang, C.-J. (1993) Kinase inhibitors from *Polygonum cuspidatum*. *Journal of Natural Products* 56, 1805-1810.
- Kakehi, K. y Honda, S. (1989) Silyl ethers of carbohydrates. En: C.J. Biermann y G.D. McGinnis (eds.), *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida, pp. 43-85.

- Kessler, H., Griesinger, C., Zarbock, J., y Loosli, H.R. (1984a) Assignment of carbonyl carbons and sequence analysis in peptides by heteronuclear shift correlation via small coupling constants with broad band decoupling in t_1 (COLOC). *Journal of Magnetic Resonance* **57**, 331-336.
- Kessler, H., Griesinger, C. y Leutz, J. (1984b) Determination of connectivities via small proton carbon couplings with a new two-dimensional NMR technique. *Angewandte Chemie International Edition in English* **23**, 444-445.
- Khanna, S.N. y Gupta, P.C. (1967) Structure of muricatin. *Phytochemistry* **6**, 735-739.
- Kikkawa, U., Takai, Y., Tanaka, Y., Mujake, R. y Nishizuka, Y. (1983) Protein kinase C as a possible receptor protein of tumor-promoting phorbol ester. *Journal of Biological Chemistry* **258**, 11442-11445.
- Kirtiker, K.R., Basu, B.D. y An, I.C.S. (1935) *Indian Medicinal Plants*. 2a. ed., Vol. 3, Jayyed Press, Delhi, p. 1716.
- Kitagawa, I., Ohashi, K., Kawanishi, H., Shibuya, H., Shinkai, K. y Akedo, H. (1989) Ionophoretic activities of oligopeptide lactones and resin-glycosides in human erythrocytes. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **37**, 1679-1681.
- Kraft, A.S. (1993) Bryostatin 1: Will the oceans provide a cancer cure? *Journal of the National Cancer Institute* **85**, 1790-1792.
- Levitzki, A., Gazit, A., Osherov, N., Posner, I. y Gilon, C. (1991) Inhibition of protein-tyrosine kinases by tyrphostins. En: T. Hunter y B.M. Sefton (eds.), *Protein Phosphorylation. Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, Protein Phosphatases. Methods in Enzymology*, Vol. 201. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 347-361.
- Lewis, M.A., Arnason, J.T., Philogene, B.J.R., Rupprecht, J.K., y McLaughlin, J.L. (1993) Inhibition of respiration at site I by asimisin, an insecticidal acetogenin of the pawpaw, *Asimina triloba* (Annonaceae). *Pesticide Biochemistry and Physiology* **45**, 15-23.
- Lieberman, H. R. (1983) Estimating LD₅₀ using the probit technique: a basic computer program. *Drug and Chemical Toxicology* **6**, 111-116.
- Likhitwitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Cordell, G.A., Pezzuto, J.M. y Ruangrunsi, N. (1993) Cytotoxic and antimalarial bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Stephania erecta*. *Journal of Natural Products* **56**, 30-38.

- Lin, L.-Z., Lin, L.-J., Cordell, G.A., Luo, S.-Q. y Jian, H.-F. (1992) Spectral assignment of 2"-O- β -D-glucopyranosylsaikosaponin b2 by two-dimensional NMR techniques. *Magnetic Resonance in Chemistry* 30, 1097-1103.
- Linajes Palacios, J.A. (1991) La raíz de jalpa *Ipomoea purga* (Wender.) Hayne (Convolvulaceae) en el municipio de Xico, Veracruz, México: su sistema de producción. Tesis Licenciatura. Facultad de Biología. Universidad Veracruzana. México.
- Linares, E., Bye, R. y Flores, B. (1990) *Tés Curativos de México*. 2a ed., Instituto de Biología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Liscovitch, M. (1992) Crosstalk among multiple signal-activated phospholipases. *Trends in Biochemical Sciences* 17, 393-399.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J. Farr, A.L., y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193, 265-275.
- Mannich, C. y Schumann, P. (1938) Jalap resin and its principal constituent, convolvulin. *Archiv der Pharmazie* 276, 211-226.
- Marston, A., Borel, C. y Hostettmann, K. (1988) Separation of natural products by centrifugal partition chromatography. *Journal of Chromatography* 450, 91-99.
- Marston, A., Slacanin, I. y Hostettmann, K. (1990) Centrifugal partition chromatography in the separation of natural products. *Phytochemical Analysis* 1, 3-17.
- Martínez, M. (1979) *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica, México.
- Martínez, M. (1989) *Las Plantas Medicinales de México*. 6a. ed. Editorial Botas, México, pp. 276-279.
- Mata, R. (1993) Chemical studies and biological aspects of some Mexican plants used in traditional medicine. En: K.R. Downum, J.T. Romeo, H.A. Stafford (eds.), *Phytochemical Potential of Tropical Plants. Recent Advances in Phytochemistry*. Vol. 27, Plenum Press, New York, pp. 41-64.
- Matin, M.A., Tewari, J.P. y Kalani, D.K. (1969) Pharmacological effects of paniculatin-a glycoside isolated from *Ipomoea digitata* Linn. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 58, 757-759.
- Matuda, E. (1963) El género *Ipomoea* en México. *Anales del Instituto de Biología* 34, 85-145.

- McLaughlin, J.L. (1991) Crown gall tumours on potato discs and brine shrimp lethality: two simple bioassays for higher plant screening and fractionation. En: K. Hostettmann (ed.). *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*, Vol. 6, Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 1-32.
- Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. y McLaughlin, J.L. (1982) Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica* **45**, 31-34.
- Millspaugh, C.F. (1974) *American Medicinal Plants*. Dover Publications, New York, pp. 479-480.
- Miyake, R., Tanaka, Y., Tsuda, T., Kaibuchi, K., Kikkawa, U. y Nishizuka, Y. (1984). Activation of protein kinase C by non-phorbol tumor promoter, mezerein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **121**, 649-656.
- Ngassapa, O. (1992) Bioactive constituents of *Kokoona ochracea* (Celastraceae) and *Tetrapleura tetraptera* (Leguminosae). Tesis Doctoral. The University of Illinois at Chicago. Chicago, Illinois, pp.146-152.
- Nishizuka, Y. (1984) The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumor promotion. *Nature* **308**, 693-698.
- Nishizuka, Y. (1986) Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**, 305-312.
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. y Okabe, M. (1987) Isolation and structure elucidation of orizabin-I, II, III and IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *Tetrahedron* **43**, 3889-3902.
- Noda, N., Kobayashi, H., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988a) Resin glycosides. II. Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the crude resin glycoside from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **36**, 627-633.
- Noda, N., Kobayashi, H., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988b) Resin glycosides. III. Isolation and structural study of the genuine resin glycosides, muricatins I-VI, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **36**, 920-929.
- Noda, N., Nishi, M., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988c) Resin glycosides. IV. Two new resin glycosides, muricatins VII and VIII, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **36**, 1707-1713.

- Noda, N., Kogetsu, H., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990) Scammonins I and II, the resin glycosides of radix scammoniae from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry* **29**, 3565-3569.
- Noda, N., Kogetsu, H., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992a) Scammonins VII and VIII, two resin glycosides from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry* **31**, 2761-2766.
- Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992b) Resin glycosides. XV. Simonins I-V, ether-soluble resin glycosides (jalapins) from the roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 3163-3168.
- Novelo, M., Cruz, J.G., Hernández, L., Pereda-Miranda, R., Chai, H., Mar, W. y Pezzuto, J.M. (1993) Cytotoxic constituents from *Hyptis verticillata*. *Journal of Natural Products* **56**, 1728-1736.
- O'Brian, C.A., Liskamp, R.M., Solomon, D.H. y Weinstein, I.B. (1985) Inhibition of protein kinase C by tamoxifen. *Cancer Research* **45**, 2462-2465.
- Okabe, H. y Kawasaki, T. (1970) Structures of pharbitic acids C and D. *Tetrahedron Letters*, 3123-3126.
- Okabe, H., Koshito, N., Tanaka, K. y Kawasaki, T. (1971) Studies on resin glycosides. II. unhomogeneity of "pharbitic acid" and isolation and partial structures of pharbitic acids C and D, the major constituents of "pharbitic acid". *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **19**, 2394-2403.
- Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1989a) Operculin I and II, new ether-soluble resin glycosides ("jalapin") with fatty acid ester groups from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **37**, 241-244.
- Ono, M., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1989b) Resin glycosides, V. Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the ether-soluble crude resin glycosides ("jalapin") from rhizoma jalapae brasiliensis (roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **37**, 3209-3213.
- Ono, M., Nishi, M., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990) Resin glycosides. IX. Operculins I, II, V, VII and VIII, new ether-soluble resing glycosides of rhizoma jalapae braziliensis (the roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **38**, 2986-2991.
- Ono, M., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1991) Resin glycosides. XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII, new ether-soluble resin glycosides of rhizoma

- jalapae braziliensis (root of *Ipomoea operculata*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **39**, 2534-2539.
- Ono, M., Fujimoto, K., Kawata, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992a) Resin glycosides. XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV, and XV, the ether-soluble resin glycosides (jalapin) from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 1400-1403.
- Ono, M., Kuwabata, K., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992b) Resin glycosides. XIV. Quamoclins I-IV, new ether-soluble resin glycosides (jalapin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 2674-2680.
- Ono, M., Ueguchi, T., Murata, H., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992c) Resin glycosides. XVI. Marubajalapins I-VII, new ether-soluble resin glycosides from *Pharbitis purpurea*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **40**, 3169-3173.
- Ono, M., Yamada, F., Noda, N., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1993) Resin glycosides. XVIII. Determination by Mosher's method of the absolute configuration of mono- and dihydroxyfatty acids originated from resin glycosides. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **41**, 1023-1026.
- Pedersen, P.L. y Carafoli, E. (1987) Ion motive ATPases-ubiquity, properties, and significance to cell function. *Trends in Biochemical Sciences* **12**, 146-150.
- Peterson, J.K. y Harrison Jr., H.F. (1991) Isolation of substance from sweet potato (*Ipomoea batatas*) periderm tissue that inhibits seed germination. *Journal of Chemical Ecology* **17**, 943-951.
- Pettit, G.R., Herald, C.L., Doubek, D.L., Herald, D.L., Arnold, E. y Clardy, J. (1982) Isolation and structure of bryostatin 1. *Journal of the American Chemical Society* **104**, 6846-6848.
- Philip, P.A., Rea, D., Thavasu, P., Carmichael, J., Stuart, N.S.A., Rockett, H., Talbot, D.C., Ganesan, T., Pettit, G.R., Balkwill, F. y Harris, A.L. (1993) Phase I study of bryostatin 1: Assessment of interleukin 6 and tumor necrosis factor α induction in vivo. *Journal of the National Cancer Institute* **85**, 1812-1818.
- Phillipson, J.D. (1991) Assays for antimalarial and amoebicidal activities. En: K. Hostettmann (ed.). *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*, Vol. 6, Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 135-152.
- Pigman, W. (1957) Introduction: structure and stereochemistry of the monosaccharides. En: W. Pigman (ed.), *The Carbohydrates. Chemistry, Biochemistry, Physiology*. Academic Press, New York, pp. 49-76.

- Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M. y Bohlin, L. (1992) Antispasmodic activity of β -damascenone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. *Planta Medica* 58, 19-21.
- Powis, G. (1991) Signalling targets for anticancer drug development. *Trends in Pharmacological Sciences* 12, 188-194.
- Rehacek, Z. y Sajdl, P. (1990) *Ergot alkaloids: Chemistry, Biological effects, Biotechnology*. Bioactive Molecules, Vol. 12, Elsevier Science Publishers, Praga, pp. 1-90.
- Reuter, H.D. (1991) What are the possibilities and limits of therapy with European native drugs in modern clinical medicine? *Journal of Ethnopharmacology* 32, 187-193.
- Roig y Mesa, J.T. (1974) *Plantas Medicinales, Aromáticas o Venenosas de Cuba*. Instituto del Libro. La Habana, Cuba, p. 124.
- Samuelsson, G. (1991) Assays for pharmacological activity: non-specific assay. En: K. Hostettmann (ed.). *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*, Vol. 6, Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 261-280.
- Sarin, J.P.S., Garg, H.S., Khanna, N.M. y Dhar, M.M. (1973) Ipoearoside: a new glycoside from *Ipomoea leari* with anti-cancer activity. *Phytochemistry* 12, 2461-2468.
- Scholes, K.A. (1987) Effects of six classes of allelochemicals on growth, photosynthesis, and chlorophyll content in *Lemna minor* L. MA thesis. University of South Dakota, Vermillion, South Dakota, p. 81.
- Schultes, R.E. (1941) *A contribution to our knowledge of Rivea corymbosa, the narcotic ololiuqui of the Aztecs*. Botanical Museum of Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 45 pp.
- Schultes, R.E. (1976) *Hallucinogenic Plants*. Western Publishing Co., Wisconsin, p.120.
- Schultes, R.E. y Hofmann, A. (1979) *Plants of the Gods: Origins of Hallucinogenic Use*. McGraw Hill Book Co., England, p.190.
- Seo, S., Tomita, Y., Tori, K. y Yoshimura, Y. (1978) Determination of the absolute configuration of a secondary hydroxy group in a chiral secondary alcohol using glycosidation shifts in carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society* 100, 3331-3339.
- Sévenet, T. (1991) Looking for new drugs: what criteria? *Journal of Ethnopharmacology* 32, 83-90.

- Sharkey, N.A., Leach, K.L. y Blumberg, P.M. (1984) Competitive inhibition by diacylglycerol of specific phorbol ester binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* **81**, 607-610.
- Shellard, E.J. (1961a) The chemistry of some convolvulaceous resins. I. Vera Cruz jalap. *Planta Medica* **9**, 102-116.
- Shellard, E.J. (1996b) The chemistry of some convolvulaceous resins. II. Brazilian jalap. *Planta Medica* **9**, 141-145.
- Shen, D.W., Fojo, A., Chin, J.E., Roninson, I.B., Richert, N., Pastan, I. y Gottesman, M.M. (1986) Human multi-drug resistant cell lines: increased mdr 1 expression can precede gene amplification. *Science* **232**, 634-645.
- Shibuya, H., Kawashima, K., Baek, N.I., Narita, N., Yoshikawa, M. y Kitagawa, I. (1989) Synthesis of (11S)-(+)- and (11R)-(-)-jalapinic acids. A revision of chemical structures of merremosides B and D. *Chemical Pharmaceutical Bulletin* **37**, 260-262.
- Singh, S. y Stacey, B.E. (1973) A new β -D-quinovoside from commercial *Ipomoea purga*. *Phytochemistry* **12**, 1701-1705.
- Singhvi, N.R. y Sharma, K.D. (1984) Allelopathic effects of *Ludwigia adscendens* Linn. and *Ipomoea aquatica* Forsk on seedling growth of pearl millet (*Pennisetum typhoides* Rich). *Trans. Isdt. & Ucds.* **9**, 95-100.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S. y Boyd, M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute* **82**, 1107-1112.
- Sneden, A.T. y Zimmermann, M.L. (1993) New PKC-inhibitory phenolic glycosides from *Polygonum pennsylvanicum*. *Proceedings of the 34th Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy*. San Diego, California, julio 18-22. Resúmen O-3.
- Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P. y Phillipson, J.D. (1993) A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (brine shrimp). *Planta Medica* **59**, 250-252.
- Soto Nuñez, J.C. (1987) Las plantas medicinales y su uso tradicional en la cuenca del río Balsas; estados de Michoacán y Guerrero, México. Tesis Licenciatura. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional Autónoma de México.

- Stadler, P.A. y Stütz, P. (1975) The ergot alkaloids. En: R.H.F. Manske (ed.), *The Alkaloids*. Vol. XV, Academic Press, New York, pp. 1-40.
- Stauffacher, D., Tschertter, H. y Hofmann, A. (1965) Isolierung von Ergosin und Ergosinin neben Agroclavin aus den Samen von *Ipomoea argyrophylla* Vatke (Convolvulaceae). *Helvetica Chimica Acta* 48, 1379-1380.
- Stoll, A. y Hofmann, A. (1965) The ergot alkaloids. En: R.H.F. Manske (ed.), *The Alkaloids*. Vol. 8, Academic Press, New York, pp.725-783.
- Suffness, M. y Pezzuto, J.M. (1991) Assays related to cancer drug discovery. En: K. Hostettmann (ed.), *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*, Vol. 6, Academic press, Great Yarmouth, Norfolk, pp.71-133.
- Sweetnam, P.M., Caldwell, L., Lancaster, J., Bauer Jr., C., McMillan, B., Kinnier, W.J. y Price, C.H. (1993) The role of receptor binding in drug discovery. *Journal of Natural Products* 56, 441-455.
- Takai, Y., Kishimoto, A., Inoue, Y. y Nishizuka, Y. (1977) Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *Journal of Biological Chemistry* 252, 7603-7609.
- Tamaoki, T. (1991) Use and specificity of saturosporine, UCN-01, and calphostin C as protein kinase inhibitors. En: T. Hunter y B.M. Sefton (eds.), *Protein Phosphorylation. Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, Protein Phosphatases. Methods in Enzymology*, Vol. 201. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 340-347.
- Taylor, C.W. y Marshall, C.B. (1992) Calcium and inositol 1,4,5-trisphosphate receptors: a complex relationship. *Trends in Biochemical Sciences* 17, 403-407.
- Trease, G.E. y Evans, W.C. (1988) *Tratado de Farmacognosia*. 12a. ed. Editorial Interamericana, México, pp. 491-492.
- Tyler, V.E., Brady, L.R. y Robbers, J.E. (1988) *Farmacognosy*. 9a. ed. Lea & Febiger, Filadelfia, pp. 143.
- Uehara, Y. y Fukazawa, H. (1991) Use and selectivity of herbimycin A as inhibitor of protein-tyrosine kinases. En: T. Hunter y B.M. Sefton (eds.), *Protein Phosphorylation. Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, Protein Phosphatases. Methods in Enzymology*, Vol. 201. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 370-379.

- Umezawa, K. e Imoto, M. (1991) Use of erbstatin as protein-tyrosine kinase inhibitor. En: T. Hunter y B.M. Sefton (eds.), *Protein Phosphorylation. Part B: Analysis of Protein Phosphorylation, Protein Kinase Inhibitors, Protein Phosphatases. Methods in Enzymology*, Vol. 201. Academic Press, Inc., San Diego, California, pp. 379-345.
- Vanden Berghe, D.A. y Vlietinck, A. (1991) Screening methods for antibacterial and antiviral agents from higher plants. En: K. Hostettmann (ed.). *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*, Vol. 6, Academic Press, Great Yarmouth, Norfolk, pp. 47-69.
- Vegesna, R.V.K., Wu, H.-L., Mong, S. y Crooke, S.T. (1988) Staurosporine inhibits protein kinase C and prevents phorbol ester-mediated leukotriene D₄ receptor desensitization in RBL-1 cells. *Molecular Pharmacology* **33**, 537-542.
- Villamayor, F.G. y Perez, R.D. (1983) Sweet potato as a weed control agent for cassava. *The Radix* **5**, 10-11.
- Vlietinck, A.J. y Vanden Berghe, D.A. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of antiviral drugs? *Journal of Ethnopharmacology* **32**, 141-153.
- Wagner, H. (1973) The chemistry of resin glycosides of the convolvulaceae family. *Nobel Symposium* **25**, 235-240.
- Wagner, H. y Kazmaier, P. (1971) Struktur der operculinsäure (ramnoconvolvulinsäure) aus *Ipomoea operculata* Martin. *Tetrahedron Letters*, 3233-3236.
- Wagner, H. y Schwarting, G. (1977) Struktur der microphyllinsäure aus dem harz von *Convolvulus microphyllus*. *Phytochemistry* **16**, 715-717.
- Wagner, H., Wenzel, G. y Chari, V.M. (1978) The turpethinic acids of *Ipomoea turpethum* L. *Planta Medica* **33**, 144-151.
- Wallis, T.E. (1966) *Manual de Farmacognosia*. Ed. C.E.C.S.A., México, pp. 477-481.
- Weber, J.M. y Ma, T.S. (1976) Microchemical investigations of medicinal plants. XIV. Identification of the alkaloids in the leaves of *Ipomoea violacea* using preparative thin layer chromatography and solid probe mass spectrometry. *Mikrochimica Acta* **I**, 227-242.
- Weinberg, R.A. (1985) The action of oncogenes in the cytoplasm and nucleus. *Science* **230**, 770-776.
- Wender, P.A. (1993) Chemical and biological studies on cancer chemotherapeutic leads: taxol, phorbol and DNA cleaving agents. *Proceedings of the 34th Annual Meeting*

of the American Society of Pharmacognosy. San Diego, California, julio 18-22.
Resumen S-5.

Wise, B.C., Glass, D.B., Chou, C.H., Raynor, R.L., Katoh, N., Schatzman, R.C., Turner, R.S., Kibler, R.F. y Kuo, J.F. (1982) Phospholipid-sensitive Ca^{2+} -dependent protein kinase from heart, II. Substrate specificity and inhibition by various agents. *Journal of Biological Chemistry* **257**, 8489-8495.

Wolfender, J.L., Maillar, M., Marston, A. y Hostettmann, K. (1992) Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides. *Phytochemical Analysis* **3**, 193-214.

Yasuda, I., Kishimoto, A., Tanaka, S., Tominaga, M., Sakurai, A. y Nishizuka, Y. (1990) A synthetic peptide substrate for selective assay of protein kinase C. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **166**, 1220-1227.