

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

**SINTESIS Y EVALUACION DE
BIORREGULADORES**

T E S I S

Que para obtener el título de:

Q U I M I C O

P r e s e n t a

AIDA NELLY GARCIA ARGAEZ



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

INDICE

	Páginas.
I. INTRODUCCION.	1
II. ANTECEDENTES.	3
2.1 Plantas	4
2.2 Cultivo de Tejidos.	7
2.3 Precursores.	11
2.4 Sitios de Síntesis	13
2.5 Transporte de Metabolitos.	14
2.6 Tubérculo.	15
2.7 Degradación de la Diosgenina.	16
III. PARTE EXPERIMENTAL QUIMICA.	18
3.1 Condiciones Generales.	18
3.2 Síntesis de Biorreguladores.	19
IV. PARTE EXPERIMENTAL BIOLOGICA.	28
4.1 Condiciones Generales.	28
4.2 Métodos Aplicados.	39
4.3 Procesamiento de Muestras.	54

	Páginas.
V. RESULTADOS Y DISCUSION,	78
5.1 Sustancias Químicas.	78
5.2 Tratamientos.	78
5.3 Hidrólisis-Extracción.	80
5.4 Determinación por Cromatografía Gas-Líquido.	82
5.5 Actividad de las Sustancias.	82
5.6 Relación Estructura-Actividad.	89
VI. CONCLUSIONES.	90
VII. BIBLIOGRAFIA.	91

I

I. INTRODUCCION

La industria esteroideal mexicana ha tenido gran auge desde 1949, cuando Russel E. Marker confirmó que las saponinas de plantas podrían transformarse fácilmente en hormonas sexuales de mamíferos. Marker inició una ardua búsqueda de plantas productoras de saponinas que lo condujeron a varias partes de Estados Unidos y México. Aquí encontró diferentes especímenes de Dioscoreas en el Edo. de Veracruz. Analizando estas encontró, que la Diosgenina de las Dioscoreas mexicanas representaban la materia prima óptima para la fabricación de hormonas.²

Las dioscoreas mexicanas que se comercializan como materia prima son Dioscorea floribunda, Dioscorea spiculiflora y Dioscorea composita, cuyo nombre genérico es el de barbasco.^{1,2,3}

Prácticamente todo el barbasco que se ha venido utilizando desde el principio (1949) ha sido de origen silvestre.^{1,2,3}

Desde hace 25 años, tanto en México como en otros países, se iniciaron ensayos para domesticar la planta en pequeños lotes experimentales. Se ha podido comprobar que el cultivo de la planta es técnica y económicamente viable.^{1,2,3}

En las condiciones actuales se puede contar con un rendimiento de 50 a 100 toneladas de barbasco fresco por -

hectárea de barbasco cultivado. En términos de diosgenina, la producción por hectárea se puede calcular entre 500 y 800 Kg. por cosecha.¹

El rendimiento del tubérculo fresco a barbasco seco es de 22% para la D. composita y de 33% para la D. floribunda. La concentración promedio de diosgenina es de 3.5 a 5% en base seca para la D. composita y de 4 a 5% en base seca para la D. floribunda.¹

Los conocimientos del cultivo y el procesamiento del barbasco a la fecha no se pueden considerar concluidos, faltando muchos problemas por resolverse.

En este trabajo se trató de inducir un aumento de la producción de diosgenina en el rizoma del barbasco, por medio de reguladores biológicos.

II. ANTECEDENTES

Debido a la enorme demanda mundial de sustancias esteroidales se han hecho estudios en plantas, tendientes a mejorar la producci3n de sus metabolitos que pueden servir de alguna manera como materia prima para la obtenci3n de esteroides.

El g3nero Dioscorea ha sido ampliamente estudiado des de 1936 por qu3micos y bot3nicos, ya que ciertas especies tienen materias primas ideales para la fabricaci3n de hormo nas esteroides. Algunos de estos estudios se llevaron a cabo con la finalidad de conocer el habitat de la planta. -- Otros con el prop3sito de mejorar la producci3n de los in termediarios esteroidales, se interesaron en encontrar los caminos biosint3ticos que la planta emplea en la elabora ci3n de estas sustancias.

Es as3 como se encuentra en la literatura una basta - informaci3n sobre plantas (y de sus respectivos componentes, rafz, tallo, hojas, tub3rculos etc.), cultivos de tejidos, sustancias precursoras, sustancias reguladoras del metabo lismo, sitios de s3ntesis, transporte activo, almacenamien to, degradaci3n, etc.

Para el presente trabajo se han seleccionado los estudios tendientes a mejorar y conocer la bios3ntesis de meta bolitos esteroidales bajo diferentes metodolog3as.

Tipo de estudios:

- 1) Plantas
- 2) Cultivo de tejidos
- 3) Precursores
- 4) Sitios de síntesis
- 5) Transporte de metabolitos
- 6) Tubérculo
- 7) Degradación de la diosgenina

1) Plantas.

Se han hecho estudios tendientes a mejorar la producción de esteroides por la aplicación de compuestos que han mostrado ser sustancias reguladoras del metabolismo en las plantas.

Estos estudios se han realizado en la semilla madura,⁹ semilla en germinación,⁸ en plantas con diferentes estados de crecimiento,^{17,15,6} y en partes de la planta.^{9,15,6}

En 1970 Hardman, R. y Wood, C. N.⁹ estudiaron los efectos de incubación de partes de fruta y de semilla parcialmente desengrasadas, de Balanites orbicularis, con clorofenoxi-ácidos, obteniéndose un incremento en la producción de diosgenina y yamogenina superior a un 20%.

Se vió que en este proceso el incremento en la producción de diosgenina es dependiente del tiempo, de la concentración y de la estrecha similitud de los fenoxiácidos con

su conocida actividad auxfínica.

Encontraron también que la máxima producción de saponina se observó cuando se aplicó 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) en concentraciones de 2×10^{-4} a 2×10^{-6} M y los ácidos 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y p-clorofenoxiacético en concentración de 2×10^{-6} M.

Investigando el contenido de saponina, se demostró que los fenoxiácidos incrementan la actividad de la saponina endógena durante la incubación. Además, experimentos con acetato-2- 14 C, sugirieron que la producción de diosgenina no fue causada por la biosíntesis de la misma.

Es posible que la ruptura de la pared celular bajo la influencia de compuestos auxfínicos, diera la liberación de la saponina enlazada y por lo tanto se aumente la producción de saponina.⁹

En 1971 estos mismos autores, Hardman, R. y Wood, C. N.⁹ germinaron semillas de Balanites orbicularis, observando que junto con este proceso, se incrementa la producción de diosgenina y yamogenina y se reduce el contenido del aceite del embrión. La incorporación de acetato 2- 14 C y colest-4-en-3-ona-4- 14 C indicó que el incremento se debió a la biosíntesis de saponina. El ácido 2,4,5-T inhibió la germinación y previno la incorporación de los precursores marcados dentro de la saponina. La incubación proporciona una cantidad adicional de diosgenina (25- α -epímero) principalmente, la cual se puede explicar por la liberación del mate

rial pre-existente enlazado. En contraste se encontró, que la germinación involucra la síntesis de yamogenina (25-B-epímero), y esta síntesis si es sensible al fenoxiácido. - La yamogenina adicional pudo haber sido sintetizada de nuevo o a partir de diosgenina vfa de la sapogenina Δ^{25} (27)

Los efectos de la clorofenil tiotrietil amina (CPTA) sobre el incremento en el contenido de esteroides, protefina y pigmentos en trigo c.v. Hércules, fueron examinados por Lier, J. B. y Lacroix, L. J. en 1974,¹⁷ por aspersión del compuesto en plantas en diferentes estados de crecimiento. Se obtuvieron óptimos resultados de la utilización del compuesto en trigo, cuando la aplicación se llevó a cabo en una concentración de 40 onzas por acre, en plántulas de una semana después de florecer.

En 1973 Geuns, J. M. C. y Vendrig, J. C.⁵ realizaron un trabajo que muestra el control hormonal de la biosíntesis de esteroides en Phaseolus aureus; para ello utilizaron secciones de hipocótilos de habichuelas de 1, 3 y 5 cm y encontraron que el ácido naftalenácetico (ANA) incrementa el contenido de esteroides, principalmente en las secciones de la zona del crecimiento de elongación, mientras que no hay estimulación significativa en tejidos de hipocótilos de 3 y 5 cm.

Para 1976 estos autores y otros, en este mismo sistema⁶ de hipocótilos de habichuelas de Phaseolus aureus, concluyen también, que hay una alta proporción en la biosíntesis de esteroides en tejidos de crecimiento activo, mientras

que, en tejidos más viejos, la síntesis de esteroides es disminuida por un bloqueo después de la síntesis de cicloartenol y que el envejecimiento está acompañado por un incremento de la proporción de stigmasterol/sitosterol, lo cual refleja una alteración en las propiedades de la membrana.

2) Cultivo de tejidos.

La diosgenina se ha aislado principalmente de los tubérculos de *Dioscoreas*; sin embargo, ya se encuentran establecidos cultivos de tejidos de éste y de otros géneros de plantas, que contienen cantidades apreciables de esteroides.

Kaul, B. y Staba, J.,¹⁵ en 1968, describieron que cultivos de tejidos en suspensión y estáticos diferenciados y no diferenciados de *Dioscorea deltoidea* Wall, crecidos en el medio de Murashige y Skoog, (utilizado también en tabaco) con y sin 2,4-D respectivamente, producen diosgenina. Los tejidos no diferenciados producen la diosgenina en cantidades significativas (aprox. 1%), mientras que, cultivos con tejidos diferenciados, producen solamente trazas. Este estudio sugiere que el sistema de cultivo de tejidos puede ser utilizado para la producción de diosgenina.

Stohs, S. J., Kaul, B. y Staba, E. J.,²⁵ en 1969, observaron en un cultivo en suspensión de células no diferenciadas de *Dioscorea deltoidea*, que el colesterol marcado

4-¹⁴C y 26-¹⁴C se convierte en diosgenina marcada, además de incorporarse en otros esteroides; y que la proporción de diosgenina incorporada es mayor que en sistemas anteriormente reportados.

Cultivos diferenciados (raíces) producen solamente trazas de diosgenina. Comparándolos con las cantidades significativas obtenidas en los cultivos no diferenciados y teniendo evidencias de que en estos últimos hay un mayor número de mitocondrias, los autores dan una posible explicación de esta diferencia, ya que las mitocondrias están íntimamente relacionadas con la biosíntesis de esteroides en plantas.²⁵

Los cultivos de callos derivados de las semillas germinadas de Dioscorea tokoro Makino, retienen la habilidad de sintetizar diosgenina en un medio de cultivo, durante un año, en un período similar al de las semillas en estado de latencia (Yutaka, T., Uomori, A. y Minato, H., 1969).²⁷

En un estudio de 16 semanas con cultivos de callos no diferenciados de Dioscorea deltoidea, llevado a cabo por Kaul et al,¹⁶ en 1969, se produjo mayor cantidad de diosgenina en la presencia de 0.1 ppm de 2,4-D que en su ausencia. Los cultivos en suspensión no diferenciados produjeron alrededor de 1.6 % de diosgenina en 56 días, después de lo cual decrece gradualmente, mientras que el máximo crecimiento celular fue registrado entre los 14 y 21 días. El sustrato inicial y pasaje de varios niveles de colesterol (10 a 100 mg/matraz) sobre cultivos en suspensión de Dioscorea

deltoidea, no produce alteración significativa en el peso celular seco. El suministro lento del colesterol alimentado (10 a 100 mg/matraz), estimuló la producción de diosgenina al décimo día de incubación, mientras que, el suministro inicial único, causó inhibición. El grado de estimulación en la producción de diosgenina fue más grande a niveles más altos de colesterol (100 mg/matraz). Las células cosechadas a los cuarenta y dos días, se pueden comparar con aquellas alimentadas pausadamente con los niveles más bajos de colesterol (10 mg/matraz) y cosechadas a los veintidós días. Una concentración alta (0.5 %) de un extracto de levadura proporcionó una mayor inducción de diosgenina por gramo en peso seco, pero este efecto se nulifica porque se reduce el crecimiento celular.

Una concentración de 0.1 ppm, de 2,4-D o simazina, fueron óptimas para el crecimiento y la producción de diosgenina. El ácido ascórbico actuó como inhibidor tanto para el crecimiento celular como para la producción de diosgenina en todos los niveles (10 a 100 mg/matraz) examinados.¹⁰

Vághjfalvi, D., Maróti, T., y Tétényi, P., en 1970,²⁰ aislaron diosgenina de cultivo de callos de Solanum laciniatum, en cantidades idénticas a las plantas de campo.

Heble, M. R., et al.¹¹ analizaron cultivos de tejidos de Solanum xanthocarpum que previamente habfan mostrado ser capaces de sintetizar solasodina, β -sitosterol y diosgenina y los sujetaron a la influencia de diferentes hormonas de plantas tales como 2,4-D (que sirve como control), ácido 3-indol-3-acético (A.I.A.), ácido indol butírico (A.I.B.), ci

netina y ácido giberélico (GA_3), aplicandolas por separado y en combinaciones; encontraron que es evidente que los tejidos en crecimiento activo, en un cultivo, son influenciados por las auxinas, cinetinas y el GA_3 en su potencial biosintético, además, es posible que ciertas funciones sean reducidas o simplificadas bajo las condiciones de cultivo, mientras que otras son enaltecidas, como lo muestra la ausencia de solasodina y el aumento de diosgenina con la aplicación exógena de AIA o AIB en el medio.

Para 1974 Stohs, S. J., Sabatka, J. J. y Rosenberg, H.^{25, 26} incubaron cultivos en suspensión de Dioscorea deltoidea con sitosterol marcado y encontraron que éste se incorporaba en diosgenina en una proporción considerable; además establecen que el C-23 no se involucra en esta transformación y que la primera etapa en la ciclización de la cadena lateral del esteroide es la oxigenación en el C-26.

También en cultivos de tejidos en suspensión de Dioscorea deltoidea, Jo. G. Marshall y Staba John E.,¹⁸ en 1975, probaron los efectos hormonales sobre la biosíntesis, de hormonas como 2,4-D., AIB, isopentiladenina (IPA) y benziladenina (BA), por separado y en combinación encontrando que medios con 2,4-D favorecen más frecuentemente la producción de diosgenina, mientras que altas concentraciones de BA y GA son tóxicas.

Meses más tarde estos autores describieron¹⁹ los efectos de otras hormonas naturales y sintéticas tales como AIA, AIB, BA, 6(γ , γ -dimetilamino) purina y 2,4-D sobre la pro

ducción de diosgenina en cultivos en suspensión de Dioscorea deltoidea. Las hormonas se combinaron y se probaron a cuatro concentraciones diferentes. El mayor crecimiento y la mejor producción de diosgenina (0.59 - 0.95 % por peso seco después de 3 semanas) se obtuvo con 0.1 mg/lit de 2,4-D en el medio. Se identificaron además de la diosgenina, sitosterol, estigmasterol y campesterol.

En cultivos de callos de Dioscorea deltoidea, H. C. Chaturvedi y S. N. Srivastava⁶ describieron que en subcultivos de estos tejidos a partir de tubérculos, se obtuvieron callos no diferenciados. Los callos aislados permanecen no diferenciados cuando se utiliza 1 mg/lit de 2,4-D ó 0.25 -- mg/lit de AIA con 0.25 mg de cinetina en un medio suplementado con 1g/lit de mioinositol. Además reportan que se desarrollan numerosas raíces cuando los callos se transplantan y se elimina el 2,4-D, o si la concentración de AIA se incrementa a 0.5 mg/lit. La concentración de sapogenina cristalina fue de 0.682 % en tejidos no diferenciados y de 0.567 % en tejidos diferenciados.

3) Precursores.

El conocimiento de las sustancias precursoras en la biosíntesis de esteroides es importante para poder intentar un control en la producción de estos compuestos.

Heftmann, Bennett y Bonner,¹² establecieron en 1960, la incorporación de acetato radioactivo en diosgenina, aunque la mayoría de este acetato es convertido en otros pro-

ductos por tubérculos de Dioscorea.

En 1963 Bennett, R. D., et al.,³ estudiando la biosíntesis de esteroides y saponinas en Dioscorea spiculiflora, -- trataron plantas con acetato y mevalonato marcados y analizaron los productos de síntesis en raíz y tallo, encontrando que sí hay una relación secuencial en la biosíntesis de β -sitosterol y estigmasterol, este último es formado por deshidrogenación de sitosterol en la cadena lateral. Por las altas actividades específicas de colesterol junto con las pequeñas cantidades presentes sugieren que puede ser un precursor de las saponinas. También encontraron que la diosgenina y la yamogenina son formadas a partir de un mismo precursor.

Graebe., J. E.⁷ incorporó mevalonato 2-¹⁴C marcado en Kaureno, escualeno y fitoeno, usando un sistema de células libres de frutos jóvenes de chícharo, y afirma que el escualeno es un producto común del ácido mevalónico en animales, plantas superiores y microorganismos. En este trabajo se concluye que los requerimientos necesarios para la biosíntesis de escualeno para una óptima producción son 3 mM de ATP con 25 mM de piruvato de fosfoenol, más de 12 nM de Mg Cl₂, 1mM de MnCl₂ y un pH de 6.5-7.5. Además Graebe establece que el camino de síntesis de isoprenoides en plantas permite la formación de esteroides a partir del escualeno.⁷

En un homogeneizado de hojas de Dioscorea floribunda se incubó¹¹ una saponina esteroideal de cadena abierta (furostanol I) y se vio que ésta se convertía en dioscina, que por

hidrólisis daba diosgenina pura. Este experimento y otros anteriores de los autores, Joly, A. R. et al., demostraron que la biosíntesis de dioscina en Dioscorea floribunda es a partir del colesterol vía el furostanol I.

Stohs, S. J., Kaul, B. y Staba, E. J.,²⁵ en un cultivo de células en suspensión no diferenciadas de Dioscorea deltoidea, encontraron que dos tipos de colesterol, uno marcado en el C-26 y el otro marcado en el C-4, eran incorporados a la molécula de diosgenina y por ser ambos metabolizados en cantidades casi iguales los autores sugieren que toda la molécula de colesterol está involucrada en la biosíntesis de la sapogenina.

En 1973, Geuns, M. C. y Vendrig, J. C.⁵ encontraron que el ácido naftalenacético (ANA) incrementa considerablemente la proporción de estigmasterol/sitosterol, después de haber incubado hipocótilos de 1 cm. de longitud de Phaseolus aureus, lo que sugiere que existe una etapa común, antes de la formación de estos esteroides, y que además es influenciada por la presencia del ANA. También se observa que el ANA aumenta el contenido de esteroides de esta planta y el incremento de esta síntesis puede ser explicado por una estimulada proporción de conversión de cicloartenol (CA) en esteroides.

Otros autores, en 1974,^{25,26} encontraron que el sitosterol marcado se incorpora en diosgenina en cultivos en suspensión de Dioscorea deltoidea.

4) Sitios de síntesis.

Los sitios de síntesis de esteroides se han estudia

do a diferentes niveles, a nivel de órganos en la planta¹ y a nivel de organelos en la célula.²⁵

Existen varios trabajos sobre este tema sin embargo sólo mencionaremos aquellos que tratan de esteroides y particularmente de la diosgenina.

En 1963 Bennett, R. D. y colaboradores¹ indicaron que los sistemas de vástagos de Dioscorea spiculiflora particularmente son los sitios de síntesis de esteroides y que el material sintetizado es rápidamente transportado a los tubérculos.

Resultados obtenidos²⁵ en células en suspensión de - Dioscorea deltoidea, de los análisis cualitativos y cuantitativos de esteroides y sapogeninas en la forma libre y glucosídica, asociados con cada fracción subcelular, sugieren que los sitios de mayor metabolismo y almacenamiento de colesterol en Dioscorea deltoidea son las fracciones mitocondriales, microsomales y citoplásmicas, y que gran parte de este colesterol es transformado en diosgenina y otros esteroides.

5) Transporte de Metabolitos.

El transporte de metabolitos esteroidales dentro de la planta ha sido poco estudiado.

En 1963, Bennett y colaboradores¹ observaron que la actividad biosintética de los vástagos es la más alta cuando compara la incorporación del ácido mevalónico dentro de los lípidos de este sistema, y al encontrar que las cantidades de todos los esteroides es más baja que en los tubérculos sugieren que la biosíntesis de esteroides es mayor en los

vástagos, pero que el sintetizado es rápidamente transportado al tubérculo.

6) Tubérculo.

Se han llevado a cabo estudios realizados en tubérculos de Dioscoreas.

Heftmann, Bennett y Bonner, en 1960,¹² se interesaron por estudiar la biosíntesis de esteroides a partir del acetato vía ácido mevalónico y en estos estudios utilizaron tubérculos de Dioscoreas por ser este género rico en diosgenina.

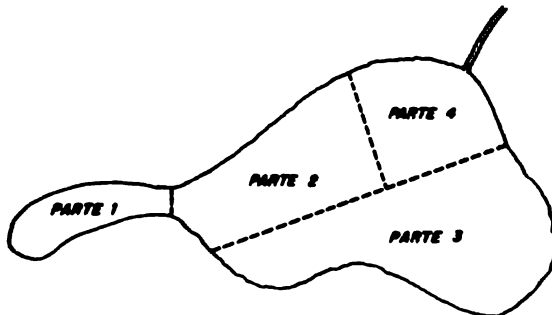


Figura No. 1

Dividieron un tubérculo de Dioscorea floribunda en secciones, según la figura No. 1. La incubación de cada una de las partes mostró que habfan diferencias significativas en el contenido de diosgenina y en la actividad biosintética, siendo

la porción cercana al vástago la más rica en diosgenina. La incorporación de acetato de sodio $1-^{14}\text{C}$ en diosgenina por la parte más baja es menor que en el caso de las otras porciones, por lo que estudios de la biosíntesis de esteroides se llevan a cabo con homogeneizados de tubérculo.

Estudios realizados con estos homogeneizados demuestran la incorporación de acetato de sodio radioactivo en diosgenina.

Un estudio reciente de las saponinas de raíz de Dioscorea floribunda¹³ muestra que la hidrólisis ácida dió diosgenina como la única sapogenina, encontrando además que ésta se encuentra formando parte de cinco glicósidos diferentes, los cuales se identificaron ampliamente.

Rozanski A.²² 1972, propone un método simplificado de extracción de diosgenina de tubérculos de Dioscorea y su determinación por Cromatografía gas-líquido.

7) Degradación de la diosgenina.

La degradación de diosgenina se ha manifestado principalmente en los procesos de extracción por hidrólisis ácida. Este efecto presenta grandes problemas en la evaluación cuali y cuantitativa de la sapogenina por lo que se ha tratado de evitar por varios métodos. Algunos productos de la degradación ya han sido identificados.

B. D. R., Et al.,³ encontraron en 1963, que la deshidratación de sapogeninas a $\Delta^{3,6}$ dienos, bajo condiciones ácidas, presenta un problema en los estudios cuantitativos y se puede disminuir su formación por el uso de una capa de benzeno con la cual las sapogeninas son extraídas cuando las saponinas son hidrolizadas.

Hardman, R.,¹⁰ en 1972, encontró que la fermentación de camotes antes de la hidrólisis reduce la formación del dieno y sugiere además que el proceso podría liberar la diosgenina del glicósido almacenado.

En una obtención común de diosgenina,¹⁹ utilizando HCl, seguida por la extracción con CHCl_3 se identificó al 25- Δ -spirosta-3,5-dieno como artefacto del procedimiento de hidrólisis. Los autores de este trabajo investigan las condiciones de hidrólisis para minimizar la producción del dieno y aumentar la producción de diosgenina. Las condiciones que encontraron son calentar a reflujo el tejido seco durante 2 horas con ácido clorhídrico al 20%.

III. PARTE EXPERIMENTAL QUIMICA

3.1 Condiciones Generales.

Los espectros de Infrarrojo (IR) se determinaron en un espectrofotómetro Perkin-Elmer 337, en película los líquidos y en pastilla los sólidos. Las absorciones en IR se expresan en cm^{-1} .

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de los compuestos se determinaron en un aparato Varian T-60, utilizando cloroformo deuterado (CDCl_3) como disolvente, a menos que se especifique otro. Se utilizó Tetrametil-Silano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos químicos se expresan en partes por millón (ppm). La descripción de los espectros se hizo de la siguiente manera: s=singulete, d=doble te, t=triplete, q=cuartete y m=multiplete. Las constantes de acoplamiento (J) se dan en ciclos por segundos (cps).

La cromatografía en capa fina, tanto para control como para purificación se hizo utilizando Gel de Silice GF-254 Merck.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato - - Fischer-Johns, y se reportaron los valores sin corrección.

3.2 Síntesis de Biorreguladores empleados.

Síntesis de: Cloruro de p-fluorobenzoato de
2-etil-N,N-dietilamonio. (1G)

METODO (A)

En un matraz de 2 bocas de 250 ml, provisto de un condensador en posición de reflujo protegido con trampa de cloruro de calcio y un embudo de adición, se colocaron 5 g - (0.042 moles) de 2-dietilaminoetanol disueltos en 50 ml de benceno y se adicionaron lentamente y con agitación 7.45 g (0.047 moles) de cloruro de p-fluoro-benzofilo, disueltos en 50 ml de benceno. Se agitó por 4 horas y después se calentó a reflujo por 45 minutos. Al terminar, la mezcla se filtró y el precipitado se lavó con hexano. En la recristalización del producto se utilizó acetato de etilo como disolvente, que al enfriarse produjo cristales blancos de cloruro de para-fluorobenzoato de 2 etil-N,N-dietilamonio, con punto de fusión de 115-117°C, (5.45 g). La concentración de las aguas madres produjo una cantidad adicional de producto (3.85 g). El rendimiento total calculado fue de 87.42%.

La caracterización del producto por su espectro de IR presentó las siguientes bandas: 3020 d (v. C-H Ar), 2970, 2900 d (v. C-H de metilos), 2920, 2870 d (v. C-H de CH₂ alifático), 2640 m (v. H-N cuaternario), 1740 f (v. C=O ester), 1600 f (v. C=C Ar), 1270 f (v. C-O-C ester asim.), 1100 f (v. C-O-C ester sim.), 770 f (v. para sust. Ar.).

La caracterización del producto por su espectro de RMN -- presentó las siguientes señales: 1.45 ppm (t, J=7.0 cps, -CH₂-CH₃), 3.30 ppm (q, J=7.0 cps, N-CH₂-CH₃), 3.52 ppm (t, J=5.5 cps, O-CH₂-CH₂-N), 4.89 ppm (t, J=5.5 cps, O-CH₂-CH₂-N), 7.09-8.21 ppm (m, H-Ar).

Siguiendo el método (A) se hicieron todas las siguientes reacciones de esterificación:

Síntesis de: Cloruro de m-bromo-benzoato de 2-etil-N,N-dietilamonio. (2G).

Se colocaron 5 g. de 2-dietilaminoetanol (0.0427 moles), disueltos en 25 ml de benceno y se adicionaron 10.32 g (0.047 moles) de cloruro de m-bromobenzoilo, disueltos en 25 ml de -- benceno. Se agitó durante 60 horas y se calentó a reflujo por 30 minutos. Al terminar, la mezcla se filtró y el precipitado se recristalizó de etanol, obteniéndose cristales blancos de - cloruro de m-bromobenzoato de 2-etil-N,N-dietilamonio, con punto de fusión de 181-182°C. El rendimiento calculado fue de -- 62.46 % que corresponden a 8.97 g del producto recristalizado.

La caracterización del producto por su espectro de IR -- presentó las siguientes bandas: 3020 d (v. C-H Ar), 2960, 2890 d (v. C-H CH₃), 2920, 2870 d (v. C-H de CH₂ alifático), - 2620 f (v. H-N cuaternario), 1735 f (v. C=O ester), 1600 d (v. C=C Ar), 1250 f (v. C-O-C ester asim.), 1130 f (v. C-O-C ester sim.), 745 m (v. m-sust. Ar).

La caracterización del producto por RMN presentó las siguientes señales: 1.42 ppm (t, J=7.0 cps, -CH₂-CH₃), 3.27 ppm

(q, $J=7.0$ cps, $N-CH_2-CH_3$), 3.48 ppm (t, $J=5.5$ cps, $O-CH_2-CH_2-N$)
4.90 ppm (t, $J=5.5$ cps, $O-CH_2-CH_2-N$), 7.29-8.20 ppm (m, $H-Ar$).

Se preparó la amina libre del ácido clorhídrico, para obtener su espectro de RMN y caracterizar mejor el producto. La RMN de la amina presenta las siguientes señales: 1.14 ppm (t, $J=7.5$ cps, $-CH_2-CH_3$), 2.70 ppm (q, $J=7.5$ cps, $-CH_2-CH_3$), 2.90 ppm (t, $J=6.75$ cps, $-CH_2-CH_2-N$), 4.49 ppm (t, $J=6.75$ cps, $-O-CH_2-CH_2-N$), 7.32-8.32 ppm (m, $H-Ar$).

Síntesis de: Cloruro de 1-naftoilato de 2-etil-N,N-dietilamonio. (3G).

Se colocaron 5 g de 2-dietilaminoetanol (0.0427 moles), disueltos en 75 ml de benceno, y se adicionaron 8.95 g (0.047 moles) de cloruro de 1-naftoilato, disueltos en 100 ml de benceno. Se agitó por 18 horas y se calentó a reflujo por 35 minutos. Al terminar, la mezcla se filtró y el precipitado se recristalizó 2 veces de metanol-éter. Se obtuvieron 2.96 g de cloruro de 1-naftoilato de 2-etil-N,N-dietilamonio, como cristales blancos de punto de fusión de 161-162°C, temperatura a la que sublima. La concentración de las aguas madres dió una cantidad adicional de producto (2.90 g). El rendimiento total calculado fue de 44.9 %.

El espectro de IR presentó las siguientes bandas: 3030 d (v. C-H Ar), 2960, 2890 d (v. C-H de CH_3), 2920, 2860 d (v. C-H de CH_2), 2650 m (v. H-N cuaternario), 1710 f (v. C=O ester), 1600 d (v. C=C Ar), 1235 f (v. C-O-C ester asim.), 1130 f (v. C-O-C ester sim.).

El espectro de RMN mostr6 las siguientes se~ales: 1.40 ppm (t, J=7.0 cps, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 3.28 ppm (q, J=7.0 cps, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.57 ppm (t, J=5.5 cps, $\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 4.95 ppm (t, J=5.5 cps, $\text{O-CH}_2\text{-CH}_2$), 7.46-9.02 (m, H-Ar).

Sfntesis de: Cloruro de 2-naftoilato de 2-etil-N,N-dietilamonio, (4G).

Se colocaron 5 g (0.0427 moles) de 2-dietilaminoetanol, disueltos en 70 ml de 6ter etilico, y se adicionaron 8.95 g (0.047 moles) de cloruro de 2 naftolo, disueltos en 125 ml de 6ter. Se calent6 a reflujo por 45 minutos y se agit6 por 12 horas a temperatura ambiente. Al terminar, la mezcla se -- filtr6 y el precipitado se lav6 con 150 ml de 6ter. De este precipitado se cristaliz6 solamente la parte soluble en metanol. El producto se cristaliz6 2 veces de metanol-6ter y se obtuvieron 5.67 g de cloruro de 2-naftoilato de 2-etil-N,N-die tilamonio con punto de fusi6n de 165-166°C. La concentraci6n de las aguas madres produjo una cantidad adicional de producto (4.55 g). El rendimiento total calculado fue de 77.81 %.

La caracterizaci6n del producto por su espectro de IR present6 las siguientes bandas: 3020 d (v. C-H Ar), 2950, 2880 d (v. C-H de CH_3), 2900, 2850 d(v. C-H de CH_2 alif6tico), 2600 m (v. H-N cuaternario), 1720 f (v. C=O ester), 1620 d (v. C=C Ar), 1280 f (v. C-O-C ester asim.).

La caracterizaci6n del producto por su espectro de RMN present6 las siguientes se~ales: 1.49 ppm (t, J=7.0 cps, CH_2 -

CH_3), 3.31 ppm (q, $J=7.0$ cps, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_3$), 3.55 ppm (t, $J=5.5$ cps, $\text{CH}_2\text{-CH}_2\text{-N}$), 4.98 ppm (t, $J=5.5$ cps, $\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2$), 7.67-8.05 ppm (m, H-Ar), 8.73 ppm (s, H-Ar).

Síntesis de: Cloruro de crotonilato de 2-etil-N,N-dietilamónio. (5G).

Se colocaron 6.16 g (0.0526 moles) de 2-dietilaminoetanol, disueltos en 50 ml de benceno seco, y se le adicionaron 5 g (0.0478 moles) de cloruro de crotonilo disueltos en 100 ml de benceno. Se agitó por 12 horas y se calentó a reflujo por 45 minutos. Al terminar, la mezcla se filtró y el precipitado se cristalizó primero de acetato de etilo y después de 2 veces de metanol-éter. En la recristalización se obtuvieron 2.88 g del cloruro de crotonilato de 2-etil-N,N-dietilamónio, con punto de fusión de 99-102°C. De las aguas madres se obtuvo una cantidad adicional (3.88 g) de producto impuro. El rendimiento total calculado fue de 63.72 %.

La caracterización del producto por su espectro de IR presentó las siguientes bandas: 2950 d (v. C-H de CH_3), 2910, 2860 d (v. C-H de CH_2 alifático), 2630 m (v. H-N cuaternario), 1725 f (v. C=O ester), 1650 m (v. C=C), 1170 f (v. C-O-C ester).

La caracterización del producto por su espectro de RMN mostró las siguientes señales: 1.52 ppm (t, $J=7.0$ cps, $\text{CH}_2\text{-CH}_3$), 1.99 ppm (dd, $J=3.0$ cps y $J=7.5$ cps, $\text{CH}_3\text{-CH=CH}$), 3.37 ppm (q, $J=7.0$ cps, $\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 3.51 ppm (t, $J=4.5$ cps, $\text{-N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 4.78 ppm (t, $J=4.5$ cps, $\text{N-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O}$), 6.0 ppm (qd, $J=3.0$

cps y $J=15.0$ cps, $-\text{CO}-\underline{\text{CH}}=\text{CH}-\text{CH}_3$), 7.19 ppm (qd, $J=7.5$ cps y $J=15.0$ cps, $-\text{CO}-\text{CH}=\underline{\text{CH}}-\text{CH}_3$).

Preparación de: Cloruro de 2,4-diclorofenoxiacetilo.
(intermediario).

En un matraz de 2 bocas de 1000 ml, provisto de un condensador en posición de reflujo protegido con trampa de cloruro de calcio anhidro y un embudo de adición, se colocaron 100 g (0.4524 moles) de ácido 2,4-diclorofenoxiacético suspendidos en 500 ml de CHCl_3 se adicionaron lentamente y con agitación --- 65.68 ml de cloruro de tionilo (107.59 g que corresponden a -- 0.904 moles) disueltos en 250 ml de CHCl_3 y se mantuvo en calentamiento a reflujo por 48 horas para que la reacción se completara, observándose la desaparición del precipitado. Al terminar, la mezcla se evaporó en el rotavapor y después se lavó 3 veces con volúmenes de 125 ml cada uno de CHCl_3 eliminando el disolvente en rotavapor. El residuo obtenido fue un líquido café que se destiló bajo presión reducida, recogiendo la -- fracción que destila a 120°C y 1,1 mm de mercurio, obteniéndose un líquido incoloro.

La cantidad de producto obtenido fue de 96.16 g que corresponde a un rendimiento de 88.72 %.

Síntesis de: Cloruro de 2,4-diclorofenoxiacetilato de 2-etil-N,N-dietilamonio. (7G).

Se colocaron 2.22 g (0.0189 moles) de 2-dietilaminoetanol,

disueltos en 75 ml de cloroformo, y se adicionaron 5 g (0.0208 moles) de cloruro de 2,4-diclorofenoxiacetilo, disueltos en 100 ml de CHCl_3 . Se agitó por 24 horas y se calentó a reflujo por 3 horas hasta desaparición del precipitado. Al terminar, la mezcla se filtró y el precipitado se recristalizó de metanol-éter. Se obtuvieron 5.74 g (84.92 % de rendimiento) de cristales blancos de cloruro de 2,4-diclorofenoxiacetilato de 2-etil-N,N-diethylamonio, con punto de fusión de 139-141°C.

La caracterización del producto por su espectro de IR - presentó las siguientes bandas: 3040 d (v. C-H Ar), 2960, 2870 d (v. C-H de CH_3), 2930, 2855 d (v. C-H de CH_2), 2610 m (v. H-N cuaternario), 1745 f (v. C=O ester), 1260 f (v. C-O-C ester asim.), 1070 f (v. C-O-C ester sim.).

La caracterización del producto por su espectro de RMN presentó las siguientes señales: 1.37 ppm (t, J=7.5 cps, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3.28 ppm (q, J=7.5 cps, $-\text{CH}_2-\text{CH}_3$), 3.51 ppm (t, J=5.25 cps, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$), 4.65 ppm (t, J=5.25 cps, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}$), 5.05 ppm (s, $-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}=\text{O}$), 7.18-7.49 ppm (m, H-Ar).

Preparación de: Cloruro de 2,4,5-triclorofenoxiacetilo (intermediario).

En un matraz de 2 bocas de 250 ml, provisto de un condensador en posición de reflujo protegido con trampa de cloruro de calcio anhidro y un embudo de adición, se colocaron 10 g (0.03918 moles) de ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, suspendido en 100 ml de cloroformo, y se adicionaron lentamente y con agitación 5.534 ml (0.07827 moles) de cloruro de tionilo disueltos en 75 ml de CHCl_3 . Se mantuvo en calentamiento a reflujo

por 24 horas hasta que desapareció el precipitado. Al terminar, la mezcla se evaporó en el rotavapor y después se lavó 3 veces con volúmenes de 75 ml cada uno de hexano eliminando el disolvente también en rotavapor. El precipitado se cristalizó rápidamente de hexano. Se obtuvieron cristales blancos de cloruro de 2,4,5-triclorofenoxiacetilo, con punto de fusión de -58-61°C. La cantidad obtenida fue de 8.48 g con un rendimiento calculado de 93.28 %.

Síntesis de: Cloruro de 2,4,5-triclorofenoxiacetilato de 2-etil-N,N-dietilamonio. (8G).

Se colocaron 7.5 g (0.0273 moles) de cloruro del ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético, disueltos en 100 ml de cloroformo, y se adicionaron 3.18 g (0.02717 moles) de 2-dietilamino-etanol disueltos en 50 ml de cloroformo. Se agitó durante 5 días y se calentó a reflujo por 24 horas. Al terminar, la mezcla se evaporó en el rotavapor y el precipitado se recrystalizó dos veces de metanol-éter. Se obtuvieron cristales blancos de cloruro de 2,4,5-triclorofenoxiacetilato de 2-etil-N,N-dietilamonio, con punto de fusión de 159-162°C. El rendimiento calculado fue de 51.52 %, que corresponden a 2.45 g del producto recrystalizado y 3.02 g de producto adicional que se encontraba en las aguas madres.

La caracterización del producto por su espectro de IR presentó las siguientes bandas: 2975, 2885 d (v. C-H de CH₃), 2940, 2860 d (v. C-H de CH₂ alifático), 2635 m (v. H-N cuaternario), 1775 f (v. C=O ester), 1595 d (v. anillo aromático es

queleto), 1495 f (v. C=C Ar), 1196 f (v. C-O-C ester asim.), -
1096 f (v. C-O-C ester sim.).

La caracterización del producto por RMN presentó las si-
guientes señales: 1.35 ppm (t, J=9.0 cps, $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_3}$), 3.13 ppm
(q, J=9.0 cps, $\text{N}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_3$), 3.30 ppm (t, J=6.0 cps, $-\text{CH}_2-\underline{\text{CH}_2}-\text{N}$),
4.70 ppm (t, J=6.0 cps, $\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{CH}_2$), 4.92 ppm (s, $-\text{O}-\underline{\text{CH}_2}-\text{COO}$),
7.27-7.51 ppm (m, $\underline{\text{H}}-\text{Ar}$).

IV. PARTE EXPERIMENTAL BIOLOGICA

4.1 Condiciones Generales.

Aparatos:

La cromatografía de gases se llevó a cabo en un --- cromatógrafo de gases Perkin-Elmer, modelo 3920. Se utilizaron 2 columnas diferentes, por lo que en cada muestra se especifica la columna empleada (Ver Procesamiento de muestras). Las columnas fueron: Columna de vidrio de 6 pies de longitud, 1/8 de pulgada de diámetro con fase líquida OV-17 al 3 % con soporte CGQ de malla 100/120 y la columna de 6 pies de longitud de 1/8 de pulgada de diámetro con fase líquida OV-101 al 3 % con soporte WAW DMCS de malla 80/100.

El gas acarreador fue nitrógeno con un flujo de 30 ml/min.

El detector utilizado fue de ionización de flama FID con gas hidrógeno a 1.5 Kg/cm^2 y aire a 3.5 Kg/cm^2 .

La temperatura de la columna, del inyector y de la interfase se especifican para cada muestra. (Ver Procesamiento de muestras).

La velocidad de la carta del graficador fue de 12 pulgadas por hora.

El disolvente utilizado fué xileno.

Las curvas de calibración se prepararon utilizando mezclas de 5 α -colestano-3- β -ol (p. f. 141.5-142°C) como estándar interno y diosgenina (p. f. 204-207°C). Cada una de ellas muestra un solo pico en la cromatografía de gases.

Cálculos:

La determinación de diosgenina se llevó a cabo inyectando por duplicado 2 μ l del extracto xilénico proveniente de la hidrólisis extracción de cada muestra y calculando el promedio de las proporciones de las áreas o de las alturas (A) de los picos.

El contenido de diosgenina del tubérculo seco se calculó usando la fórmula:²²

$$\% \text{ Diosgenina} = \frac{A \cdot a}{b} \cdot \frac{m_1}{m_2} \cdot 100$$

donde "m₁" es la masa del estándar interno; "m₂" es la masa del barbasco seco; "a" es la intersección de la curva de calibración con el eje "y", por último "b" es la pendiente de la curva de calibración.

A los porcentajes de diosgenina de las muestras tratadas por los métodos (H), (I), (J) y (K) se les hicieron análisis estadísticos utilizando la distribución "t de Student".

El valor de "t" se calculó mediante la fórmula:

$$t = \frac{\bar{X} - \bar{Y} - \Delta}{\left(\frac{1}{n_x} + \frac{1}{n_y} \right)^{1/2} \left(\frac{\sum X_i^2 - n_x \bar{X}^2 + \sum Y_j^2 - n_y \bar{Y}^2}{n_x + n_y - 2} \right)^{1/2}}$$

Grados de Libertad: $n_x + n_y - 2$

donde: $X_i = X_1, X_2, \dots, X_n$

$Y_j = Y_1, Y_2, \dots, Y_n$

$$\bar{X} = \frac{1}{n_x} \sum_{i=1}^{n_x} X_i$$

$$\bar{Y} = \frac{1}{n_y} \sum_{j=1}^{n_y} Y_j$$

Los cálculos se hicieron para $\Delta=0$

El valor que se obtuvo de "t" se comparó en las tablas de distribución de "t" y se observó el porcentaje de confiabilidad de que las muestras son diferentes del control.

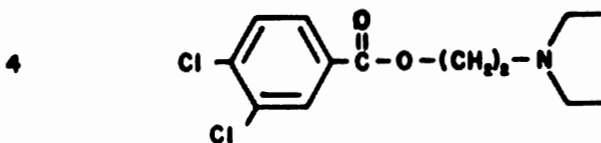
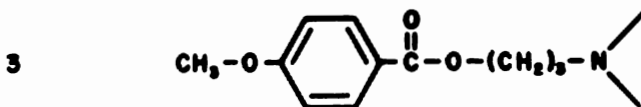
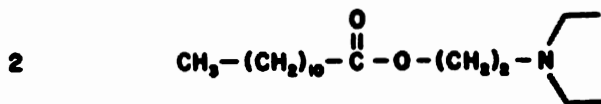
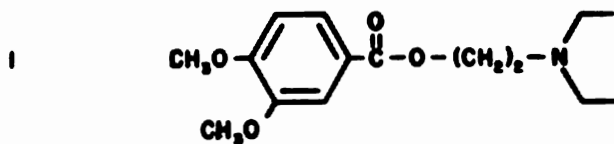
Los porcentajes de confiabilidad se indican de la siguiente manera:

* < 85 %
** > 85 %
*** < 90 %
**** > 90 %
***** < 98 %
***** < 99 %

LISTA DE COMPUESTOS APLICADOS

Número

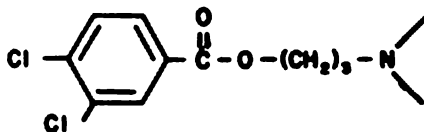
Fórmula



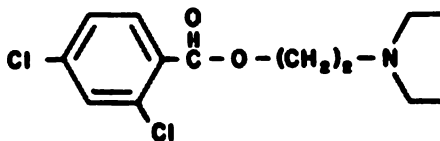
Número

Fórmula

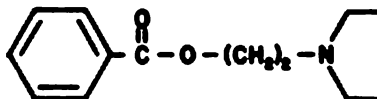
5



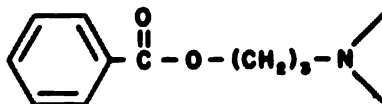
6



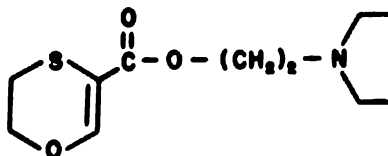
9



10



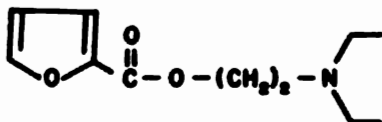
11



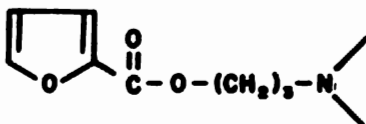
Número

Fórmula

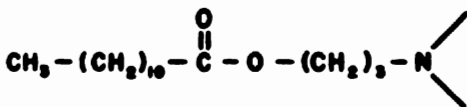
13



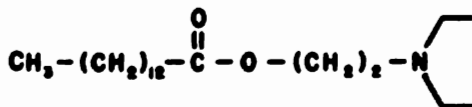
14



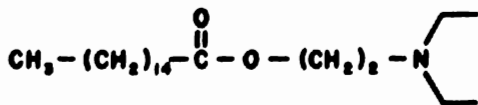
19



20

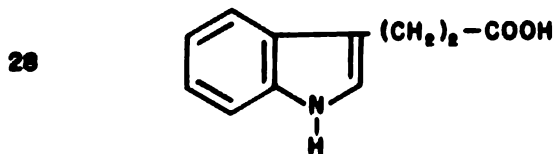
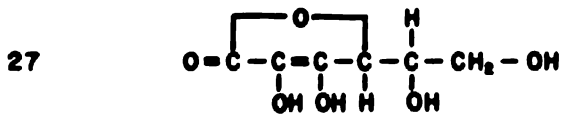
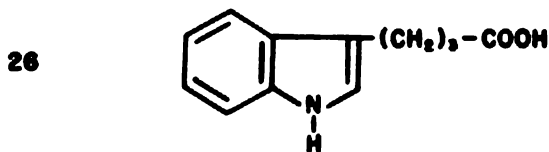
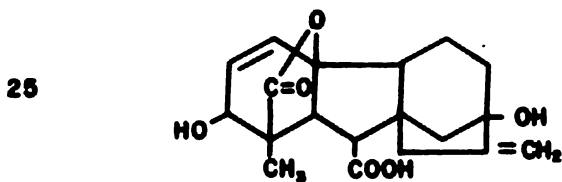
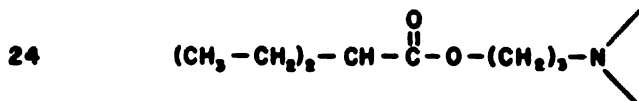


22



Número

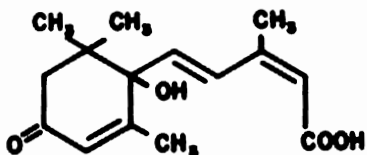
Fórmula



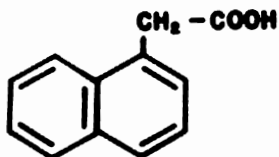
Número

Fórmula

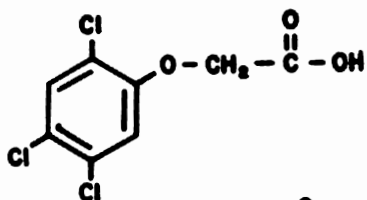
29



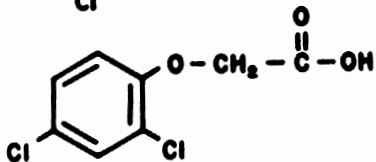
30



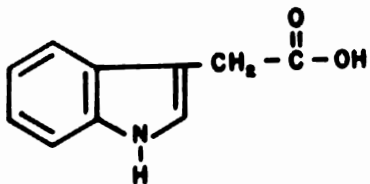
31



32



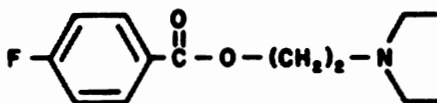
33



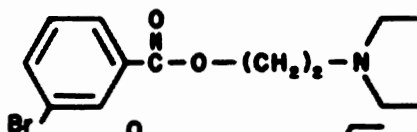
Número

Fórmula

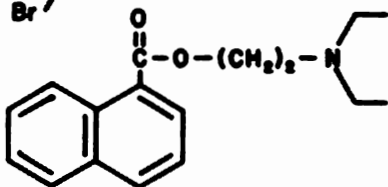
16



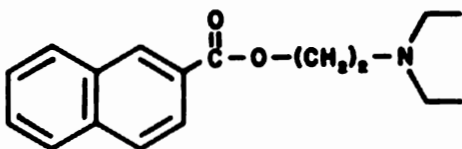
26



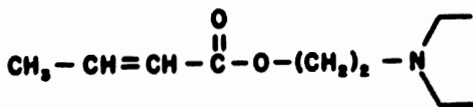
36



46



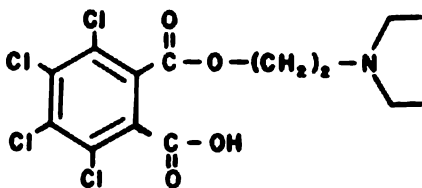
56



Número

Fórmula

66



4.2 Métodos Aplicados.

Método (A)

Tratamiento (A).

Una rebanada de tejido fresco de rizoma de barbasco con cáscara se colocó en un cristizador de 400 ml y se adicionaron 10 ml de solución acuosa del compuesto a probar, en una concentración de 1000 ppm y se dejó en reposo durante 7 días. Los compuestos probados fueron los números 1 y 2 por duplicado (Ver Figura No. 2). Al finalizar, la rebanada de camote se retiró de la solución y se secó en la estufa entre 100 y 103°C durante 4 horas. El camote seco, con cáscara, se molió en un mortero hasta tener un polvo fino.

Hidrólisis-Extracción (A).

En un matraz de 50 ml se colocó una cantidad pesada de barbasco finamente molido, una cantidad conocida de 5 α -colestán-3- β -ol, 8 ml de xileno y 8 ml de ácido clorhídrico 3 N. (Ver pág. 54). El matraz provisto de un refrigerante de aire se calentó a reflujo con agitación magnética vigorosa durante 4 horas.

Al terminar el calentamiento a reflujo, la mezcla se dejó enfriar y se decantó la solución xilénica, la cual, se analizó en el cromatógrafo de gases.²⁷

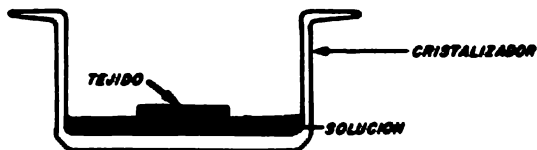


Figura No. 2

Análisis por cromatografía de gases (A).

Se inyectaron por duplicado 2 microlitos (μl) del extracto xilénico de cada muestra en el cromatógrafo de gases, con las condiciones necesarias (Ver pág. 54).

La curva de calibración se obtiene preparando, individualmente, cuatro soluciones standard que contienen 5, 10, 15 ó 20 mg de diosgenina y 5 mg del standard interno en 6 ml de xileno respectivamente. Se inyectan por duplicado 2 μl de cada solución.

Por triangulación se calcularon las áreas de los picos de diosgenina y del colestanol y se obtuvieron los promedios de las proporciones de las áreas (diosgenina/colestanol) que se graficaron contra los promedios de las proporciones de las masas.

Método (B)

a) Análisis del tejido:

Tratamiento (B).

Una rebanada de tejido fresco de rizoma de barbasco con cáscara, se colocó en un cristizador de 400 ml con 10 - ml de solución acuosa con una concentración de 1000 ppm del compuesto No. 1 y 100 mg de Benomil. (Ver Figura No. 2). Se dejó en reposo durante 8 días. Al finalizar, el tejido se retiró de la solución y se lavó con 75 ml de agua para quitar el hongo formado, se secó a la estufa entre 100 y 105°C durante 4 horas. El camote seco con cáscara, se molió en mortero hasta tener un polvo fino.

La Hidrólisis-Extracción y el análisis cromatográfico - se realizaron de la misma forma que el Método (A). (Ver págs. 55 y 56).

b) Análisis de la solución acuosa.

La solución acuosa y las aguas de lavado de las --- muestras de tejido tratadas según el método (B) se juntaron y se extrajeron con xileno.

En un embudo de separación de 250 ml se colocaron la solución acuosa y las aguas de lavado de cada muestra y se trataron con un volumen igual de xileno, que se emulsionó.

A la solución xilénica se le adicionó una cantidad

conocida de 5 α -colestano-3- β -ol (Ver pág. 55) y se analizó por cromatografía de gases de la misma manera que en el Método (A).

Método (C)

Tratamiento (C)

Camote de barbasco floribunda, de la región de Tapachula (Chiapas), se sembró en macetas y se mantuvo en el Invernadero de la División de Estudios de Posgrado (D.E.Pg), de la Facultad de Química, hasta que la planta tuvo una foliación frondosa.

Sobre las plantas se aplicaron, por rocío, 25 ml de solución acuosa de los compuestos a probar en una concentración de 5000 ppm, con una pequeña cantidad de Ingsawet Ot-72 como agente humectante. Los compuestos probados fueron los números 1 y 2.

A la planta se le hicieron cortes de camote periódicamente. El camote cortado se secó a la estufa entre 100 y 105°C hasta que estuvo completamente seco. El camote, con cáscara, se molió en mortero hasta tener un polvo fino.

Hidrólisis-Extracción (C).

En un matraz hola de 50 ml se colocó una cantidad pesada del barbasco finamente molido, se añadieron 8 ó 4 ml de una solución de 5 α -colestano-3- β -ol de concentración conocida en xileno y 8 ó 4 ml de solución de HCl 3N (ver páginas 56 a 59). Al matraz se le colocó un refrigerante de aire y se calentó a reflujo

con agitación magnética vigorosa durante 4 horas. Al terminar el reflujo la mezcla se dejó enfriar, se centrifugó y se decantó la solución xilénica, la cual se analizó en el cromatógrafo de gases de la misma forma que en el Método (A) (Ver páginas 56 a 59).

Método (D)

Tratamiento (D).

Se tomaron hojas y tallos por separado de barbasco floribunda de las plantas sin tratamiento, sembradas en maceta en la D. E. Pg. Tanto las hojas como los tallos se secaron en la estufa entre 100 y 105°C y se molieron en mortero.

La Hidrólisis-Extracción de las muestras se llevó a cabo según el Método (C) (Ver pág. 60).

Análisis por Cromatografía de Gases (D).

Se inyectaron por duplicado 2 μ l del extracto xilénico de cada muestra.

La curva de calibración se obtuvo preparando individualmente tres soluciones estándar que contengan 10, 25 ó 35 mg de diosgenina y 10 mg del estándar interno en 6 ml de xileno, respectivamente.

Con las alturas de los picos de diosgenina y del colestano se obtuvieron los promedios de las proporciones de la altura del pico de diosgenina, entre la altura del pico de colestano, que se graficó contra los promedios de las proporciones de las masas.

La determinación de diosgenina de las muestras se llevó a cabo inyectando por duplicado 2 μ l del extracto xilénico de cada muestra y calculando el promedio de las proporciones de las alturas, el cual es directamente proporcional al contenido de diosgenina.

Método (E)

Tratamiento (E).

Un trozo de barbasco floribunda de la región de Tapachula, Chiapas, que se encontraba refrigerado, se cortó en rebanadas.

En cuatro diferentes cristalizadores se colocó una rebanada de tejido con cáscara sobre papel filtro como lo muestra la figura número 3 y se adicionaron sobre el fondo del cristalizador, 20 ml de diferentes soluciones, mencionadas a continuación.

En un cristalizador se adicionaron 20 ml de agua; en otro se colocaron 20 ml de solución del compuesto No. 2 en una concentración de 1000 ppm (estos ensayos se repitieron posteriormente por duplicado en otro grupo de muestras); en otro cristalizador se colocaron 20 ml de solución de Sulfito de Sodio (Na_2SO_3) en una concentración de 50 ppm; y en el último se adicionaron 20 ml de solución del compuesto No. 2 en una concentración de 1000 ppm con 50 ppm de Na_2SO_3 .

Los cristalizadores se taparon y se dejaron en reposo durante 12 días. Al terminar, cada rebanada se colocó en una caja Petri y se secó a la estufa entre 100 y 105°C, hasta que

estuviera completamente seca. Todo el camote se molió en mor
tero para tener un polvo fino.

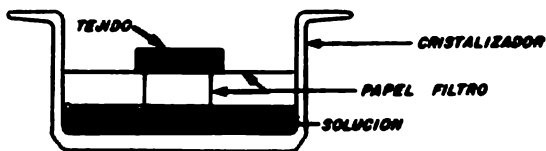


Figura No. 3

La Hidrólisis-Extracción de las muestras se lleva a cabo de la misma forma que el Método (C) y la Cromatografía de gases según el Método (D) (Ver págs. 60 y 62).

Método (F)

Tratamiento (F)

Un trozo de barbasco floribunda de la región de Tapachula, Chiapas, que se encontraba refrigerado, se cortó en rebanadas. Cada rebanada se cortó en trozos y estos trozos se molieron en mortero hasta desmenuzar el camote.

En cuatro diferentes matraces erlenmeyer de 50 ml, se

depositan partes iguales del camote molido y se les adicionaron 20 ml de diferentes soluciones, quedando en suspensión como se muestra en la Figura No. 4,

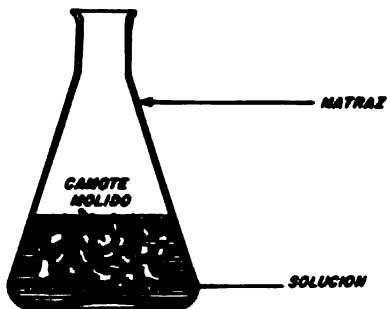


Figura No. 4

A uno de los matraces se le adicionaron 20 ml de agua; en otro se colocaron 20 ml de solución del compuesto No. 2 -- (estos ensayos se repitieron posteriormente por duplicado en otro grupo de muestras); en otro matraz se adicionaron 20 ml de solución del compuesto número 2 en una concentración de 1000 ppm con 50 ppm de Na_2SO_3 y en el último se adicionaron 20 ml de solución de Na_2SO_3 en una concentración de 50 ppm.

Los matraces se taparon y se dejaron en reposo durante 12 días. Al terminar, cada una de las mezclas se colocaron en una caja Petri y se secaron a la estufa entre 100 y 105°C, hasta que estuvieron secas completamente. Todo el residuo se raspó de la caja y se molieron en mortero hasta obtener un polvo fino.

La Hidrólisis-Extracción de las muestras se llevó a cabo de la misma manera que en el Método (C) v la Cromatografía de Gases según el Método (D) (Ver págs, 60 a 62).

Método (G)

Tratamiento (G).

A una sola muestra se le aplica este tratamiento. Un trozo de barbasco refrigerado se secó en la estufa entre 100 y 105°C, hasta que el camote estuvo completamente seco se molió en mortero y se obtuvo un polvo fino.

Hidrólisis-Extracción (G).

El polvo de barbasco se pesó y la Hidrólisis-Extracción de la muestra se realizó según el Método (C), refluendo durante 91 horas con agitación vigorosa. Al terminar el reflujo, la mezcla se dejó enfriar, se centrifugo y se decantó la solución xilénica, la cual se analizó por Cromatografía de gases según el Método (D) (Ver pág.62 y 63).

Método (H)

Tratamiento (H).

A varios pedazos de camote refrigerado se les quitó la cáscara, se cortaron, se picaron en trocitos pequenísimos y se juntaron.

Los trocitos se revolviéron y la mezcla se fraccionó en varias partes, cada una de aproximadamente 2 gramos. Cada parte se molió en mortero hasta que el barbasco se desmenuzó.

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml se colocó el barbasco desmenuzado con 20 ml de la solución del compuesto a probar. Cada compuesto se probó por duplicado en una concentración de 2500 ppm durante 12 días como lo muestra la Figura No. 4.

Los compuestos aplicados por duplicado fueron: Compuesto No. 1, 2, 3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 13, 14, 19, 20, 22, 24, 1G, 2G, 3G, 4G y 5G.

El matraz se tapó y la mezcla se vació en una caja Petri y se secó a la estufa entre 100 y 105°C hasta que quedó un residuo sólido.

El residuo sólido se raspó de la caja y se molió en mortero hasta tener un polvo fino.

Hidrólisis-Extracción (H).

La Hidrólisis-Extracción de las muestras se realizó de la misma manera que en el Método (C), variando solamente el tiempo de reflujo a 5 horas y sin agitación magnética (Ver páginas 63 a 68).

El análisis por cromatografía de gases se realizó según el Método (D) (Ver páginas 63 a 68).

Método (I)

A varios trozos de camotes de Dioscorea floribunda refrigerado se les quitó la cáscara y se cortaron en pedazos. Los pedazos de barbasco se molieron con hielo en la licuadora en una proporción de 10 g de agua por cada 2 g de barbasco. La mezcla del camote con hielo se dividió en 42 partes iguales.

En un matraz Erlenmeyer de 50 ml se colocaron 10 ml de solución del compuesto a probar en una concentración al doble de la deseada y cada una de las partes de mezcla que contienen aproximadamente 2 g de barbasco y 10 ml de agua frfa. Cada compuesto se probó por duplicado a 2 tiempos diferentes,

Los Compuestos Aplicados son:

Compuesto No.	Concentración de la solución	Concentración de la solución al adicionarla
25	4 ppm	2 ppm
26	4 ppm	2 ppm
27	2000 ppm	1000 ppm
28	4 ppm	2 ppm
29	4 ppm	2 ppm
30	4 ppm	2 ppm
31	4 ppm	2 ppm
32	4 ppm	2 ppm
33	4 ppm	2 ppm

El matraz con la mezcla se dejó reposar durante 1 ó 7 días. Al terminar este tiempo la mezcla se vació completamente a un matraz bola de 50 ml con junta 24/40 y se secó a la estufa entre 95 y 100°C durante toda una noche hasta que quedó un residuo sólido.

Hidrólisis-Extracción (I).

Al matraz con el barbasco seco previamente pesado, se le adicionaron 4 ml de solución xilénica de 5 α -colestán-3- β -ol de concentración conocida, (Ver págs. 68 a 72) y 4 ml de solución de HCl 3N. Al matraz se le adaptó un refrigerante de aire y se calentó a reflujo con agitación vigorosa durante 4 horas. Al terminar el reflujo la mezcla se dejó enfriar, se centrifugó y se decantó la solución xilénica, la cual se analizó en el cromatógrafo de gases según el Método (D) (Ver páginas 68 a 72).

Método (J)

Tratamiento (J).

Se utilizaron varios camotes de barbasco floribunda refrigerado, se les quitó la cáscara y se cortaron en pedazos. Los pedazos de barbasco se molieron con hielo en la licuadora en una proporción de 12 g de hielo por cada 2 g de barbasco. Esta mezcla se fraccionó en 35 partes aproximadamente iguales.

En cada matraz Erlenmeyer de 50 ml se colocaron cada una de las partes que contenían aproximadamente 2 gramos de barbasco y 12 ml de agua y se adicionaron 8 ml de una solución del

compuesto a probar. Cada compuesto se probó por quintuplicado y a continuación se menciona la concentración de las soluciones.

Los compuestos aplicados por este método fueron:

Compuesto No.	Concentración de la solución	Concentración de la solución al adicionarla a la mezcla.
25	5 ppm	2 ppm
26	5 ppm	2 ppm
27	2500 ppm	1000 ppm
28	5 ppm	2 ppm
29	5 ppm	2 ppm

Los matraces con las mezclas se dejaron reposar durante 4 días. Al finalizar el tiempo las mezclas se vaciaron cada una de ellas a un matraz de bola de 50 ó 100 ml con junta 24/40, previamente pesado, y se secaron a la estufa entre 95 y 100°C durante toda una noche hasta que quedó un residuo sólido que se pesó y se hidrolizó.

Hidrólisis-Extracción (J).

El residuo sólido que quedó en cada uno de los matraces de bola se pesó por diferencia y se les adicionaron HCl 3 N y solución de 5 α -colestán-3- β -ol en xileno (de concentración 850 mg/l) a razón de 4 ml de xileno y 4 ml de ácido por cada 300

mg de residuo sólido. A los matraces se les adaptó un refrigerante de aire y se calentaron a reflujo por 4 horas. Al terminar el reflujo las mezclas se dejaron enfriar, se centrifugaron y se decantó la solución xilénica, la cual se analizó por cromatografía de gases según el Método (D) (Ver páginas 72 a 74).

Método (K)

Tratamiento (K)

Se utilizaron varios camotes de Dioscorea floribunda refrigerado, se les quitó la cáscara y se cortaron en pedazos; los pedazos de barbasco se molieron con hielo en la licuadora en una proporción de 10 gramos de hielo por cada 2 gramos de barbasco. Esta mezcla se fraccionó en 65 partes aproximadamente iguales.

En cada matraz Erlenmeyer de 50 ml se colocaron 10 ml de solución del compuesto a probar en una concentración conocida y se adicionó cada una de las partes que contienen aproximadamente 2 gramos de barbasco y 10 ml de agua. Cada compuesto se probó por quintuplicado.

Los compuestos probados por este método fueron:

Compuesto No.	Concentración de la solución	Concentración de la solución al adicionar la mezcla
1	2×10^{-2} M	1×10^{-2} M
1	2×10^{-3} M	1×10^{-3} M
1	2×10^{-4} M	1×10^{-4} M
3	2×10^{-2} M	1×10^{-2} M
3	2×10^{-3} M	1×10^{-3} M
3	2×10^{-4} M	1×10^{-4} M
14	2×10^{-2} M	1×10^{-2} M
14	2×10^{-3} M	1×10^{-3} M
14	2×10^{-4} M	1×10^{-4} M
24	2×10^{-2} M	1×10^{-2} M
24	2×10^{-3} M	1×10^{-3} M
24	2×10^{-4} M	1×10^{-4} M

Los matraces con las mezclas se dejaron reposar durante 4 días. Al finalizar este tiempo las mezclas se vaciaron cada una de ellas a un matraz de bola de 50 ó 100 ml con junta -- 24/40, previamente pesado, y se secaron a la estufa entre 95 y 100°C durante toda una noche hasta que quedó un residuo sólido que se pesó y se hidrolizó según el Método (J). El análisis cromatográfico se realizó según el Método (D) (Ver páginas 74 a 77).

4.3 Procesamiento de Muestras,

Muestras No. 1 a 6

El camote utilizado fué barbasco floribunda, con --
cáscara, en rebanadas.

A todas las muestras se les aplicó el Método (A), (Tratamiento, Hidrólisis-Extracción y Análisis Cromatográfico). Las muestras 5 y 6 se utilizaron como controles.

La columna utilizada en la cromatografía de gases fué la OV-17-3 %.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg
1	1	0.3987	15
2	2	0.5370	15
3	2	0.6000	15
4	1	0.6000	15
5	C	0.4904	15
6	C	0.6000	15

Observaciones: Todas las muestras presentaron hongo y mal olor, además de que se resecaron.

Los valores de los porcentajes de diosgenina no se tabularon porque las muestras se utilizaron solamente como ensayos exploratorios.

Muestras No. 7 y 8 y soluciones

El camote utilizado fué barbasco floribunda, con cáscara, en rebanadas.

Todas las muestras se trataron según el Método (B).

La muestra No. 8 sirvió como control, por lo que sólo se le adicionaron 10 ml de agua. Las muestras 7s y 8s fueron las soluciones acuosas y las aguas de lavado de las muestras 7 y 8, respectivamente.

Para la Cromatografía de Gases se utilizó una columna OV-17-3 $\frac{1}{8}$, manteniendo en el aparato la temperatura de la interfase (T int.) a 300°C, la temperatura de la columna (T. col.) a 280°C y la temperatura de la inyección (T. inj.) a 300°C.

Muestra No.	Compuesto No.	barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina $\frac{1}{8}$
7	1	0.6013	7.0	4.01
8	c	0,6100	7.0	3.99
7s	1	--	8.8	0.00
8s	c	--	7.0	0.00

Observaciones: Los ensayos después del tratamiento presentaron hongo y mal olor, por lo que se lavaron con 75 ml de agua para extracción con un volumen igual de xileno.

En la extracción solo se utilizó la solución xilénica recuperada de la emulsión.

Muestras No. 9 a 11

Todas estas muestras se utilizaron como controles iniciales, por lo que el camote se cortó antes de ser rociadas las plantas 9, 10 y 11. Las muestras se procesaron según el Método (C).

En la Hidrólisis-Extracción de las muestras se utilizó solución de colestanol de concentración 850 mg/l.

Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna OV-17-3 %, y las temperaturas en el aparato para la columna, la interfase y la inyección fueron de 300°C.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina %
9	c	0.6000	6.80	1.18
10	c	0.6168	6.88	3.47
11	c	0.6001	6.88	1.76

Observaciones: (ninguna).

Muestras No. 13 a 15

Las muestras fueron procesadas según el Método (C); -- el camote se tomó de las plantas 9, 10 y 11, quince días - después de haber sido éstas rociadas. En la Hidrólisis-Extracción se utilizó solución de colestanol en una concentración de 850 mg/l. En el análisis cromatográfico se requirió de una columna OV-17-3 μ y manteniendo en el aparato - 300°C para la columna la interfase y la inyección.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina μ
13	c	296.5	3.4	0.88
14	1	380.0	3.74	5.39
15	2	313.0	3.4	3.82

Observaciones: La curva de calibración sólo se calculó con 2 soluciones standard como puntos de la curva.

Muestras No. 16 a 22

Todas las muestras se trataron según el Método (C). - Las muestras 16, 17 y 18 fueron cortes de camotes de las plantas 9, 10 y 11, después de 30 días de aplicado el compuesto. Las muestras 19, 20, 21 y 22 sirvieron como controles iniciales a tiempo cero, antes de ser rociadas las plantas 19 a 22 respectivamente. En la Hidrólisis-Extracción se utilizó solución de colestanol en una concentración de 850 mg/l. En la Cromatografía de gases se utilizó una columna OV-17 al 3 % - manteniendo 300°C de temperatura para la columna, la interfase y la inyección.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg	Diosgenina %
16	c	300	3.4	6.85
17	f	300	3.4	6.89
18	2	300	3.4	0.84
19	c	300	3.4	4.13
20	c	300	3.4	5.93
21	c	300	3.4	2.20
22	c	300	3.4	1.68

Observaciones: Los extractos xilénicos de estas muestras se volvieron a cromatografiar utilizando una columna OV-101-3 % y los resultados fueron muy similares.

Muestras No. 24 a 30

Para procesar estas muestras se utilizó el Método (C). Las muestras 24 a 26 fueron cortes de las plantas 9 a 11, -- respectivamente, después de 45 días de aplicado el compuesto. Las muestras 27 a 30 fueron cortes de las plantas 19 a 22, - respectivamente, después de 15 días de aplicado el compuesto. Al barbasco utilizado antes de secarse a la estufa, se le quitó la cáscara.

En la Hidrólisis-Extracción se utilizó solución de colestanol en xileno de 3.5 mg/4 ml.

En el análisis cromatográfico se utilizó una columna--OV-101-3 %. Las condiciones del aparato se varfaron constantemente en cada muestra. Los extractos se cromatografiaron repetidamente hasta optimizar los picos sin importar el número de veces que se corrieron. Las determinaciones de diosgenina se hicieron de una manera relativa ya que no se contó con una curva standard para cada situación.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg	Diosgenina %
24	c	328.5	3.5	4.38
25	1	301.3	3.5	1.24
26	2	310.0	3.5	7.32
27	1	300.0	3.5	6.46
28	1	307.6	3.5	5.34
29	2	300.0	3.5	7.23
30	2	300.0	3.5	5.45

Muestras No. 32 y 33

Las muestras se procesaron utilizando el Método (D). La muestra No. 32 contenía hojas de Dioscorea floribunda y la muestra 33 tallo de Dioscorea floribunda. En la Hidrólisis-Extracción de las muestras se utilizó solución de colestanol de concentración de 3.5 mg/4 ml. Para la cromatografía de gases se utilizó una columna OV-101-3 %, y las temperaturas del aparato fueron: en la interfase de 300°C, en la columna de 265°C y en la inyección de 300°C.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina %
32	--	302.3	3.5	0.00
33	--	349.6	3.5	0.00

Muestras No. 31 y 34 a 41

La muestra No. 31 no tuvo ningún tratamiento, sirvió como control inicial del camote utilizado para las muestras 34 a 41. Las muestras 34 a 37 se procesaron según el método (F) y se utilizó el Método (E) para las muestras 38 a 41.

En la Hidrólisis-Extracción se utilizó solución de colestanol de concentración de 3.5 mg/4 ml.

El análisis cromatográfico se realizó en una columna OV-101-3 % y las temperaturas que se mantuvieron fueron para la interfase de 300°C, para la columna de 265°C y para la inyección fué de 300°C.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg	Diosgenina %
31	C	300.1	3.5	0.57
34	H ₂ O	305.1	3.5	4.46
35	Na ₂ SO ₃	321.8	3.5	--
36	2	331.0	3.5	3.15
37	2 y Na ₂ SO ₃	437.2	3.5	2.63
38	H ₂ O	489.7	3.5	0.91
39	Na ₂ SO ₃	434.4	3.5	--
40	2	368.5	3.5	1.33
41	2 y Na ₂ SO ₃	380.7	3.5	1.11

Observaciones: Las muestras procesadas por el Tratamiento (F) se fermentaron. Las muestras procesadas por el tratamiento (E) presentaron hongo en la superficie de la rebanada.

Las muestras 35 y 39 se confundieron entre si, por lo que no se pudieron calcular los porcentos de diosgenina.

Muestras No, 42 a 50

La muestra 42 no tuvo ningún tratamiento, sirvió como control inicial del camote utilizado para las muestras 43 a 50. Las muestras 43 a 46 se procesaron según el método (F); y se utilizó el método (E) para las muestras 48 a 50.

En la Hidrólisis-Extracción se utilizó solución de co-
lestanol de concentración de 3.5 mg/4 ml.

El análisis cromatográfico se realizó en una columna -
OV-101-3 % y las temperaturas que se mantuvieron fueron para
la interfase de 300°C, para la columna de 265°C y para la in-
yección fué de 300°C.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg	Diosgenina %
42	C	461.0	3.5	1.92
43	H ₂ O	355.8	3.5	4.24
44	H ₂ O	294.8	3.5	4.27
45	2	308.0	3.5	4.03
46	2	341.5	3.5	4.00
47	H ₂ O	464.2	3.5	2.96
48	H ₂ O	433.4	3.5	2.74
49	2	403.5	3.5	2.57
50	2	330.3	3.5	3.32

Observaciones: Las muestras tratadas por el método (F)
se fermentaron. Las muestras procesadas por el tratamiento
(E) presentaron hongo en la superficie de la rebanada.

Muestra No. 51

Esta muestra se trató según el Método (G). Para la Hi

hidrólisis-Extracción se utilizó solución de colestanol de concentración 3.5 mg/4 ml. Las condiciones del aparato fueron: una columna OV-17-3 λ y 300°C de temperatura para la interfase, la inyección y la columna.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg	Diosgenina λ
51	C	303.3	3.5	0.70

Muestra No. 52 a 101

Las muestras números 98 a 101 se usaron como control inicial del camote, por lo que solamente se pusieron a secar y se les hizo la Hidrólisis-Extracción. Las muestras 94 a 97 sirvieron como controles durante los días de aplicación de las muestras 52 a 93, por lo que únicamente contenían agua. Todas estas muestras se procesaron según el Método (H).

La Hidrólisis-Extracción de las muestras se llevaron a cabo utilizando solución de colestanol de concentración 3.5 mg/4 ml y calentando a reflujo por 5 horas sin agitación magnética.

El análisis cromatográfico se realizó para las muestras 98 a 101 en una columna de OV-17-3 λ con temperaturas de 300°C en el aparato; y para las muestras 52 a 97 en una columna -- OV-101-3 λ con temperaturas de 300°C para la interfase y la

inyección y de 265°C para la columna.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg	Diosgenina %	Prom. Diosg. %
52	1	304.6	3.5	3.02	2.89**
53	1	327.3	3.5	2.76	
54	2	288.0	3.5	2.05	2.20*
55	2	309.2	3.5	2.35	
56	3	312.5	3.5	3.26	2.95**
57	3	318.1	3.5	2.63	
58	4	306.8	3.5	1.99	1.86*
59	4	338.6	3.5	1.73	
60	5	337.3	3.5	1.82	1.94*
61	5	301.1	3.5	2.06	
62	6	316.8	3.5	2.03	1.96*
63	6	265.6	3.5	1.89	
64	9	318.2	3.5	2.23	2.53*
65	9	325.6	3.5	2.83	

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg	Colestanol mg	Diosgenina %	Prom. Diosg. %
66	10	300.0	3.5	2.59	2.25*
67	10	306.2	3.5	1.90	
68	11	309.6	3.5	2.02	2.35*
69	11	371.1	3.5	2.68	
70	13	302.7	3.58	1.97	2.15*
71	13	298.5	3.5	2.32	
72	14	302.2	3.5	2.60	2.84***
73	14	303.3	3.85	3.08	
74	19	308.1	3.5	2.37	2.51*
75	19	305.5	3.5	2.64	
76	20	338.6	3.5	1.87	2.01*
77	20	353.5	3.5	2.14	
78	22	305.5	3.5	2.16	2.21*
79	22	316.8	3.5	2.26	
80	24	328.6	3.5	3.78	3.19***
81	24	301.9	3.5	2.60	

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina %	Prom. Diosg. %
82	1G	306.0	3.5	2.88	2.67*
83	1G	309.3	3.5	2.45	
84	2G	300.6	3.5	1.83	1.97*
85	2G	311.5	3.5	2.11	
86	3G	302.1	3.5	2.43	2.36*
87	3G	301.0	3.5	2.29	
88	4G	309.4	3.5	2.13	2.09*
89	4G	301.6	3.5	2.05	
90	5G	313.1	3.5	1.97	1.97*
91	5G	303.0	3.5	- -	
92	--	--	--	--	
93	--	--	--	--	
94	H ₂ O	367.7	3.5	2.32	
95	H ₂ O	299.6	3.5	2.17	2.62
96	H ₂ O	300.5	3.5	2.80	
97	H ₂ O	300.0	3.5	3.20	

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina %	Prom. Diosg. %
98	C	328.1	3.5	1.54	
99	C	337.5	3.5	1.26	
100	C	358.8	3.59	1.46	1.43
101	C	337.3	3.5	1.46	

Observaciones: Las notaciones indican (*) menor del 85%, (**) mayor del 85 % y (***) menor del 90 % de probabilidad de que las muestras fueran diferentes del control.

La muestra 81 se emulsionó en la Hidrólisis-Extracción y no se rompió por centrifugación, por lo que así se cromatografió.

La muestra 91 se perdió porque el matraz se rompió.

El compuesto 6G no fue soluble en agua por lo que no se aplicó en las muestras 92 y 93.

Muestras No. 64 a - 64 b - 72 a - y 72 b

El polvo fino de barbasco sobrante de las muestras 64 y 72 que fueron procesadas según el tratamiento (H) se utilizaron para las muestras 64 a y b y 72 a y b, respectivamente.

En la Hidrólisis-Extracción de las muestras se aplicó el Método (H) para las muestras 64 a y 72 b y el Método (C) para las muestras 72 a y 64 b. La solución de colestanol que se utilizó tenía una concentración de 3.5 mg/4 ml.

El análisis cromatográfico se realizó en una columna OV-101-3 % con temperaturas de 300°C para la interfase y la inyección y de 265°C para la columna.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina %
64 a	9	249.2	3.5	2.40
64 b	9	163.5	3.5	3.45
72 a	14	204.2	3.5	4.46
72 b	14	167.4	3.5	2.31

Observaciones: Las muestras 64 a y 72 b tuvieron 5 horas de reflujo sin agitación magnética y las muestras 64 b y 72 a tuvieron 4 horas de reflujo y agitación magnética vigo rosa.

Muestras No. 102 a 143

Todas estas muestras se procesaron según el Método (I). Las muestras 138 a 143 no contenían ningún compuesto, únicamente se les adicionó agua y sirvieron como controles durante el tratamiento de las muestras 102 a 137. En la Hidrólisis-Extracción se utilizó solución de colestanol en xileno. A to das las muestras se les adicionó 3.5 mg de colestanol (4 ml

de solución), con excepción de la muestra 129 que contenfa 3.59 mg y de la muestra 132 que contenfa 3.68 mg de colestanol. El análisis cromatográfico se realizó en una columna OV-17-3 † con temperaturas en la columna, interfase e inyección de 300°C.

Muestra No.	Compuesto No.	Días	Barbasco mg.	Diosgenina †	Promedio † Diosgenina
102	25	1	234.0	3.81	3.69*
103	25	1	196.3	3.58	
104	25	7	280.1	3.59	4.53**
105	25	7	181.7	5.48	
106	26	1	163.0	3.37	3.84*
107	26	1	211.8	4.30	
108	26	7	209.4	4.23	3.87
109	26	7	187.1	3.51	
110	27	1	909.1	1.62	2.49
111	27	1	307.6	3.37	
112	27	7	326.8	3.99	3.78*
113	27	7	444.2	3.57	

Muestra	Compuesto	Días	Barbasco	Diosgenina	Promedio Diosgenina
No.	No.		mg	g	g
114	28	1	368.8	3.68	3.73*
115	28	1	393.4	3.78	
116	28	7	354.4	4.13	3.63*
117	28	7	300.2	3.13	
118	29	1	530.2	2.43	2.80*
119	29	1	394.2	3.17	
120	29	7	346.8	6.79	6.00*****
121	29	7	354.5	5.21	
122	30	1	436.1	4.90	3.81*
123	30	1	474.6	2.72	
124	30	7	342.6	3.33	3.53*
125	30	7	588.0	3.83	
126	31	1	659.4	2.98	3.07*
127	31	1	538.4	3.16	
128	31	7	549.1	2.24	3.54*
129	31	7	316.1	4.84	

Muestra	Compuesto	Días	Barbasco	Diosgenina	Promedio Diosgenina
No.	No.		mg.	%	%
130	32	1	--	--	2.53*
131	32	1	1,050.1	2.53	
132	32	7	494.7	5.74	4.05*
133	32	7	523.3	2.36	
134	33	1	628.5	3.09	3.15*
135	33	1	706.3	3.21	
136	33	7	402.1	2.70	2.98*
137	33	7	687.0	3.25	
138	C	7	432.0	5.01	
139	C	7	542.0	2.80	3.39
140	C	7	492.7	2.38	
141	C	1	718.2	3.12	
142	C	1	551.7	2.95	3.05
143	C	1	592.1	3.09	

Observaciones: Las notaciones indican que los porcentajes de confiabilidad de las muestras fueron diferentes al control (*) para porcentajes menores del 85%, (**) para porcentajes mayores del 85% y (*****) para porcentajes menores del 98%.

El matraz que contenfa la muestra No. 130 se rompió en el calentamiento a reflujo.

Muestras No. 144 a 178

Las muestras 144 a 173 se procesaron según el Método (J). Las muestras 174 a 178 sirvieron como controles iniciales del camote, por lo que solamente se pudieron a sequedad y se hidrolizaron. Las muestras 169 a 173 sirvieron como controles durante los cuatro días de aplicación de las muestras 144 a 168, por lo que únicamente contenfan mayor cantidad de agua. En la Hidrólisis-Extracción se utilizó solución de colestanol de concentración 850 mg/l. En el análisis cromatográfico se utilizó una columna OV-17-3 y las temperaturas en el aparato fueron para todas las muestras de 300°C para la interfase y la inyección y en la columna, de 280°C para las muestras 144 a 150 y 152 a 157 y de 300°C para las muestras 158 a 178 y 151.

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina %	Promedio Diosgenina %
144	25	964.7	10.20	2.35	
145	25	546.2	5.95	2.55	
146	25	1,130.7	12.75	1.29	2.28***
147	25	741.9	8.50	2.63	
148	25	850.6	8.50	2.59	

Muestra No.	Compuesto No.	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosgenina %	Promedio Diosgenina %
149	26	917.9	10.20	2.61	
150	26	715.6	7.65	2.20	
151	26	465.5	4.25	2.57	2.42***
152	26	878.3	10.20	2.15	
153	26	625.0	6.80	2.58	
154	27	812.6	8.50	2.50	
155	27	750.1	8.50	2.52	
156	27	724.7	7.90	2.53	2.61***
157	27	810.5	8.50	2.52	
158	27	558.2	5.95	2.97	
159	28	859.9	10.20	2.63	
160	28	981.1	10.20	2.58	
161	28	1,247.7	13.60	2.44	2.48***
162	28	864.1	10.20	2.30	
163	28	905.4	10.20	2.45	
164	29	1,010.8	11.05	2.35	
165	29	788.9	8.50	1.93	
166	29	876.9	8.50	2.51	2.36***
167	29	871.1	10.28	2.59	
168	29	925.6	10.37	2.40	
169	H ₂ O	1,563.7	12.75	2.37	
170	H ₂ O	1,290.0	12.75	2.55	
171	H ₂ O	1,417.9	17.00	3.28	2.72
172	H ₂ O	1,439.5	16.15	3.01	
173	H ₂ O	1,240.9	13.60	2.41	

Muestra	Compuesto	Barbasco	Colestanol	Diosgenina	Promedio Diosgenina
No.	No.	mg.	mg.	%	%
174	C	1,298.1	14.45	2.36	
175	C	997.0	11.05	2.05	
176	C	763.7	8.50	1.63	1.93
177	C	1,337.1	12.75	2.02	
178	C	1,098.3	12.75	1.62	

Observaciones: Todas las muestras presentaron un porcentaje de confiabilidad (***) menor de un 90% de que las muestras sean diferentes al de las muestras de control.

Muestras No. 179 a 243

Todas las muestras se trataron según el Método (K). Las muestras 239 a 243 fueron controles durante los 4 días de aplicación de las muestras 179 a 238, por lo que únicamente contenían agua. En la Hidrólisis-Extracción se utiliza solución de colestanol de concentración 850 mg/l. Para el análisis cromatográfico se utilizó una columna OV-17-3 % y se mantuvo 300°C de temperatura en la interfase, en la inyección y en la columna.

Muestra	Comp.	Concentración	Barbasco	Colestanol	Diosg.	Promedio Diosg.
No.	No.	Molar	mg.	mg.	%	
179	1	1×10^{-2}	620.5	6.80	4.10	
180	1	1×10^{-2}	757.9	8.50	2.43	
181	1	1×10^{-2}	364.6	4.25	2.18	2.38*
182	1	1×10^{-2}	713.5	8.07	1.19	
183	1	1×10^{-2}	632.8	7.14	2.01	

Muest. No.	Comp. No.	Concentraci6n Molar	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosg. %	Promedio Diosgenina %
184	1	1×10^{-3}	620.0	7.05	5.05	
185	1	1×10^{-3}	476.4	5.44	3.04	
186	1	1×10^{-3}	518.4	7.05	4.08	3.39****
187	1	1×10^{-3}	428.5	4.84	3.03	
188	1	1×10^{-3}	544.9	6.20	1.78	
189	1	1×10^{-4}	478.2	5.44	3.28	
190	1	1×10^{-4}	271.7	3.40	5.39	
191	1	1×10^{-4}	443.0	5.05	1.40	3.29****
192	1	1×10^{-4}	414.7	4.67	1.32	
193	1	1×10^{-4}	411.1	4.76	5.05	
194	3	1×10^{-2}	273.4	2.72	5.15	
195	3	1×10^{-2}	464.6	5.18	5.04	
196	3	1×10^{-2}	578.2	6.54	1.49	3.69****
197	3	1×10^{-2}	433.9	4.93	3.56	
198	3	1×10^{-2}	514.9	5.86	3.22	
199	3	1×10^{-3}	445.3	5.10	1.25	
200	3	1×10^{-3}	496.5	5.61	1.49	
201	3	1×10^{-3}	534.5	5.95	3.26	2.71*
202	3	1×10^{-3}	393.3	4.25	4.82	
203	3	1×10^{-3}	519.6	5.95	--	
204	3	1×10^{-4}	477.4	5.10	4.34	
205	3	1×10^{-4}	495.5	5.52	4.97	

Muest. No.	Comp. No.	Concentración Molar	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosg. %	Promedio Diosgenina %
206	3	1×10^{-4}	505.8	5.95	5.24	3.98****
207	3	1×10^{-4}	527.7	6.12	4.44	
208	3	1×10^{-4}	1,011.2	11.47	0.91	
209	14	1×10^{-2}	479.5	5.10	1.10	
210	14	1×10^{-2}	445.9	5.10	2.06	
211	14	1×10^{-2}	493.4	5.52	1.28	1.4*****
212	14	1×10^{-2}	459.8	5.10	1.19	
213	14	1×10^{-2}	507.5	5.95	1.37	
214	14	1×10^{-3}	347.8	3.99	1.54	
215	14	1×10^{-3}	561.5	6.37	1.99	
216	14	1×10^{-3}	1,342.5	15.3	1.48	2.27***
217	14	1×10^{-3}	341.5	3.82	4.88	
218	14	1×10^{-3}	392.2	3.82	1.46	
219	14	1×10^{-4}	346.1	3.91	1.31	
220	14	1×10^{-4}	504.0	5.70	1.80	
221	14	1×10^{-4}	346.1	6.03	5.91	2.83***
222	14	1×10^{-4}	549.3	6.20	2.91	
223	14	1×10^{-4}	326.1	3.82	2.25	
224	24	1×10^{-2}	339.6	3.82	1.48	
225	24	1×10^{-2}	342.1	4.25	3.65	
226	24	1×10^{-2}	488.3	5.52	1.26	2.33***
227	24	1×10^{-2}	463.1	5.27	1.34	
228	24	1×10^{-2}	478.0	5.44	3.90	

Muest. No.	Comp. No.	Concentración Molar	Barbasco mg.	Colestanol mg.	Diosg. %	Promedio Diosgenina %
229	24	1×10^{-3}	444.8	5.01	1.47	
230	24	1×10^{-3}	490.3	5.52	1.72	
231	24	1×10^{-3}	564.4	6.37	1.46	2.32***
232	24	1×10^{-3}	508.5	5.86	3.11	
233	24	1×10^{-3}	425.1	4.84	3.86	
234	24	1×10^{-4}	667.8	7.65	2.12	
235	24	1×10^{-4}	561.3	6.37	4.10	
236	24	1×10^{-4}	1,162.0	13.17	1.26	2.50***
237	24	1×10^{-4}	419.9	4.76	3.31	
238	24	1×10^{-4}	478.6	5.44	1.72	
239	H ₂ O	C	636.2	7.23	1.98	
240	H ₂ O	C	785.2	7.22	1.98	
241	H ₂ O	C	364.5	3.91	2.68	2.24
242	H ₂ O	C	545.7	6.20	2.44	
243	H ₂ O	C	834.7	9.52	2.12	

Observaciones: El porcentaje de confiabilidad en el que las muestras fueron diferentes del control se marcaron (*) para menor del 85 %, (***) para menor del 90 %, (****) para mayores del 90 % y (*****) para menores del 99%.

El matraz que contenía la muestra No. 203 se rompió en el calentamiento a reflujo.

V. RESULTADOS Y DISCUSION

Basándonos en los estudios anteriores^{1-19 y 24-28} sobre las plantas y la inducción de sus metabolitos por agentes químicos externos, se procedió a la aplicación sobre barbasco de una serie de sustancias químicas, algunas previamente sintetizadas y otras de origen comercial.

5.1 Sustancias Químicas.

Las sustancias químicas sintetizadas fueron ésteres formados por cloruros de ácido y alcoholes de trialkuilaminas, de acuerdo a las técnicas reportadas en la literatura.²⁰ Algunas de estas sustancias químicas muestran actividad bioinductora de hule en guayule²¹ y en la biosíntesis de carotenos.¹⁷ Los compuestos de origen comercial fueron sustancias con conocida actividad auxínica, inhibidora o giberélica.

5.2 Tratamientos.

Para poder evaluar correctamente la bioinducción de diosgenina en el barbasco se procedió a evaluar una serie de bioensayos con el objeto de ver cual de ellos se apegaba más a nuestras necesidades. A continuación se mencionan las ventajas e inconvenientes de cada método usado.

El tratamiento (A) presentó el inconveniente de la formación de hongo en la superficie del tejido cortado, esto se trató de corregir en el tratamiento (B) con la adición de --

Benomil y en el tratamiento (E) con la adición de Sulfito de Sodio, sin embargo, las muestras tratadas con estas sustancias también presentaron hongo.

En estos tratamientos (A), (B) y (E), se observó un -- resecamiento en la parte del tejido que no era bañado por la solución lo que implica una aplicación no homogénea sobre el material tratado.

El tratamiento (C), en el cual las rebanadas procedían de plantas rociadas sobre las hojas con soluciones de las sustancias en estudio, presentó el inconveniente de que el barbasco cultivado se plagó con nemátodos. Para combatir éstos, se regó la tierra con 10 ml de $\text{CH}_2\text{-Cl}_2$ y 90 ml de una solución formada por 4 ml de clordano por cada 6 lt de agua. Con la utilización de estos insecticidas, los vástagos se secaron y las hojas se cayeron. Además de no tener hojas los vástagos, se observó que algunas plantas no volvían a foliar. -- Una supervisión de los camotes mostró que casi todos tenían nemátodos y que algunos ya estaban completamente descompuestos.

Las condiciones de cultivo de la planta ya han sido ampliamente estudiadas (1) y se ha visto que en caso de tener nemátodos como plaga es conveniente desechar los camotes. -- Por lo que se procedió a utilizar camotes de barbasco refrigerado.

En el tratamiento (D) se observó que la cantidad de -- diosgenina presente en hojas y tallos de D. floribunda es nula.

Estudios anteriores¹² han demostrado que hay diferencias significativas en el contenido de diosgenina y en la actividad biosintética de diferentes partes de un camote, por lo que los tratamientos (A), (B), (C), (E) y (F), donde se tomaron rebanadas de tejido, pueden ser no representativos de la planta. De esta manera se buscó un tratamiento en el cual se homogeneizara el camote.

En el tratamiento (H) se homogeneizó el camote picándolo en trocitos y revolviéndolos; sin embargo, se obtiene un mejor resultado con la técnica reportada por Heftmann, - - Bennett y Bonner.¹²

En los tratamientos (I), (J) y (K) se utilizó esta técnica,¹² en la cual el camote en trozos y sin cáscara se licuó con hielo molido, con el fin de no afectar la actividad enzimática y de mezclar perfectamente todos los rizomas. En estos tratamientos no se siguió la técnica de Hidrólisis-Extracción reportada por los autores, sino que se utiliza el método de Rozanski.²²

El tratamiento (K) fue el que proporcionó resultados - mas reproducibles y confiables.

Hidrólisis-Extracción.

El método de extracción y determinación de diosgenina en tubérculos de dioscoreas propuesto por Rozanski A.,²² fue el empleado en este trabajo, sin embargo, se hicieron algunas modificaciones al respecto.

Este método mostró precisión y exactitud comparable con métodos gravimétricos frecuentemente usados, pero es mucho más simple y más rápido. La Hidrólisis-Extracción son llevadas a cabo en un mismo matraz, usando un sistema de 2 fases y no es necesaria la etapa de extracción separada; en la determinación por cromatografía de gases se utilizó un standard interno.

En el método (A) la Hidrólisis-Extracción se llevó a cabo de la misma manera que en dicha técnica,²² aunque después (Hidrólisis-Extracción (C)) se utilizó la mitad de los materiales con objeto de disminuir el gasto de estos. Posteriormente en la Hidrólisis-Extracción (J), se utilizaron las cantidades de reactivos proporcionales a las cantidades de barbasco seco residual.

También con objeto de facilitar las mediciones se prepararon soluciones de colestanol de concentración conocida.

La variación para el método (H) consistió en calentamiento a reflujo durante 5 horas sin agitación magnética, a diferencia de las 4 horas de reflujo con agitación vigorosa sugeridas por Rozanski.²² Comparaciones posteriores (muestras Nos. 64 a, b y 72 a, b) mostraron que había una mejor extracción cuando se seguían las indicaciones de Rozanski.

En la Hidrólisis-Extracción (G) se observó que la cantidad de diosgenina decrece a medida que aumenta el tiempo de reflujo.

La Hidrólisis-Extracción que mejores resultados proporcionó fue (J).

Determinación por Cromatografía Gas-Líquido.

Las condiciones del aparato se ajustaron hasta tener una resolución óptima de los picos.

Se utilizaron indistintamente dos columnas (anteriormente mencionadas) y dieron respuesta constante a soluciones de concentraciones conocidas de colestanol y diosgenina mezcladas y sin mezclar.

Primero la determinación de diosgenina se hizo midiendo las áreas de los picos por triangulación, sin embargo, de un lote de muestras se calculó la cantidad de diosgenina, también, midiendo las alturas de los picos y resultó este método ser tan exacto como el anterior y más fácil de medir, por lo que posteriormente se utilizó este método para los cálculos.

Las mejores condiciones fueron mediante el Análisis Cromatográfico (D).

El método que proporcionó los resultados más reproducibles y confiables fue el (K).

Actividad de las Sustancias.

Trabajos realizados con clorofenoxiácidos,^{4,9,11,15,16,19} especialmente con 2,4-D y 2,4,5-T en concentraciones 2×10^{-4} , 2×10^{-5} y 2×10^{-6} M,⁹ también con CPTA,¹⁷ ANA,⁵ AIA, AIB, cinetina y GA₃,¹¹ reportaron que estas sustancias de alguna

manera inducen la producción de diosgenina, mientras que el ácido ascórbico actúa como inhibidor de la producción de diosgenina¹⁹ y altas concentraciones de GA₃ y BA son tóxicas para las plantas.

Con el propósito de ver la actividad biosintética de algunas de estas sustancias y de otras con actividades similares en la producción de diosgenina, se aplicaron los compuestos sobre homogeneizados de barbasco preparados según el método (I) a 1 y 7 días de aplicación.

Los compuestos probados de origen comercial fueron: 25 (GA₃), 26 (AIB), 27 (Acido ascórbico), 30 (ANA), 31 (2,4,5-T), 32 (2,4-D) y 33 (AIA).

Los tratamientos con los compuestos 25, 26, 28, 30 y 31 contuvieron porcentajes de diosgenina superiores al control a 1 y 7 días de aplicación. El compuesto 33 tuvo un porcentaje de diosgenina superior al control después de un día de aplicación, sin embargo, a los 7 días, es el único compuesto que se mantuvo inferior al control. Los compuestos 27, 29 y 32 después de un día de aplicación tuvieron porcentajes de diosgenina inferiores al control, sin embargo después de 7 días se incrementaron y son superiores al del control. En estos experimentos los niveles de confiabilidad se mantuvieron alrededor del 85% (Ver págs. 68 a 72), con excepción del compuesto 29 que después de 7 días de aplicación, mostró un nivel de confianza menor del 98%. Además esta sustancia presentó la mayor producción de diosgenina manteniéndose superior al control en un 76.99%.

De estos experimentos se escogieron las sustancias con

marcada actividad en la producción de diosgenina (compuestos Nos. 25, 26, 27, 28 y 29) y se probaron por quintuplicado utilizando el Método (J) durante 4 días de aplicación, con objeto de obtener mayores niveles de confianza.

Los nuevos experimentos mostraron que la producción de diosgenina es menor en todos los casos que en el control, - con un nivel de confianza menor al 90 %.

Comparando los resultados de los compuestos de origen comercial con aquellos reportados en la literatura se observó que: (Ver Tabla No. 1).

Tanto en sistemas anteriormente establecidos, como en los sistemas de homogeneizados de barbasco preparados por los Métodos (I) y (J), los clorofenoxiácidos 2,4-D y 2,4,5-T¹⁹ y el ANA,⁸ indujeron en la producción de diosgenina con un nivel de confianza menor del 85 % con excepción del 2,4-D que después de un día de aplicación mostró un efecto inhibitorio.

Los ácidos ascórbico y GA₃, que se reportaron^{11,16} - como inhibidores de la producción de diosgenina para otros sistemas, también mostraron un efecto inhibitorio de un 16.17 % y un 4.04% respectivamente inferior al del control, en el sistema homogeneizado de barbasco, con un nivel de confianza del 90 %.

El ácido indolacético, que se encuentra reportado¹¹

TABLA No. 1

Compuesto		Días de Aplicación	Incremento sobre el control %	Confiabilidad
No.	Nombre			
25	GA ₃	4	-16.17	***
26	AIB	4	-11.03	***
27	Ac. Ascórbico	4	- 4.04	***
28	AIP	4	- 8.82	***
29	Ac. Absfícico	7	76.99	*****
		4	-13.23	***
30	ANA	1	24.92	*
		7	5.6	*
31	2,4,5-T	1	0.65	*
		7	4.42	*
32	2,4-D	1	-17.05	*
		7	19.46	*
33	AIA	1	3.28	*
		7	-12.10	*

Las notaciones significan el porcentaje de confiabilidad de las muestras: (*) para menor del 85 %; (***) para menor del 90 %; y (*****) para menor del 98 %.

como promotor de la producción de diosgenina, se observó que, después de un día de aplicación en este sistema se promueve la producción de diosgenina; sin embargo, después de 7 días inhibe dicha producción, al compararla con el control, teniendo ambos resultados igual nivel de confianza (menor del 85 %).

El AIB, después de 4 días de aplicado ejerció un efecto inhibitorio en la producción de diosgenina con un nivel de confianza menor del 90 %, que es contrario al efecto reportado en la literatura¹¹ en otros sistemas.

No se encontraron reportes en la literatura del AIP y del ácido absfícico. Las aplicaciones de estos compuestos en los homogeneizados de barbasco mostraron que el ácido absfícico, después de 7 días de aplicación, indujo la producción de diosgenina en un 76.99 % superior al del control, con un nivel de confianza menor del 98 %. Los resultados posteriores mostraron a los 4 días de aplicado el compuesto un efecto inhibitorio en la producción de diosgenina con 13.23 % inferior al del control y con un nivel de confianza menor del 90 %.

El ácido indolpropiónico mostró después de 4 días de aplicado un efecto inhibitorio de un 8.82 % con un nivel de confianza menor del 90 %.

Una exploración previa sobre la actividad de todas las sustancias sintetizadas en el laboratorio se llevó a cabo con el Método (H).

Utilizando el Método (K), se probaron los compuestos 1,

3, 14 y 24, que previamente mostraron tener marcada actividad en la producción de diosgenina. Estas sustancias se probaron en tres concentraciones diferentes y por quintuplicado para tener un mayor nivel de confianza. Los resultados se observan en la Tabla No. 2.

De estos resultados se observó que todos los compuestos, en sus tres concentraciones, tienen una mayor producción de diosgenina sobre el control, con niveles de confianza alrededor del 90 %, a excepción de los compuestos: 14, a la concentración de $1 \times 10^{-2}M$, con un nivel de confianza menor del 99 %; el compuesto 1 a la concentración de $1 \times 10^{-2}M$, así como el compuesto 3 a la concentración de $1 \times 10^{-3}M$, con niveles de confianza menores del 85%.

Las mejores actividades de los compuestos para la inducción de diosgenina se tuvieron para el compuesto No. 1 a la concentración de $1 \times 10^{-3}M$, cuyo incremento sobre el control es de 51.34 %, con un nivel de confianza mayor del 90 % y a la concentración de $1 \times 10^{-4}M$, se incrementó sobre un 46.88 %, con un nivel de confianza sólo menor del 90%. Para el compuesto 3 la inducción de diosgenina fue: a la concentración de $1 \times 10^{-2}M$, un incremento de un 64.73 % y a la concentración de $1 \times 10^{-4}M$, un incremento de un 77.68 % sobre el control, con un nivel de confianza mayor del 90 %. El compuesto 14, a la concentración de $1 \times 10^{-4}M$, dió su mayor incremento en un 26.34% sobre el control, con una confianza menor del 90 %. Y el compuesto 24, a la concentración de $1 \times 10^{-4}M$ incrementa la producción de diosgenina en un 11.61 % sobre el control, con una confiabilidad menor del 90 %.

TABLA No. 2

Compuestos aplicados durante 4 días

Compuesto No.	Concentración Molar	Porcentaje de Diosgenina promedio	Incremento sobre el control %
1	1×10^{-2}	2.38*	6.25
	1×10^{-3}	3.39*****	51.34
	1×10^{-4}	3.29***	46.88
3	1×10^{-2}	3.69*****	64.73
	1×10^{-3}	2.71*	20.98
	1×10^{-4}	3.98*****	77.68
14	1×10^{-2}	1.40*****	-37.50
	1×10^{-3}	2.27***	1.34
	1×10^{-4}	2.83***	26.34
24	1×10^{-2}	2.33***	4.02
	1×10^{-3}	2.32***	3.57
	1×10^{-4}	2.50***	11.61

Los niveles de confianza de estas muestras son: (*) menor del 85 %, (***) menor del 90 %, (****) mayor del 90 %, y (*****) menor del 99 %.

La mayor actividad de inhibición en la producción de --- diosgenina se obtuvo en el compuesto 14, a la concentración de $1 \times 10^{-2} M$, con un nivel de confianza menor del 99 %, pero debido a que la alta concentración pudo causar efectos tóxicos.

Substancias reportadas previamente como inductores de diosgenina (Compuestos Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33) no tuvieron un efecto significativo en el incremento de diosgenina. Muy probablemente estas sustancias promueven enzimas que liberan la diosgenina no libre y a esto se debe el incremento reportado. En nuestro método de evaluación - hubo una etapa de hidrólisis ácida la cual libera toda la -- diosgenina presente.

Relación estructura-actividad.

Las sustancias más activas 1 y 3 tienen en común un anillo aromático con substituyentes donadores de electrones, el número de átomos de carbono entre el ester y el nitrógeno puede variar de 2 ó 3 átomos lo mismo que los alquilo terminales pueden ser metilos o etilos. Es importante hacer no tar que en el caso de la bioinducción de carotenos es esencial que existan dos carbonos entre el ester y el nitrógeno, resultando inactivas las sustancias con 3 carbonos.

VI. CONCLUSIONES

1. Substancias reportadas previamente como inductores de diosgenina (Compuestos Nos. 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32 y 33) no tuvieron un efecto significativo en el incremento de diosgenina.
2. Las substancias 1, 3 y 14 mostraron mayor actividad en el incremento de diosgenina, lo mismo que el compuesto 24, pero en menor grado.
3. Las substancias más activas 1 y 3 tienen en común un anillo aromático con substituyentes donadores de electrones, el número de átomos de carbono entre el ester y el nitrógeno puede variar de 2 ó 3 átomos lo mismo - que los alquilos terminales pueden ser metilos o etilos.
4. El bioensayo desarrollado resulto confiable para la de terminación de la actividad de sustancias químicas en la bioinducción de diosgenina,

BIBLIOGRAFIA

1. Asociación de Fabricantes de Esteroides, A. C. El cultivo del Barbasco en México su estado actual y su potencial futuro. Rev. Sociedad Química de México. 21 (5) 302 (1977).
2. Applezweig, N. De Russel Marker a Gregory Pincus. La industria mexicana de los esteroides y el desarrollo de la moderna tecnología contraceptiva. Rev. Sociedad Química de México. 23 (4) 162-9 (1979).
3. Bennet, D. R. et al. Biosynthesis of Sterol and Sapogenins in Dioscorea spiculiflora Arch. of Biochem. and Biophys. 103 74-83 (1963).
4. Chaturvedi, H. C. and Srivastava, S. N. Diosgenin biosynthesis by tuber callus tissue cultures of Dioscorea deltoidea. Lloydia. 39 (1) 82-3 (1976).
5. Geuns, J. M. C. and Vendrig, J. C. Hormonal control of Sterol biosynthesis in Phaseolus aureus. Phytochemistry. 13 919-22 (1974).
6. Geuns, J. M. C., et al Physiological aspects of sterol biosynthesis and metabolism in higher plants. Abstracts of the "Symposium on Lipids and Lipid Polymers in Higher Plants" Botanical Institute, Karlsruhe. (1976).

13. Hoyer, G. A., Sucrow, W. and Winkler, D. Diosgenin -- saponins from Dioscorea floribunda. Phytochemistry. 14 (2) 539-42 (1975).
14. Joly, A. R. et al. Conversion of an Open-Chain saponin into dioscin by a Dioscorea floribunda homogenate. Phytochemistry. 8 1445-7 (1969).
15. Kaul, B. and Staba, E. J. Dioscorea Tissue Cultures I. Biosynthesis and Isolation of Diosgenin from Dioscorea deltoidea Callus and Suspension Cells. Lloydia. 31 (2) 171-9 (1968).
16. Kaul, B., Stohs, S. J. and Staba, E. J. Dioscorea Tissue Cultures III. Influence of Various Factors on Diosgenin Production by Dioscorea deltoidea Callus and Suspension Cultures. Lloydia. 32 (3) 347-59 (1969).
17. Lier, J. B. and Lacroix, L. J. Carotenoides of Durum -- Wheat: Induced High Pigment. Levels Obtained by Treatment of the Growing Plant. With -- Chlorophenylthiotriethylamine (CPTA) Hydrochloride. Cereal Chemistry, American Assoc. of -- Cereal Chemist's. 51 188-94 (1974).
18. Marshall, J. G. and Staba, E. J. Plant hormone effects on the production of diosgenin by Dioscorea deltoidea tissue cultures. Lloydia. 38 (6) 541-2 (1975).

19. Marshall, J. G. and Staba, E. J. Hormonal effects on -- diosgenin biosynthesis and growth in Dioscorea deltoidea tissue cultures. Phytochemistry. 15 (1) 53-5 (1976).
20. Morrison and Boyd
Organic Chemistry
3rd. edition
Allyn and Bacon Inc.
Boston, U. S; A. (1974).
21. Neme, P. Síntesis de Triacilaminas como Biorreguladores en Plantas. Tesis, Fac. Química, - U. N. A. M. (1978).
22. Rozansky, A. A Simplified Method of Extraction of --- Diosgenin from Dioscorea Tubers and its --- Determination by Gas-Liquid Chromatography - Analyst. 97 968-72 (1972).
23. Simposium Internacional de Esteroides. Presente y Futuro de la Industria de Esteroides. México, D. F. Febrero (1978).
24. Stohs, S. J. and Rosenberg, H. Incorporation of 4-¹⁴C-22-23-³H-sitosterol into diosgenin by Dioscorea deltoidea tissue suspension cultures. Lloydia. 37 (4) 646 (1974).

25. Stohs, S. J., Kaul, B. and Staba, E. J. The metabolism of ^{14}C -cholesterol by Dioscorea deltoidea - Suspension cultures. *Phytochemistry*. 8 (9) 1679-86 (1969).
26. Stohs, S. J. Sabatka, J. J. and Rosenberg, H. Incorporation of 4- ^{14}C -22-23- ^3H -sitosterol into diosgenin by Dioscorea deltoidea tissue suspension - cultures. *Phytochemistry*. 13 (10) 2145-8 (1974).
27. Tomita, Y., Uomori, A. and Minato, H. Steroidal saponins and sterols in tissue cultures of - - Dioscorea tokoro. *Phytochemistry*. 9 (1) 111-4 (1970).
28. Vágújfalvi, D., Maróti, M. and Tétényi, P. Presence of Diosgenin and Absence of Solasodine in Tissue Cultures of Solanum laciniatum. *Phytochemistry*. 10 (6) 1389-90 (1970).