

ESTUDIO QUIMICO Y BIOLÓGICO DE LA
PIQUERIA TRINERVIA Y SUS COMPONENTES

Que para obtener el Grado Académico de:
MAESTRO EN CIENCIAS QUIMICAS
FARMACIA (SINTESIS DE FARMACOS)
Presenta el Q.F.B.
MARIO GONZALEZ DE LA PARRA IRIGOYEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

a

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL DEPARTAMENTO DE QUIMICA FARMACEUTICA Y PRODUCTOS NATURALES DE LA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO, DE LA FACULTAD DE QUIMICA, EN EL INSTITUTO DE QUIMICA Y EN EL CENTRO DE INVESTIGACION EN FISILOGIA CELULAR BAJO LA ASESORIA DEL DR. RAFAEL CASTILLO BOCANEGRA, DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA Y LA DRA. ANA LUISA ANAYA LANG.

C O N T E N I D O

- I. INTRODUCCION GENERAL
- II. ESTUDIO QUIMICO Y ESPECTROSCOPICO DE LOS PIQUEROLAS A Y B
- III. ESTRUCTURA DE LA TRINERVINA
- IV. AISLAMIENTO Y ESTUDIO QUIMICO DE LA PIQUERINA
- V. ESTUDIO MICORBIOLÓGICO DE LOS COMPONENTES DE LA P. TRINERVIA
- VI. ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DE P. TRINERVIA EN LA GERMINACION Y CRECIMIENTO DE SEMILLAS
- VII. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPONENTES DE PITRINERVIA SOBRE GARRAPATAS
- VIII. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DEL PIQUEROL-A SOBRE TRYPANOSOMA CRUZI
- IX. TOXICOLOGIA DEL PIQUEROL-A
- X. CONCLUSIONES
- XI. APENDICE ESTADISTICO

Introducción

Las grandes aportaciones del conocimiento humano han tenido como base la comprensión de la naturaleza. Las leyes que el hombre — abstrae mediante el estudio de los procesos naturales sirven como modelos para las mas grandiosas creaciones del género humano.

En su constante lucha por sobrevivir y trascender, el hombre ha buscado desde sus orígenes alargar su vida y hacerla mas plena, es por ello que la medicina nace con el hombre y es una de las expresiones mas importantes de su cultura.

Todos los grupos humanos de alguna u otra manera han recurrido a los recursos naturales para la terapia de sus enfermedades, esto compone parte de su medicina con otros elementos como son la religión, magia y corrientes filosóficas imperantes en su momento histórico.

Con el florecimiento de las ciencias naturales en los últimos siglos, los conocimientos y teorías de ciencias como las Matemáticas, Física, Química y Biología han revolucionado la manera de curar del hombre y han alcanzado grandes progresos en el control y conocimiento de varias enfermedades.

Este tipo de medicina "científica" pretende entender los padecimientos y su terapéutica a través de mecanismos mas o menos sencillos que a veces son demasiado parciales y no comprenden a la enfermedad y al hombre como un todo.

Es por ello que algunos fármacos originados de esta manera tienen apareados con su efecto terapéutico efectos tóxicos serios.

Debido a lo anterior, actualmente se está volviendo a recurrir a la medicina tradicional en la búsqueda de mejores agentes terapéuticos y sacar a la luz conocimientos que amplíen los horizontes de la medicina.

Sin embargo hay que tener cuidado en no caer en los extremos de un naturismo empírico e irracional y de una medicina francamente positivista y cerrada.

El presente trabajo fué elaborado intentando, a partir de las dos corrientes médicas discutidas anteriormente. Por un lado en lo que se refiere al aspecto tradicional se obtuvo la información concerniente a las propiedades medicinales que en nuestro país se le han atribuido a la planta Pimenta trineria y por otra parte a partir del conocimiento estructural y químico de compuestos aislados de esta planta se elaboraron hipótesis basadas en relaciones estructura química actividad biológica con fármacos prototipos empleados en el control de algunos padecimientos que de alguna manera pudieran estar relacionados con las propiedades medicinales tradicionalmente asignadas a la planta.

Las propiedades terapéuticas o tóxicas de una planta, son un subconjunto de sus propiedades biológicas. Es importante destacar que las plantas no solo son útiles, porque proporcionan agentes terapéuticos, también son interesantes los insecticidas, herbicidas, colorantes etc. obtenidos de las mismas. Y se puede pensar que la información empírica sobre cualquier actividad biológica mas los conocimientos de las estructuras y comportamiento fisicoquímico de sus compuestos, pueden ser muy útiles en el descubrimiento de productos de interes biológico y entender la fisiología, bioquímica y las relaciones con su ambiente.

Aunque el interés central del presente trabajo es el estudio de la posible aplicación de la Picneria trinervia y componentes en medicina humana, no deja de ser importante el estudio de otros posibles usos como, en el campo de los plaguicidas y reguladores del crecimiento vegetal entre otros, que se presentan a lo largo de esta tesis, además los datos obtenidos en un ensayo biológico pueden servir de base para el estudio de otras propiedades biológicas mas interesantes y trascendentes.

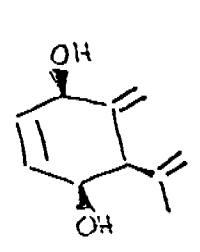
De ninguna manera se piensa, que la filosofía y la metodología seguida en esta tesis sea la panacea, el hecho de haber obtenido algunos resultados exitosos pudieran ser debido a factor suerte, y se necesita todavía mucha investigación para apoyar las hipótesis propuestas, hay que tomar en cuenta que en el momento en que se escribe, las relaciones estructura actividad biológica distan mucho de ser leyes y que la mayor parte de la Química Farmacéutica actual está muy relacionada con la escuela Halógena.

Se deja al tiempo y a futuros lectores la decisión sobre el contenido de verdad de esta tesis o si nada más responde a una moda cultural imperante en el momento histórico en que presenta este trabajo.

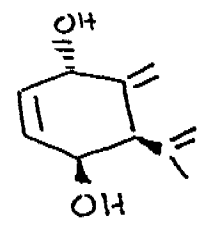
Estudio Químico y Microquímico de
Los Piqueros A y B

RESUMEN.

Los piqueros A y B son metabolitos aislados de la planta -- Piqueria tinarioides. La fórmula mínima de ambos productos es : $C_{10}H_{14}O_2$ y solo difieren sus estructuras (fig. 1) en la configuración de C_1 , por lo tanto son diastereoisómeros.



PIQUEROL-A



PIQUEROL-B

Aunque los dos compuestos se aislaron de la misma especie, el hecho de que el Piquerol A se haya obtenido de P. tinarioides que crece en la zona del Peñascal de Sta. Angel y el Piquerol B de la planta que crece en Itzacapulco Mo. de México resulta muy interesante, desde el punto de vista biológico, X además sus estructuras y las de sus derivados presentan relaciones estructura actividad biológica con compuestos de diversas actividades biológicas lo cual se discutirá más ampliamente en capítulos posteriores de este trabajo.

El objeto de esta parte de la tesis es contribuir al estudio químico y microquímico de estos compuestos, para que sirvan como bases para futuras investigaciones químicas y biológicas de ellos.

Resonancia magnética nuclear de ^{13}C

En trabajos anteriores^{1,2}, se ha discutido los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno de los piqueroles. En el presente trabajo se presentan los espectros: totalmente desacoplado y parcialmente desacoplado de piqueroles. Así se mostraron las siguientes señales: 28.571 ppm un cuarteto que se asignó al carbono del metileno del grupo isopropenilo, 67.26 y 69.034 dobletes asignados a C_1 y C_4 indistintamente,^{##} 108.018 y 115.570 tripletes asignables al metileno del grupo isopropenilo y al metileno exocíclico unido a C_2 , 130.922 y 132.440 dobletes que se asignó a C_3 y C_4 y los singuletes en 145.075 y 146.528 que se asignaron a C_2 y al carbono tetrasustituído del grupo isopropenilo.

Espectrometría de masas

En lo que se refiere a la espectrometría de masas de los piqueroles solo se ha reportado los resultados de baja resolución, sugiriendo que estos isómeros difieren ligeramente en la abundancia relativa de algunas señales. Esto sugiere que los iones base de estas señales poseen diferente grado de estabilidad y que el mecanismo fino de fragmentación podría ser diferente para estos isómeros,² para estudiar lo anterior se obtuvieron los espectros de masas de alta resolución de los piqueroles cuyos principales resultados se muestran en la siguiente tabla.

1) Bohlman F. *Phytochemistry*, **L7**, 560, (1978).

2) J. ROMO, ROMO A., RIVERA T., QUIJANO L. Y DÍAZ E., *REVISTA LATINOAMERICANA DE QUÍMICA*, **1**, 72, (1970).

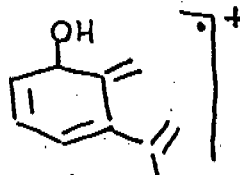
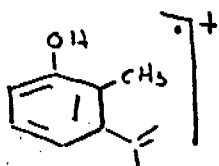
##, ##, VER PARTE EXPERIMENTAL.

m/z	A.R. Piquenol A	A.R. Piquenol B	Fórmula
145	1.31 %	7.27 %	C ₁₀ H ₁₄ O ₂
143	38.95 %	42.52 %	C ₁₀ H ₁₂ O ₁
133	68.85 %	82.93 %	C ₉ H ₉ O ₁
119	100 %	100 %	C ₉ H ₁₁

De las determinaciones de altas resoluciones ^(A.R.) para ambos productos --
 podemos decir que la masa del ión molecular ^{de estos} para ambos compuestos
 es de 166.0893 que corresponde a la fórmula C₁₄ H₁₂ O₂ cuyo va--
 lor teórico es 166.0890 y que la diferencia entre los espectros --
 de los piquenoles se atribuyen a las abundancias relativas de al--
 gunas iones.

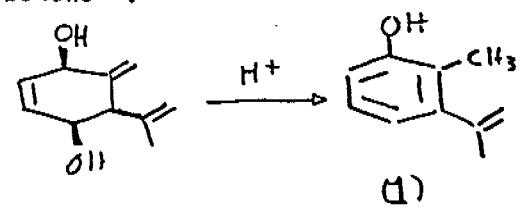
La base ⁶⁵ para ambos casos o ⁵ m/z = 119 cuya masa exacta es
 119.0431, corresponde a la fórmula C₉ H₁₁, lo que indica una alta
 fragmentación ocurrida en la muestra.

Un aspecto importante en los espectros de masas de estos com--
 puestos es el ión m/z 141, al cual corresponde a la pérdida de
 átomos de H₂O, la estructura asociada a este ión presenta dos
 alternativas como se puede ver en la fig. 2



* Ver parte experimental.

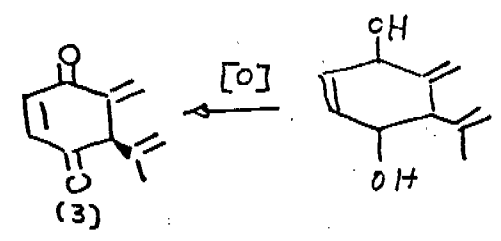
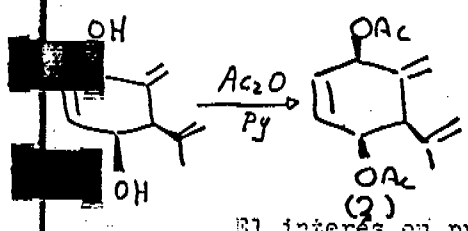
Considerando que el Piqueroles-A es un diol cíclico produce 2-metil-5-isoprenilfenol (1), un radical en el que se ha perdido 2 unidades de masa, lo cual es característico de los fenoles³.



Por lo anterior los espectros de masas de los dos compuestos -- corresponden a la mezcla de piqueroles, sus productos de descomposición (M-16) y aromatización de los compuestos originales inducido, probablemente por efecto térmico ocurrido en la cámara de ionización.

Estudio químico.

Como en el presente trabajo el interés radica en el potencial biológico de los componentes de Piqueroles triarviria se decidió sintetizar el diacetato de piqueroles-A (2) y el derivado oxidado del mismo compuesto (3).



El interés en preparar el diacetato, fue tratar de aumentar la lipofilicidad en relación al piqueroles-A, con objeto de que el derivado penetrara más fácilmente las membranas biológicas que son de naturaleza lipídica. Este compuesto se preparó de la manera usual --

3 - Beynon J.H., *The Mass Spectra of Organic Molecules*, Elsevier Publishing Company, N.Y., p.155-157, (1968).

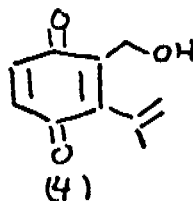
haciendo reaccionar el piquerol-A con anhídrido acético en piridina,¹ El diacetato resultó ser un aceite que se obtuvo con un rendimiento de 80 % , en su espectro de infrarrojo ya no mostró las bandas características de alcoholes y presentó bandas intensas en 1740 cm^{-1} y 1240 cm^{-1} propias de esteres⁵, lo cual indica que la reacción fue total, lo que se confirmó con el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno por la presencia de las siguientes ^{datos} señales: - dos singuletes en 2.03 y 2.06 ^{ppm} que integraron para tres hidrógenos respectivamente, asignables a los hidrógenos de los metilos de los dos grupos acetatos, y por ^{no lado no se requirió intercambio de protones con} ~~no registrarse en la determinación de es~~ ~~pectro intercambio con~~ óxido de deuterio.

Aunque se obtuvo el diacetato en buena cantidad y puro, presentó problemas al tratar de ser probado en sistemas biológicos al hidrolizarse rápidamente al piquerol-A en medio acuoso.

El derivado oxidado (3) teóricamente resultó muy interesante, - porque una de las hipótesis de la posible actividad biológica de los piqueroles radica en el hecho de la oxidación de los piqueroles en sistemas biológicos para obtener dicho producto el cual sería -- mucho más activo que estos compuestos, por razones que se discuti-- ~~que se discutiría~~ más apropiadamente en los proximos capítulos de este trabajo. El producto (3) se intentó preparar por diferentes métodos de oxidación[#]; oxidaciones en medio básico (trioxido de cromo en piridina), en medio ligeramente ácido con clorocromato de piridina (reactivo de Corey)⁵, medio ácido (oxidación de Jones) y oxidación selectiva de alcoholes alílicos con dióxido de manganeso activado.

5-Nakanishi K., INFRARED ABSORPTION SPECTROSCOPY, Holden Day, INC, San Francisco, 5th, p. 42-50, (1969).

De ninguno de los métodos anteriormente mencionados se obtuvo el producto (3), sin embargo todos los métodos excepto la oxidación con dióxido de manganeso proporcionaron la quinona (4) con pequeño rendimiento. ##



Este producto ya ha sido reportado por Bohlman. En su espectro de infrarrojo mostró bandas en 3450 cm^{-1} banda intensa atribuida a cuando menos un grupo oxhidrilo, 1650 cm^{-1} , banda intensa asignable a carbonilos de quinona en 1600 cm^{-1} banda intensa asignada a dobles ligaduras presentes en el núcleo quinoideo.

En el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno, — presentó las siguientes señales: en 1.95 ppm un singulete ancho que integró para tres hidrógenos, que se asignó a los hidrógenos del metilo del grupo isopropenilo, 4.5 ppm un singulete que integró para dos hidrógenos, asignado a los dos hidrógenos bases de un alcohol primario, multipletes en 4.83-4.9 ppm y 5.23-5.3 ppm que integraron respectivamente para un hidrógeno asignables a los hidrógenos vinílicos del grupo isopropenilo y un singulete en 6.7 ppm que integró para dos hidrógenos que correspondieron a los dos hidrógenos vinílicos del núcleo quinoideo.

Aunque las quinonas tienen actividades biológicas interesantes — como se verá mas adelante, no se pudo evaluar biologicamente por los pequeños rendimientos y por su fácil descomposición a temperatura ambiente.

6- Bohlman, *Tetrahedron letter*, 2418, (1969).

VER PARTE EXPERIMENTAL

ESTRUCTURA DE LA TRINERVINA

En anteriores trabajos, se presentó el aislamiento y las primeras aproximaciones a la elucidación estructural de la trinervina^{1,2}

La trinervina es un alcohol diterpénico, cuya fórmula mínima es: $C_{20}H_{34}O_2$, que se obtiene por fermentación aeróbica de hojas y flores de la planta *Eichornia trinervia*³. El objetivo de esta parte de la tesis es completar la información química y espectroscópica, para la total elucidación de la estructura de este compuesto.

Los datos obtenidos permiten establecer los siguientes puntos:

- a) El esqueleto fundamental.
- b) Posiciones de los sustituyentes.
- c) Posición de un doble enlace.
- d) Estereoquímica.
- e) Formalita fundamental

Anteriormente se propuso un esqueleto tricyclico, conformado de cuillos de seis miembros disueltos como en el ferantreno.

Como la trinervina se hizo reaccionar con selenio⁴ se obtuvo el derivado ferantrenico (1), que fué identificado por ---



(1)

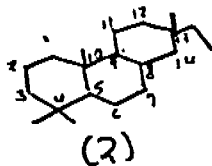
1- GONZÁLEZ DE LA PARRA M., AISLAMIENTO Y ESTUDIO QUÍMICO DE UN DITERPENOS DE LA PLANTA *EICHORNIA TRINERVIA*, TESIS, UNAM. (1971)

2- GONZÁLEZ DE LA PARRA M. Y JIMÉNEZ M., XIII CONGRESO DE QUÍMICA PURA Y APLICADA.

≡ VER PARTE EXPERIMENTAL.

comparación del espectro de ultra violeta de este con uno sintético.

La obtención de este derivado ferrocénico es significativa, porque se ha obtenido el reactivo con selenio diterrano con esqueleto fundamental de pirreno (2)³.



b) Posiciones de los sustituyentes.

Los sustituyentes presentes en el triterceno son dos grupos alcoholes, uno primario y otro secundario, así como un grupo glicol. La posición de un grupo glicol queda definida en el esqueleto del pirreno en ^{al dicitano} C₁₃.

El alcohol secundario se se asignó al C₅; porque las resonancias de los metilos vecinos se muestran en la mayoría de los espectros de RMN de triterceno y derivados como no equivalentes, esto se explicaría por la proximidad de un grupo oxidrilo a ellos, y además por el desplazamiento químico, el triple de multiplicidad y constantes de acoplamiento de los protones bases de los acetatos de dicho alcohol, concuerdan con los reportados.⁴

El alcohol primario tiene dos posibilidades, la primera es que el oxidrilo este unido en el metilo en C₁₀ o en el metilo a C₁₃.

3- Pudles J., DIARA, MEMOIRS PRÉSENTÉS A LA SOCIÉTÉ CHIMIQUE,
693-700, (1959).

4- JEFFERIES AND RECTALACK, AUS. J. C., 1311, (1968).

que se le atribuye se hizo reaccionar con peróxido sódico y con tetrahidrofur no. La estructura del aldehído (VI), su espectro de infrarrojo mostró dos bandas de absorción para oxhidrilo libre en 3540 cm^{-1} y para oxhidrilo asociado en 3300 cm^{-1} . Estas bandas se explican por la interacción de puente de hidrógeno entre el oxígeno del carbónilo del aldehído y el hidrógeno del oxhidrilo. Esto explica la presencia del alcohol en el sustituyente sobre C_{13} .

Para obtener la estructura del aldehído (VI) se redujo con hidruro de sodio en etanol para obtener el triol (VII). Este derivado disuelto en acetona se trató con peróxido de hidrógeno concentrado y de este tratamiento se obtuvo el nonacetónido (VIII) su espectro de infrarrojo mostró dos bandas simétricas intensas centradas en 1375 cm^{-1} atribuidas a los metilos terciarios del grupo acetónido y en el espectro de rmp (100 MHz) mostró un sextete en 1.4 ppm que integró para 6H, que se asignó a los protones del mismo grupo.

La obtención del nonacetónido sustiene la asignación del alcohol primario unido al sustituyente en C_{13} .

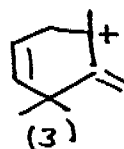
c). Asignación del doble enlace

La triterpena posee una doble ligadura trisustituida, la cual se presume originalmente en 7-8⁵, sin embargo esta posición no explica las fragmentaciones observadas en los espectros de masas de la triterpena y sus derivados. Ya que no se observan los fragmentos resultantes de una fragmentación de Retrodiels-Alder esperada para diterpenos con doble enlace en 7-8⁶.

C- WENKERT E., J.O.C., 30, 713, 1965.

VER PARTE EXPERIMENTAL

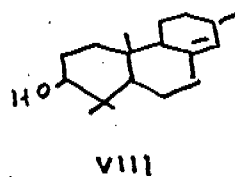
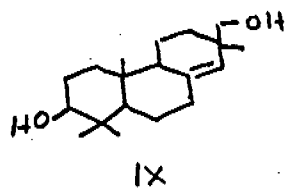
En los espectros de masa de la trinarvina se encontraron fragmentos significativos característicos de distorsión alarénicos con el doble enlace en la posición 2-14, tales como m/z : 135, 119, 109 y 105⁷ entre otros.^{7,8} En especial el fragmento $m/z=135$ corresponde al ion (3). El cual apoya también la posición del oxhidrilo secundario en C₂.⁸



En la fig. 1 se puede ver el patrón de fragmentación propuesto para la trinarvina.

d). Estereoquímica

Para proponer la configuración de los centros quirales de la trinarvina, esta se derivó mediante el siguiente esquema -- de reacciones (fig. 1). Primeramente la trinarvina se hizo -- reaccionar con peróxido de sodio en tetrahidrofurano a temperatura ambiente para obtener el aldehído (VI). Este producto -- por la reacción de Wolf-Kishner proporcionó dos productos, el -- diol esperado (IX) y el monoalcohol (VIII).⁷

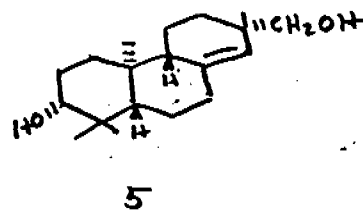
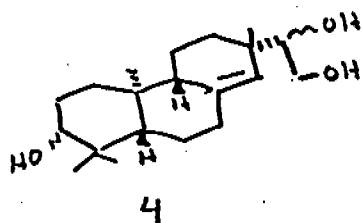


7 NAKANISHI K., *Phytochemistry*, **10**, 1617, 1971.

8 Werner Herz S.V., *Phytochemistry*, **11**, 1060, 1968.

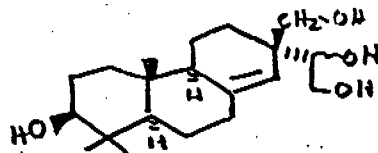
H VER PARTE EXPERIMENTAL

El diol (IX) tiene el mismo punto de fusión (180°C) que otro diol (5) obtenido por degradación del darutigenol³ (4), además la rotación óptica específica del derivado de la trinervina es exactamente la inversa ($[\alpha]_D^{25} = +38$) del derivado del darutigenol.



Lo anterior significa que ambos productos deben ser un par - enantiomérico y por lo tanto las configuraciones de todos los -- carbonos asimétricos de la trinervina, deben ser invertidas en -- relación al derivado del darutigenol.

De esta manera se propone la siguiente estructura en la cual todavía queda por conocer la configuración del carbono secunda-- rio del grupo glicol.



TRINERVINA

INTRODUCCION

La planta Piqueria trinervia ha sido anteriormente estudiada, desde el punto de vista químico por varios investigadores mexicanos. Entre estos estudios, es muy interesante el realizado por el Dr. Río de la Loza en los inicios de este siglo en el ya desaparecido Instituto Médico Mexicano.¹

En aquel tiempo, el Dr. Río de la Loza estudiaba la planta — con objeto de probar la actividad antipirética y antipalúdica — que tradicionalmente se le ha atribuido, y como uno de los resultados de su investigación obtuvo del extracto acuoso de la planta un producto ~~puro~~ cristalino puro al cual denominó como piquerina y lo clasificó como "alcaloide". Posteriormente Maximino Martínez en su estudio de plantas medicinales mexicanas, ^{RECOPILADO} (replicó) la metodología de aislamiento y purificación del mismo.¹

Quando se hizo la revisión bibliográfica de P. trinervia llamó la atención el hallazgo de dicha metodología y se repitió tal cual. Para nuestra sorpresa se obtuvo un producto cristalino, — que será objeto de esta parte de la tesis.

ESTUDIO QUIMICO

El producto puro recristalizado de metanol presentó las siguientes propiedades físicas: cristales blancos, pf 280 ° con — descomposición $[\alpha]_{\text{etanol}} = -27.5$, soluble a temperatura ambiente en piridina y N-Ndimetilformamida, soluble en caliente en metanol y etanol e insoluble en agua.

1- MAXIMINO MARTINEZ, LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO, pp 218 y 219,
Ed. BOTAN

16

El compuesto analizó para la fórmula mínima $C_{32}H_{54}O_{14}$, $PM = 662$. En su espectro de infrarrojo mostró: a 3350 cm^{-1} una banda intensa y ancha, que se atribuyó a grupos oxhidrilos, a 1630 cm^{-1} una banda débil que se asignó a un doble enlace, 1375 cm^{-1} una banda débil atribuida a grupos metilos. En el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno presentó: tres singuletes que integraron respectivamente para tres hidrógenos en 0.73 , 0.93 y 1.16 ppm que se asignaron a tres metilos terciarios y multipletes entre 3.83 a 6 ppm que se simplificaron al obtener el espectro con óxido de deuterio. El espectro de masas no presentó ion molecular. El fragmento de mayor masa correspondió a 482 m/z que explicaría como 180 unidades de masa menos que el peso molecular esperado para la fórmula mínima, otras señales importantes que se encontraron en este espectro fueron: $320(12.6\%)$, $135(20.1\%)$, $119(18.2\%)$, $105(29.6\%)$ y $91(37.1\%)$ señales características de la trinervina. Los datos anteriormente mencionados nos hicieron suponer que la piquerina corresponde a un glucósido de la trinervina.

Para comprobar lo anterior, primeramente se hicieron la fusión alcalina de la piquerina, de este ensayo se obtuvieron resultados negativos para la presencia de nitrógeno y la prueba de azúcares reductores de Fehling⁷ que proporcionó resultados positivos. Estos resultados descartan la suposición de alcaloide propuesta -- por el Dr. Río de la Loza y sostienen que la piquerina es un glucósido.

VER PARTE EXPERIMENTAL

Cuando se hizo la hidrólisis ácida de la piquerina se obtuvieron como productos de la reacción: isotrinervina que se identificó por punto de fusión mixto con muestra auténtica³, trinervina y D-glucosa que se identificaron por cromatografía en placa fina en gel de sílice con bisulfito de sodio.³

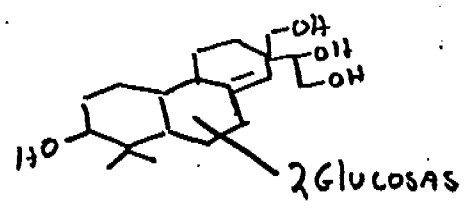
Para conocer la cantidad de unidades de glucosa presentes en la piquerina, esta se trató con cloruro de acetilo en acetona a temperatura ambiente, de este tratamiento se obtuvo el derivado-peracetilado, en su espectro de infrarrojo ya no se encontraron las señales características de grupos oxhidrilos, en el espectro de resonancia magnética nuclear de hidrógeno mostró un multiplete muy intenso en la región correspondiente a protones de metilos de acetatos que se resolvieron al obtener el espectro con adiciones sucesivas de Eu (FOD₃)₂, en particular cuando se añadieron 30 mg del reactivo de desplazamiento se resolvió el multiplete en diez singuletes entre 2 y 2.6 ppm que se asignaron a los protones de diez metilos de grupos acetatos.

También la piquerina se hizo reaccionar con yoduro de metilo en presencia de hidruro de sodio y dimetil formamida⁴ en frío, de esta reacción se obtuvo el eter permitílico, su espectro de infrarrojo no presentó las bandas propias de grupos oxhidrilos, y el espectro de resonancia magnética de hidrógeno mostró diez singuletes que integraron respectivamente para tres protones, entre 3.38 y 3.6 ppm que se asignaron a los protones de diez metilos de eteres metílicos.

Los datos de las reacciones anteriores sostienen la presencia de dos unidades de glucosa.

3-SUSUKU AOYCHI, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 11, 295, (1965).
4 SANDFORD P.A, BIOCHEMISTRY, 5, 1508, 1966.
4 VER PARTE EXPERIMENTAL

Hasta el momento queda por elucidar: las posiciones de union de las unidades de glucosa a el aglicón y la estereoquímica del compuesto.



MICROBIOLOGIA

1.- Introducción.

Uno de los problemas más grandes de salud pública en nuestro país con las enfermedades infecciosas de origen bacteriano como la tifoidea y paratifoidea que causan alta mortalidad en la población infantil!

Actualmente se pueden controlar las infecciones bacterianas con el uso de quimioterápicos como las sulfas y los antibióticos, no obstante el uso indiscriminado de los últimos ha provocado resistencia creciente de las bacterias a estos fármacos.

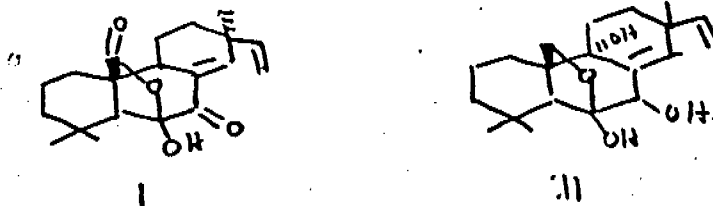
Por otro lado las infecciones causadas por hongos y levaduras, aunque por número de casos no son un gran problema de salud para México, causan graves complicaciones en pacientes que tienen sus sistemas de defensas debilitados, como los enfermos que padecen cáncer en estos casos algunos hongos y levaduras que pertenecen a la flora normal aprovechan la baja de defensas del huésped para desarrollar algún padecimiento? En general no existen muchos fármacos efectivos contra levaduras y hongos y además los tratamientos son muy largos.

Tradicionalmente los antibióticos se han obtenido de hongos y bacterias, pero actualmente se está investigando también en plantas superiores, ya que algunas de ellas poseen productos de defensa X contra microorganismos.

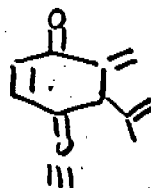
-
- 1 Chavez A, Nutrición y Desarrollo Infantil, Ed. Interamericana
1ª ed. pag. 65-77 (1971)
 - 2 Davis, Microbiología

La planta Picunia trinervia tradicionalmente se ha usado como antipirético, antipalúdico y contra tifo exantemático; actividades que sugieren una posible acción antimicrobiana.

Los productos disponibles de la planta para este trabajo: la trinervina, isotrinervina, piquerina se caracterizan por poseer esqueletos diterpenoides y se ha encontrado algunos diterpenos con actividad antimicrobiana como los antibióticos: LL-8491 (I) y LL-8491^B (II) aislados del hongo Aspergillus chevalien.⁵



Para los piqueroles A y B se supone la oxidación biológica de los dos grupos alcoholes de sus estructuras, para obtener en ambos casos la dicetona (III).



La dicetona contiene como se puede observar sistemas cetona α, β no saturados, estos sistemas, en especial cuando existe un metileno exocíclico se les ha relacionado con varias actividades biológicas⁶ como:

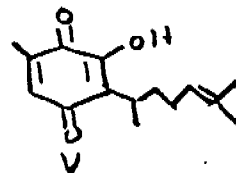
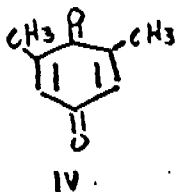
4- MARTINEZ MAXIMINO, LAS PLANTAS MEDICINALES DE MEXICO

5- ELLESTEAD G., J.A.C.S., 94, 6206, 1972.

6- Kupchan, Eckin and Thomas, J. Med. Chem., 14, 1147, (1971).

carcinogénica, citotóxica, antitumoral, antimicrobiana, vermífuga e insecticida.

También la dicetona posee una estructura semiquinoidea y varios compuestos quinoides poseen actividades antimicrobianas como la 2,6-dimetoxiquinona⁷ contra Staphylococcus aureus⁸ (IV) y la perezona^(V) contra la misma especie bacteriana.



2.- Ensayos de actividad biológica in vitro de los componentes de P. trinervia contra E. coli, S. aureus y C. albicans.

Los compuestos de P. trinervia mencionados se probaron in vitro por el método de difusión en discos de papel⁸⁷, a concentraciones de 1µg/ml contra Escherichia coli representante de bacterias gram negativas, Staphylococcus aureus representante de bacterias gram positivas y Candida albicans representando a las levaduras.

Los resultados se pueden ver en la figura 1. Como se observa en ningún caso se obtuvo inhibición del crecimiento de bacterias, pero es notorio que el piquerol-B estimula su crecimiento. Este resultado es difícil de interpretar, bien puede ser debido a que sea más fácilmente metabolizado por las bacterias y por lo tanto les serviría como nutriente, o que actuara como una vitamina para ellas.

⁷ Ai Jeng Lin, J. Med. Chem., 15, 1247, (1972).

⁸ Basurto A., Roldan Isabel, DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE DIVERSOS PRODUCTOS NATURALES, Tesis U.N.A.M., Facultad de Química, (1980).

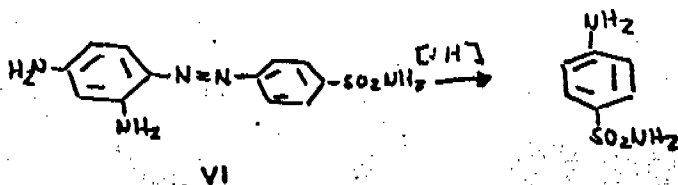
Para G.albicans ninguno de los productos mostró actividad.

Resulta muy interesante que el piquerol-B estimule el crecimiento en comparación a su isómero el piquerol-A, esto tal vez podría explicar la menor toxicidad del piquerol-B. En relación al piquerol-A contra trichinosema cruzi, plantas y garrapatas que se estudiarán en capítulos posteriores. Partiendo de que el piquerol-B pudiera ser metabolizado a productos menos tóxicos en estos organismos.

La estimulación del crecimiento bacteriano promovido por el piquerol-B puede ser estudiada mas a fondo por las implicaciones prácticas que esto tendría, pues bien se sabe que existen muchas especies microbianas útiles para el hombre como son las que sostienen todas las industrias derivadas de procesos de fermentación.

El hecho de que ningún producto de P.trinervia, en especial los piqueroles no inhibieran el crecimiento de estos microorganismos no es para descartarlos como posibles antimicrobianos.

Un caso clásico lo encontramos en la historia de las sulfas⁹, ya que el prontosil (IV) que fué la primera sulfa que se investigó no muestra actividad in vitro pero sí in vivo.



9- GOODMAN and Gilman, *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 4th ed, Mc.Millan Co. (1971), pp. 1177.

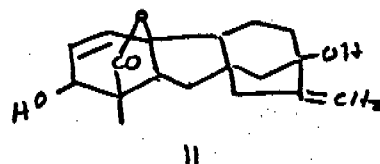
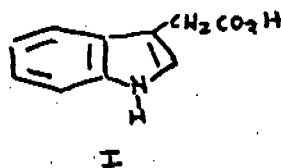
Esto se explicó porque la parte activa del compuesto es la sulfonamida y para ser liberada es necesario romper la unión-nitrógeno doble ligadura nitrógeno y solo los organismos superiores poseen esta enzima por ello es que solo es activo in vivo.

Como última posibilidad podemos especular en que las bacterias y levaduras no poseen las enzimas o que las tengan en una muy pequeña cantidad para oxidar los piqueroles y dar la sustancia dicetona activa. Por lo anterior es necesario probar los piqueroles in vivo.

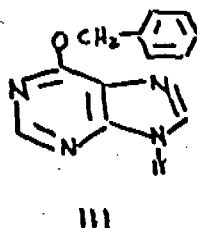
ESTUDIO DE LOS COMPONENTES DE *P. CRIVERUA* SOBRE LA GERMINACION Y CRECIMIENTO DE SEMILLAS.

Actualmente se sabe que el crecimiento y desarrollo de las plantas está controlado por un complejo de hormonas o inhibidores de acción hormonal, los cuales son sustancias químicas producidas por la misma planta.¹

Se han encontrado dos tipos de procesos fundamentales en el crecimiento de las plantas: uno consiste en la expansión celular mediado por dos tipos de reguladores. Las auxinas representadas principalmente por el ácido indolacético (I) y las giberelinas representadas por el ácido giberélico (GA3) (II).¹



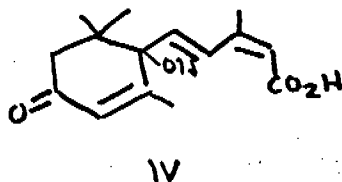
El segundo proceso consiste en el incremento en la división celular, los reguladores involucrados en dicho proceso se conocen como citocinas, entre las cuales mencionaremos a la zeatina (III).²



1 - MAYER A.H., The GERMINATION OF SEEDS, 2nd ed, Pergamon Press, pp 155, 1975

2) WAIN R.L., Los Reguladores DE LAS PLANTAS Y DE LOS INSECTOS, Editado, POR CONACYT, MEXI, 1979

Las tres clases de reguladores hasta aquí discutidas concier-
nen a la promoción del crecimiento; sin embargo, se sospechaba -
desde hace tiempo que los compuestos inhibidores deben operar -
también en los procesos de control del crecimiento, por ejemplo, -
cuando debido a condiciones ambientales desfavorables el creci-
miento de la planta se detiene por completo. En 1965 un inhibi-
dor natural fue aislado de frutos de algodón, ahora conocido co-
mo ácido abscísico. (IV)³.



El ácido abscísico ha sido encontrado en un amplio rango de es-
pecies vegetales, y estudios fisiológicos han demostrado que pue-
de inhibir la actividad de las auxinas, giberelinas, y citocininas.⁴
Se ha encontrado también que el ácido abscísico opera como siste-
ma de defensa de las plantas contra los efectos de stress fisio-
lógicos⁵, por ejemplo, en períodos de sequía el ácido abscísico -
detiene el crecimiento y reduce la transpiración de las plantas -
proporcionándoles una mejor oportunidad de supervivencia.

-
- 3- Okhuma K., *Tetrahedron Letters*, 29, 2529, (1965)
4- Thomas T.H., *NATURE, LOND.*, 205, 1271, (1965).
5- Wnght. S.T.C., *NATURE LOND.*, 224, 719, (1969).

Las plantas también producen sustancias que proporcionan defensas contra otros organismos como: microorganismos, insectos, y otras plantas. Un caso especial es cuando una planta produce y libera al medio ambiente productos que interfieren en el crecimiento de otros organismos, proporcionándole ventajas relativas en el dominio de su habitat, a esto se le conoce como alelopatía, y las sustancias responsables del efecto ^{tal} alelopático. ^{Se los llama} 6 La alelopatía es difícil de demostrar porque no basta hallar en una planta algún producto tóxico para otros organismos, además hay que demostrar que en condiciones naturales las sustancias se liberen al habitat y ahí ejercer su acción. Algunas observaciones de campo pueden sugerir el potencial alelopático de una planta, por ejemplo que predomine y que existan áreas alrededor de ella donde se observe escaso crecimiento de otras especies.

Cuando se hicieron las recolecciones de la P. trinervis en la zona del pedregal de Sn. Angel nos llamó la atención el crecimiento de la planta en poblaciones mas o menos puras y encontrar pocas especies en zonas circundantes.

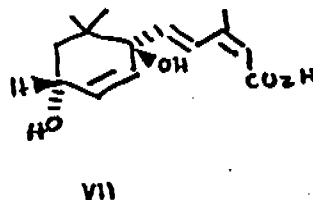
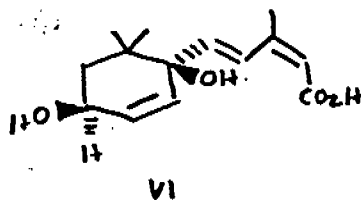
Esto nos sugirió que la planta podría tener potencial alelopático. Analizando las estructuras de los piqueroles () () podemos visualizar que por oxidación de ambos, se podría obtener el derivado quinoideo (V).[#]

6- Sondheimer and Simone, Chemical Ecology, Academic Press, N.Y., London (1970), pp. 44-45.

VER LA ESTRUCTURA EN EL CAPITULO REFERENTE A MICROORGANISMOS

Este derivado tiene analogías estructurales con el ácido abcísico como ^{lo es} el anillo de seis miembros y el sistema de cetona α, β -no saturado.

Cuando se estudió la biosíntesis del ácido abcísico se encontraron dos metabolitos (VI)(VII) con la misma actividad, - que como se observa son muy parecidos estructuralmente al Piquerol A y al Piquerol B.



Las analogías estructurales antes mencionadas hacen pensar que el Piquerol-A, Piquerol-B y el producto de oxidación de - ambos podrían tener actividades biológicas semejantes al ácido abcísico.

Una vez planteadas estas hipótesis se procedió a probar los extractos de hojas y raíces de la *P. trinervia* y los compuestos aislados de la misma como los Piqueroles, la Piquerina, - Trinervina e Isotrinervina.

Para estudiar el potencial alelopático de la planta se estudiaron extractos acuosos de hojas y raíces al 1% obtenidos e en condiciones suaves y a temperatura ambiente y los produc--

Hilbrow B.V., PLANT GROWTH SUBSTANCES 1970, Ed. por Denis J. CARR
Springer Verlag, Berlin and New York pp 281-290, (1972).

tos mencionados se trabajaron en soluciones acuosas, todo esto para tratar de imitar las condiciones naturales en las cuales se daría la alelopatía.⁹

Los ensayos in vitro de extractos y productos se realizaron por el método de placas de agar⁷ # En ellas se sembraron las semillas a probar y se dejaron germinar a 28° C X con un fotoperiodo de doce horas durante 7 días.

Al finalizar se midieron las longitudes de las radículas y de los talluelos de la plántulas y los resultados se expresaron como porcentajes de inhibición respecto a los controles, -- también se obtuvo el por ciento de germinación.[#]

Los datos se resumieron en las tablas (1,2 y 3), se graficaron usando barras para los porcentajes de inhibición y puntos y líneas para los porcentajes de germinación.

Los resultados de los ensayos con los extractos acuosos de hojas y raíces (tabla 1, grafical) mostraron actividad significativa para inhibición del crecimiento y germinación, para todas las especies probadas. Es notorio que el extracto de hojas es mucho más activo que el extracto de raíces, además se ven en general más afectadas las radículas que los talluelos.

Los valores obtenidos para los porcentajes de inhibición -- llegan al extremo en Lepidium virginicum donde se detiene -- por completo la germinación.

VER APENDICE ESTADISTICO

Las soluciones acuosas de Piquerol-A a concentraciones de 50 a 200 ppm (tabla 1, grafico "2"), mostraron actividad inhibitoria del crecimiento analogo a los extractos de hojas y raices de P. trinervia. La actividad es notoria desde concentraciones de 50 ppm del producto puro para todos los casos, además aplicando el método de regresión lineal[#] se obtuvo que el porcentaje de inhibición para radículas y talluelos depende de la concentración de Piquerol-A, según la siguiente ecuación. En la tabla (II) se pueden ver los valores de las pendientes y los interceptos.

$$\% I = - \log C + b$$

✓ La actividad de las soluciones acuosas de Piquerol-B (tabla 3, gráfica III) probadas a las mismas concentraciones que las soluciones acuosas de Piquerol-A, manifestaron menor actividad que las de este último y en algunos casos no es estadísticamente significativa.

✓ Las soluciones acuosas de Piquerina, Trinervina, e Isotrinervina (tabla 4, gráficas IV, V y VI), mostraron poca actividad y en general no significativa. El interés en probarlas fue el hecho de poseer esqueletos diterpenoides, ya que algunos diterpenos como las prodolactonas¹¹ son inhibidores del crecimiento de plantas.

11 Sasse J., PLANT GROWTH SUBSTANCES 1970 pp 299-305

VER APENDICE ESTADISTICO

Los estudios con el Piquerol-A se extendieron a especies tropicales como: Mimosa pudica y Mimosa somnians, también a especies de interés económico como el nabo (tabla 5, grafica VIII). En general los resultados concordaron con los obtenidos con las plantas del habitat de P. trinervia.

Otro estudio realizado con el Piquerol-A fué el grado de reversibilidad de su actividad, para llevar a cabo este trabajo - semillas previamente inhibidas con el producto se trasplantaron a medios carentes de él, se dejaron crecer durante cinco días y al terminar el experimento se compararon con plantulas y semillas inhibidas. Los resultados se expresaron como porcentaje de recuperación[#] (tabla 6, grafica VIII).

La recuperación fué significativa para todas las plantulas y semillas trasplantadas. En el caso de Lepidium virginicum -- la recuperación fué drástica, ya que esta planta se vió totalmente inhibida con Piquerol-A y las semillas trasplantadas todas germinaron.

De los resultados anteriores podemos concluir que P. trinervia tiene potencial alelopático y que los Piqueroles pudieran ser algunos de los productos responsables de esta actividad, pero falta demostrar que en condiciones naturales se liberen al medio ambiente, también se puede especular que los Piqueroles podrían actuar como reguladores naturales de P. trinervia seme--

VER APENDICE ESTADISTICO

jantes al ácido abscísico.

La diferencia de actividades de los Piqueroles sugieren actividad específica, tal vez tengan interacción con algún receptor.

El hecho de que el Piquerol-A se obtenga de poblaciones de P. trinervia que crece en la zona del Pedregal de Sn. Angel y el Piquerol-B de poblaciones que crecen en los alrededores de Atlacomulco Estado de México se podría explicar por las distintas influencias del medio ambiente en que habitan y esto les obligaría a seleccionar rutas biosintéticas específicas para obtener algunos de los isómeros preferentemente, o que también existan diferencias genéticas entre las dos poblaciones. Esto abre un campo amplio de investigación biológica.

Desde el punto de vista de aplicación práctica los Piqueroles, en especial el Piquerol-A podría investigarse como herbicida lo cual lo haría muy interesante por ser de origen natural, suponiendo que causaría menos problemas de toxicidad y contaminación ambiental en comparación a otros productos comerciales, también se podría utilizar como conservador de la latencia de semillas, esto sería de interés para el almacenaje y transporte de granos, así se evitaría las grandes pérdidas por descomposición de estos.

En el estudio de fisiología y bioquímica vegetal se podría utilizar en la investigación de reguladores de plantas.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LOS COMPONENTES
DE P. TRINERVIA CON GARRAPATAS

I. Introducción

Las garrapatas son artrópodos que pertenecen a la superfamilia Ixodoidea, dividida a su vez en dos familias: Ixodidae, garrapatas con caparazón y Argasidae, garrapatas sin caparazón.

En el mundo hay cuatrocientas especies de garrapatas de las cuales solo diez tienen interés parasitológico.^{1,2}

Las garrapatas son parásitos obligados que dependen de los nutrientes de la sangre del huésped para poder desarrollarse. En su vida pasan por las etapas de larva, ninfa y adulto.

La especie de garrapata que con más frecuencia infesta al ganado bovino en México es Boophilus microplus, se le conoce vulgarmente como: garrapata tropical del ganado, garrapata de venado, "cueruda" en estado adulto y "pinolillo" en estado larvario. En el país se encuentra ampliamente distribuida.

En la industria pecuaria B. microplus causa importantes daños como: baja producción de leche, de carne y pieles, para nuestro país se estima que anualmente se pierden alrededor de cuatro mil millones de pesos.^{3,4}

Los métodos hasta el momento más efectivos, para combatir a la garrapata han sido insecticidas como: los organoclorados, los organofosforados y carbamatos que son de origen sintético⁴ e insecticidas de origen natural entre los cuales destacan los

1- ADOLPHO, MANUAL OF LIVESTOCK FOR ANIMAL DISEASE ERADICATION, Ed by U.S. DEPARTMENT OF AGRICULTURE RESEARCH SERVICE (1963), pp 1-20.

2- TREVIÑO, EVALUACION IN VITRO DE SIETE IXODICIDAS ORGANOFOSFORADOS COMERCIALES, TESIS U.N.A.M., (1976).

3- CHAVEZ D, EVALUACION DEL PIQUEOZ-A Y DERIVADOS COMO QUIMIOTERAPICOS DE

4- USO VETERINARIO, TESIS U.N.A.M., (1979).

piretroides. Estudios de relación estructura actividad biológica de estos compuestos⁵ señalan como partes fundamentales de la estructura un anillo de cinco o seis miembros insaturado -- planar o pseudoplanar, poseer un grupo oxhidrilo y sustituyentes insaturados ambos unidos al anillo fundamental.

Por otro lado suponiendo una oxidación de estos compuestos, la dicetona^{*} todavía tendría mayor relación estructural con los piretroides, por ser el anillo mas plano y por tener los sistemas cetona $\text{C}=\text{O}$ insaturado presentes en los piretroides.

2. Ensayos de actividad biológica del piquerol-A, piquerol-B y trinervina en garrapatas.

En esta parte del estudio se probaron in vitro el piquerol-A, piquerol-B y piquerina[#], con larvas y hembras adultas gestantes de Boophilus microplus;^{##} las técnicas usadas son las recomendadas por la O.N.U. para la evaluación in vitro de garrapaticidas.⁷

Con las larvas se ensayaron la técnica de inmersión^{##} con soluciones acuosas de piquerol-A, piquerol-B y piquerina a 200 y 300 ppm empleando controles de agua destilada.

El experimento duró tres días y en cada día se contaron -- larvas sobrevivientes, los resultados se expresaron como porcentajes de mortalidad, esto es la diferencia entre las larvas sobrevivientes con el total inoculado en cada ensayo, que fué --- aproximadamente cien. (Gráfica 1)^{###}

#, VER DICCIONA EN EL CAPITULO DE MICROPRONISMO

#, # VER PARTE EXPERIMENTAL

VER APENDICE ESTADISTICO

Los resultados obtenidos demuestran que ambos piqueroles son eficientes larvicidas ya que al tercer día mataron[#] el total de las larvas esto resulta muy interesante porque es similar a las actividades de organofosforados reportadas para esta prueba.² La piquerina no mostró diferencia significativa -- con la curva del testigo.

Con las hembras adultas gestantes se probaron los piqueroles en soluciones acuosas de 200 y 300 ppm y controles de agua destilada con dos técnicas: la de inmersión y la de aplicación topical,[#]

Los resultados se expresaron como porcentajes de supervivencia (gráfica 2 y 3, tabla 2 y 3), estos índices se obtienen de asignar un valor de supervivencia, según el día en que haya muerto cada garrapata calificando como 100 % de supervivencia a las que sobrevivieron en el último día del experimento y posteriormente se calculó la media aritmética para cada control y tratamiento.

Los datos se analizaron estadísticamente por análisis de variancia a un nivel de significancia del 5%.[#]

En ambos experimentos, también resultaron activos ambos piqueroles, siendo más activo el piquerol-A, durante los ensayos se observaron cambios morfológicos de las garrapatas en relación a los controles como: deshidratación y cambios de color --

Efecto del Piquero1-A sobre Tripanosoma cruzi

INTRODUCCION

Los tripanosomas son protozoarios flagelados, algunas especies causan importantes enfermedades en el hombre y en animales domésticos, entre ellas podemos destacar la enfermedad de Chagas cuyo agente etiológico es el Tripanosoma cruzi, que se encuentra principalmente distribuida en el continente americano, afectando países como: México (en el sureste), Brasil, Argentina y Chile entre otros.¹

Carlos Chagas en 1909 descubrió en el intestino de un insecto del género triatoma el Tripanosoma cruzi; que posteriormente inoculó monos con este protozoario y observó el mismo padecimiento encontrado con gran frecuencia en habitantes de varias regiones de Brazil. En honor a este investigador, a la enfermedad se le denominó enfermedad de Chagas.

El Tripanosoma cruzi es un parásito obligado que tiene dos fases en su ciclo vital, una en el hombre y otra en los insectos transmisores. Es un protozoario pleomórfico, en la sangre de los mamíferos se encuentra en su forma típica conocida como: Tripanosoma que mide alrededor de 20 micras, siendo los detalles característicos de esta forma: el citoplasma en forma de media luna, núcleo al centro, membrana ondulante y un flagelo.

En las células del sistema retículo endotelial se encuentra principalmente como leishmania, cuyas características son: citoplasma redondo u ovoidal, midiendo aproximadamente 1.4 a 1.5 micras, posteriormente como leptomonas y criticidias que son

1- Craig and Fount, Clinical Parasitology, Lea & Febiger, 7th ed. pag. 147-160, 1964.

formas intermedias entre leishmania y tripanosoma.

En los insectos transmisores se puede encontrar como leishmania, leptomona, critidia y tripanosoma.

Generalmente, para que se manifieste la enfermedad de Chagas, el insecto transmisor pica al huésped en zonas como la comisura de los labios y cerca de los párpados, en este proceso el insecto defeca y en el excremento lleva los tripanosomas que se introducen al huésped en el punto de picadura. En México - las principales especies que lo transmiten son: Triatoma protracta, T. phyllosoma y T. pallidipennis conocidas vulgarmente - como chinches hociconas o chinches besuconas.

Una vez que el Tripanosoma ha entrado al cuerpo se traslada a los nódulos linfáticos mas cercanos, proceso que se lleva aproximadamente en tres días y se reproduce en las células de este tejido provocando inflamación en la zona circundante a la picadura, posteriormente se disemina por todo el organismo.

El Tripanosoma se reproduce por fisión binaria y en el organismo solo puede hacerlo en el interior de las células del retículo endotelial, eventualmente las logra llenar y destruir, por esta razón se ven muy afectados los órganos como: bazo, hígado, nódulos linfáticos y médula osea, pero también pueden atacar otros tejidos como el miocardio y el sistema nervioso central.

El pronóstico de la enfermedad en general es grave, afectando principalmente niños de meses a 2 años de edad, a los cuales puede causar la muerte, en adultos es progresiva y puede llegar a ser paralizante, no se conocen muchos casos de cura

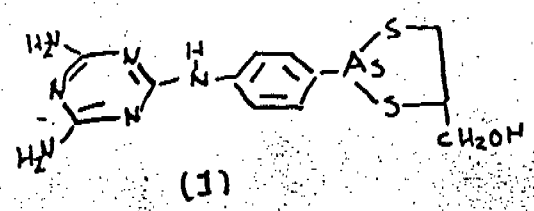
ción espontánea, el parásito puede vivir por años.

Hasta el momento no existe tratamiento eficaz y las medidas preventivas se reducen al control de los insectos transmisores.

La mayoría de los tripanomicidas son efectivos contra el Tripanosoma extracelular, pero no cuando este está dentro de las células, por esta razón no son muy eficaces.²

Por lo anterior no existe un fármaco prototipo del cual podríamos establecer relaciones estructura química actividad-biológica para desarrollar una estrategia racional para la búsqueda de tripanomicidas, por lo que se tienen que probar compuestas al azar y/o basándonos en los estudios bioquímicos y fisiológicos del tripanosoma, encontrar puntos vulnerables del metabolismo de éste y ensayar con productos que hipotéticamente actuarían a este nivel.

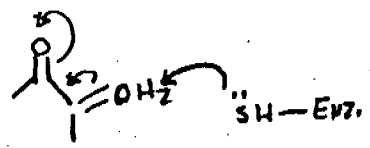
Cuando se estudió el efecto de compuestos arsenicales como el melarsoprol(1), con tripanosomas se propuso como mecanismo de acción de estos compuestos, la interacción de los grupos sulfhidrilos de enzimas esenciales del metabolismo de los tripanosomas con el arsénico, provocando de esta manera su muerte.²



2. GOODMAN AND GILMAN, The Pharmacological Basis of Therapeutics, MacMillan Co. 4th ed. (1971), pp-1144-1163.

Sin embargo es de llamar la atención la mayor selectividad de los arsenicales por las enzimas del parásito en relación a las del huésped, siendo por esta razón menos tóxicos para este último, como lo ha demostrado Flynn y Bowman³ al encontrar que los arsenicales obran de modo diferente sobre la enzima glucolítica terminal, piruvato cinasa, según esta enzima pertenezca al parásito o al huésped.

Como se ha propuesto en capítulos anteriores la oxidación de los piqueroles a la dicetona (*) que contiene sistemas de cetona, no saturados. Kupchan⁴ ha demostrado que estos sistemas, en especial cuando existe un metileno exocíclico pueden reaccionar con los grupos sulfhidrílicos de aminoácidos por adición de estos a los sistemas cetona, no saturados, como se puede ver en la fig. 2



Basados en esta hipótesis se escogió el piquerol-A para probarlo contra Trypanosoma cruzi.

Bioensayo de piquerol-A contra Trypanosoma cruzi

El piquerol-A se probó in vitro con tripanosomas en fase de epimastigotes, a concentraciones que van de 0.1 a 1 mg/ml del producto. Inicialmente la concentración de tripanosomas fué de 12 X 10⁶ células/ml, se dejaron incubar a 28°C y cada 24 horas se contaron las células y se observaron al microscopio frotis preparados de cada tratamiento y control durante 5 días.

3 - Flynn I.W and Bowman I.B. R. TRANS. R. Soc. Trop. Med. Hyg. (3, 121, 1969).

Las curvas de crecimiento obtenidas al graficar tiempo contra concentración de tripanosomas, para cada tratamiento y control (gráfica 1), mostraron que el piquerol-A inhibe totalmente la multiplicación de estos parásitos a concentraciones que van de 0.2 mg/ml, y a concentraciones de 0.1 mg/ml los tripanosomas se multiplican pero mas lentamente que el control, esto indica que la dosis mínima efectiva in vitro es cercana a 0.1 mg/ml.

Por otro lado los tripanosomas tratados con el producto -- mostraron su citoplasma en formas esféricas u ovoides, siendo la forma normal de estos alargada, además presentaron cuerpos de inclusión y deformación del flagelo estos efectos fueron mas drásticos a concentraciones de 0.8 mg/ml.

Por lo anteriormente establecido, el piquerol-A resulta -- un producto interesante, para ser investigado mas ampliamente -- como tripanocida. Los resultados hasta aquí obtenidos deben interpretarse con cuidado, ya que la terapia de la enfermedad de Chagas requiere que el fármaco elimine al tripanosoma cuando éste se encuentra infestando las células del organismo. Por esta razón es necesario el bioensayo in vivo y el estudio toxicológico del compuesto para mamíferos y el hombre.

También sería conveniente aplicar las investigaciones a -- otro tipo de parásitos similares al T. cruzi como lo son otras especies de tripanosomas que causan padecimientos en otras partes del mundo como: T. zambiense y T. rhodensiense y con protozoarios del género Babesia que afectan al ganado bovino generando grandes pérdidas en la industria pecuaria.

Toxicología del Piquerol-A

Se determinó la dosis letal media del piquerol-A[†] en ratas - el resultado de este estudio fué de 600 mg por Kg de peso del animal.

Este resultado si se pudiera extrapolar a animales domesticos y al hombre es prometedor en terapeutica veterinaria y humana. No obstante además de este estudio hay que conocer mas acerca de su toxicología como : la toxicología crónica, posibles efectos teratogénicos y carcinogénicos entre otros.

† LA DETERMINACION DEL LD₅₀ FUÉ HECHA EN EL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA DE LA FACULTAD DE MEDICINA POR EL DR. RODOLFO RODRIGUEZ CARRAZA Y COLABORADORES.

CONCLUSIONES

Los estudios espectroscópicos de ^{13}C de Piquerol-A y de espectroscopía de masas de alta resolución de Piquerol-A y Piquerol-B confirman las estructuras propuestas para ambos productos, y resultan de interés para futuras investigaciones.

La quinona obtenida por oxidación del Piquerol-A es potencialmente muy interesante desde el punto de vista biológico, no obstante se necesitan métodos más eficaces para su síntesis y preparar derivados de este producto más estables, para su estudio biológico.

Se propone la estructura de la trinervina, como un diterpeno del tipo de pináreno, quedando por determinar la configuración de carbono 15.

La piquerina, producto aislado por Río de la Loza resultó ser un glucósido, compuesto por dos unidades de glucosa y como aglicón la trinervina.

Los extractos acuosos de las hojas y raíces de la P. trinervia y los piqueroles A y B poseen actividad in vitro inhibitoria sobre la germinación y crecimiento de semillas que coexisten con la planta. El piquerol-A resultó ser el producto más potente.

Los piqueroles A y B en solución acuosa matan larvas de Boophilus microplus de una manera similar a los organo-fosforados comerciales.

Los Piqueroles también matan a las hembras adultas pero no inhiben la oviposición ni la eclación.

El piquerol-A en solución acuosa inhibe in vitro la multiplicación de epimastigotes de *T. cruzi* y causa malformaciones como hinchamiento de su citoplasma y acortamiento del flagelo.

La dosis letal media del Piquerol-A en ratas es de 600 mg - por Kg de peso.

PARTE EXPERIMENTAL

MATERIALES.

Obtención de la planta

La planta Piqueria trinervia fué recolectada en octubre de 1978 en los alrededores de la nueva carretera al cerro del -- Ajusco (Mex. D.F.) y fué identificada por la Dra. Ana Luisa -- Anaya Lang^{**} con una muestra del herbario del Instituto de Biología de la U.N.A.M.

INSTRUMENTACION

Los datos de infrarrojo se obtuvieron de un espectrómetro-Perkin-elmer 337 de doble haz, la mayoría de las muestras se -- corrieron en películas de cloroformo, la posición de las ban-- das se describen en cm.

Los espectros de resonancia magnética nuclear se determina-- ron en espectrómetros:EM 90-varian, HA 100-varian y HA 60-varian, en la sección de métodos se describe en cada caso cual fué u-- tilizado. Se usó tetrametil silano como referencia interna, la mayoría de las muestras se trabajaron con deuterocloroformo y las excepciones se especifican. Los desplazamientos químicos de las señales están expresados en unidades de partes por millon (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) están dadas en hertz (Hz).

El espectro de C-13 del piquerol-A fué obtenido en el De-- partamento de Química de la Universidad de Ginebra Suiza, así-- como el espectro "off-resonance" espectro totalmente acoplado-- se obtuvo en el Departamento de Química de la Universidad de # Toronto.

** se agradece a la Dra. Anaya por haber identificado la planta*

Los espectros de masas fueron obtenidos en los espectrómetros ABI-MS-30 y Dupont-21-490B y el espectro de masas de alta resolución del piquerol-A así como el espectro de masas del piquerol-B fueron obtenidos en el Departamento de Química de la Universidad de Cornell N.Y., en condiciones de impacto electrónico de 70ev. Las muestras fueron determinadas por la técnica de introducción directa. En la sección de metodología solo se reportan las señales prominentes y los iones moleculares.

La intensidad de las señales se reporta como porcentajes relativos al pico base.

Las rotaciones ópticas fueron medidas en un polarímetro Perkin-Elmer-241.

Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher Jones y no están corregidos.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

En general se utilizó gel de sílice 60, 0.2-0.5 mm (merk), en los experimentos donde se emplearon otros adsorbentes se es pecífica.

CROMATOGRAFIA EN PLACA FINA

Para cromatografía en placa fina analítica se dispuso de - placas comerciales 60 F- 254 merk. Las manchas fueron revela- das con sulfato cérico (CeSO₄ - 12g.- en H₂ SO₄ cōncentrado-40g, 22.2 ml-mas hielo 350 g), tambien se visualizaron con luz ultravioleta.

Las placas comerciales preparativas fueron de 20 X 20 cm - (60 F 254, 2mm merk).

En la determinación analítica de azúcares se prepararon placas de 5 X 10 cm con gel de sílice suspendida en una solución-

acuosa de bisulfito de sodio 0.1 molar (80 ml)¹. Usando como referencias muestras analíticas de carbohidratos merk. Se empleó como revelador una mezcla de fenol-ácido sulfúrico (fenol-3g- mas ácido sulfúrico concentrado-5ml) en alcohol etílico (95ml).

DISOLVENTES

Los disolventes usados para extracciones, cromatografía en columna, cromatografía en placa fina y procedimientos, como transferencia de material de un envase a otro, fueron purificados -- por destilación de disolventes grado técnico a presión ambiente.

Los disolventes empleados como medio de reacción fueron reactivos analíticos de la casa merk.

Los disolventes anhidros que se emplearon fueron: eter etílico anhidro (Merk), N-N-dimetilformamida la cual se preparó -- por agitación magnética durante 12 horas con tamiz molecular y después se destiló a presión ambiente.

REACTIVOS

La mayoría de los reactivos comerciales fueron de la casa Merk y de grado analítico.

El yoduro de metilo anhidro fué preparado primero lavando -- lo con una solución acuosa de hidróxido de potasio al 10 % y -- después con agua. Se secó con sulfato de sodio anhidro y des -- pués se destiló a presión ambiente con yoduro de calcio.

1 - SUSUHU ADACHI, JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY, 12, 295, (1965)

Dioxido de manganeso activado²- Una solución de sulfato de manganeso tetrahidratado (111g-0.5 M.) en agua(150 ml) y una solución acuosa de hidróxido de sodio (40 %,120ml) fueron combinados y adicionados simultaneamente durante una hora con agitación y a temperatura de ebullición, a una solución de permanganato de potasio (96 g, 1.6 M.) en agua (600 ml). La mezcla de reacción se dejó con agitación una hora mas. El dioxido de manganeso precipitado fué colectado por centrifugación y lavado con agua hasta que las aguas del lavado no tuvieran color. El sólido(90 g, 1.03 M.) se secó en una estufa a 120 C.

Clorocromato de piridina (Reactivo de Corey)³- A una solución acuosa de ácido clorhídrico 6 molar (92 ml,0.55 M.) se adicionó trióxido de cromo (50g,0.5M.) rápidamente y con agitación magnética. Cuando se disolvió completamente se enfrió a 0 C,-- se añadió lentamente piridina (40g,0.5M.) y se dejó toda la noche a 4 C. El clorocromato de piridina (90g,0.39 M.,78%) es un precipitado amarillo que se aisló por filtración al vacío y se lavó con agua fria varias veces.

Reactivo de Jones⁴ - El trióxido de cromo (26.72g,0.3 M.) se disolvió en ácido sulfúrico concentrado (23ml) y se diluyó con agua (100ml).

2- *Atlemborow*, J. Chem. Soc., 1092, (1952).

3- *Corey E. J.*, *Tetrahedron Letters*, 31, 2647, (1975)

4- *Dominguez X.* *Metodos de Investigacion Fitoquímica*, *Limaon, MEXICO* 1ª Ed. (1973)

Reactivo de Fehling - Solución A. sulfato cúprico (34.6g, 0.2M.) en agua (500ml). Solución B. Hidróxido de sodio (60g,) y tartrato de sodio y potasio (173g) en agua (500ml). Cuando se efectúa la reacción se mezclan en partes iguales.

Procedimientos generales de reacción

En las reacciones en condiciones anhidras el material de vidrio y agujas de jeringas se secaron en una estufa a 120 C durante una hora. Los dispositivos usados como reactores en general fueron bolas de una, dos y tres entradas esmeriladas. Las entradas se protegieron con tapones de hule y la transferencia de líquidos y soluciones se hizo via jeringa.

En las reacciones en condiciones inertes se burbujeó gas argón. El calentamiento se hizo con canastas y se controló la temperatura con reóstatos. En todos los casos donde se requirió la agitación esta fué magnética.

Microanálisis

Los microanálisis se hicieron en el laboratorio de análisis elementales del Dr. Pascher. en Bonn Alemania.

Experimentos con bacterias y levaduras

Las cepas E. coli, S aureus, C. albicans , fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología de la Facultad de Química de la U.N.A.M..

Los medios de cultivo solidos que se emplearon fueron: --- Hinton-Mueller (3.8 g de medio en 100ml de agua) y agar dextrosa Sabureau (6.5 g en 100 ml de agua) ambos de la casa Bioxon.

Se emplearon cajas de petri estériles de plástico de 10 cm de diámetro. Los microorganismos se sembraron en las placas -- con hisopos de algodón esteriles. Los discos de papel (1 cm de diámetro) se hicieron con papel de filtración rápida y se cartaron con un sacabocados eléctrico.

El material de vidrio, medios de cultivo y los discos de papel se esterilizaron con autoclave (120 C y 20 lbs) durante -- 30 min. Las bacterias fueron incubadas a 37 C y la levadura a 28 C.

Experimentos con semillas

Las semillas fueron proporcionadas por el Biólogo Francisco Espinoza y la Dra. Ana Luisa Anaya Lang del Instituto de -- Biología de la U.N.A.M., se dispuso de las siguientes especies: Bidens odorata, Bidens serrulata, Brunus carinatus, Lopezia → racemosa, Lenidium virginicum, Raphanus raphanistrum, Mimosa → pubica, Mimosa somnians, col y nabo.

En los experimentos se emplearon cajas de petri de cristal de 10 cm de diámetro, se trabajó con agar-agar (biocox) como -- soporte al 1% en agua destilada. La germinadora consistió en -- una estufa a temperatura de 28 C con una lámpara de luz de día controlada automáticamente para obtener fotoperíodos de 12 horas.

Experimentos con garrapatas

Se trabajó con larvas de Boophilus microplus proporcionadas por el Dr. Ricardo Campos del Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias, las hembras adultas preñadas se obtuvieron

ron infestando un becerro Holstein hembra de 70 Kg. con las larvas. El becerro se mantuvo en observación en un cuarto de aislamiento durante 3 semanas. Al final se recogieron las garrapatas y fueron lavadas. Se seleccionaron garrapatas con un peso aproximado de 200 mg.

Para mantener las condiciones de temperatura (28°C) y humedad (90 %) se dispuso de campanas de desecación con una solución acuosa saturada de cloruro de sodio y estas se mantuvieron en una estufa a 28°C. Las observaciones se hicieron con microscopio estereoscópico y para contar se utilizó un contador de - Hope^o.

Experimento con Tripanosoma cruzi

La cepa que se empleó se aisló de triatomas de la Cruz -- Jalisco en abril de 1976 y se ha mantenido a los tripanosomas en fase de epimastigotes desde entonces[#].

Medio L.I.T.- Se preparó con una infusión de hígado DIFCO (20 g.), triptosa DIFCO (5 g), fosfato monoácido de sodio anhidro (8 g.), fosfato diácido heptahidratado (15.1 g), cloruro de sodio (4 g), cloruro de potasio (0.4 g), destrosa (2 g) en agua destilado (1 l.) y se esterilizó en autoclave (120 C , - 20 lbs.) durante 15 min.

Medio de cultivo- Al medio L.I.T. (95 ml) se le añadió suero bovino fetal de la marca Bicol (5 ml), previamente inactivado a 56 C durante 30 min., luego se añadió hemina (400 mg.)

La cepa fue proporcionada por la Hcn C. Clementina Castro del Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M.

El medio de cultivo fué observado con microscopio a las 72 horas y no presentó contaminación por bacterias ni hongos.

Los tripanosomas se inocularon a matraces erlenmeyer con ---
 tapón de rosca de 125 ml via jeringa en una campana de flujo -
 laminar. Las soluciones de los productos se filtraron previa-
 mente con ^{1/100} filtros milipore.

Durante el experimento los tripanosomas se contaron con un contador de células Coulter, y las observaciones se hicieron - con un microscopio Zeiss a 50 y 100 aumentos.

Tinción de las preparaciones de Tripanosoma cruzi- Para te-
 ñir las preparaciones se empleó colorante Geimsa de la marca -
 Merk, se toma ron 5 ml y se diluyeron con 60 ml de agua desti-
 lada y finalmente se filtraron mediante filtro milipore.

ABREVIATURAS

Unidades: mol (M), milimol (mM). Disolventes: N,N-dimetil-
 formamida(DMF), dimetilsulfoxido (DMSO).

Espectros: infrarrojo (ir), resonancia magnética nuclear de hi-
 drógeno (rmp), resonancia magnética nuclear de carbono 13 (rnc^{13}C),
 espectroscopia de masas (em), masa/carga (m/z), ión molecular
 (M^+). Para la intensidad de las señales de ir: fuerte (f), me-
 dia (m) y débil (w). La multiplicidad de las señales en rmp: -
 singulete (s), singulete ancho(sa), doblete (d), triplete(t), -
 cuarteto (q) y doble de doble (dd), constantes de acoplamiento
 (J) y nH para especificar el número de hidrógenos.

Los rendimientos de las reacciones se describen como por-
 centaje, los puntos de fusión están dados en grados centígrados
 (C) y no están corregidos.

Cromatografía en placa fina (cpf) y cromatografía en placa preparativa (cpp).

METODOLOGIA

✓ Obtención de piquerol-A, (5-metilen-6^o-(metiletenil)-2-ciclohexen-1^o, 4^o-diol.) (I)

Las hojas y flores (3 Kg) enteras de P.trinervia, se extraen con cloroformo (9 l) a reflujo durante 12 horas repetidas veces. El extracto se concentró a sequedad por destilación a presión ambiente.

✓ El extracto cloroformico (80 g) se fraccionó por cromatografía en columna con gel de sílice (300 g) y se eluyó con un gradiente de benceno y acetato de etilo. De las fracciones obtenidas, con la proporción de benceno-acetato de etilo (1:1) ^{¿quien?} cristalizó como cristales blancos, pf = 139-40, que se purificó por cristalización en cloroformo. Espectro de ir(KBr): 3400 -- (i, OH), 3050 (w, C≡CH), 1640 y 1650 (m, C=C), 1370 (i, CH₃) -- 1075 (i, C-O) y 975 (i, CH₂ exocíclico). rmp(90MHz): 1.77(sa, 3H), 2.43-2.56(m, 2H), 2.9(sa, 1H), 4.03-4.36(m, 1H), 4.5-4.7(n, 1H), - 5.0-5.1(m, 2H), 5.3-5.43(m, 2H) y 5.7-6.13(m, 2H). r³C (DMSO): 23.371(q), 67.26(d), 69.008(d), 108.019(t), 113.370(t), 113.545(t), 130.922 (d), 132.440(d), 143.075(s) y 146.528(s). em(Dupont) m/z : M⁺-166(7.7), 148(37.2), 133(53.8), 119(64.1), 105(55.1), 91(51.3), 79(76.9), 67(37.2), 57(100), 41(92.3), y 39(91).

Obtencion de piquerosol-B; (5-metilen-6 β -(metiletetil)-2-ciclohexen-1 β , 4 α -diol).(II)

Se empleó una muestra original proporcionada por el Dr. Alfonso Romo de Viver. La muestra es cristalina de color blanco-
pf= 114-115. ir(KBr): 3250(i,OH), 2850(m,CH), 1600(m,=C), 1370
(w,CH₃) y 1070(i)C-O), rmp (90 MHz): 1.76(sa,3H), 3.13(d,J=3,2H),
5.2-5.3(m,2H) y (sistema ABancho, Jab= 10 Hz, 2H). em, m/z: E⁺-
166(5.2), 148(42.9), 119(100), 105(68.8), 91(55.8), 79(84.4),
67(31.2), 57(89.6), 41(63.1), y 39(83.1).

Diacetato de piquerol-A (III).

A una solución de piquerol-A (250 mg, 1.5 mM) en piridina + (1 ml) se le añadió anhídrido acético (1 ml, 9.8 mM), se calentó durante dos horas en baño de vapor, se vertió en agua, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con una solución acuosa de sulfato cáprico (10%) y con agua, se secó y se concentró[#].

El diacetato de piquerol-A resultó ser un aceite que se purificó por cromatografía en columna de alúmina básica grado - (II-III Brockman, 1 g), el diacetato (200 mg, 1.2 mM, 80%), se obtuvo al diluir con hexano. Ir: 1740 (i, C=O), 1650 (m, C=C), 1375 (i, CH₃) y 1240 (i, C-O). rmp (90 MHz): 1.73 (sa, 3H), 2.03 (s, 3H), 2.06 (s, 3H), 3.3 (d, J = 6 Hz, 1H), 4.86-4.96 (m, 2H), 5.16-5.23 (m, 1H), 5.27-5.3 (m, 1H), 5.33-5.47 (m, 1H) y 5.6-6.25 (m, 3H).

Oxidaciones de piquerol-A

a) Oxidación con dióxido de manganeso activado[#] - El piquerol-A (500 mg, 3 mM) se agitó[#] durante 30 min con una suspensión de dióxido de manganeso activado (5 g, 57 mM) en cloruro de metileno (25 ml) a temperatura ambiente durante 12 horas. La mezcla se filtró y se concentró a presión reducida y el residuo (450 mg), resultó ser una mezcla compleja por cpf (gel de sílice, cloroformo-hexano 3:1).

b) Oxidación con clorocromato de piridina (reactivo de Corey)[#]

El clorocromato de piridina (400 mg, 3 mM) se suspendió en cloruro de metileno (4 ml) con agitación.

[#] VER PARTE DE MATERIALES

El piquerol-A (170 mg), 1 mM) disuelto en cloruro de metileno (2 ml), se añadió en una sola porción a la suspensión a temperatura ambiente. Se dejó reaccionar durante 12 horas y posteriormente se añadió metanol (1 ml), después eter etílico (100 ml) y se decantó. El residuo insoluble se lavó repetidas veces con porciones de eter etílico (50 ml) hasta que el precipitado tomó una apariencia de sólido negro granular. La solución eterea se concentró a presión reducida. Se recuperó piquerol-A (50 mg, 0.3 mM), el resto fué un residuo aceitoso que por cpf (benceno-acetato de etilo 3:2) reveló una mancha abundante color naranja con ácido sulfúrico de $R_f \approx 47\%$ correspondiente a la quinona (IV) que se purificó por cpf (benceno-acetato de etilo 3:2). La quinona (20 mg, 0.1 mM, 10%) no cristalizó.

c) Oxidación con reactivo de Jones- El piquerol-A (800 mg, 4.8 mM) disuelto en acetona (20 ml), en un baño de hielo seco y acetona (-10 C) se le añadió reactivo de Jones⁷ gota a gota lentamente hasta que se observó coloración constante del reactivo

Posteriormente se añadió metanol (5 ml), se vertió en agua y se extrajo con acetato de etilo y finalmente se lavó con una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 10%. Se secó y concentró, obteniéndose un residuo aceitoso (600 mg) que por cpf mostró una mancha naranja $R_f \approx 47$ idéntica a la de la quinona (IV).

El residuo se percoló en una columna de gel de sílice (3 g) y se eluyó de hexano a benceno. Se obtuvieron 80 mg (0.4 mM, 8%) de la quinona (IV). Ir: 3450 (1, OH), 3070 (w, =CH), 1650 (1, $\overset{R}{C}=\overset{R}{C}$), 1600 (1, $\overset{R}{C}=\overset{R}{C}$), 1375 (w, CH₃), 1050 (1, C-O). rmp (90 MHz):

1.96(s,3H), 2.4-2.8(m,1H), 4.5(sa,2H), 4.83-4.9(m,1H), 5.23-5.3(m,1H), y 6.7(s,2H).

Obtención de trinervina (V)

Hojas y flores (1 Kg) enteras de P. trinervia se pusieron a fermentar en condiciones aeróbicas (la planta humedecida esparcida en charolas) y a temperatura ambiente durante 5 días. Se extrajo con cloroformo (5 l.) a temperatura ambiente dos veces y el extracto cloroformico se destiló a presión ambiente a una décima parte del volumen original. La trinervina (1g) precipitó espontáneamente y se recristalizó de acetona-metanol. Cristales blancos, $[\alpha]_D^{20} = -209-10$, ir(nujol): 3400(1,OH), 1615(ν , C=C), 1380 y 1670(m, gem dietilo). ν_{max} (90 MHz) piridina-D 5): 0.85(s, 3H), 1.08(s, 3H), 1.18(s, 3H), 3.48(m, 1H), 3.91(s, 2H), (m, 1H), em(Dupont) m/z: M^+ 338(2.2), 320(92.9), 305(35.7), 259(61.9), 241(57.1), 168(47.6), 135(71.4), 119(61.9), 105(90.5), 91(83.3), 81(66.7), 77(83.3), -- 69(54.8), 57(47.6), 43(100).

Análisis elemental encontrado: C 71.06 %, H 10.20 %, O 19%.

Calculado para: $C_{20}H_{34}O_4$: C 70.97 %, H 10.13 %, O 18.91%.

Aldehído de trinervina (VI)

A una solución de trinervinol (500 mg), 1.5 mM) en tetra--hidro furano (6 ml), se le añadió peryodato de sodio (600 mg, 4.3 mM) mas agua (5 ml) con agitación a temperatura ambiente. La reacción se dejó seis horas y se concentró a presión redu--cida (3 mm de Hg) hasta sequedad. El aldehído precipitó y se --

redisolvió en acetona y cristalizó de este disolvente. Se obtuvieron 430 mg. de cristales blancos (1.4 ml, 93.3 %), n_D^{20} = 1.93-4, μ (nujol): 3540(1,OH,libre), 3340(1,OH,asociado), 2725(w,C-H aldehído), 1720(C=O), τ_{mp} (90 MHz, piridina/D5): 0.8(s,3H), 1.06(s,3H), 1.16(s,3H), 2.93(dd, $J=3$, $J=12$ Hz, 1H), 3.43(dd, $J=6$, $J=9$ Hz, 1H), 5.46-5.67(m, 1H) y 9.86(s, 1H), em m/z : M^+ - 30(CH₂=O), 276(9.7), 258(4.1), 243(13.8), 145(6.7), 135(10.3), 122(10.3), 91(20.7), y 83(100).

Diacetato del Aldehído (VI a)

A una solución de aldehído(50 mg, 0.16 mM) en piridina se añadió anhídrido acético (1ml, 9.8 mM) siguiendo el procedimiento de obtención del compuesto (III). El diacetato(40 mg, 62.5%) resultó ser un aceite que se purificó por cromatografía en columna de gel de sílice (1 g) eluyendo con hexano, μ (nujol): 2710(w, CH aldehído), 1735(C=O ester), 1710(C=O aldehído), 1250(i, C-O), τ_{mp} (100 MHz); 0.76(s, 3H); 0.88(s, 3H), 0.96(s, 3H), 2.01(s, 3H), 2.03(s, 3H), 4.00(s, 2H), 4.49(dd, $J=6$, $J=9$ Hz, 1H), 5.5-5.7(m, 1H) y 9.47(s, 1H), em m/z : M^+ -390(1.6), 330(18), 276(3.1), 255(12.5), 119(20.3), 107(22.7), 91(19.5), 43(100).

Reducción del aldehído(triol)(VII)

A una solución de aldehído(100mg, 0.3 mM) en metanol (20 ml) en baño de hielo(5 C), se le añadió borohidruro de sodio(150mg, 3.9mM) disuelto en metanol (15 ml). Después se vertió en agua, se extrajo con acetato de etilo, este se lavó con agua se secó y se concentró a sequedad. El triol(40 mg, 0.13 mM, 43.3 %) se purificó por cristalización de hexano-acetona y se obtuvieron cristales blancos.

$\nu_{\text{max}}=120$, ir (nujol): 3340(1,OH), 1375(m,CH₃), y 1060(1,C=O), τ_{mp} (100 MHz) - DMSO-d₆): 0.82(s,3H), 0.86(s,3H), 0.96(s,3H), 3.2(d, J=5, J=9 Hz, 1H), 3.39 - (s, 2H), 3.46(s, 2H), y 5.28-5.42(m, 1H), em, m/v⁺M⁺-18(H₂O) 290(29.1), 275 - (48.1), 257(43), 159(25.3), 135(49.4), 119(82.3), 105(81.01), 91(84.8) y 41(100).

Acetato del triol(VIIa)

El triol(40 mg, 0.12 mM) se acetiló con piridina (1 ml) X anhídrido acético (1 ml) y se trabajó de la manera ya descrita para los productos (III) y (VIa). El triacetato (40 mg, 0.09 mM, 75%) resultó ser un aceite.

ir: 1740(1,C=O), 1375(1,CH₃) y 1240(1,C=O), τ_{mp} (100MHz): 0.86(s, 3H), 0.96(s, 3H) 2.04(s, 9H), 3.86(s, 2H), 3.94(s, 2H), 4.5(dd, J=6, J=9 Hz, 1H) y 5.3-5.48 (m, 1H).

Monoacetónido del triol(VIIb)

A una solución del triol (50mg, 0.16 mM) en acetona (10 ml) se le añadieron 3 gotas de ácido clorhídrico concentrado, se dejó a temperatura ambiente durante 24 horas y después se vertió en una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 10%. Se extrajo con acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró a sequedad. El monoacetónido (20 mg, 0.06 mM, 37.5%) se purificó por cristalización de hexano-acetona. Obteniéndose cristales blancos con $\nu_{\text{max}}=120$, ir: 3440(1,CH), 1375(1, doblete, gem dimetilos) y 1040, 1090(1,C=O), τ_{mp} (100 MHz): 0.80(s, 3H), 0.88(s, 3H), 0.98(s, 3H), 1.4(s, 6H), 2.3-2.5(m, 2H), 3.24(dd, J=6, J=9 Hz, 1H), 3.44(s, 2H), 3.56(s, 2H) y 5.28-5.56(m, 1H).

Reducción de Wolff Kishner del aldehído (VI)

A una solución de aldehído (150 mg, 0.49 mM) en etilenglicol (5 ml) X en una atmósfera inerte y con agitación, se añadió hidrato de hidrasina (0.2 ml, 75 mg, 1.9 mM) y una lenteja de hidróxido de potasio (75 mg, 1.4 mM). Se calentó a reflujo (75 min.), luego se retiró el condensador de aire y se evaporó el agua. Se llevó la reacción a una temperatura de 180°C durante 3 horas.

Se vertió en agua, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y concentró, dejando un residuo aceitoso que se percoló en una columna de gel de sílice (1 g). De las primeras fracciones eluidas con benceno se obtuvo el monoalcohol(VIII)(80 mg, 0.36 mM, 63.5%) como cristales blancos μ f=80-5, ir: 3320(i, OH), 1375(m, CH₃), 1080, 1040(m, C-O), ν_{mp} (100MHz): 0.9(d, J=6, 3H), 1.05(s, 3H), 1.25(s, 3H) y 5.25-5.40(m, 1H).

De las fracciones eluidas con benceno-acetato de etilo(9:1) se obtuvieron cristales blancos del diol(IX)(30 mg, 0.1 mM, 20.4%) que se purificó por recristalización de hexano-acetona, μ f=180 [CHCl₃]²⁵ + 38, ir:

ν_{mp} : 0.78(s, 3H), 0.86(s, 3H), 0.9(s, 3H), 2.3(s, 2H), 3.18-3.48(m, 1H) y 5.3-5.46(m, 1H).

Acetilación del diol (IXa)

El diol (IX) (25 mg, 0.1mM), se acetiló con piridina (1 ml) ~~X~~ anhídrido acético(1 ml, 9.8 mM) en las condiciones ya descritas. Se obtuvo el diacetato (20 ml, 0.08 mM, 80 %) que resultó ser un aceite inestable que se purificó por μ f (benceno). Se aisló la banda correspondiente a un μ f=43.5 %. ir: 1745(i, C=O), 1375(m, CH₃) y 1240(i, C-O), ν_{mp} : 0.84(d, J=7 Hz, 3H), 0.88(s, 3H), 0.97(s, 3H), 2.06(s, 2H), 3.78(s, 2H), 4.5(dd, J=6, J=9 Hz, 1H) y 5.3-5.48(m, 1H).
 ¿d donde?

Obtención de isotrinervina (XI)

A una solución de trinervina (500 mg, 1.5 mM) en metanol(50 ml) se le añadió ácido clorhídrico concentrado(0.5 ml), se calentó a reflujo durante 6 horas, después se vertió en una solución acuosa de bicarbonato de sodio al 10 %, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con agua y se concentró a sequedad.

✓ La isotrinervina (300 mg, 0.8MM, 53.3 %), se purificó por cristalización de acetona. Se obtuvieron cristales blancos μ f-208-9, ir(nujol): 3340(1,OH), 1390, 1380(w, gem dimetilos) y 1050(1, C=O), μ mp(100 MHz)(polysol): 0.73(s, 3H), 0.93(s, 3H), 0.96(s, 3H), em, m/s: M^+ - 338(2.3), 320(2.3), 288(31.41), 270(29.5), 149(34.9) 123(44.2), 105(29.1), 95(60.5), 81(53.5), 69(56.1), 55(75.6) y 43(100).

Análisis elemental encontrado: C 71.14 %, H 10.21 %, O 18.187 %.

Calculado para $C_{20}H_{34}O_4$: C 70.97 %, H 10.13 %, O 18.91 %.

Aislamiento de Piquerina (XII)

✓ Las hojas y flores enteras de *P. trinervia* (1 Kg) se extrajeron con agua a(5:1) por reflujo dos veces. El extracto acuoso se concentró por destilación a presión ambiente, después se añadió etanol (500 ml), se decantó y el residuo gomoso se lavó con dos porciones de etanol (100 ml). El extracto alcohólico se concentró al mismo volumen por destilación a presión ambiente, luego se le agregó agua (200 ml) y se filtró con gasa. El filtrado se trató con hidróxido de amonio concentrado hasta obtener un pH=10 y se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. La piquerina (2 g, 2%) precipitó espontáneamente y se purificó por cristalización en metanol. Se obtuvieron cristales blancos, μ f \approx 280 (descomposición), μ f²⁵ etanol = -27.5, ir(KBr) : - 3350(1, CH), 2900(m, CH), 1630(w, C=C), 1375(w, CH₃), y 1050(1, C=O). μ mp(60 MHz, piridina-d₅): 0.73(s, 3H), 0.96(s, 3H), 1.16(s, 3H), 1.46-2.16(m, 10-12 H), 3.83-4.5(m, 13-17 H), 6.0-6.6(m, 5-6H), em m/s : M^+ -180($C_6H_{12}O_6$). 482(2), 320(12.6), 303(31.4), 259(13.8), 145(21.4), 135(20.1), 123(31.4), 119(18.2), 105(29.6), 91(37.1) y 43(100).

Análisis encontrado: C 58.09%, H 8.15%, O 33.84 %.

Calculado para: $C_{32}H_{54}O_{14}$: C 57.99 %, H 8.21 %, O 33.8 %.

Fusión alcalina de la piquerina³

En un tubo de ensayo (13 X 100 mm), se introdujo un trocito de sodio metálico y la porción inferior del tubo se calentó hasta la fusión del sodio; entonces se agregó 20 mg de piquerina mezclados con 20 mg de sacarosa y se volvió a calentar el tubo al rojo vivo. Se dejó enfriar y se añadió lentamente etanol (1 ml). El tubo se volvió a calentar de nuevo y se le dejó caer en un vaso de precipitado conteniendo 20 ml de agua. El fondo del tubo se rompió con una varilla de vidrio y la solución resultante se calentó en ebullición y después se filtró. Se tomó una alícuota de 3 ml y se le añadieron dos gotas de una solución de bencidina (1%) y en ácido acético (5%) y se agitó la mezcla, añadiéndose tres gotas de sulfato cúprico al 1%. No se observó la coloración azul esperada para un compuesto conteniendo nitrógeno.

Ensayo de azúcares reductores de la piquerina⁴

La piquerina (30 mg) en metanol (10 ml) y tres gotas de ácido sulfúrico concentrado se pusieron a reflujar durante una hora, posteriormente la mezcla de reacción se neutralizó con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio. Se tomó una alícuota de 1 ml y se le añadió reactivo de Fehling⁵ (1 ml).

Se observó un precipitado abundante rojo ladrillo indicando la presencia de azúcares reductores.

Hidrólisis ácida de la piquerina

A una solución de piquerina (500mg, 0.7 mM) en metanol (20 ml), se le añadió agua (1 ml) y ácido clorhídrico concentrado (1ml). Se calentó a reflujo durante 6 horas y posteriormente se neutralizó con una solución acuosa saturada de carbonato de sodio. Se extrajo con acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y concentró a sequedad.

3- Shriner - Fuson, IDENTIFICACION SISTEMATICA DE COMPUESTOS ORGANICOS, LIMUSA 3^{ra} Ed, Mexico (1971), pp. 7577

4- DOMÍNGUEZ X: METODOS DE INVESTIGACION FITOQUIMICA, LIMUSA, 1^a Ed, MEXICO (1973), pp 203.

La isotrinervina (30 mg, 0.08 mM, 11 %) ^{C i} presipitó en estas condiciones y se purificó por cristalización en acetona. Fue identificada por comparación con muestra auténtica, por punto de fusión mixto.

Identificación de glucosa por cpf

La porción acuosa resultante de la hidrólisis de la piquerina al ser extraída con acetato de etilo, se concentró por destilación a presión reducida dejando un residuo aceitoso (200 mg).

Se aplicaron a las placas de gel de sílice-bisulfito de sodio 0.1 molar[#], alícuotas correspondientes de D-glucosa y del residuo de la hidrólisis. Se eluyó con propanol-agua (8.5:1.5) y se reveló con fenol-ácido sulfúrico.

Se observó la presencia de una mancha muy intensa en la fracción correspondiente al residuo de hidrólisis, poseyendo el mismo r_f de la D-glucosa.

Peracetato de piquerina (XIIa)

A una suspensión de piquerina (300 mg, 0.75 mM) en acetona anhidra (20 ml) se le adicionó en condiciones anhidras, con agitación y a 0 °C, cloruro de acetilo (20 ml, ?). Se dejó a temperatura ambiente durante una hora, posteriormente se vertió en hielo, se extrajo con acetato de etilo, se lavó con agua, se secó y se concentró dejando un residuo aceitoso (200 mg). El peracetato (150 mg, 0.14 mM, 19 %), se aisló por cpf (benceno-acetato de etilo, 1:1) y se cristalizó en etanol. Se obtuvieron cristales blancos, μ_f -84-6, i_r : 1740 (1, C=O), 1370 (1, CH₂) y 1225 (1, C-O), r_{mp} (90 MHz): 0.80 (s, 3H), 0.90 (s, 3H), 0.93 (s, 3H), -1.9-2.2 (m, 30 H), r_{mp} (Eu(FOB))₃, 30 mg, 0.04 mM): 2.03 (s, 3H), 2.12 (s, 3H), 2.16 (s, 3H), 2.23 (s, 3H), 2.26 (s, 3H), 2.43 (s, 6H), 2.56 (s, 3H), 2.73 (s, 3H), 2.86 (s, 3H).

Eter metilico de piquerina (XIIb)

A una suspensión de hidruro de sodio limpio (3 g) (lavado con hexano repetidas veces) en DMF anhidra se le añadió en condiciones anhidras, piquerina (600 mg, 0.9 mM) en DMF (5 ml).

VER PARTE DE MATERIALES

Se mantuvo en condiciones inertes con agitaci3n y a temperatura ambiente durante 4 horas. Posteriormente se aÑadi3 yoduro de metilo anh3dro (20 ml), - en frio (4 g) durante 15 min., y se dej3 en reposo en la oscuridad durante - 72 horas. Despu3s se aÑadi3 metanol (5 ml), se destil3 a presi3n ambiente hasta eliminar el ex3s^co de yoduro de metilo y metanol, luego se filtr3 y el filtra- do se destil3 a presi3n reducida a m3nimo volumen. Posteriormente se extrajo con acetato de etilo, se lav3 con una soluci3n acuosa de tiosulfato de sodio al 10 % y luego con agua, se sec3 y se concentr3, dejando un residuo aceitoso (550 mg), se percol3 en una columna de gel de s3lice (3 g) y se eluy3 con - un gradiente de benceno-acetato de etilo. El eter permet3fico (340mg, 0.4mM, - 44%) que result3 ser un aceite. Ir: 1375(1, CH₃), y 1100(C-C), rmp(100 MHz): - 0.90(s, 6H), 1.0(s, 3H), 3.26(s, 3H), 3.34(s, 3H), 3.36(s, 3H), 3.38(s, 3H), 3.48 - (s, 3H), 3.52(s, 3H), 3.54(s, 3H), 3.56(s, 3H), 3.58(s, 3H), 3.60(s, 3H), 4.28 - (d, J=6 Hz, 1H), 4.32(d, J=6 Hz) y 5.4-5.5(m, 1H). em, m/s: , 189(95.6), 157(21.7), 115(100), 103(56.5), y 91(56.5).

Bioensayos con bacterias y levaduras.

Se prepararon soluciones acuosas de piquerol-A, piquerol-B (1 mg/1 ml) - y soluciones de trinervina y piquerina en isopropanol (1 mg/1 ml), se toma- ron alícuotas de 0.06 ml para cada disco de papel. Se hicieron placas de me- dio s3lido de Hinton Yueler para E. coli y S. aureus y dextrosa sabourau pa- ra C. albicans. Las placas se sembraron con isopo de algod3n esteril homoge- neamente (una especie por placa), en cada una de ellas se deposit3 un disco - de papel impregnado con la^s soluciones de los productos mencionados, y un dis- co de papel sin nada. Los experimentos se hicieron por triplicado. Las placas se dejaron a 4^o C durante una hora y despu3s se pusieron a encubar durante - 24 horas (28^o C para la levadura y 37^o C para las bacterias). Finalmente se ni-

✓ dieron los halos de inhibición o de crecimiento bacteriano al/rededor de los discos.

Bioensayos con extractos acuosos de hojas y raíces con semillas

Hojas y raíces de P. trinervia secas y molidas se extrajeron con agua destilada a temperatura ambiente y se licuaron durante un minuto, para obtener concentraciones de los extractos al 1%, se filtraron y al filtrado se le determinó la presión osmótica para no rebasar los límites de tolerancia a este factor⁵, y se incorporaron a las cajas de petri. Se sembraron 10 semillas por tratamiento por triplicado, se pusieron a germinar a 28 °C durante 5 días. Al finalizar se midió la longitud de radículas y de talluelos y se determinaron los porcentajes de germinación.

Bioensayos con semillas de piquerol-A, piquerol-B, trinervina, isotrinervina y piquerina

Se prepararon soluciones acuosas de piquerol-A y piquerol-B a 50, 100, 150 y 200 ppm y de trinervina, isotrinervina y piquerina a 100 y 200 ppm, se midió la presión osmótica de las soluciones y se probaron de la misma manera que los extractos acuosos de hojas y raíces.

Experimentos de recuperación

De las semillas que se dejaron crecer en las condiciones anteriores para piquerol-A, se escogió la mitad de ellas y se lavaron con agua destilada (30 seg. cada plántula y semilla) y se trasplantaron a medios de agar agua destilada al 1%. Se dejaron crecer cinco días más junto con la otra mitad que no se trasplantó. Finalmente se midieron la longitud de radícula y talluelos y se obtuvo el porcentaje de recuperación[#].

Bioensayos con larvas de garrapatas

En tubos de ensayo de (13 X 100 mm) se pusieron 5 ml de una solución de piquerol-A y piquerol-B (200 y 300 ppm) o suspensiones de piquerina a la misma concentración, después se transfirieron cien larvas de garrapatas aproximadamente por tubo y se agitaron durante 2 min. Las larvas se separaron y se envolvieron en discos de papel Wathman-2 (9 cm) que se sellaron con clips

VER APENDICE ESTADISTICO

66
se introdujeron en cajas de petri, se guardaron en campanas de desecación y se incubaron a 28°C. Cada 24 horas se hizo el conteo de muertas (las larvas sin movimiento, durante tres días.

Bioensayos con hembras adultas de garrapatas (técnica de inmersión)

Se prepararon las mismas soluciones ya descritas en el experimento de larvas y 30 garrapatas se sometieron a un remojo durante 30 segundos en cada solución y testigo de agua destilada, después se colocaron en cajas de petri con tapas horadadas y se colocaron en campanas de desecación y se incubaron a 28°C. Cada 24 horas se tomaron lecturas de mortalidad, cambios de color y movimientos peristálticos, durante 20 días.

Bioensayos con hembras adultas de garrapatas (técnica de aplicación topical)

En cajas de petri de plástico horadadas se colocaron en la base cintas adhesivas donde se pegaron 20 garrapatas en posición ventral por solución. Cada garrapata se impregnó con un ml de las soluciones y testigo y se incubaron a 28°C, cada 24 horas se tomaron las mismas lecturas que en el experimento anterior, durante 20 días.

Bioensayos con tripanosoma cruzi

En erlenmeyers de 25 ml con tapón de rosca se transfirieron un ml de una suspensión de tripanosoma (40×10^6 células/ml) por 8 ml de medio, después se añadieron respectivamente ^{1ml de} soluciones de piquerol-A a concentraciones de: — 1, 0.8, 0.6, 0.4, 0.2 mg/ml, se incubaron a 28 C y cada 24 horas se contaron las células[#] y se hicieron observaciones de morfología al microscopio durante 5 días.

67
Apendice Estadístico

a) Porcentaje de Germinación (% G)

$$\% G = n/N \times 100$$

n número de semillas que germinaron

N número total de semillas sembradas

b) Porcentaje de inhibición (% I)

$$\% I = 100 - \bar{X}_T / \bar{X}_C \times 100$$

\bar{X}_T = media aritmética de la longitud de radículas o talluelos de las plántulas de los tratamientos

\bar{X}_C = media aritmética de la longitud de radícula o talluelos de los controles.

c) Porcentajes de recuperación (% R)

$$\% R = 100 - \bar{X}_R / \bar{X}_T \times 100$$

\bar{X}_R media aritmética de las longitudes de radículas o talluelos de las semillas trasplantadas

\bar{X}_T media aritmética de las longitudes de radículas o talluelos de las semillas testigo

d) Porcentaje de supervivencia (% S)

$$\% S = \frac{d}{20} \times 100$$

d = último día en que vivió cada garrapata

El número 20 corresponde al total de días del experimento.

Para la estimación de la media aritmética no se tomaron en cuenta las semillas que no germinaron.

e) Porcentaje de supervivencia medio (% S)

$$\% S = \sum \frac{S_i}{n}$$

% S porcentaje de supervivencia individual
n número de garrapatas por tratamiento o control

f) Análisis de variancia^{1,2}

Para llevar a cabo el análisis de variancia los datos procedentes del control y tratamientos con los productos se ordenaron en grupos como se muestra en el siguiente ejemplo extraído de las experiencias de inhibición de la germinación y crecimiento de plantas.

GRUPO I	GRUPO II	GRUPO III	GRUPO IV
control	Piquerol-A 50 ppm	Piquerol-A 100ppm	Piquerol-A 200ppm
34 [#]	22	8	4
42	15	10	3
39	18	6	2
27	23	4	4
38	10	3	5
51	25	10	8
42	33	9	10

Se emplearon las siguientes fórmulas para construir la:

Suma total de cuadrados = $\sum X_T^2 - \frac{(\sum X_T)^2}{N}$
572

longitud de radícula de cada plantula en mm.

N = total de datos en la tabla

Suma de cuadrados entre grupos =
(SEC)

$$\frac{(\sum X_1)^2}{n_1} + \frac{(\sum X_2)^2}{n_2} + \frac{(\sum X_3)^2}{n_3} \dots - \frac{(\sum X_T)^2}{N}$$

Suma de cuadrados dentro de los grupos = STC - SEC
(SDC)

Para estimar las variancias para el cociente "F"

$$F = \frac{S^2_b}{S^2_a}$$

$$S^2_b = \frac{S.E.C}{(g l)_1}$$

(g l)₁ = Grados de libertad entre grupos
N número de grupos

$$S^2_a = \frac{S.D.C}{(g l)_2}$$

(g l)₂ = grados de libertad dentro de los grupos N-1

El cociente resultante se comparó en las tablas de la distribución F, para niveles de 1% y 5 % de significancia.

En los experimentos de inhibición de la germinación, crecimiento y recuperación de plantas se trabajó con las longitudes en mm de radícula o talluelos para control y el conjunto de tratamientos de un mismo producto y para los experimentos con garrapatas adultas se utilizó como variable aleatoria los porcentajes de supervivencia individuales.

Estudio Químico y biológico de la planta

P. trinervia y sus componentes

Resumen de tesis

Asesores: Rafael Castillo
y Manuel Jimenez

Mario González de la Parra
Agosto, 1980

En el presente trabajo se contribuyó a la química y a la —
espectroscopía de compuestos aislados de la planta Piqueria tri-
nervia Cav. como los piqueroles A y B. Se elucidó la estructura
de la trinervina que resultó ser un diterpeno del tipo del pi-
marano (1).



(1)

Se estudió un glucosido aislado de la misma planta por el —
Dr. Río de la Loza a principios de este siglo, dicho compuesto—
está formado por dos unidades glucosa y el diterpeno trinervi-
na como aglicón, a este nuevo producto se le denominó piquerina
como la reporta originalmente este investigador.

Los extractos y compuestos de la planta se emplearon para el
estudio in vitro de las siguientes actividades biológicas: inhi-
bición de la germinación y crecimiento de plantas del habitat de
P. trinervia, actividad sobre bacterias, levaduras, larvas y hem-
bras adultas de garrapata y sobre epimastigotes de T. cruzi.

Los productos mas interesantes de estos estudios fueron el piquerol-A y el piquerol-B, ambos inhiben germinación y crecimiento de plantas, matan larvas y hembras adultas de la garrapata Bombus microplus, siendo en general el producto mas potente el piquerol-A. También se encontró que el piquerol-B estimula el crecimiento de bacterias y por otro lado el Piquerol-A -- inhibe la multiplicación y causa mal formaciones celulares en epimastigotes de T. cruzi.

Finalmente se determinó la dosis letal media del piquerol-A en ratas siendo 600 mg/Kg.