



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS.

**“RESINAS GLICOSÍDICAS DE LAS CONVULVÁCEAS COMO
AGENTES MODULADORES DE LA ACTIVIDAD ANTIBIÓTICA EN CEPAS
MULTIFÁRMACO RESISTENTES”**

TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA
BERENICE CORONA CASTAÑEDA

TUTOR: DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

COMITÉ TUTOR:
DR. ALEXANDRE CARDOSO TAKETA
CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA, UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

DR. ALFONSO ROMO DE VIVAR
INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM

MÉXICO, D.F. ENERO DE 2013.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado por las siguientes personas e instituciones:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca escolar (número de registro: 204856) otorgada durante el período de Septiembre de 2008 – Agosto de 2012 y por el apoyo económico brindado a través del proyecto 101380-Q.
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN212813) por el financiamiento parcial de esta investigación.
- M. en C. Rosa Isela del Villar de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química, UNAM, por el registro de los espectros de RMN.
- M. en C. Georgina Duarte Lisci y a la Q.F.B. Margarita Guzmán Villanueva de la USAI, de la Facultad de Química, UNAM, por el registro de los espectros de masas.
- Q.F.B. Marisela Gutiérrez de la USAI de la Facultad de Química, UNAM, por el registro de las rotaciones ópticas.
- Dr. Federico del Río Portilla, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM, por proporcionar la cepa de *Escherichia coli* Rosetta-gami.
- Dr. Fernando Calzada Bermejo, Unidad de Investigación Médica en Farmacología y Productos Naturales, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, por proporcionar las cepas hospitalarias de *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi*.
- Dr. Alexandre Cardoso Taketa, Departamento de Productos Naturales, de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos y al Dr. Alfonso Romo de Vivar, Departamento de Productos Naturales, Instituto de Química de la UNAM, miembros del comité tutorial, por su constante interés y seguimiento durante el desarrollo de la presente investigación.
- Miembros del jurado por sus observaciones que permitieron la corrección del presente manuscrito.
- Dra. Mabel Frago Serrano del Departamento de Farmacia, de la Facultad de Química, UNAM, por su asistencia técnica en los procedimientos cromatográficos.
- Dr. Rogelio Pereda Miranda por su atención, interés y dedicación en la dirección de la presente tesis.

JURADO ASIGNADO

Presidente Dr. Alfonso Romo de Vivar Romo
Vocal Dr. Robert Arthur Bye Boettler
Vocal Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal Dr. Fausto Rivero Cruz
Secretario Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Dr. Rogelio Pereda Miranda.

Sustentante: Berenice Corona Castañeda.

Índice

Resumen	1
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. La familia Convolvulaceae	3
2.2. El género <i>Ipomoea</i>	4
2.3. Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae	4
2.4. Resinas glicosídicas del complejo cacahuate	5
2.4.1. Núcleos oligosacáridos y glicolípidos de <i>Ipomoea arborescens</i>	6
2.4.2. Núcleo oligosacárido y glicolípidos de <i>Ipomoea intrapilosa</i>	8
2.4.3. Núcleos oligosacáridos y glicolípidos de <i>Ipomoea murucoides</i>	9
2.5. Aislamiento y purificación de las resinas glicosídicas	13
2.6. Elucidación estructural de las resinas glicosídicas	16
2.6.1. Degradación química.....	16
2.6.2. Espectrometría de masas	16
2.6.3. Resonancia magnética nuclear	18
2.7. Estudios de actividad antibacteriana y modulación antibiótica de las resinas glicosídicas del género <i>Ipomoea</i>	24
2.8. Resistencia bacteriana a los antibióticos	25
2.9. Mecanismos de actividad antibacteriana	26
2.9.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular microbiana.....	27
2.9.2. Inhibición de la síntesis o funciones del ADN.....	27
2.9.3. Inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas.....	28
2.9.4. Lesión o destrucción de las membranas microbianas.....	28
2.10. Mecanismos de establecimiento de multifármaco resistencia	29
2.10.1. Inactivación enzimática.....	29
2.10.2. Modificación del blanco	30
2.10.3. Disminución de la permeabilidad.....	31
2.10.4. Bombas de extrusión	32
3. JUSTIFICACIÓN	34
4. OBJETIVOS	34

5. Publicación 1.....	35
Resumen.....	35
Introducción	36
Resultados y discusión	37
6. Publicación 2.....	55
1. Introducción	56
2. Resultados y discusión	58
3. Conclusiones	66
4. Experimental	67
4.1. Procedimientos experimentales generales.....	67
4.2. Material vegetal	68
4.3. Aislamiento y purificación de los compuestos 1 a 3	68
4.4. Caracterización estructural	68
4.5. Ensayos biológicos	69
7. Publicación 3.....	77
Resumen.....	77
1. Introducción	78
2. Resultados y discusión	80
3. Conclusiones	92
4. Experimental	93
4.1. Procedimientos experimentales generales.....	93
4.2. Material vegetal	93
4.3. Aislamiento y purificación de los compuestos 1 a 5	94
4.4. Caracterización estructural	94
4.5. Ensayos biológicos	95
8. Conclusiones	105
9. Publicación y presentaciones en congresos.....	110
10. Referencias.....	111

Lista de cuadros

Cuadro 1. Estudios químicos y actividad biológica de los cacahuates. 6

Cuadro 2. Especies convolvuláceas que poseen los núcleos oligosacáridos identificados en los cacahuates. 10

Publicación 1

Cuadro 1. Susceptibilidad de *E. coli* Rosetta gami a los glicolípidos **1-26**. 38

Cuadro 2. Susceptibilidad de las cepas hospitalarias *S. typhi* y *S. flexneri* a los glicolípidos **4, 6, 14, 16, 18-21** y **23-25**. 39

Publicación 2

Cuadro 1. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H de las murucoidinas XVII–XIX (**1–3**).^a 59

Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³C de las murucoidinas XVII–XIX (**1–3**). 61

Cuadro 3. Susceptibilidad de *S. aureus* a las murucoidinas XVII-XIX (**1–3**) y su citotoxicidad. 65

Cuadro 4. Susceptibilidad de *E. coli*, *S. typhi* y *S. flexneri* a las murucoidinas XVII-XX (**1–3**). 65

Publicación 3

Cuadro 1. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H y ¹³C de los compuestos **1** y **2**. 82

Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H y ¹³C de los compuestos **4** y **5**. 83

Cuadro 3. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H y ¹³C del compuesto **3**. 84

Cuadro 4. Susceptibilidad de las cepas MDR Gram negativo a los compuestos **1–5**. 89

Cuadro 5. Concentraciones inhibitorias 50 de las líneas celulares a los compuestos de prueba. 90

Cuadro 6. Modulación de la citotoxicidad de la vinblastina en MCF-7/Sensible y MCF-7/Vin MDR. 90

Lista de figuras

Figura 1. Flores de <i>Ipomoea tricolor</i> .	3
Figura 2. Estructura de los ácidos arboresínico y murucínico de <i>Ipomoea arborescens</i> .	7
Figura 3. Estructura del ácido operculínico A identificado en <i>Ipomoea intrapilosa</i> .	8
Figura 4. Núcleos oligosacáridos identificados en <i>I. murucoides</i> .	9
Figura 5. Glicolípidos de los cazahates lactonizados en la posición C-2 de la segunda unidad sacárida.	11
Figura 6. Glicolípidos de los cazahates lactonizados en la posición C-3 de la segunda unidad sacárida.	12
Figura 7. Aislamiento de los glicolípidos presentes en la jalapina de <i>I. wolcottiana</i> .	14
Figura 8. Reciclaje de los glicolípidos individuales de la subfracción C de la jalapina de <i>I. wolcottiana</i> .	14
Figura 9. Purificación de la subfracción C2 utilizando la técnica de reciclaje.	15
Figura 10. Espectro de masas FAB negativo del wolcotinósido I.	17
Figura 11. Región anomérica del espectro de RMN de ¹³ C del wolcotinósido I.	18
Figura 12. Región anomérica del espectro de RMN de ¹ H del wolcotinósido I.	19
Figura 13. Identificación de los metilos de las 6-desoxihexosas en el espectro de RMN de ¹ H del wolcotinósido I.	19
Figura 14. Identificación mediante RMN ¹ H de metilos terminales de los ácidos que esterifican el núcleo oligosacárido del wolcotinósido I.	20
Figura 15. Región de grupos carboxílicos del espectro de RMN de ¹³ C del wolcotinósido I.	21
Figura 16. Región anomérica del espectro HSQC del wolcotinósido I.	22
Figura 17. Sección de la porción oligosacárida del espectro COSY del wolcotinósido I.	22
Figura 18. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY del wolcotinósido I.	23
Figura 19. Los cuatro principales mecanismos de acción antibacteriana.	26
Figura 20. Inactivación de la penicilina por β-lactamasa en <i>Haemophilus influenzae</i> .	30
Figura 21. Resistencia de <i>Streptococcus pneumoniae</i> a los β-lactámicos.	31
Figura 22. Comparación esquemática de las familias de bombas de extrusión.	33

Publicación 1

Información suplementaria de la publicación 1	43
---	----

Publicación 2

Figura 1. Estructura química de las murucoidinas XVII y XVIII (1 y 2).	63
Figura 2. Estructura química de la murucoidina XIX (3).	64
Información suplementaria de la publicación 2	72

Publicación 3

Figura 1. Estructura molecular del wolcotinósido I.	87
Figura 2. Estructura molecular de la intrapilosina VII y los wolcotinósidos II y III.	87
Figura 3. Estructura molecular de la wolcotina I.	88
Información suplementaria de la publicación 3	96

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
[M-H] ⁻	Ion pseudomolecular
ATCC 25923	Cepa silvestre de <i>S. aureus</i>
Cam	Cloramfenicol
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CI ₅₀	Concentración inhibitoria 50
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear (¹ H- ¹ H)
EMRSA-15	Cepa hospitalaria de <i>S. aureus</i> resistente a metilina y que contiene el gen <i>mecA</i>
EPI	Inhibidores de las bombas de extrusión
EtBr	Bromuro de etidio
FAB-	Bombardeo rápido de átomos modalidad negativa
GpP	Glicoproteína P
HCT-15	Carcinoma humano de colon
Hela	Carcinoma humano de cervix
Hep-2	Carcinoma humano de laringe
HMBC	Correlación heteronuclear a enlaces múltiples (¹³ C- ¹ H)
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
HSQC	Correlación espectroscópica heteronuclear a un enlace (¹³ C- ¹ H)
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
Kan	Kanamicina
KB	Carcinoma epidermoide oral humano
LB	Caldo Luria Bertani

Lista de abreviaturas (continuación)

Abreviatura	Significado
m/z	Relación masa-carga
MDR	Multifármaco resistencia
MH	Caldo Mueller-Hinton
MIC	Concentración mínima inhibitoria
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina
MTT	Bromuro de 3-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio
Nor	Norfloxacin
NorA	Bomba de extrusión de múltiples fármacos especialmente norfloxacin
PBP	Proteínas de unión a penicilina
Res	Reserpina
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
SA-1199B	Cepa de <i>S. aureus</i> multifármaco resistente que sobreexpresa la bomba de extrusión NorA
Tet	Tetraciclina
TetK	Bomba de extrusión de múltiples fármacos especialmente tetraciclina
TOCSY	Correlación espectroscópica total (^1H - ^1H)
t_R	Tiempo de retención
XU-212	Cepa de <i>S. aureus</i> resistente a meticilina y que posee la bomba de extrusión TetK
α	Rotación óptica observada en el polarímetro
δ	Desplazamiento químico

Resumen

El presente estudio describe la evaluación de la modulación antibiótica de diferentes series estructurales de glicolípidos pertenecientes a la familia Convolvulaceae sobre cepas multifármaco resistentes. Se determinó que este tipo de metabolitos pueden inhibir uno de los mecanismos de resistencia a los antibióticos, las bombas de extrusión, logrando así, un aumento en la potencia y la eficacia de los antibióticos que actualmente no son eficaces en el tratamiento de infecciones causadas por cepas multifármaco resistentes.

Los resultados obtenidos durante la realización de la presente investigación se organizaron y discuten en las tres publicaciones generadas.

En la primera etapa de este trabajo (Publicación 1: Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae como moduladores de la actividad antibiótica en cepas Gram negativo multifármaco resistentes), se evaluó el potencial modulador antibiótico de veintiséis glicolípidos microbiológicamente inactivos (concentración mínima inhibitoria; MIC > 512 µg/mL) pertenecientes a las series de las intrapilosinas, las muruoidinas, las pescapreínas, las orizabinas y las tricolorinas (concentración: 25 µg/mL) sobre cepas multifármaco resistentes: *Escherichia coli* Rosetta gami y dos cepas patógenas hospitalarias, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*. Se observó que estos compuestos ejercen un efecto potenciador de los antibióticos tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol sobre las bacterias Gram negativo al aumentar hasta 64 veces la sensibilidad a los antibióticos.

La segunda etapa (Publicación 2: Glicolípidos de *Ipomoea muruoides* como moduladores de la actividad antibiótica) contempló el aislamiento y la purificación de tres glicolípidos novedosos denominados muruoidinas XVII a XIX a partir del extracto clorofórmico de las flores de *ipomoea*

murucoides mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC). La caracterización estructural de dichos pentasacáridos se realizó por técnicas espectroscópicas (resonancia magnética nuclear; RMN) y espectrométricas (espectrometría de masas por bombardeo rápido de átomos; EM-FAB). La evaluación de actividad biológica, incluyó la determinación de la actividad citotóxica frente a líneas de carcinoma epidermoide oral humano (KB), carcinoma laríngeo (Hep-2) y carcinoma cervical (Hela), y de la actividad antibacteriana y moduladora antibiótica frente a cepas multifármaco resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Rosetta gami, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*. Estos glicolípidos inactivos aumentan la potencia de los antibióticos norfloxacina, tetraciclina y cloramfenicol a concentraciones de 25 µg/mL, mostrando un efecto potenciador de hasta 16 veces y que es similar a la reserpina, un inhibidor de las bombas de extrusión de origen natural.

Durante la tercera etapa (Publicación 3: Glicolípidos de *Ipomoea wolcottiana* como moduladores del fenómeno de resistencia cruzada a fármacos), se aislaron y purificaron mediante HPLC cinco glicolípidos individuales del extracto clorofórmico de las flores de *ipomoea wolcottiana*, de los cuales se caracterizaron cuatro estructuras novedosas y la intrapilosina VII al emplear técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Respecto a la evaluación *in vitro* de la actividad biológica de los glicolípidos, se determinó que son microbiológicamente inactivos contra las cepas Gram negativo de prueba pero se demostró un incremento de la potencia y la eficacia de los antibióticos de prueba en combinación con ellos. Adicionalmente, se determinó que no poseen actividad citotóxica frente a las líneas de carcinoma humano de colon (HCT-15), carcinoma humano de mama (MCF-7), carcinoma epidermoide oral humano (KB), carcinoma cervical (Hela) ($CI_{50} > 15 \mu\text{g/mL}$); sin embargo en concentraciones de 25 µg/mL, modularon la actividad citotóxica de la vinblastina sobre las líneas MCF-7/sens y MCF-7/Vin⁺ de forma más eficaz que la reserpina, utilizado como control positivo.

Abstract

This study describes the modulatory activity of different structural series of convolvulaceous glycolipids against multidrug resistant strains. They could be considered as leads for developing potent efflux pump inhibitors (EPIs) of Gram positive and negative bacteria that can reverse microbial resistance mechanisms, favoring an increase in the strength and effectiveness of current antibiotics that are not effective in the treatment of refractive infections caused by multidrug-resistant strains.

The results obtained during this investigation were organized and discussed in three publications.

In the first step of this work, twenty-six microbiologically inactive ($MIC > 512 \mu\text{g/mL}$) convolvulaceous resin glycosides (**1–26**) belonging to the intrapilosin, murucoidin, pescaprein, orizabin and tricolorin series were tested for resistance modulatory activity *in vitro* against *Escherichia coli* Rosetta-gami and two nosocomial pathogens, *Salmonella typhi* and *Shigella flexneri*. These compounds exerted a potentiation effect of the clinically useful antibiotics tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol against the tested gram-negative bacteria by increasing antibiotic susceptibility up to 64-fold at concentrations of $25 \mu\text{g/mL}$.

In the second stage, the CHCl_3 -soluble extract from flowers of *Ipomoea murucoides*, through preparative scale recycling HPLC, yielded three new pentasaccharides of 11-hydroxyhexadecanoic acid, named murucoidins XVII–XIX, which were characterized by NMR and mass spectrometry. These compounds were tested for *in vitro* antibacterial and resistance modulating activity against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Rosetta gami, and two nosocomial pathogens, *Salmonella typhi* and *Shigella flexneri*. They exerted a potentiation effect of the clinically useful antibiotics tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol against the tested bacteria strains by increasing antibiotic susceptibility up to 16-fold at concentrations of $25 \mu\text{g/mL}$.

During the third stage, four novel glycolipids, wolcotinosids I to III, and wolcotin I, as well as the known intrapilosin VII were isolated from the flowers of *Ipomoea wolcottiana* and purified by preparative-scale recycling HPLC from a chloroform-soluble extract. Their structures were characterized through the interpretation of their NMR spectroscopic and FABMS data. All glycolipids did not possess cytotoxic activity against carcinoma cell lines ($IC_{50} > 15 \mu\text{g/mL}$) or antibacterial activity against gram positive ($MIC \geq 128 \mu\text{g/mL}$) and negative strains ($MIC \geq 512 \mu\text{g/mL}$). However, all of them exhibit a strong modulatory effect of the antibiotic activity at concentration of $25 \mu\text{g/mL}$. The modulatory effects were similar to those displayed by the positive control, reserpine.

1. Introducción

Las plantas medicinales representan la fuente principal de productos con actividad biológica, pueden ser comercialmente útiles por sí mismas o representan la fuente natural de sustancias biodinámicas y prototipos químicos para diseñar derivados con mayor actividad y/o menor toxicidad. El 80% de las formas farmacéuticas desarrolladas entre 1981 y 2007 contienen productos de origen natural o derivados de la síntesis total o parcial basada en productos naturales y, aproximadamente, cien productos naturales novedosos que se encuentran en estudios clínicos son agentes anticancerígenos y antiinfecciosos [1].

El género *Ipomoea* de la familia Convolvulaceae se distingue por su extensa distribución en las regiones tropicales del mundo y por sus propiedades medicinales purgantes y citotóxicas principalmente, las cuales están asociadas a la presencia de resinas glicosídicas en los tejidos florales, foliares y radiculares. Desde el punto de vista químico, las resinas glicosídicas constituyen un complejo de glicolípidos con alto peso molecular de naturaleza anfipática por la presencia de una porción hidrofílica que corresponde al núcleo oligosacárido (de tres a seis unidades sacáridas) y la porción lipofílica constituida por la aglicona (ácidos grasos monohidroxilados de catorce y dieciseis átomos de carbono) que usualmente forma un éster intramolecular con la cadena oligosacárida [2,3].

De la extensa diversidad de actividades biológicas que poseen los glicolípidos presentes en la familia Convolvulaceae destaca su potencial como agentes moduladores de las bombas de extrusión, las cuales representan uno de los mecanismos más importantes en el establecimiento de resistencia celular [4]. Estas bombas de extrusión, son proteínas transmembranales que confieren el fenotipo de

multirresistencia a diversos fármacos (por ejemplo: NorA, TetK y GpP) ya que funcionan como sistemas de transporte en su mayoría dependientes de ATP; se activan para expulsar los fármacos, evitando que alcancen la concentración necesaria para ejercer su actividad al interior de la célula [5]. Esta actividad constituye un ejemplo de sinergismo en el cual los glicolípidos inactivos inhabilitan el mecanismo de resistencia celular (bomba de extrusión NorA y GpP) y permiten un incremento de la potencia y la eficacia de los agentes antibióticos y citotóxicos.

Los ejemplos más relevantes de la actividad moduladora de los glicolípidos de las convolvuláceas incluyen:

- a) Modulación de la actividad antibacteriana contra cepas multifármaco resistentes (MDR) de *Staphylococcus aureus* [6-9], *E. coli* Rosetta-gami, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* [10]. En estudios previos se ha descrito la potenciación de antibióticos comerciales como norfloxacin, tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol al emplear glicolípidos microbiológicamente inactivos como inhibidores de las proteínas membranales expresadas en cepas MDR (por ejemplo, NorA en *S. aureus* SA-1199B) la mayoría de ellos redujo por lo menos dos veces el valor de la concentración mínima inhibitoria (MIC).

- b) Modulación de la actividad citotóxica de la vinblastina contra líneas de carcinoma de mama resistentes. Los glicolípidos no citotóxicos ejercen un efecto de potenciación de la susceptibilidad de vinblastina desde 1.9 y hasta 1906 veces en las concentraciones ensayadas de 5 y 25 µg/mL [11].

2. Antecedentes

2.1. La familia Convolvulaceae

La familia de las convolvuláceas se distribuye extensamente a nivel mundial en las regiones tropicales, subtropicales y templadas. Se estima que existen 55 géneros y 1650 especies, entre los géneros más representativos se encuentran *Ipomoea* (500 especies), *Convolvulus* (250 especies) y *Cuscuta* (170 especies) [12]. La morfología de las convolvuláceas es similar, la mayoría son enredaderas con hojas alternas y simples, tallos trepadores, flores grandes y vistosas, su cáliz constituido por cinco sépalos libres y una corola con cinco pétalos fusionados formando un embudo (**Figura 1**) [13]. El nombre Convolvulaceae proviene del vocablo latino *convolvere* que significa entrelazarse y se refiere básicamente a su modo de crecimiento ya que los miembros más representativos son especies rastreras. Una de las características anatómicas más notables, es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas tanto en el tejido foliar como en sus raíces; estas resinas, constituyen una de las características quimiotaxonómicas propias de esta familia y a las cuales se les atribuye principalmente la actividad purgante [3].



Figura 1. Flores de *Ipomoea tricolor*.

2.2. El género *Ipomoea*

El género *Ipomoea* es uno de los mayoritarios dentro de la familia Convolvulaceae y se estima que en México tiene un grado de endemismo de 65%, es decir, en nuestro país se encuentran presentes 104 de un aproximado de 160 especies del género. Esta distribución se concentra, aunque no se limita, a las regiones subtropicales de la costa del Pacífico [13]. La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* no poseen gran variedad morfológica (enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros de altura), sin embargo existen especies que presentan variantes a dicha morfología general: *Ipomoea philomega* e *ipomoea santillanii* son lianas tropicales que alcanzan alturas de hasta 15 metros; *ipomoea imperati* e *ipomoea pes-caprae* crecen a iguales longitudes pero crecen de forma tendida formando extensas cubiertas sobre arenas costeras; *ipomoea stans*, *ipomoea durangensis* e *ipomoea sescossiana* son arbustos perennes leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1 metro; en tanto que las especies de la serie arborescente crecen en forma de árboles de madera suave de 3 a 9 metros de altura [3].

El género *Ipomoea* ha tenido un uso continuo desde tiempos inmemoriales para diferentes propósitos, tales como: alimenticio (*Ipomoea batatas*), ornamental (*ipomoea alba*) y medicinal (*ipomoea pes-caprae* e *ipomoea murucoides*). El principal uso medicinal de algunas especies de éste género es purgante [2] y se conoce desde la época prehispánica, siendo *ipomoea purga* la especie exponente del denominado complejo medicinal de la “raíz de jalapa” (*ipomoea jalapa*, *ipomoea orizabensis* e *ipomoea stans*) [15].

2.3. Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae

Las resinas glicosídicas forman parte de una mezcla compleja de glicolípidos con alto peso molecular y son derivados de ácidos grasos de cadenas de catorce o dieciséis átomos de carbono que pueden encontrarse mono o dihidroxilados. Desde el punto de vista químico, representan estructuras inusuales debido a su naturaleza anfipática, debido a una porción lipofílica (agliconas de ácidos grasos) y a una porción hidrofílica (núcleo oligosacárido). La porción hidrofílica es un

heteropolisacárido que puede estar constituido por dos hasta seis unidades sacáridas, entre las que se encuentran: D-glucosa y epímeros de pentosas (L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa, y D-xilosa) en sus formas de piranosa. El enlace *O*-glucosídico es el único enlace de los monosacáridos entre sí y con la aglicona [3]. Los ácidos alifáticos usualmente reportados en la literatura como sustituyentes de tipo éster en los núcleos oligosacáridos son: acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), ácido (2*S*)-metilbutírico (mba), 3-metilbutírico (3-mba), (-)-(2*R*, 3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nílico, nla), ácido tíglico (tga), (*E*)-cinámico (cna), y otros ácidos grasos saturados de cadena larga, como: *n*-hexanóico (hexa), *n*-octanóico (octa), *n*-decanóico (deca), *n*-dodecanóico (dodeca), *n*-hexadecanóico (hexadeca). Frecuentemente, el ácido jalapínico, ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico, se encuentra como la aglicona, que forma un anillo de macrolactona que abarca dos o más unidades del núcleo oligosacárido [2,3]. Por lo tanto, la diversidad química de estos metabolitos depende en gran medida del establecimiento de la lactonización, el número, el tipo y la secuencia glicosídica de las unidades sacáridas que formarán el núcleo oligosacárido; así como por el número, el tipo y el sitio de esterificación de los residuos de ácido.

2.4. Resinas glicosídicas del complejo cazahuate

Se han descrito trece especies arbóreas pertenecientes a la familia de las convolvuláceas, la mayoría de ellas son endémicas de México y Centroamérica. En el centro de nuestro país, seis especies arborescentes del género *Ipomoea* (*i. arborescens*, *i. bracteata*, *i. intrapilosa*, *i. muruoides*, *i. pauciflora* e *i. wolcottiana*) [6] son conocidas como el complejo del “cazahuate”, vocablo náhuatl que significa "árbol para curar la sarna" para designar a estas especies medicinales [8]. Los miembros de este complejo se distinguen por sus características morfológicas: árboles que miden desde tres hasta doce metros de altura y que poseen grandes flores blancas con corolas en forma de embudo; y por sus usos terapéuticos tradicionales: a) las flores se frota directamente sobre la piel para tratar infecciones, picazón y erupciones cutáneas; y b) las hojas, el tallo y la corteza se emplean como decocciones, emplastos y cataplasmas para el tratamiento de reumatismo, inflamación y dolor muscular [3]. En el **Cuadro 1** se describen los resultados de los estudios químicos y la actividad biológica descrita para las especies de ipomeas arborescentes mexicanas.

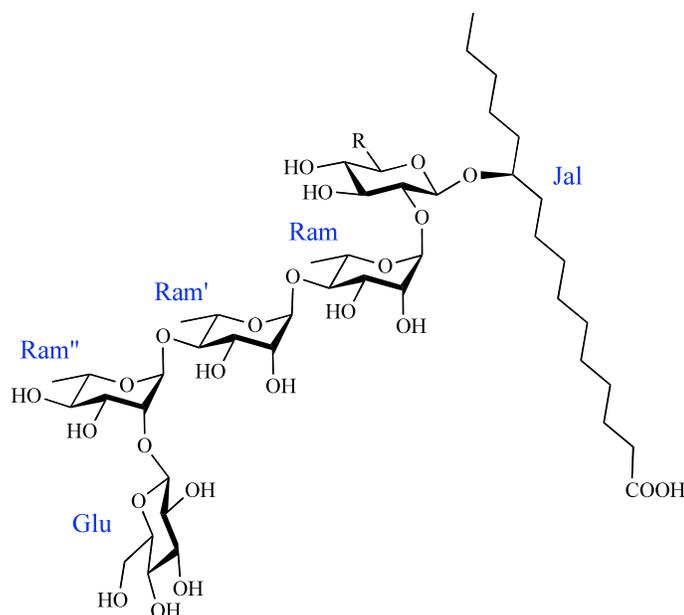
Cuadro 1. Estudios químicos y actividad biológica de los cacahuates.

Especie	Estudios químicos			Actividad biológica	
	Extracto	Glicolípidos	Ácido glicosídico		
<i>Ipomoea arborescens</i>	Clorofórmico de la raíz	Arboresinas	Arborescínico	Ac, pa, ba, mba, tga, nla [16]	
		Murucinas	Murucínico		
<i>Ipomoea intrapilosa</i>	Clorofórmico de las semillas	Intrapilosinas	Operculínico A	Mba, cna, octa, dodeca [17]	Modulación antibiótica [10]
<i>Ipomoea murucoides</i>	Clorofórmico de las flores	Murucoidinas Intrapilosina I Pescapreína III Estoloniferina I	Operculínicos A, C y E Simónicos A y B	Iba, mba, dodeca, 8-OH-dodeca [6, 7, 18]	Citotóxica [18] Modulación antibiótica [6, 7, 10] Modulación citotóxica [11]

Abreviaturas: Ácido acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2*S*)-metilbutírico(mba), (-)-(2*R*, 3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nilico, nla), tíglico (tga), (*E*)-cinámico (cna), *n*-octanóico (octa), *n*-dodecanóico (dodeca), 8(*R*)-hidroxidodecanóico (8-OH-dodeca).

2.4.1. Núcleos oligosacáridos y glicolípidos de *Ipomoea arborescens*

La hidrólisis alcalina del extracto clorofórmico de la raíz de *I. arborescens* produjo los ácidos arboresínico: *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico y murucínico: *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-quinovopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico (**Figura 2**) [16].



Ácido arboresínico: R=CH₂OH; glucosa.

Ácido murucínico: R=CH₃; quinovosa.

Figura 2. Estructura de los ácidos arboresínico y murucínico de *Ipomoea arborescens*.

Se aislaron mediante la aplicación de HPLC quince glicolípidos intactos derivados de estos ácidos, denominados como las arboresinas 1-6 (**1-6**) y las murucinas 1-9 (**7-15**) (**Figura 5**). Para todos los glicolípidos de estas series, se estableció el sitio de lactonización en la posición C-2 de la segunda unidad monosacárida (ram) y ácido *n*-dodecanóico como grupo acilante en C-2 de la tercera unidad sacárida (ram'). La diversidad estructural de estas series se debe a la presencia de diversos grupos acilantes en las posiciones C-3 y C-4 de la cuarta unidad sacárida (ram'') identificando residuos de ácido acético, propiónico, *n*-butírico, (2*S*)-metilbutírico, nílico o tíglico [16]. En un primer estudio, se determinó la presencia del ácido murucínico en *I. arborescens* colectada en Oaxaca ya que este material vegetal fue mal identificado y se confundió con otro cazahuate, *i. murucoides* [19], que se distribuye principalmente en el valle de México y el estado de Morelos. Sin embargo, la naturaleza química de este núcleo oligosacárido no correspondía con los ácidos glicosídicos previamente descritos para *i. murucoides*, los ácidos operculínicos A, C y E y los simónicos A y B [6, 7, 18]. Por lo tanto, la especie analizada correspondía al cazahuate con una distribución abundante en el estado de Oaxaca, *i. arborescens*, tal como se corroboró en un estudio

posterior donde se identificó la presencia de los ácidos murucínico y arboresínico [16] (**Figura 2**) como los núcleos glicosídicos constitutivos de las resinas glicosídicas de esta especie.

2.4.2. Núcleo oligosacárido y glicolípidos de *Ipomoea intrapilosa*

La caracterización estructural de los glicolípidos aislados y purificados de la resina glicosídica de la especie *I. intrapilosa* se realizó mediante el estudio de las constantes espectroscópicas y espectrométricas de los glicolípidos intactos como de sus productos de degradación: el ácido operculínico A: *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico (**Figura 3**) y los ácidos (2*S*)-metilbutírico, (-)-(2*R*)-metilbutírico, cinámico, *n*-octanóico y *n*-dodecanóico [17]. Todos los pentasacáridos de la serie intrapilosinas (**16-22**) se encuentran lactonizados en la posición C-2 de la primera unidad de ramnosa (ram) y nuevamente se observa que las variaciones estructurales corresponden a los diferentes residuos de ácido anteriormente mencionados, que esterifican las posiciones C-2 de la segunda unidad de ramnosa (ram') y C-3 y C-4 de la tercera unidad de ramnosa (ram'') (**Figura 5**) [17].

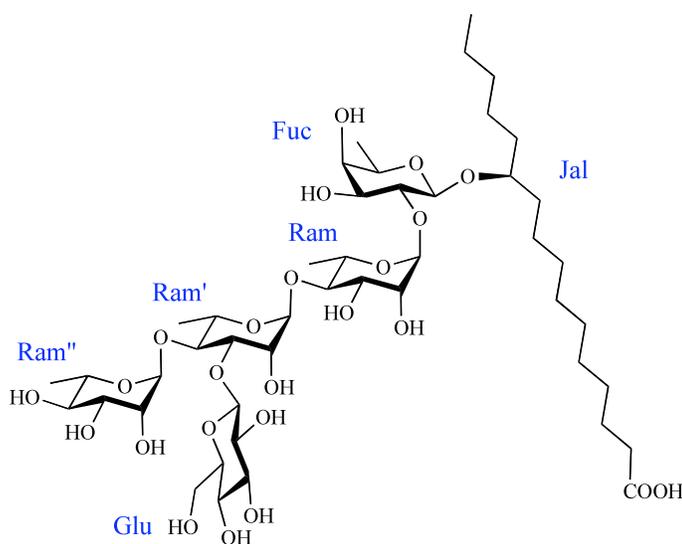
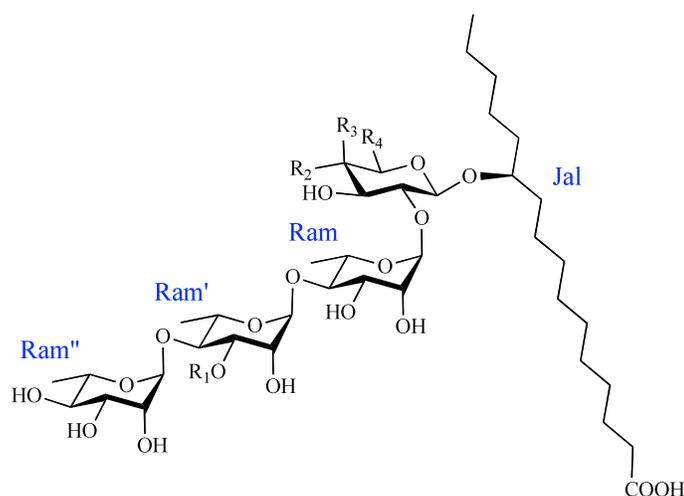


Figura 3. Estructura del ácido operculínico A identificado en *Ipomoea intrapilosa*.

2.4.3. Núcleos oligosacáridos y glicolípidos de *Ipomoea murucoides*

El estudio químico de las resinas glicosídicas de las flores de *I. murucoides* permitió la identificación de cinco núcleos oligosacáridos: ácido operculínico A, ácido operculínico C: *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico, ácido operculínico E: *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico, ácido simónico A: *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico, y ácido simónico B: *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico (**Figura 4**) [18].



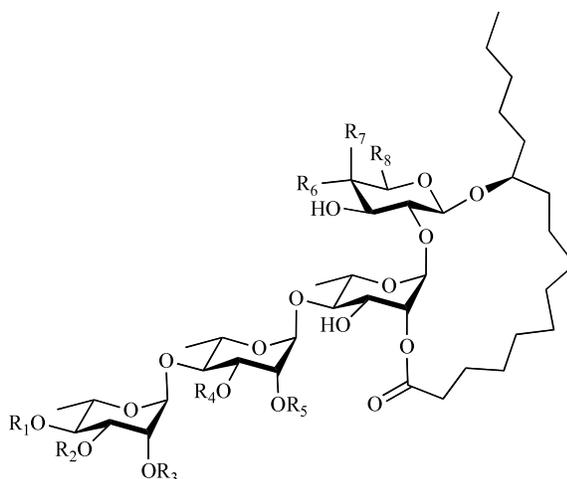
Ácido	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Operculínico A	Glu	H	OH	CH ₃
Operculínico C	H	H	OH	CH ₃
Operculínico E	H	OH	H	CH ₂ OH
Simónico A	Ram	OH	H	CH ₂ OH
Simónico B	Ram	H	OH	CH ₃

Figura 4. Núcleos oligosacáridos identificados en *I. murucoides*.

Se identificaron dieciocho oligosacáridos derivados de los ácidos operculínicos A, C y E, así como de los ácidos simónicos A y B, de los cuales dieciséis correspondían a estructuras novedosas, las murucoidinas I-XVI (**23-38**) y dos anteriormente reportados: la intrapilosina I (**16**), la pescapreína III (**39**) y la estoloniferina I (**40**) (**Figuras 5 y 6**). Las diferencias entre estos glicolípidos se determinan por el número y la naturaleza de las unidades monosacáridas que constituyen el núcleo oligosacárido, el número y la posición de los residuos acilantes: ácido isobutírico, (2*S*)-metilbutírico, *n*-dodecanóico, 8(*R*)-hidroxidodecanóico en la posición C-4 de la tercera unidad de ramnosa (ram'') y en la posición C-2 de la segunda unidad de ramnosa (ram') y el sitio de lactonización de la aglicona [18]. En el **Cuadro 2** se enumeran otras especies de las convolvuláceas que tienen en común los núcleos identificados en las especies arborescentes.

Cuadro 2. Especies convolvuláceas que poseen los núcleos oligosacáridos identificados en los cacahuates.

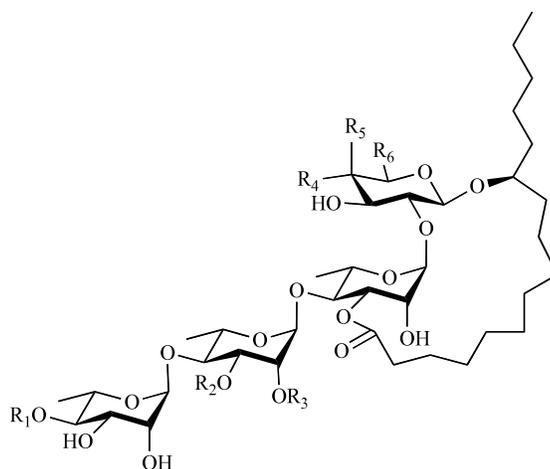
Ácido	Fuentes naturales
Operculínico A	<i>I. batatas</i> [20, 21]
	<i>I. leptophylla</i> [22]
	<i>I. operculata</i> [23, 24]
	<i>I. stolonifera</i> [25]
	<i>I. mammosa</i> (<i>Merremia mammosa</i>) [26]
	<i>I. quamoclit</i> (<i>Quamoclit pennata</i>) [27]
	<i>M. hungaiensis</i> [28]
	<i>I. digitata</i> [29]
	<i>I. purga</i> [30]
	Operculínico C
<i>Ipomoea operculata</i> [31, 32]	
<i>I. stolonifera</i> [33]	
<i>I. pes-caprae</i> [34]	
Operculínico E	<i>I. batatas</i> [35-37]
Simónico A	<i>I. purpurea</i> (<i>Pharbitis purpurea</i>) [38,39]
Simónico B	<i>I. batatas</i> [20, 35]
	<i>I. batatas</i> [20, 21, 40, 41]
	<i>I. pes-caprae</i> [34, 42, 43]
	<i>I. stolonifera</i> [25]



Serie	Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇	R ₈
Arboresina	1	H	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
	2	ac	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
	3	pa	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
	4	ba	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
	5	mba	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
	6	tga	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
Murucina	7	ac	H	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	8	pa	H	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	9	ba	H	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	10	mba	H	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	11	nla	H	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	12	ac	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	13	ba	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	14	tga	nla	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
	15	H	H	glu	H	dodeca	OH	H	CH ₃
Intrapilosina	16	mba	cna	H	glu	mba	H	OH	CH ₃
	17	octa	cna	H	glu	mba	H	OH	CH ₃
	18	octa	cna	H	glu	octa	H	OH	CH ₃
	19	mba*	cna	H	glu	dodeca	H	OH	CH ₃
	20	mba	cna	H	glu	dodeca	H	OH	CH ₃
	21	cna	mba	H	glu	dodeca	H	OH	CH ₃
	22	octa	cna	H	glu	dodeca	H	OH	CH ₃
Murucoidina	23	H	H	H	ram	mba	H	OH	CH ₃
	24	iba	H	H	ram	mba	H	OH	CH ₃
	25	mba	H	H	ram	mba	H	OH	CH ₃
	26	mba	H	H	glu	mba	H	OH	CH ₃
	29	iba	H	H	ram	mba	OH	H	CH ₂ OH
	30	mba	H	H	ram	mba	OH	H	CH ₂ OH
	37	mba	H	H	H	mba	H	OH	CH ₃
38	mba	H	H	mba	H	H	OH	CH ₃	

Abreviaturas: Ácido acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2*S*)-metilbutírico (mba), (-)-(2*R*)-metilbutírico (mba*) (-)-(2*R*, 3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nilico, nla), tíglico (tga), (*E*)-cinámico (cna), *n*-octanóico (octa), *n*-dodecanóico (dodeca), glucosa (glu), ramnosa (ram).

Figura 5. Glicolípidos de los cazahates lactonizados en la posición C-2 de la segunda unidad sacárida.



Serie	Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
Murucoidina	27	mba	glu	mba	H	OH	CH ₃
	28	mba	ram	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
	31	iba	ram	mba	H	OH	CH ₃
	32	mba	ram	8(R)-hidroxidodeca	H	OH	CH ₃
	33	mba	glu	dodeca	H	OH	CH ₃
	34	mba	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH
	35	mba	dodeca	H	OH	H	CH ₂ OH
	36	mba	dodeca	H	H	OH	CH ₃
	39	mba	ram	dodeca	H	OH	CH ₃
	40	mba	ram	mba	H	OH	CH ₃

Abreviaturas: Ácido isobutírico (iba), (2*S*)-metilbutírico(mba), *n*-dodecanóico (dodeca), glucosa (glu), ramnosa (ram).

Figura 6. Glicolípidos de los cazahates lactonizados en la posición C-3 de la segunda unidad sacárida.

2.5. Aislamiento y purificación de las resinas glicosídicas

Los constituyentes individuales de las mezclas de resinas glicosídicas generalmente se presentan como homólogos que tienen el mismo núcleo oligosacárido pero con diferentes sustituyentes o bien, con sustituyentes alquilo que sólo difieren en la longitud de la cadena hidrocarbonada. La similitud estructural y, por lo tanto, el comportamiento cromatográfico representan los principales impedimentos para la purificación mediante el uso de técnicas cromatográficas convencionales (por ejemplo, la cromatografía en capa fina, la columna abierta sobre gel de sílice o el empleo de sephadex), ya que la aplicación de éstas únicamente permite la purificación parcial de las mezclas de oligosacáridos. La purificación total de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas se ha logrado mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) [2]. Esta variante cromatográfica de alta resolución permite la purificación de mezclas cuya separación no se consigue por otras técnicas, mayor velocidad de análisis y elevada sensibilidad. Lo anterior debido a una disminución del tamaño de las partículas de la fase estacionaria (<25 μm), el tamaño de poro entre 60 y 130 \AA , el uso de fases estacionarias modificadas con grupos hidrofóbicos (fase reversa: C_8 y C_{18}) o grupos de polaridad media (cianopropilmetilo, aminopropilmetilo y fenilo) y el uso de altas presiones para lograr el flujo adecuado de la fase móvil [44].

Los principales desafíos técnicos consisten en el establecimiento de condiciones óptimas instrumentales (fases estacionaria y móvil, elución isocrática o en gradiente y la carga máxima de muestra) y posteriormente el escalamiento a condiciones preparativas [3]. Las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra han sido empleadas individualmente o en conjunto para lograr la purificación de los componentes individuales de la mezcla de resinas glicosídicas. Para alcanzar la homogeneidad cromatográfica, cada pico recolectado se recicla manualmente o utilizando una válvula de reciclado hasta que los diversos componentes que se superponen en un determinado tiempo de retención se separen en forma individual [45]. Las **Figuras 7 a 9** muestran los perfiles cromatográficos obtenidos mediante HPLC del aislamiento y purificación del wolcotinosido I (compuesto **1** de la publicación 3) a partir de la jalapina de *Ipomoea wolcottiana*.

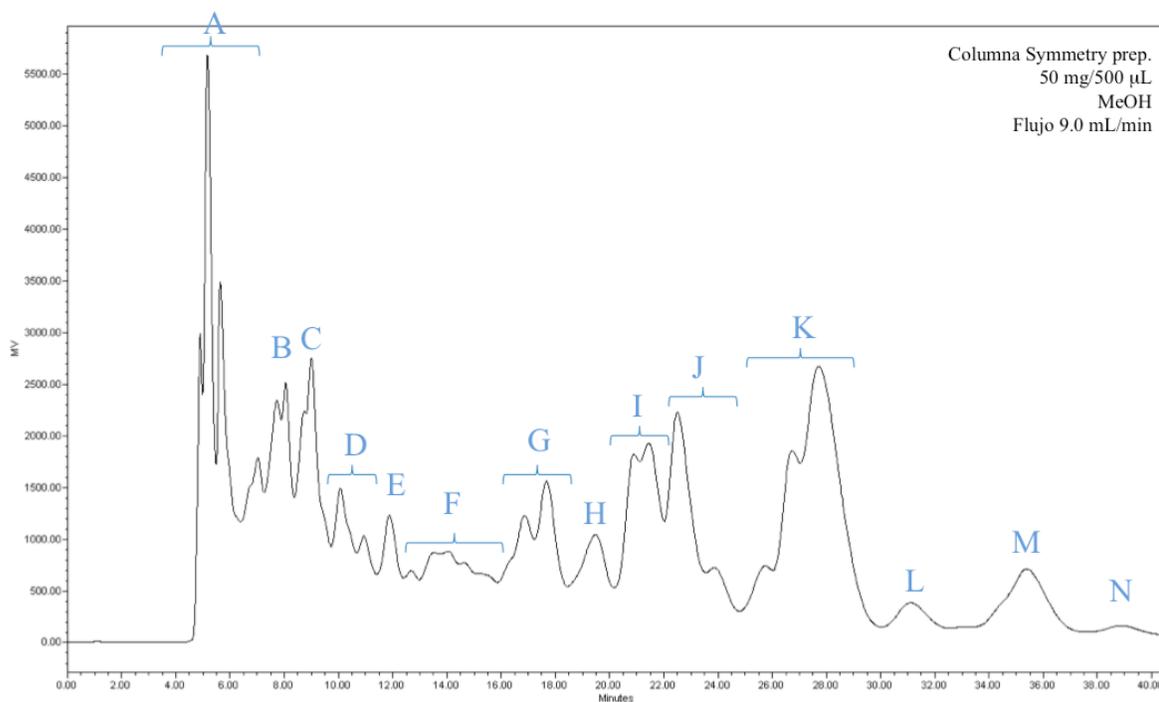


Figura 7. Aislamiento de los glicolípidos presentes en la jalapina de *I. wolcottiana*.

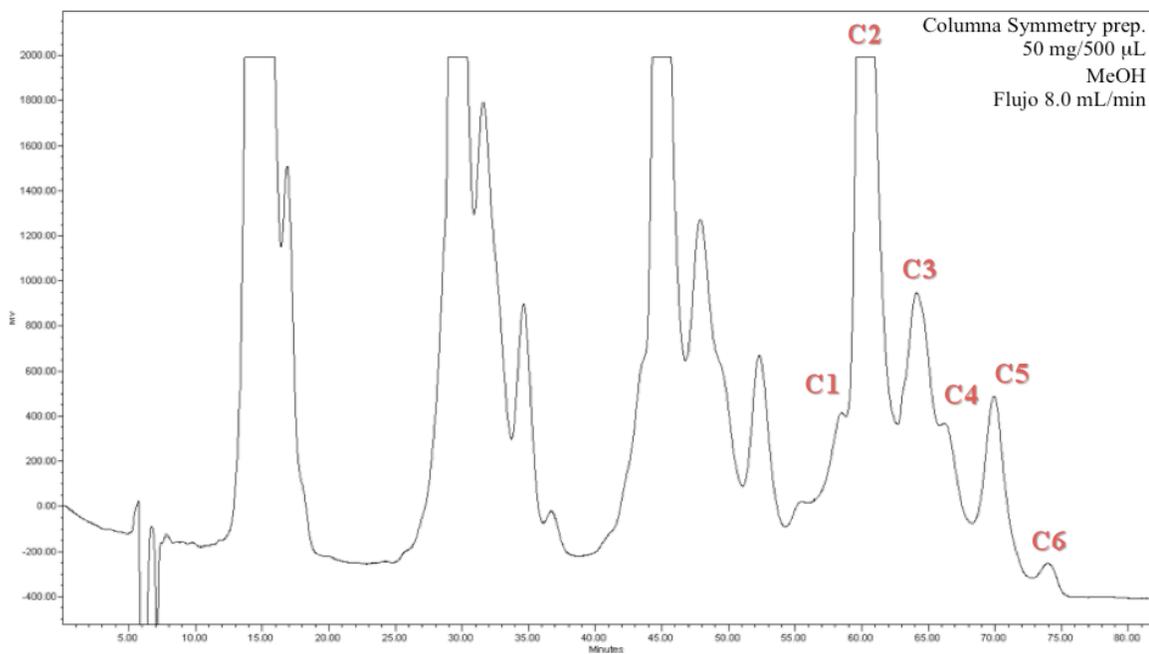


Figura 8. Reciclaje de los glicolípidos individuales de la subfracción C de la jalapina de *I. wolcottiana*.

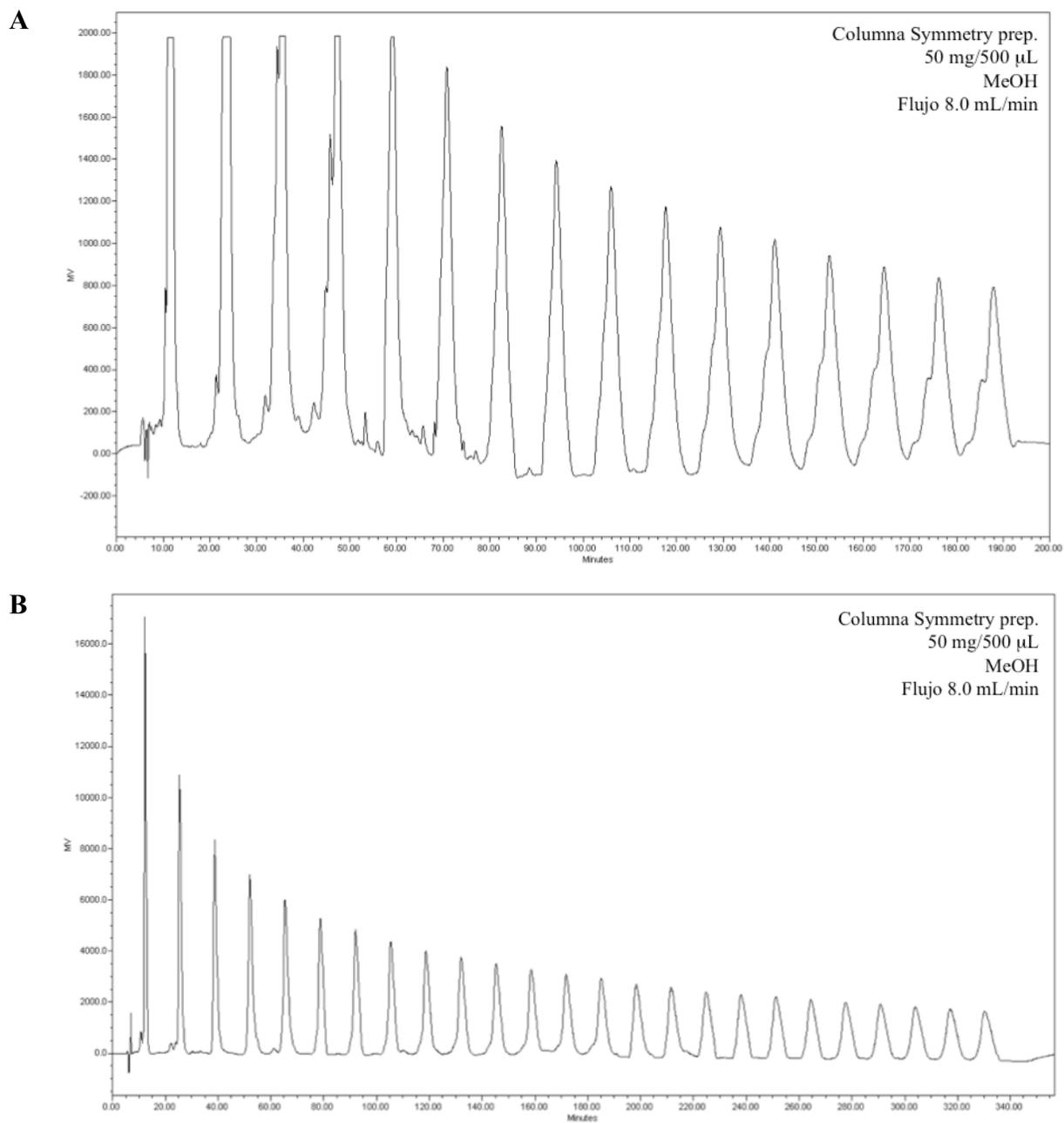


Figura 9. Purificación de la subfracción C2 utilizando la técnica de reciclaje.

A) Primer reciclaje de la muestra. B) Tercer reciclaje.

2.6. Elucidación estructural de las resinas glicosídicas

Los enfoques principales para la elucidación de estas moléculas complejas implican el uso de reacciones químicas degradativas y de técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

2.6.1. Degradación química

La primer reacción de degradación de la resina glicosídica total es la saponificación, como resultado se fragmenta la lactona macrocíclica y se liberan los ácidos grasos que esterifican el núcleo oligosacárido. Los ésteres de tales residuos de ácido se analizan mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y su identificación se realiza a través de la comparación de los tiempos de retención (t_R) y los patrones de fragmentación observados en los espectros de masas con los parámetros generados por compuestos de referencia. Adicionalmente, se realiza la hidrólisis de los ácidos glicosídicos, la cual libera la aglicona correspondiente (ácidos grasos hidroxilados de C_{14} o C_{16}) y las unidades monosacáridos que los constituyen. Éstas se convierten en derivados volátiles por tratamiento con clorotrimetilsilano y después se analizan mediante CG-EM, o bien pueden ser identificados por HPLC empleando una columna analítica para el análisis de carbohidratos. La longitud de la cadena y las posiciones exactas de hidroxilación de la aglicona se determinan mediante espectrometría de masas por impacto electrónico (EMIE) directa de la aglicona o por CG-EMIE de su éster metílico y/o derivados de trimetilsililo. Para determinar el número y las posiciones relativas de los enlaces glicosídicos, se realiza la permetilación de los ácidos glicosídicos seguido por la hidrólisis ácida, la reducción y la acetilación de los monosacáridos obtenidos [3, 46].

2.6.2. Espectrometría de masas

Las técnicas de ionización suaves, como el bombardeo con átomos rápidos (FAB) y de ionización por electrospray (ESI), representan técnicas analíticas indispensables en la elucidación estructural de los glicolípidos de las convolvuláceas ya que favorecen: el análisis de las muestras no volátiles, polares y de alto peso molecular; la obtención de espectrogramas de alta calidad de compuestos complejos; y la fácil determinación del peso molecular y los iones fragmento [3, 47].

La técnica de FAB consiste en hacer incidir un haz de átomos (xenón o argón) o iones acelerados a alta velocidad sobre la muestra que se encuentra disuelta en una matriz líquida (glicerol o trietanolamina), lo que favorece la formación de iones **positivos** y **negativos** que son expulsados de la superficie de la muestra por un proceso de desorción. Los iones positivos son resultado de la protonación de la muestra $[M + H]^+$ o por cationización $[M + \text{catión}]^+$, en tanto que los iones negativos son preponderantemente $[M - H]^-$ aunque también pueden obtenerse por adición de un anión $[M - \text{anión}]^-$. El tipo de iones pseudomoleculares obtenidos es gobernado por la naturaleza química de la muestra y la composición de la matriz. El uso de la trietanolamina conduce a la fragmentación extensa del oligosacárido y la detección en modo negativo facilita la identificación de la secuencia de glicosidación [3, 47]. El empleo de FAB en su modalidad negativo para la elucidación estructural de los glicolípidos de las convolvuláceas representa un método analítico ampliamente utilizado [3, 6-9]. La **Figura 10** muestra el espectro de masas FAB negativo del wolcotinósido I (compuesto **1** de la publicación 3) aislado durante la presente investigación a partir de la jalapina de las flores de *I. wolcottiana*.

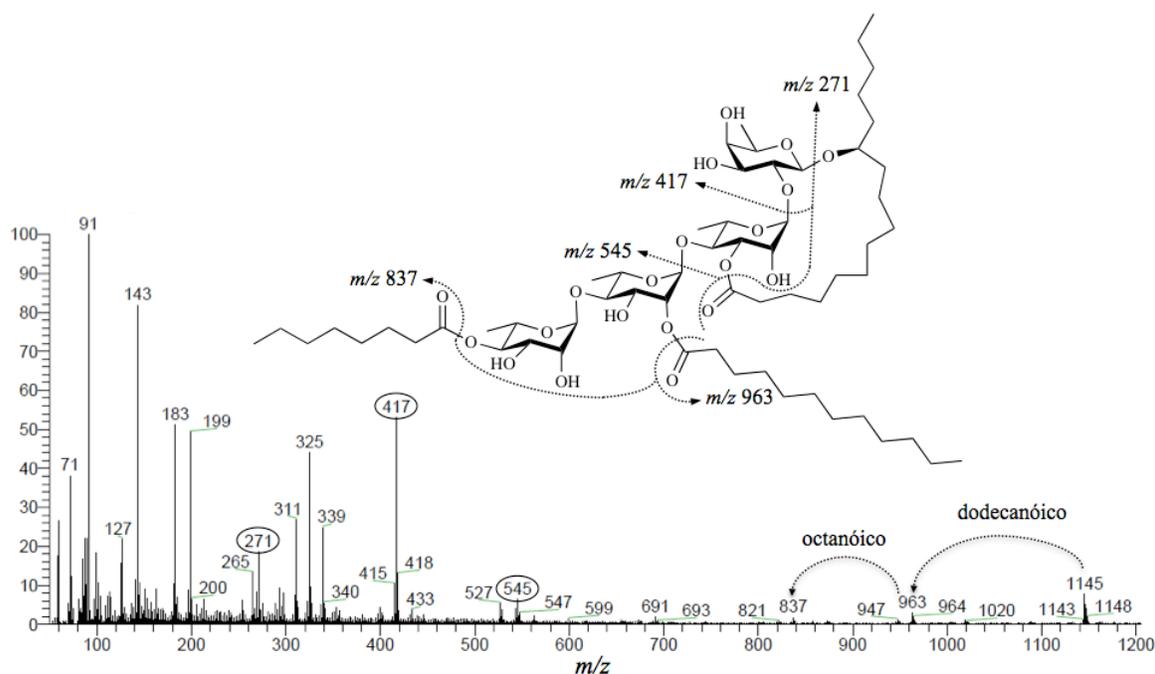


Figura 10. Espectro de masas FAB negativo del wolcotinósido I.

2.6.3. Resonancia magnética nuclear

De las técnicas utilizadas en la elucidación estructural de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas, la resonancia magnética nuclear (RMN) provee la información más completa y útil para la caracterización de dichos metabolitos ya que permite la generación de señales con desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) definidos y característicos. Estas constantes se determinan a través de espectros unidimensionales (^1H y ^{13}C), así como de espectros bidimensionales homonucleares (^1H - ^1H) y heteronucleares (^1H - ^{13}C) [48, 49]. Debido a la complejidad estructural de los glicolípidos, sus espectros unidimensionales de ^1H y ^{13}C sólo permiten identificar un número limitado de señales. Sin embargo, estas señales son características y permiten obtener información preeliminar de las moléculas en estudio:

a) Estimación del número y el tipo de unidades sacáridas:

Se pueden identificar dobletes entre 4.4 y 6.5 ppm que corresponden a los protones anoméricos. La integración de cada una de estas resonancias permite la estimación del número de residuos de monosacáridos diferentes y los valores de las constantes de acoplamiento observadas para estos protones anoméricos son distintivas para cada tipo de monosacárido: 1.0 – 3.0 Hz de la ramnosa, 7.0 – 8.0 Hz para fucosa y 8.0 – 9.0 Hz para la glucosa y quinovosa. En el espectro de RMN ^{13}C , las señales anoméricas se observan claramente en la región de 98 – 105 ppm y permiten confirmar el número de unidades monosacáridas (**Figuras 11 y 12**) [49].

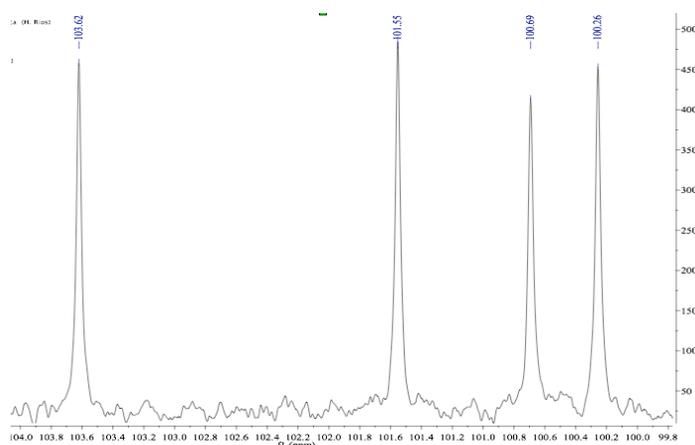


Figura 11. Región anomérica del espectro de RMN de ^{13}C del wolcotinósido I.

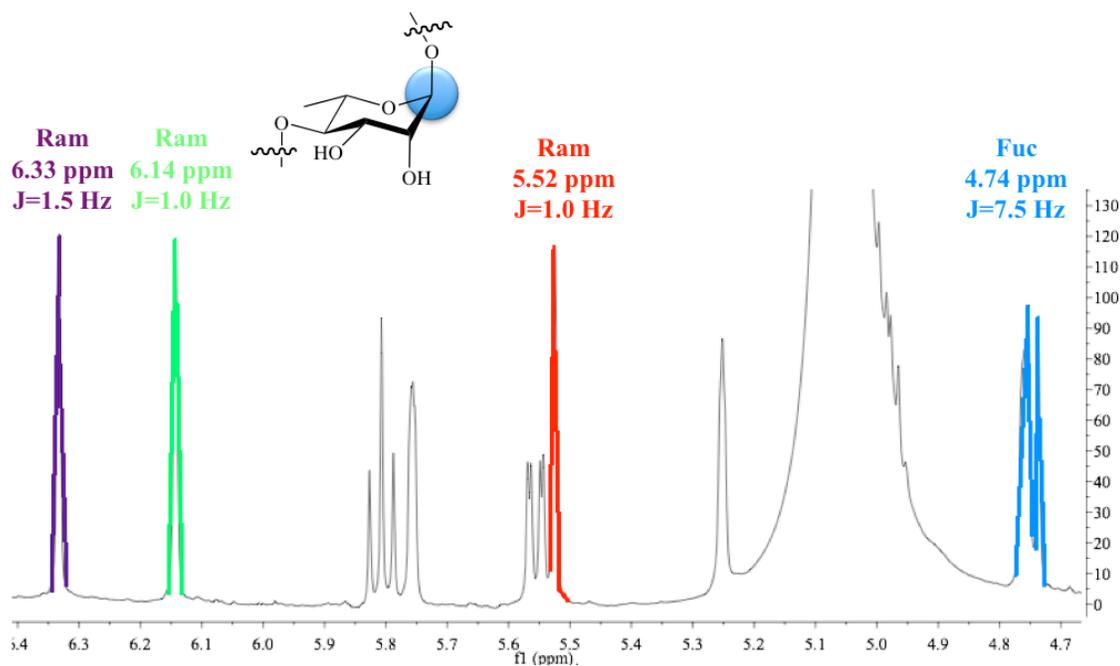


Figura 12. Región anomérica del espectro de RMN de ^1H del wolcotinosido I.

- b) Identificación de los grupos metilos de las 6–desoxihexosas (**Figura 13**): Se identifican los dobletes entre 1.35 y 1.70 ppm con constantes de acoplamiento 6.0 – 7.0 Hz [49].

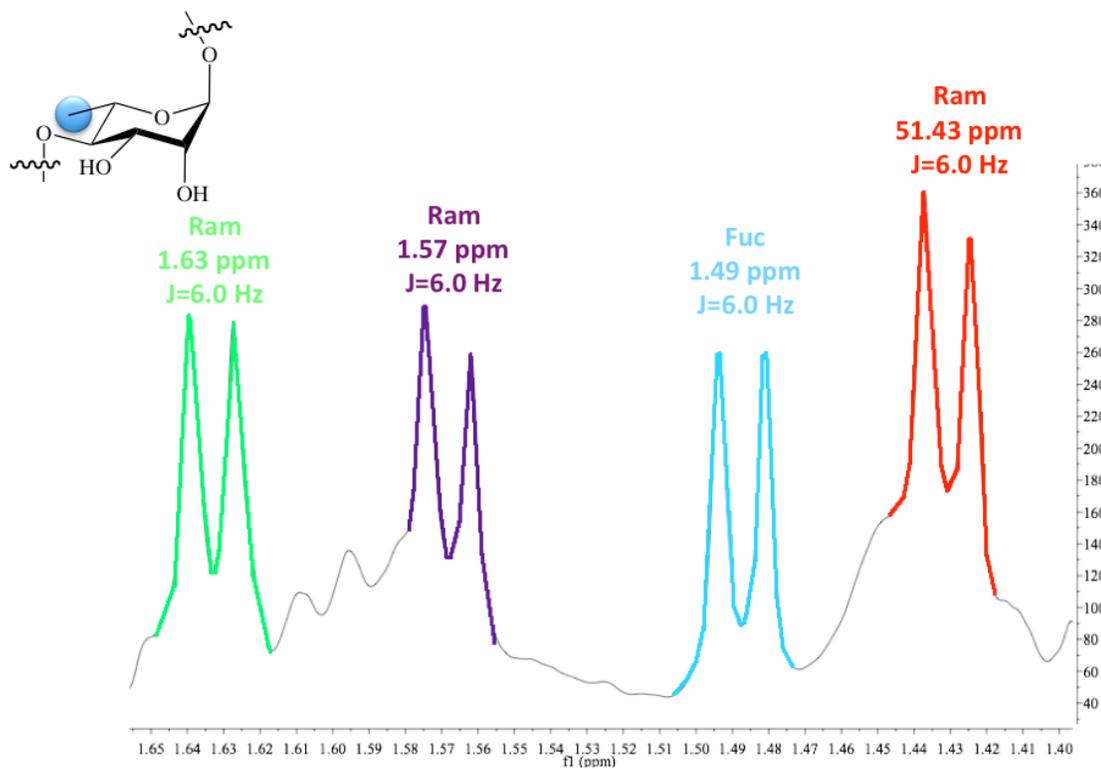


Figura 13. Identificación de los metilos de las 6–desoxihexosas en el espectro de RMN de ^1H del wolcotinosido I.

c) Estimación del número y el tipo de grupos acilantes.

La multiplicidad y las constantes de acoplamiento de las señales características para cada uno de los ácidos alifáticos que esterifican el núcleo pueden identificarse también mediante la RMN ^1H . Por ejemplo, para el wolcotinosido I, se pueden observar tripletes entre 0.70 – 1.00 ppm que corresponden a los metilos terminales de los residuos de ácido de cadena larga (octanóico y dodecanóico) y de la macrolactona (ácido jalapinólico) (**Figura 14**) [47-49].

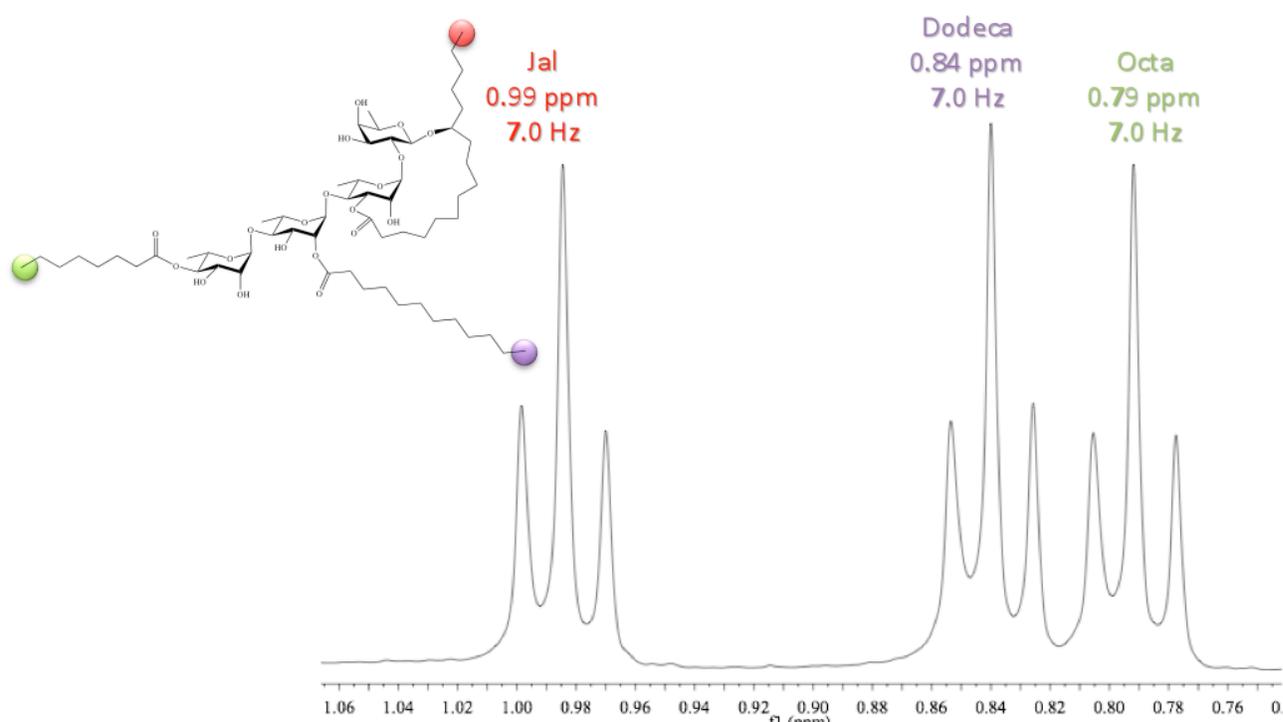


Figura 14. Identificación mediante RMN ^1H de metilos terminales de los ácidos que esterifican el núcleo oligosacárido del wolcotinosido I.

El número de ácidos que esterifican el núcleo puede corroborarse en el espectro de RMN ^{13}C ya que las señales identificadas en la región de 170.0 – 176.0 ppm indican la presencia de los grupos carboxílicos (**Figura 15**) [47-49].

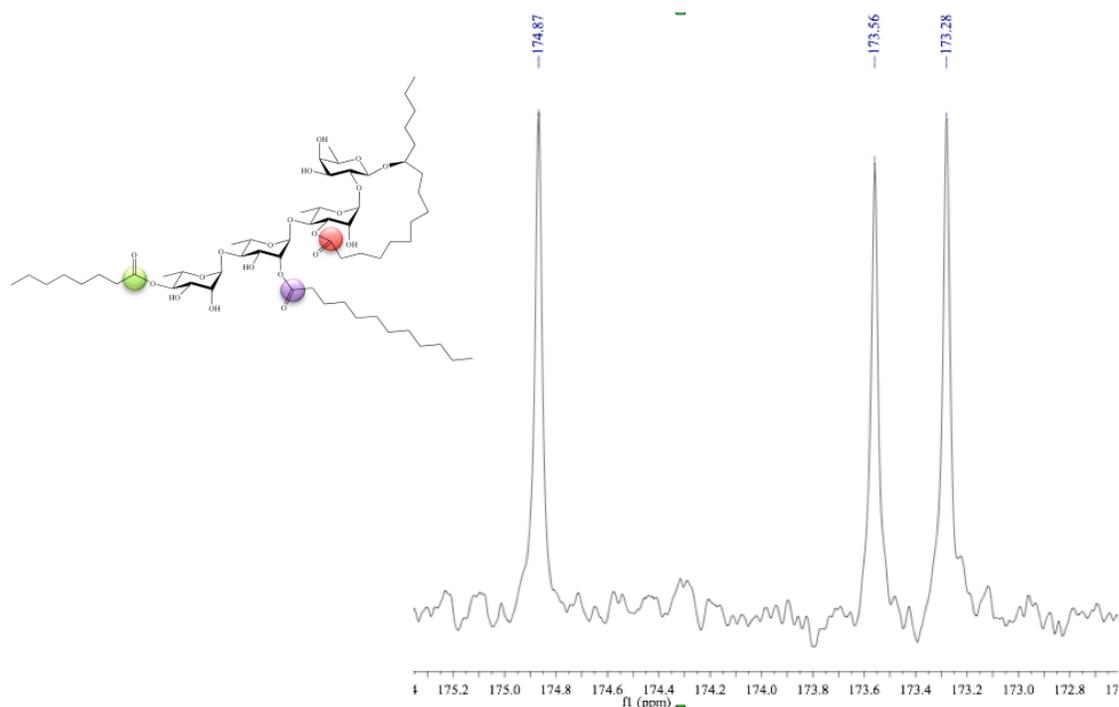


Figura 15. Región de grupos carboxílicos del espectro de RMN de ^{13}C del wolcotinosido I.

Las técnicas bidimensionales utilizadas para la elucidación estructural de los glicolípidos pueden agruparse en dos clases: correlación bidimensional homonuclear ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) y la correlación bidimensional heteronuclear ^1H - ^{13}C (HSQC, HMBC). El primer paso para la asignación de las señales consiste en localizar en el espectro heteronuclear HSQC (**Figura 16**) los carbonos anoméricos con (δ 98 – 105 ppm) y sus respectivos protones (δ 4.5 – 6.5 ppm) [47, 48].

Posteriormente, se asignan las señales protónicas para cada unidad sacárida del núcleo a partir de los espectros homonucleares bidimensionales COSY y TOCSY. El espectro COSY (**Figura 17**) permite identificar interacciones entre protones geminales y vecinales mediante correlaciones que se establecen por cuadros de conectividad. Como resultado se logra determinar la secuencia $J_{\text{H-H}}$ para cada unidad sacárida iniciando con el protón anomérico que se determina a partir del espectro HSQC [47-49].

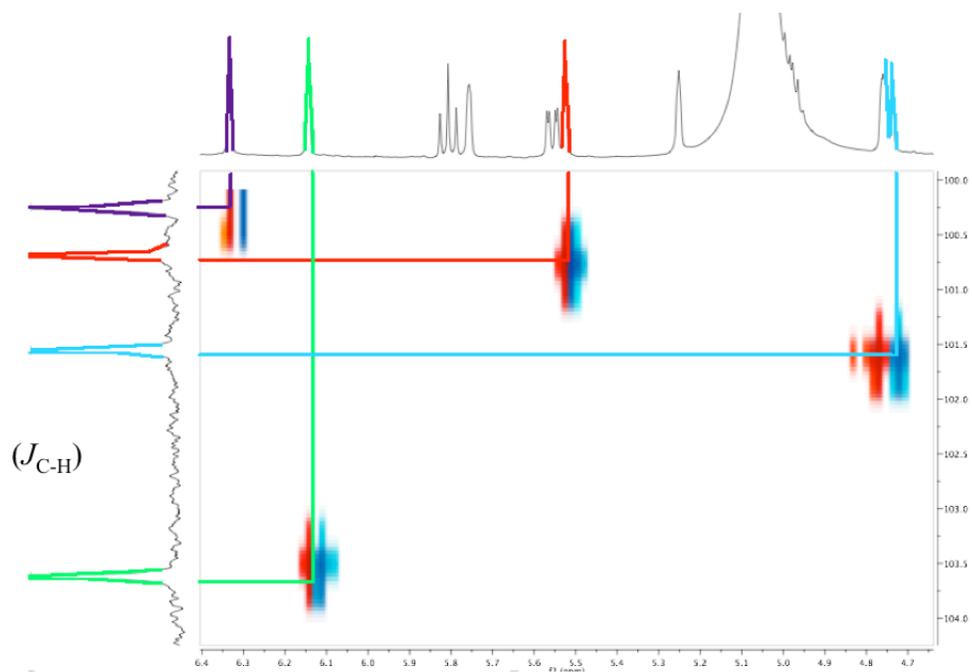


Figura 16. Región anomérica del espectro HSQC del wolcottinósido I.

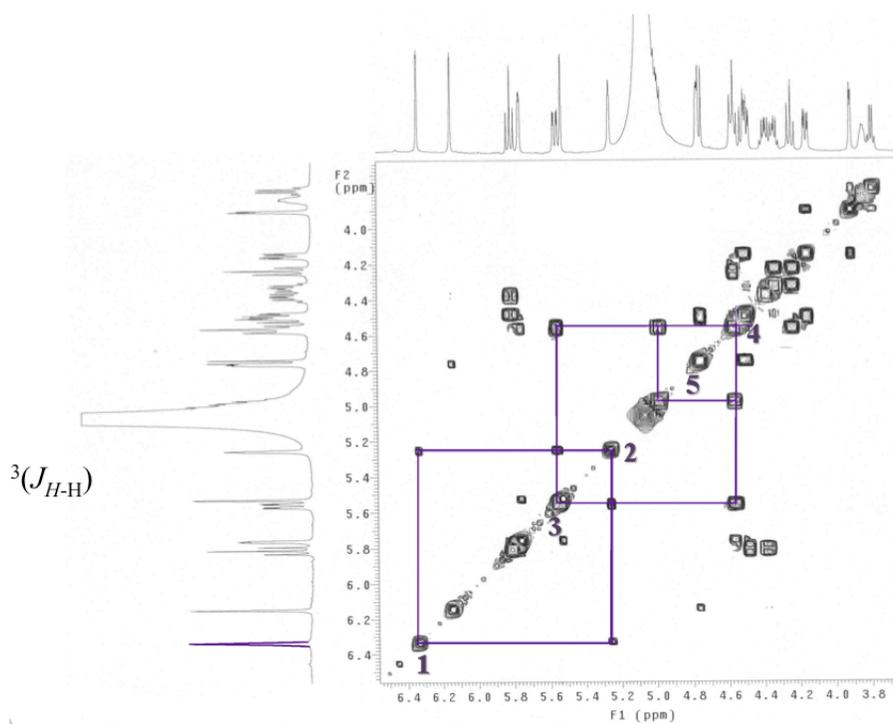


Figura 17. Sección de la porción oligosacárida del espectro COSY del wolcottinósido I.

El experimento TOCSY (**Figura 18**) permite establecer la conectividad a lo largo del sistema de espines de cada unidad del oligosacárido. Este experimento corrobora la asignación inequívoca de cada una de las señales pertenecientes a las unidades monosacáridos individuales del núcleo oligosacárido. Se identifican los protones anoméricos y se establecen los protones que tienen interacción con él [47-49].

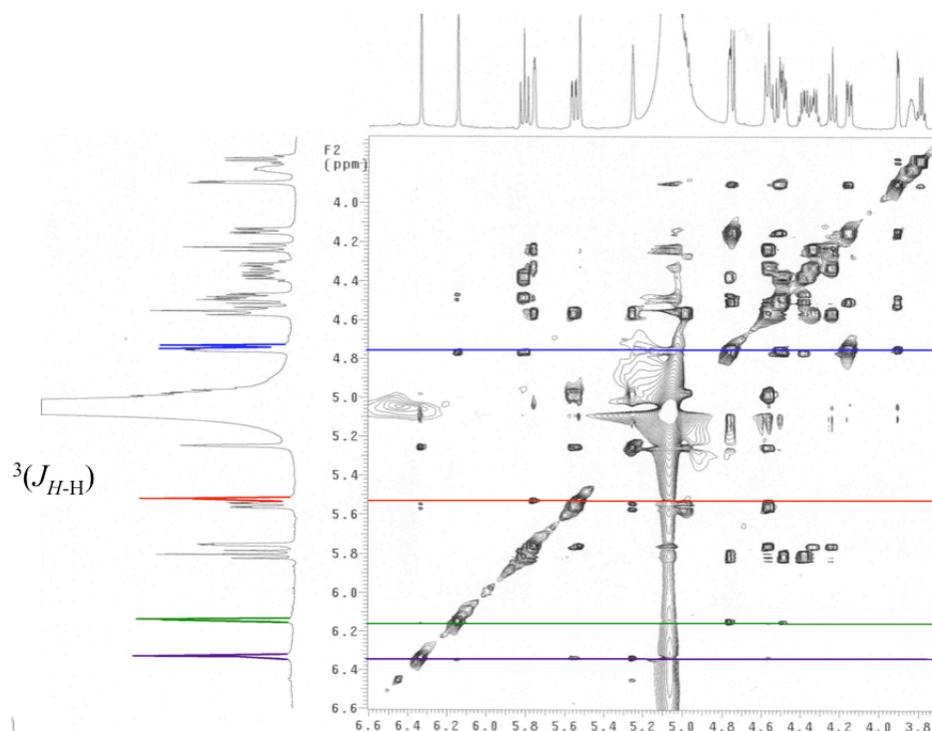


Figura 18. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY del wolcotinósido I.

Una vez identificadas las señales de los protones de cada unidad sacárida se procede a asignar las señales de RMN ^{13}C para cada unidad mediante la técnica HSQC [49]. La confirmación de la secuencia de glicosidación y de los sitios de esterificación en el núcleo oligosacárido que incluyen las posiciones para el establecimiento de la lactonización con la aglicona y la localización de las dos posiciones de acilación, se realiza mediante la secuencia de pulsos HMBC que permite detectar las conectividades $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$) [47].

2.7. Estudios de actividad antibacteriana y modulación antibiótica de las resinas glicosídicas del género *Ipomoea*

En el caso particular de las cepas MDR de *S. aureus*, se conoce que la presencia de proteínas transmembranales confieren el fenotipo de multirresistencia a diversos antibióticos, por ejemplo, la NorA (norfloxacina) y TetK (tetraciclina). Estas proteínas funcionan como sistemas de transporte dependientes de ATP que se activan para expulsar los antibióticos, evitando que el fármaco alcance la concentración necesaria para ejercer su actividad al interior de la célula [4]. En estudios previos, se describió la potenciación de antibióticos comerciales como la tetraciclina y la norfloxacina al emplear miembros microbiológicamente inactivos de las series de las tricolorinas, las escamoninas, las orizabinas [8] y las murucoidinas como inhibidores de la proteína membranal NorA expresada en cepas de *S. aureus* SA-1199B [6].

La primer investigación que evidenció la actividad antibacteriana y la modulación antibiótica de las resinas glicosídicas del género *Ipomoea* sobre diversas cepas de *S. aureus* incluyó la evaluación de veintidós glicolípidos de las series de las tricolorinas, escamoninas y orizabinas. Las concentraciones mínimas inhibitorias para la mayoría de estos compuestos anfipáticos varió desde 4 hasta 32 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre las cepas XU-212 (que posee la bomba de extrusión TetK), SA-1199B (que sobreexpresa la bomba de extrusión NorA) y EMRSA-15 (cepa hospitalaria resistente a metilina y que contiene el gen *mecA*), en comparación con los valores de MIC de tetraciclina de 64, 0.25 y 0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para cada una de las cepas. Dos miembros microbiológicamente inactivos (MIC \geq 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$) de la serie orizabina (orizabinas IX y XIX) ejercieron un fuerte efecto sinérgico en combinación con norfloxacina al emplear concentraciones subinhibitorias de estos oligosacáridos. La orizabina XIX a 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ revirtió la resistencia a norfloxacina en un factor de 4 veces (de 32 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) sobre la cepa SA-1199B, en tanto que la orizabina IX a la concentración de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ inhibió completamente el crecimiento de la cepa SA-1199B al adicionarla conjuntamente con norfloxacina a una concentración de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. De manera adicional, se evaluó la inhibición de las bombas de extrusión por métodos fluorométricos mediante la pérdida de fluorescencia en función del tiempo a partir de células que poseían una elevada concentración intracelular de bromuro de etidio (EtBr). Las orizabinas IX y XV mostraron inhibiciones de extrusión del EtBr equipotentes entre ellas y mejores que la reserpina a concentraciones menores a 10 μM [8].

Un estudio posterior permitió identificar dieciocho glicolípidos provenientes de la especie arborecente *Ipomoea murucoides*, como compuestos moduladores de la actividad antibiótica de la norfloxacin sobre las cepas de *S. aureus* XU-212, EMRSA-15 y SA-1199B que poseen mecanismos de multifármaco resistencia como las bombas de extrusión. Sólo, las murucoidinas I, VI, VII y XIV mostraron actividad antibacteriana contra la cepa SA-1199B (MIC de 32 µg/mL). Posteriormente, se evaluó el potencial de estos metabolitos como inhibidores de las bombas de extrusión al adicionarlos en concentraciones subinhibitorias y conjuntamente con norfloxacin. Los glicolípidos pertenecientes a la serie de murucoidinas potenciaron fuertemente el efecto de la norfloxacin, generando la reducción en los valores de MIC hasta cuatro veces (32 a 8 µg/mL); este efecto se observó tanto las murucoidinas I, VI, VII y XIV (evaluadas a concentración de 5 µg/mL), en los miembros inactivos de la serie (evaluadas a concentración de 25 µg/mL), así como en la reserpina que se empleó como control positivo (evaluada a concentración de 20 µg/mL) [6, 7].

Por último, se evaluaron nueve glicolípidos aislados y purificados de la especie medicinal *Ipomoea pes-caprae*, se determinó que todos estos compuestos no poseen actividad microbiológica, sin embargo, a la concentración de 25 µg/mL potencian la actividad antibacteriana de la norfloxacin, al disminuir cuatro veces su MIC (de 32 a 8 µg/mL) [9]. Estos efectos de potenciación fueron similares a los observados anteriormente para las orizabinas IX y XIX, así como para la serie de murucoidinas [6-8].

Esta actividad constituye un claro ejemplo de sinergismo en el cual los componentes inactivos de un extracto vegetal inhabilitan el mecanismo de resistencia celular (bomba de extrusión NorA) permitiendo un incremento de la potencia y eficacia de los agentes antibióticos y con ello la posible reintroducción de agentes que actualmente no son eficaces como la meticilina para el posible tratamiento de infecciones refractarias [3, 4].

2.8. Resistencia bacteriana a los antibióticos

La resistencia se define como la capacidad temporal o permanente de un organismo y su progenie para continuar siendo viables y multiplicarse en condiciones que inhiben a otros miembros de la cepa. Se puede decir que las bacterias son resistentes cuando no son susceptibles a un agente antibacteriano en las concentraciones que se emplean en la práctica clínica [50]. A nivel mundial, la

resistencia a los antibióticos continúa siendo un problema creciente. La rápida adaptabilidad de las poblaciones bacterianas como la aparición de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) [51-56], enterococos resistentes a vancomicina [57], y enterobacterias que producen β -lactamasas han permitido la aparición de cepas resistentes a diferentes antimicrobianos y, en consecuencia, han afectado en forma negativa al número de agentes químicos eficaces para el tratamiento de las infecciones. El aumento de la resistencia en las bacterias Gram negativo disminuye considerablemente las alternativas clínicas al momento de elegir la terapia inicial adecuada [58].

Las bacterias presentan características que favorecen la aparición, persistencia y transmisión de los genes que codifican para la resistencia a los agentes antimicrobianos. Lo cual se debe en gran medida a propiedades intrínsecas como: la facilidad de intercambio de material genético (transmisión genética horizontal), la elevada capacidad de supervivencia después de haber modificado las condiciones ambientales, la facilidad de colonización y de infección bacterianas y su capacidad de desarrollo en una cinética exponencial que les permite la colonización en periodos cortos [59, 60].

2.9. Mecanismos de actividad antibacteriana

Con la finalidad de lograr una mejor comprensión de los mecanismos de resistencia bacteriana, se describirán brevemente los cuatro mecanismos moleculares principales de la acción de los antibióticos (**Figura 19**) [50].

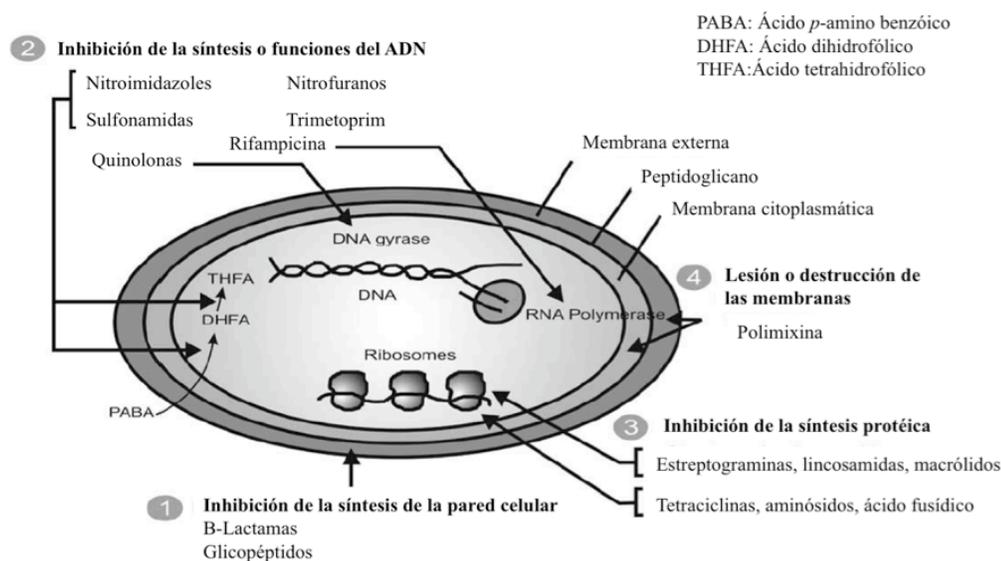


Figura 19. Los cuatro principales mecanismos de acción antibacteriana [50].

2.9.1. Inhibición de la síntesis de la pared celular microbiana

Los blancos enzimáticos para los antibióticos β -lactámicos son las transpeptidasas o proteínas de unión a penicilina (PBP) que se sitúan en la parte externa de la membrana citoplasmática. Cuando este tipo de antibióticos se une a las PBPs, éstas dejan de catalizar la reacción de transpeptidación, es decir, inhiben la formación del enlace interpeptídico, que es el último paso de la síntesis del peptidoglicano. La pared celular continúa sintetizándose pero sin enlaces interpeptídicos y se va haciendo cada vez más débil a medida que se deposita el esqueleto de peptidoglicano. Adicionalmente, el complejo antibiótico-PBP resultante tiene como única actividad fisiológica, la liberación de autolisinas que digieren la pared celular existente. Por lo que se genera una pared celular debilitada que finalmente se degrada [61, 62]. Los antibióticos tipo glicopéptidos (vancomicina y teicoplanina) también actúan en el último paso de la síntesis del peptidoglicano, pero no se unen a PBP sino que actúan directamente sobre el péptido D-alanil-D-alanina de los precursores del peptidoglicano, inhibiendo la actividad de la transpeptidasa y bloqueando la polimerización de peptidoglicano [61].

2.9.2. Inhibición de la síntesis o funciones del ADN

La rifampicina es un antibiótico hidrofóbico que inhibe la ARN polimerasa que transcribe el ADN en ARNm, dando lugar a un efecto bacteriostático. Su toxicidad selectiva para las bacterias, depende de su inocuidad para las células eucariotas [50, 61,62].

Las quinolonas inducen una rápida inhibición de la síntesis de ADN y después la muerte bacteriana a través de la unión a la ADN girasa, una topoisomerasa, formando así un complejo de ADN-enzima-quinolona que inhibe la función enzimática y, por ende, causa la muerte celular bacteriana. La ADN girasa no sólo es necesaria para la compactación del ADN, también se requiere para el proceso de replicación y transcripción [50, 61,62].

Las sulfonamidas y el trimetoprim inhiben la síntesis de folatos mediante la inhibición de la dihidrofolato sintasa. El ácido fólico es necesario para la síntesis de purinas y pirimidinas, los principales constituyentes de los ácidos nucleicos, lo que conduce a la reducción o la interrupción del crecimiento bacteriano [50, 61,62].

2.9.3. Inhibición de la síntesis de proteínas bacterianas

Los antibióticos aminoglucósidos inhiben el inicio de la replicación del ADN mediante la unión con la subunidad ribosomal 30S. Los pasos implicados en la traducción son alterados, lo que resulta en su inhibición. Las proteínas sintetizadas resultan anormales debido a numerosos errores de lectura. Este tipo de antibióticos se utilizan en la clínica contra bacterias Gram negativo [50, 61,62].

Las tetraciclinas tienen actividad bacteriostática inhibiendo la etapa de elongación de la traducción. Se unen a la subunidad 30S ribosomal, evitando así la fijación de un nuevo ARNt en el ribosoma. Tienen un amplio espectro de actividad [50, 64].

Los macrólidos, la estreptogramina y los antibióticos de tipo lincosamidas se unen a la subunidad 50S ribosomal, lo que resulta en la inhibición de la elongación del péptido y, por ende, en la síntesis de proteínas. Los macrólidos como la eritromicina, la azitromicina y la estreptomycin difunden con facilidad en las bacterias Gram positivo; solamente la claritromicina, penetra las bacterias gram negativo [50, 64].

El cloramfenicol se une a la subunidad 50S y evita que el aminoácido del complejo aminoacil-tRNA se una a los ribosomas normalmente. También, muestra un amplio espectro de actividad [50].

2.9.4. Lesión o destrucción de las membranas microbianas

Las polimixinas se unen a las membranas lipídicas, que inducen alteraciones estructurales provocando rápidamente la muerte bacteriana [50].

2.10. Mecanismos de establecimiento de multifármaco resistencia

La resistencia se ha definido como la capacidad temporal o permanente de un organismo y su prole para seguir siendo viables y/o multiplicarse en condiciones que podrían destruir o inhibir a otros miembros de la cepa. Se considera que las bacterias son resistentes cuando no son susceptibles a la concentración del agente antibacteriano usado en la clínica [50].

La resistencia antibiótica en los microorganismos se debe a condiciones intrínsecas (resistencia natural) o a la modificación genética (resistencia adquirida) que se genera por cambios en la secuencia de bases de los cromosomas y se transmite de forma vertical de generación en generación; o bien, por transmisión de material genético extracromosómico de otras bacterias, en cuyo caso la transferencia de genes es horizontal (plásmidos, integrones o transposones) [59, 61]. Los principales mecanismos moleculares y bioquímicos que conducen a la resistencia a los antibióticos son:

2.10.1. Inactivación enzimática

El primer mecanismo por el cual las bacterias pueden ser resistentes a un antibiótico es debido a la modificación enzimática del fármaco en cuestión (**Figura 20**). El mecanismo bioquímico más importante de la inactivación de los antibióticos β -lactámicos es mediante las enzimas penicilinasas; de las cuales, existen dos tipos generales: β -lactamasas y acilasas. Las β -lactamasas catalizan la apertura hidrolítica del anillo β -lactama de las penicilinas para producir ácido peniciloico inactivo. La producción de β -lactamasas por la célula es el mecanismo más común de resistencia adquirida a los antibióticos β -lactámicos. Las bacterias pueden adquirir nuevos genes por la transducción del bacteriófago o por transformación. El principal problema clínico es la transferencia de genes de resistencia a través de géneros y especies [50, 59]. El descubrimiento del ácido clavulánico como potente inactivador de las β -lactamasas ha generado interés en la terapia de combinación con antibióticos β -lactámicos [50].

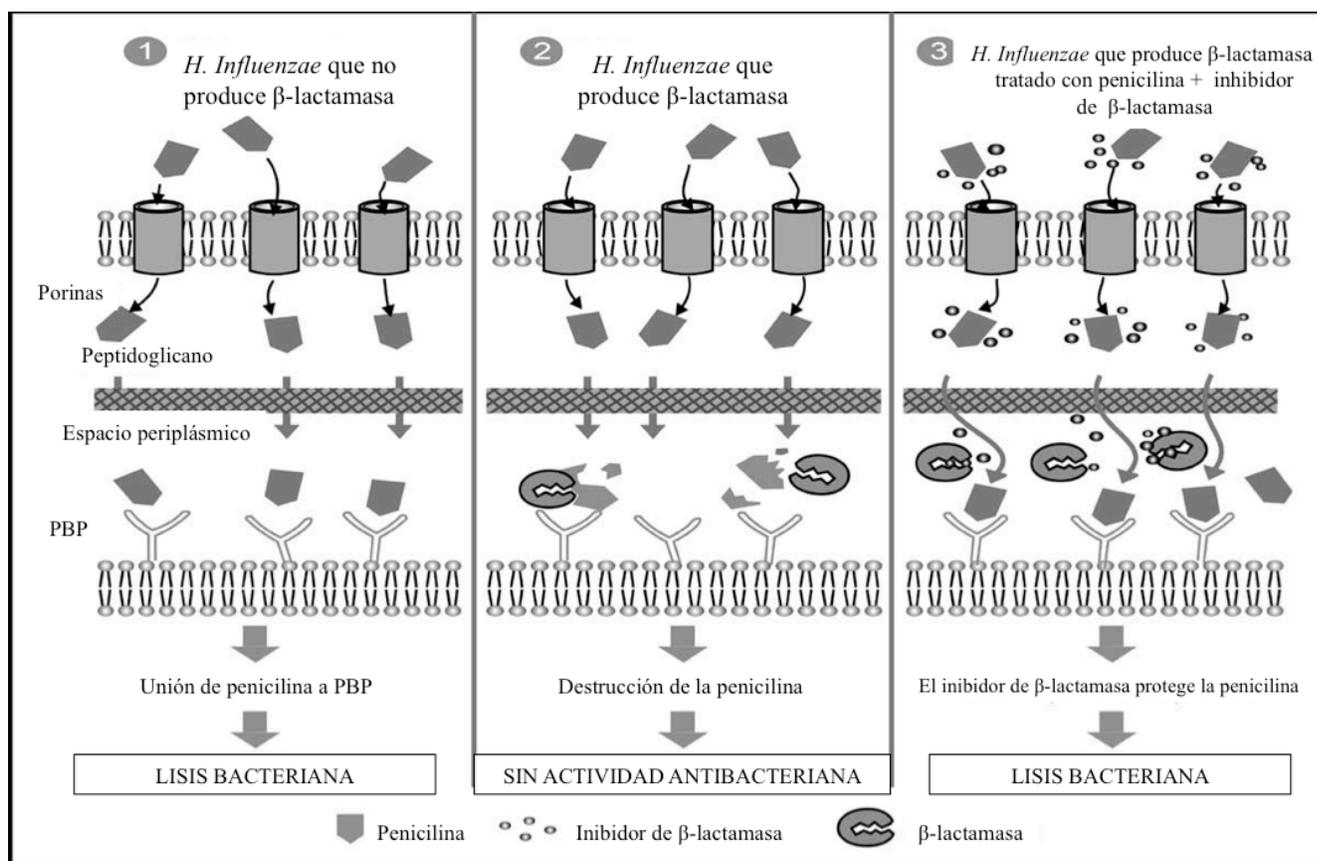


Figura 20. Inactivación de la penicilina por β -lactamasa en *Haemophilus influenzae* [50].

2.10.2. Modificación del blanco

La modificación de un blanco puede resultar de la mutación cromosómica espontánea ocasionada por la sustituciones de uno o varios aminoácidos, o de la recombinación homóloga con ADN exógeno que contiene segmentos de genes que codifican porciones de proteínas con propiedades de baja afinidad con los fármacos. Los genes adquiridos en elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y transposones, también pueden contribuir a la resistencia por modificación del blanco [65]. Por ejemplo, la resistencia adquirida de *Streptococcus pneumoniae* a la penicilina y otros β -lactámicos se basa en una serie de mutaciones cromosómicas que provocan alteraciones por sustitución de uno o más aminoácidos y dan lugar a la codificación de nuevas y diferentes PBPs que poseen baja afinidad por estos antibióticos asegurando la síntesis del peptidoglicano, como se muestra en la **Figura 21** [50].

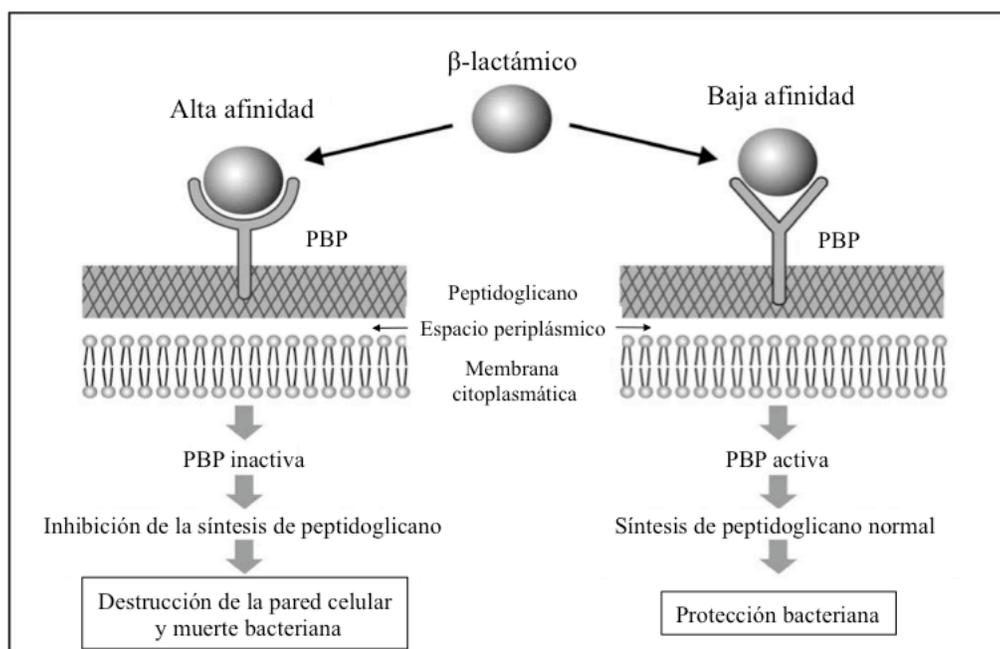


Figura 21. Resistencia de *Streptococcus pneumoniae* a los β -lactámicos [50].

2.10.3. Disminución de la permeabilidad

La capacidad de los compuestos antimicrobianos para entrar en las células bacterianas es un requisito para su acción antibacteriana. Dependiendo de la naturaleza química del antibiótico (hidrófilo o hidrófobo), la penetración puede ocurrir mediante el uso de poros transmembranales, por la desorganización localizada de la membrana, por difusión a través de la bicapa lipídica o por procesos que implican la cooperación de los sistemas de transporte de nutrientes. Las especies bacterianas difieren ampliamente en la estructura de sus membranas y, por lo tanto, en su resistencia intrínseca a los antibióticos. Los requerimientos energéticos para la entrada de los antibióticos parecen variar ampliamente según la clase de antibióticos. Los compuestos catiónicos, como los aminoglucósidos, parecen responder al nivel de umbral del potencial de membrana con el fin de atravesar la membrana citoplasmática, mientras que la introducción de otros, depende de transportadores dependientes de energía (ATP-binding cassette, ABC) [66].

2.10.4. Bombas de extrusión

Las bombas de extrusión son una clase especial de proteínas transmembranales de transporte que tienen la habilidad de detectar y remover las toxinas del interior de la célula hacia el exterior, reduciendo la concentración intracelular de un fármaco a un nivel subletal, permitiéndole así sobrevivir. Inicialmente fueron estudiadas en eucariontes, pero su identificación se ha realizado también en bacterias y son los principales contribuyentes de la resistencia intrínseca farmacológica, por ejemplo, las bombas de extrusión presentes en células eucariotas extruyen agentes antineoplásicos y son en gran parte responsables de la resistencia tumoral a múltiples fármacos. Del mismo modo, las bombas de extrusión bacterianas, generan el fenotipo de multifármaco resistencia en cepas microbianas [67]. Estas bombas pueden ser específicas (bomba de extrusión Tet para las tetraciclinas) o bien, no distinguen entre sustratos y simplemente los expulsan. Este último tipo de bombas inespecíficas son las involucradas en los procesos de la resistencia a múltiples fármacos (MDR, “multidrug resistance”) ya que confieren resistencia a diversos antibióticos con diferentes mecanismos de acción sin que el microorganismo necesite adquirir determinantes específicos, como las proteínas Blt, Bmr o NorA que pueden reconocer un grupo heterogéneo de moléculas como sustratos, por ejemplo: acriflavina, cloramfenicol, fluoroquinolonas, bromuro de hexadeciltrimetilamonio y bromuro de etidio (EtBr) entre otros [68, 69]. Las bombas de extrusión trabajan de modo sinérgico con otros mecanismos de resistencia, o bien, las bacterias pueden poseer diferentes bombas de extrusión que trabajan en conjunto.

Esencialmente, se han clasificado las bombas de extrusión en cinco familias denominadas: “Resistance Nodulation Division” (RND), “Major Facilitator Superfamily” (MFS), “Staphylococcal MultiResistance” (SMR), “Multidrug And Toxic compound Extrusion” (MATE) “ATP Binding Cassette” (ABC). En la **Figura 22** se ilustran las características y diferencias entre algunos de los transportadores más representativos de estas familias [68, 70]. La estructura básica de este tipo de sistemas de transporte es diferente en bacterias Gram positivo y negativo y en células eucariontes debido principalmente a las diferencias estructurales intrínsecas a cada uno de estos tipos celulares [71]. Sin embargo, se ha sugerido que el fenómeno de la MDR simplemente representa una variación en la estructura y la función de una translocasa regular que amplió su espectro de afinidad por los sustratos y, de esta manera, proporcionó a la células de procariontes y eucariontes de una

defensa simple en contra de los agentes xenobióticos y toxinas siempre presentes en el medio ambiente [67].

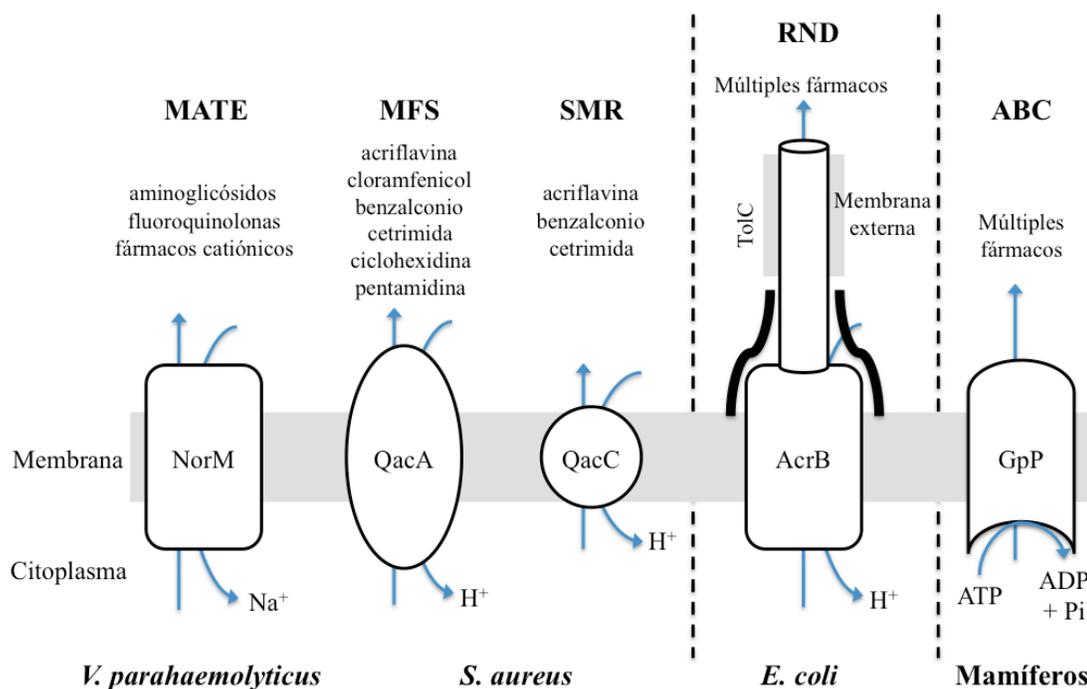


Figura 22. Comparación esquemática de las familias de bombas de extrusión [71].

Las bacterias Gram positivo tienen una estructura relativamente simple ya que se encuentran constituidas por la membrana citoplásmica y una capa gruesa de peptidoglicano, debido a estas características, las bombas de extrusión presentes en ellas son sencillas en organización y tienen un único componente situado en la membrana citoplásmica como la proteína Bmr, encontrada en *B. subtilis* o las proteínas QacA o QacC presentes en *S. aureus* [70, 72]. La estructura básica de las bombas de extrusión involucradas en el establecimiento del fenotipo multifármaco resistente de cepas Gram negativo, pertenecen a la familia RND, forma parte de un sistema de transporte multicomponente que comprende un transportador de membrana interno, una proteína de fusión de membranas periplásmico y un canal de membrana externa. Sin embargo, la arquitectura y la composición de múltiples bombas de extrusión puede variar significativamente debido a la diversidad topológica y funcional de los transportadores de la membrana interna [69, 71, 73]. La base molecular de la resistencia a un amplio rango de agentes antineoplásicos en tejidos cancerosos, generalmente implica la sobreexpresión de la proteína transmembranal glicoproteína P (GpP), la cual, es un miembro de la familia de transportadores “ATP-binding cassette” (ABC) [74].

3. JUSTIFICACIÓN

La mayoría de los inhibidores de las bombas de extrusión obtenidos de fuentes naturales, principalmente de origen vegetal, son activos únicamente contra bacterias Gram positivo y existe una escasa información disponible sobre los inhibidores activos contra bacterias Gram negativo. Debido a que las resinas glicosídicas de las convolvuláceas poseen potencial como agentes moduladores de la resistencia a norfloxacin en cepas de *S. aureus* [6-8], se sugiere que estos metabolitos anfipáticos pueden representar agentes que administrados en combinación con los agentes terapéuticos de uso clínico potencien la acción de éstos y vuelvan a ser de utilidad para el tratamiento de las infecciones refractarias ocasionadas por las cepas hospitalarias Gram negativo.

4. OBJETIVOS

- Establecer el potencial modulador de los glicolípidos de las convolvuláceas sobre el fenómeno de resistencia a antibióticos en cepas multifármaco resistentes.
- Aislar y purificar mediante el uso de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) algunos glicolípidos constitutivos de la mezcla de resinas glicosídicas de las flores de *Ipomoea murucoides* e *i. wolcottiana*.
- Caracterizar las estructuras de los glicolípidos aislados y purificados mediante técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB).

5. Publicación 1

Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae como moduladores de la actividad antibiótica en cepas Gram negativo multifármaco resistentes.

Berenice Corona-Castañeda y Rogelio Pereda-Miranda.

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 DF, México.

Publicado en Planta Medica el 14 de Octubre de 2011.

Resumen

Se evaluó el potencial modulador antibiótico de veintiséis glicolípidos microbiológicamente inactivos (Concentración mínima inhibitoria, MIC > 512 µg/mL) de la serie de las intrapilosinas [17], las murucoidinas [6, 7, 18], las pescapreínas [9, 42] y las tricolorinas [47, 75] sobre cepas multifármaco resistentes: *Escherichia coli* Rosetta gami y dos cepas patógenas hospitalarias, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*. Se observó que estos compuestos ejercen un efecto potenciador de los antibióticos tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol sobre las bacterias Gram negativo al aumentar hasta 64 veces la sensibilidad a los antibióticos al emplear concentraciones de 25 µg/mL. Por lo tanto, los glicolípidos de la familia Convolvulaceae representan metabolitos que inhiben las bombas de extrusión y pueden revertir los mecanismos de resistencia a los antibióticos, lo que favorece un aumento en la potencia y la eficacia de los antibióticos que actualmente no son eficaces en el tratamiento de infecciones causadas por cepas multifármaco resistentes.

Palabras clave

Resinas glicosídicas, familia Convolvulaceae, *Escherichia coli* Rosetta gami, *Shigella flexneri*, *Salmonella typhi*, multifármaco resistencia.

Introducción

Las resinas glicosídicas son glicolípidos complejos de alto peso molecular característicos de las especies de la familia Convolvulaceae [2, 3]. Estos metabolitos han demostrado diversas actividades biológicas de interés terapéutico [3], entre las cuales destaca su actividad potencial como inhibidores de la MDR en cepas hospitalarias de *Staphylococcus aureus* [7-9].

Uno de los mecanismos más frecuentes en el establecimiento de la resistencia bacteriana es la expresión de proteínas transmembranales, que producen el fenotipo MDR por ejemplo, NorA y TetK en *S. aureus* [50] y además, desempeñan un papel importante en la resistencia clínica adquirida de las bacterias Gram positivo y negativo [69].

Estas proteínas detectan concentraciones tóxicas de fármacos al interior de las células y se activan para expulsarlos, evitando en el caso de las bacterias, que los antibióticos alcancen la concentración mínima inhibitoria en el citoplasma [76]. La extrusión es más eficaz cuando se involucran otros mecanismos de resistencia [69] como se observa en las cepas nosocomiales, como la disminución de la absorción pasiva de los fármacos [62], situación que ha contribuido a la propagación de bacterias MDR Gram negativo en hospitales.

Se ha reportado la potenciación de antibióticos como la tetraciclina y la norfloxacin a al emplear glicolípidos microbiológicamente inactivos como inhibidores de la proteína membranal NorA expresada en cepas de *S. aureus* SA-1199B . Esta actividad constituye un ejemplo de sinergismo en el cual los glicolípidos microbiológicamente inactivos inhabilitan el mecanismo de resistencia celular (bomba de extrusión NorA) y permiten un incremento de la potencia y la eficacia de los agentes antibióticos [7, 9].

Por lo que, los glicolípidos aislados de las convolvuláceas podrían considerarse como prototipos para el desarrollo de potentes inhibidores de las bombas de extrusión (EPI). La mayoría de los EPIs

obtenidos de fuentes naturales, principalmente de origen vegetal, que se describen en la literatura son activos contra bacterias Gram positivo y existe una escasa información disponible sobre EPIs activos contra bacterias Gram negativo [4]. Las bombas de extrusión de las bacterias Gram negativo son complejas debido a la presencia de una membrana externa adicional favoreciendo la formación de una sofisticada bomba de extrusión conformada por un sistema tripartita que afecta drásticamente a la eficacia de los antibióticos en las cepas MDR y, por lo tanto, limita su uso clínico [5, 73].

El efecto modulador de los glicolípidos sobre las cepas MDR de *S. aureus*, previamente descritas por nuestro grupo de investigación [7, 8], permitió la caracterización de este tipo de compuestos como sustratos para las bombas de extrusión (ensayos de inhibición de la extrusión con bromuro de etidio) y constituye la fundamentación para evaluación de la actividad moduladora de estos oligosacáridos sobre la resistencia contra las cepas MDR Gram negativo.

Resultados y discusión

Los valores de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de todos los compuestos que pertenecen a la serie de las pescapreínas (1-4), las murucoidinas (5-11), las orizabinas (12-18), las tricolorinas (19-21) y las intrapilosinas (22-26) se determinaron contra la cepa *Escherichia coli* Rosetta-gami, y dos cepas MDR hospitalarias (*Shigella flexneri* y *Salmonella typhi*), y los datos se presentan en los **Cuadros 1 y 2**. Las estructuras de todos los compuestos evaluados se incluyen en las **Figuras 1-5** de la información suplementaria.

Todos los glicolípidos fueron microbiológicamente inactivos (MIC > 512 µg/mL; **Figura 6S, información suplementaria**) y al adicionarse en concentraciones subinhibitorias, potenciaron la actividad de la tetraciclina, la kanamicina y el cloramfenicol contra las cepas MDR Gram negativo en los ensayos de modulación (**Figuras 7S-13S, información suplementaria**).

Cuadro 1. Susceptibilidad de *E. coli* Rosetta gami a los glicolípidos 1-26.

Clave	Compuesto	MIC ($\mu\text{g/mL}$)			
		(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)
	Antibióticos		128	32	256
1	Pescapreina II	>512	64	16	128
2	Pescapreina III	>512	64	16	128
3	Pescapreina VI	>512	64	16	128
4	Estoloniferina III	>512	64	4	128
5	Murucoidina III	>512	64	4	128
6	Murucoidina IV	>512	32	4	128
7	Murucoidina V	>512	8	32	128
8	Murucoidina VII	>512	64	8	128
9	Murucoidina VIII	>512	4	32	128
10	Murucoidina XIV	>512	8	32	128
11	Murucoidina XVI	>512	64	4	128
12	Orizabina X	>512	64	8	128
13	Orizabina XI	>512	64	16	128
14	Orizabina XIV	>512	64	16	64
15	Orizabina XVI	>512	64	16	128
16	Orizabina XVII	>512	64	32	128
17	Orizabina XX	>512	64	16	128
18	Orizabina XXI	>512	64	16	128
19	Tricolorina A	>512	64	8	128
20	Tricolorina E	>512	64	16	128
21	Tricolorina I	>512	64	16	128
22	Intrapilosina I	>512	64	16	128
23	Intrapilosina II	>512	64	16	128
24	Intrapilosina III	>512	64	16	128
25	Intrapilosina IV	>512	64	16	128
26	Intrapilosina V	>512	64	16	128
	Reserpina	>512	64	8	128

Abreviaturas: (-) = (MIC) Valor de la concentración mínima inhibitoria determinado en la prueba de susceptibilidad; Tet (+) = valor de la MIC determinado para tetraciclina; Kan (+) = valor de la MIC determinado para kanamicina; Cam (+) = valor de la MIC determinado para cloramfenicol en el ensayo de modulación en la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ del oligosacárido evaluado.

Cuadro 2. Susceptibilidad de las cepas hospitalarias *S. typhi* y *S. flexneri* a los glicolípidos **4, 6, 14, 16, 18-21 y 23-25.**

Clave	Compuesto	MIC ($\mu\text{g/mL}$)							
		(-)	<i>Salmonella typhi</i>			<i>Shigella flexneri</i>			
			Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)	(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)
	Antibióticos		1024	1024	512		512	512	256
4	Estoloniferina III	>512	512	512	512	>512	128	64	256
6	Murucoidina IV	>512	512	512	256	>512	128	512	64
14	Orizabina XIV	>512	512	512	256	>512	256	256	128
16	Orizabina XVII	>512	512	512	256	>512	256	256	128
18	Orizabina XXI	>512	512	512	256	>512	256	8	128
19	Tricolorina A	>512	512	512	256	>512	128	64	128
20	Tricolorina E	>512	512	512	256	>512	256	32	128
21	Tricolorina I	>512	512	512	256	>512	128	64	128
23	Intrapilosina II	>512	512	512	256	>512	64	64	128
24	Intrapilosina III	>512	512	512	256	>512	128	128	128
25	Intrapilosina IV	>512	512	512	256	>512	128	64	128
	Reserpina	>512	512	512	256	>512	256	64	128

Abreviaturas: (-) = (MIC) Valor de la concentración mínima inhibitoria determinado en la prueba de susceptibilidad; Tet (+) = valor de la MIC determinado para tetraciclina; Kan (+) = valor de la MIC determinado para kanamicina; Cam (+) = valor de la MIC determinado para cloramfenicol en el ensayo de modulación en la concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ del oligosacárido evaluado.

Estos efectos de potenciación fueron similares o incluso superiores a los observados para la reserpina, un derivado natural e inhibidor de las bombas de extrusión por lo que fue utilizado como un control positivo. Por lo tanto, su eficacia es comparable a la observada en bacterias Gram positivo [7-9] y se sugiere que el posible mecanismo se debe a la inhibición de las bombas de extrusión. En la mayoría de los casos, los glicolípidos evaluados (25 $\mu\text{g/mL}$) revierten a la mitad la resistencia a los antibióticos, aunque se observaron reducciones de hasta 64 veces. Por ejemplo, en el ensayo de la modulación de los tres antibióticos ensayados frente a *E. coli* Rosetta-Gami, los compuestos **8, 12 y 19** mostraron la misma eficacia que la reserpina con reducciones de la mitad de la MIC para la tetraciclina (de 128 $\mu\text{g/mL}$ a 64 $\mu\text{g/mL}$) y el cloramfenicol (de 256 $\mu\text{g/mL}$ a 128 $\mu\text{g/mL}$) y reducción de cuatro veces para la kanamicina (de 32 $\mu\text{g/mL}$ a 8 $\mu\text{g/mL}$). Las mejores

reducciones en las MIC se observaron para las combinaciones realizadas con: compuesto **9** y tetraciclina (de 128 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$ -32 veces-), **4-6** y **11** con kanamicina (de 32 $\mu\text{g/mL}$ a 4 $\mu\text{g/mL}$ -8 veces-), y el compuesto **14** con cloramfenicol (de 256 $\mu\text{g/mL}$ a 64 $\mu\text{g/mL}$).

Para el ensayo de modulación sobre *S. typhi*, todos los glicolípidos evaluados mostraron la misma eficacia que la reserpina con una reducción de la mitad en los valores de MIC para la tetraciclina y la kanamicina (de 1024 $\mu\text{g/mL}$ a 512 $\mu\text{g/mL}$) y el cloramfenicol (de 512 $\mu\text{g/mL}$ a 256 $\mu\text{g/mL}$), excepto para el compuesto **4** que no mostró actividad moduladora del cloramfenicol.

Finalmente, en el ensayo de modulación contra *S. flexneri*, los compuestos **6**, **18** y **23** ejercieron el mayor efecto de potenciación en las siguientes combinaciones: glicolípido **6** con cloramfenicol, reducción de cuatro veces (de 256 $\mu\text{g/mL}$ a 64 $\mu\text{g/mL}$); compuesto **18** con kanamicina, reducción de 64 veces (de 512 $\mu\text{g/mL}$ a 8 $\mu\text{g/mL}$); y compuesto **23** con tetraciclina, reducción de ocho veces (de 512 $\mu\text{g/mL}$ a 64 $\mu\text{g/mL}$).

En términos de la relación entre la estructura química y la actividad moduladora observada, ni el tamaño del anillo de lactona, ni la longitud de la cadena de oligosacáridos fueron cruciales para la potenciación de la actividad. Tampoco el grado, el tipo o la posición de acilación en el núcleo oligosacárido tienen una clara influencia en la actividad de estos compuestos.

Se han descubierto pocos EPIs de origen vegetal, por lo tanto, los oligosacáridos derivados de las convolvuláceas pueden tener un potencial como nuevos prototipos fitofarmacéuticos.

La actividad antimicrobiana de las mezclas de resinas glicósidas contra bacterias Gram positivo y negativo puede ser el resultado de una sinergia en la que los EPIs (compuestos microbiológicamente inactivos) de origen vegetal, pueden inactivar las bombas de extrusión y permitir un incremento en la potencia y la eficacia de los agentes antibacterianos. Estos resultados sugieren que el uso de este tipo de metabolitos como prototipos de nuevos EPIs puede facilitar la reintroducción de antibióticos terapéuticamente ineficaces y contribuir a la supresión de la aparición de cepas MDR hospitalarias.

Materiales y Métodos

Escherichia coli Rosetta-gami fue proporcionada por el Dr. Federico del Río Portilla, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química de la UNAM, y se cultivó en agar Luria Bertani (Sigma) antes de la determinación de los valores de MIC. Se utilizó caldo Luria Bertani (LB) para las pruebas de susceptibilidad. Las cepas hospitalarias de *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi* fueron proporcionadas por el Dr. Fernando Calzada Bermejo, Unidad de Investigación Médica en Farmacología y Productos Naturales, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, y se cultivaron en agar Mueller-Hinton (Sigma) antes de la determinación de los valores de MIC. Se utilizó caldo Mueller-Hinton (MH) para las pruebas de susceptibilidad.

Tetraciclina (pureza > 98%), kanamicina (pureza > 99%), cloramfenicol (pureza > 98%), y reserpina (pureza > 98%) se adquirieron en Sigma.

Los glicolípidos 1-26 (**Figuras 1S-5S**) se purificaron de sus respectivas mezclas de resinas glicosídicas como se ha descrito previamente para *Ipomoea intrapilosa* [17], *i. murucoides* [6, 7, 18], *i. orizabensis* [77], *i. pes-caprae* [9, 42] e *i. tricolor* [47, 75], empleando la técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra mediante HPLC a nivel preparativo: un sistema Waters 600 E Multisolvant equipado con un detector de índice de refracción Waters 410. La pureza de los glicolípidos se evaluó por HPLC, RMN y MS-FAB como > 99%.

Los valores de las MIC se determinaron por duplicado mediante procedimientos de microdilución estándar. Se ajustó la densidad del inóculo con solución salina al 0.9% a 1.5×10^8 UFC de cada una de las cepas evaluadas por comparación con un estándar de McFarland. Todos los glicolípidos de prueba se disolvieron en DMSO antes de la dilución en MH o LB para uso en determinaciones de

MIC. La mayor concentración de DMSO restante después de la dilución (3,125 % v/v) y no causó inhibición del crecimiento bacteriano.

Se utilizó una microplaca con 96 pozos y se adicionaron 125 μ L de LB o MH en las columnas 1 a 12, 125 μ L del glicolípido de prueba o el antibiótico en la columna 1 y se realizaron diluciones seriadas hasta la columna 10 para obtener concentraciones finales de 512 a 1 μ g/mL. Posteriormente, se adicionaron 125 μ L del inóculo correspondiente. La placa se incubó a 37° C durante 24 h. Los valores de MIC: menor concentración en la cual no se observa crecimiento, se determinaron al emplear una solución metanólica (5 mg/mL) de bromuro de 3-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma) para detectar el crecimiento bacteriano mediante el cambio en la coloración de amarillo a violeta.

Para el ensayo de modulación, todos los glicolípidos se ensayaron a una concentración final de 25 μ g/mL. Se empleó reserpina en una concentración de 20 μ g/mL como control positivo (inhibidor de la bomba de extrusión).

Agradecimientos

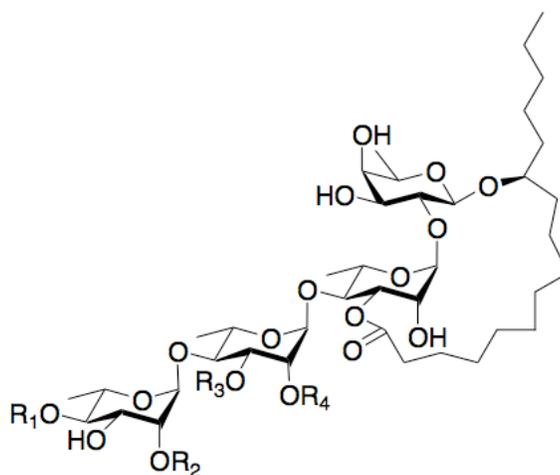
Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (101380-Q) y la Dirección General de Asuntos Personal Académico de la UNAM (IN217310).

Información suplementaria.

Se encuentran disponibles: las estructuras de los compuestos de prueba, ensayos de susceptibilidad de los compuestos 6, 14 y 23 contra *E. coli*, y el ensayo de la modulación de la tetraciclina, kanamicina, cloramfenicol con compuestos **6**, **14** y **23** contra *E. coli*, *S. typhi* y *S. flexneri*.

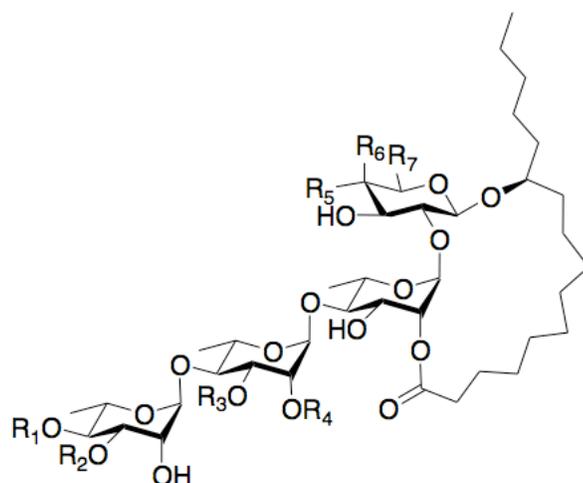
Información suplementaria de la publicación 1

Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae como moduladores de la actividad antibiótica en cepas Gram negativo multifármaco resistentes



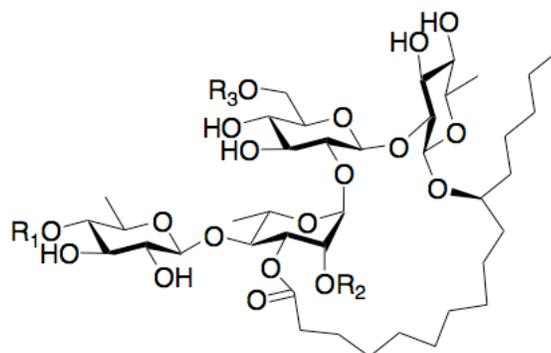
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
1	iba	H	ram	dodeca
2	mba	H	ram	dodeca
3	H	dodeca	mba	H
4	mba	H	ram	deca
7	mba	H	glu	mba
10	mba	H	dodeca	H

Figura 1S. Estructura química de la pescapreína II (**1**), pescapreína III (**2**), pescapreína VI (**3**), estoloniferina III (**4**), murucoidina V (**7**) y murucoidina XIV (**10**). Abreviaturas: iba = isobutanoilo; ram = ramnosa; dodeca = dodecanoilo; mba = metilbutanoilo; deca = decanoilo; glu = glucosa.



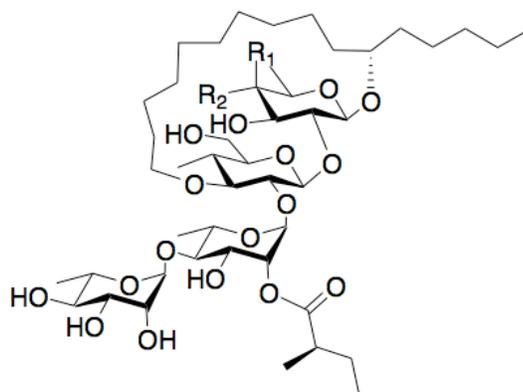
	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆	R ₇
5	mba	H	ram	mba	H	OH	CH ₃
6	mba	H	glu	mba	H	OH	CH ₃
8	iba	H	ram	mba	OH	H	CH ₂ OH
9	mba	H	ram	mba	OH	H	CH ₂ OH
11	mba	H	mba	H	H	OH	CH ₃
22	mba	cna	glu	mba	H	OH	CH ₃
23	octa	cna	glu	mba	H	OH	CH ₃
24	octa	cna	glu	octa	H	OH	CH ₃
25	(-)-2 <i>R</i> - mba	cna	glu	dodeca	H	OH	CH ₃
26	mba	cna	glu	dodeca	H	OH	CH ₃

Figura 2S. Estructura química de la muruoidina III (**5**), muruoidina VII (**8**), muruoidina VIII (**9**), muruoidina XVI (**11**), intrapilosina I (**22**), intrapilosina III (**24**), intrapilosina IV (**25**) e intrapilosina V (**26**). Abreviaturas: iba = isobutanoilo; ram = ramnosa; dodeca = dodecanoilo; mba = (2*S*)-2-metilbutanoilo; deca = decanoilo; glu = glucosa, octa = octanoilo; cna = *trans*-cinnamoilo.



	R ₁	R ₂	R ₃
12	tga	nla(-)	iba
13	tga	nla(+)	iba
14	tga	nla(-)	mba
15	tga	mba	nla(-)
16	tga	mba	nla(+)
17	mba	mba	nla(-)
18	mba	mba	nla(+)

Figura 3S. Estructura química de la orizabina X (**12**), orizabina XI (**13**), orizabina XIV (**14**), orizabina XVI (**15**), orizabina XVII (**16**), orizabina XX (**17**) y orizabina XXI (**18**). Abreviaturas: tga = 2(*E*)-metil-2-butenilo; iba = isobutanoilo; mba = (2*S*)-2-metilbutanoilo; nla = 3-hidroxi-2-metilbutanoilo.



	R ₁	R ₂
19	OH	H
20	H	OH

Figura 4S. Estructura química de la tricolorina A (**19**) y tricolorina E (**20**).

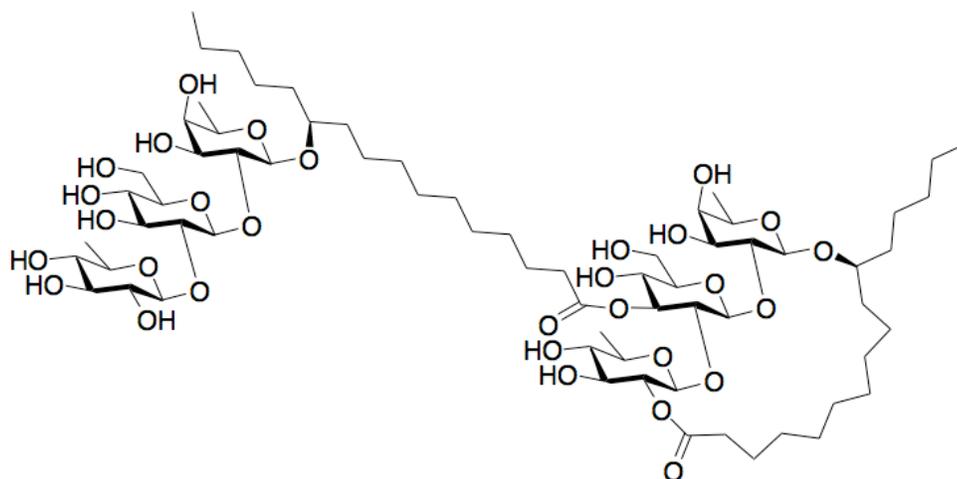


Figura 5S. Estructura química de la tricolorina I (21).

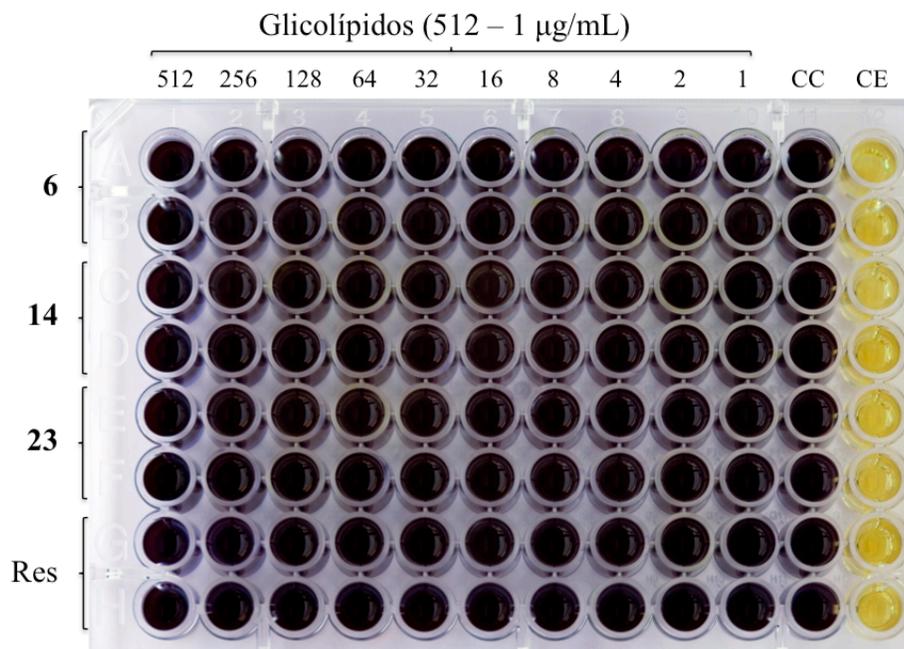


Figura 6S. Ensayo de actividad antibacteriana de los compuestos **6**, **14** y **2** contra *Escherichia coli* Rosetta gami. Reserpina como control positivo EPI (20 $\mu\text{g/mL}$).

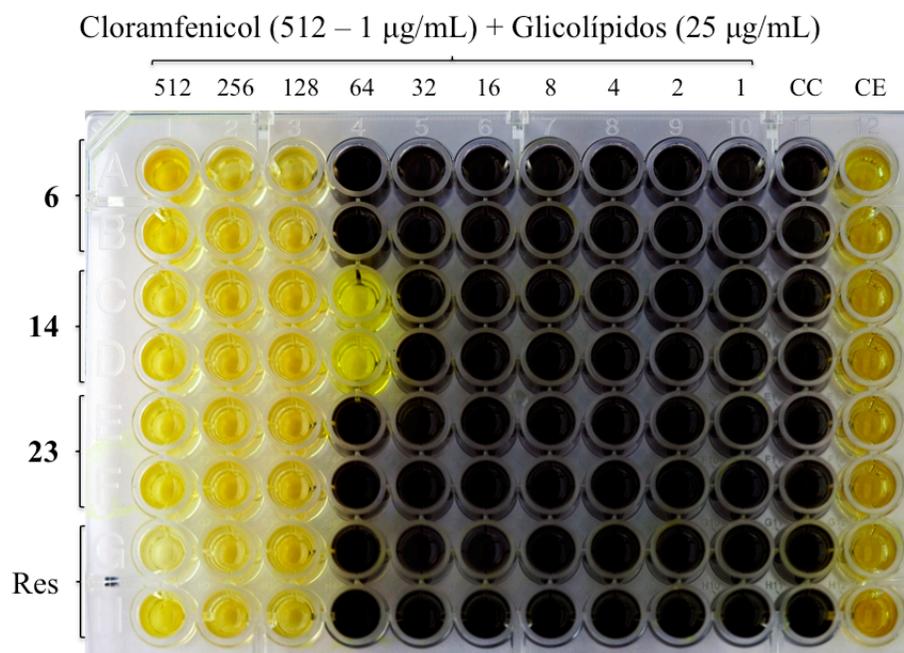


Figura 7S. Ensayo de modulación de cloramfenicol con los compuestos **6**, **14** y **23** (25 $\mu\text{g/mL}$) contra *E. coli*.

Abreviaturas: Res, reserpina como control positivo (20 $\mu\text{g/mL}$); CC, control de crecimiento; CE, control de esterilidad.

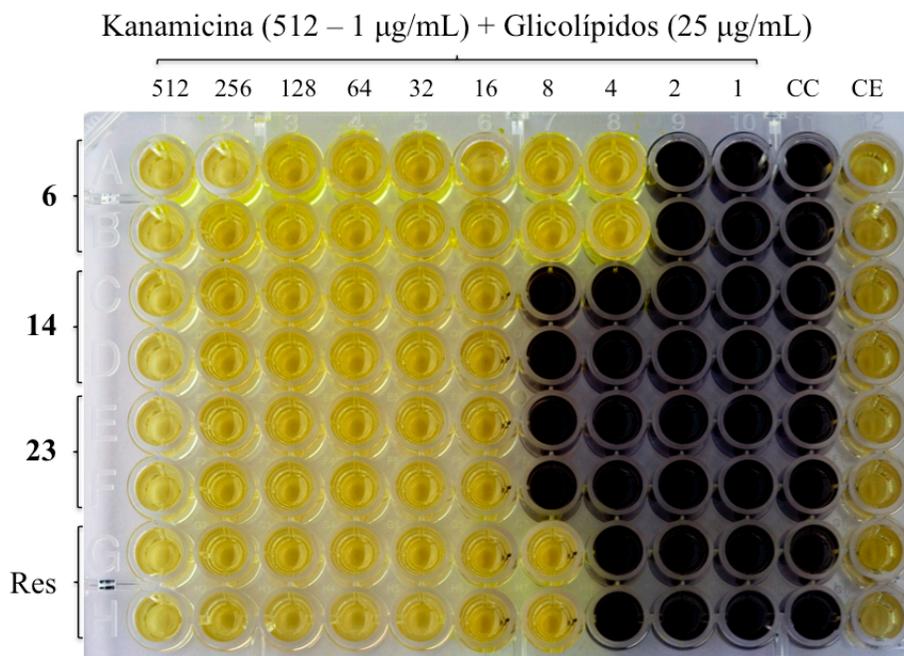


Figura 8S. Ensayo de modulación de kanamicina con los compuestos **6**, **14** y **23** (25 $\mu\text{g/mL}$) contra *E. coli*.

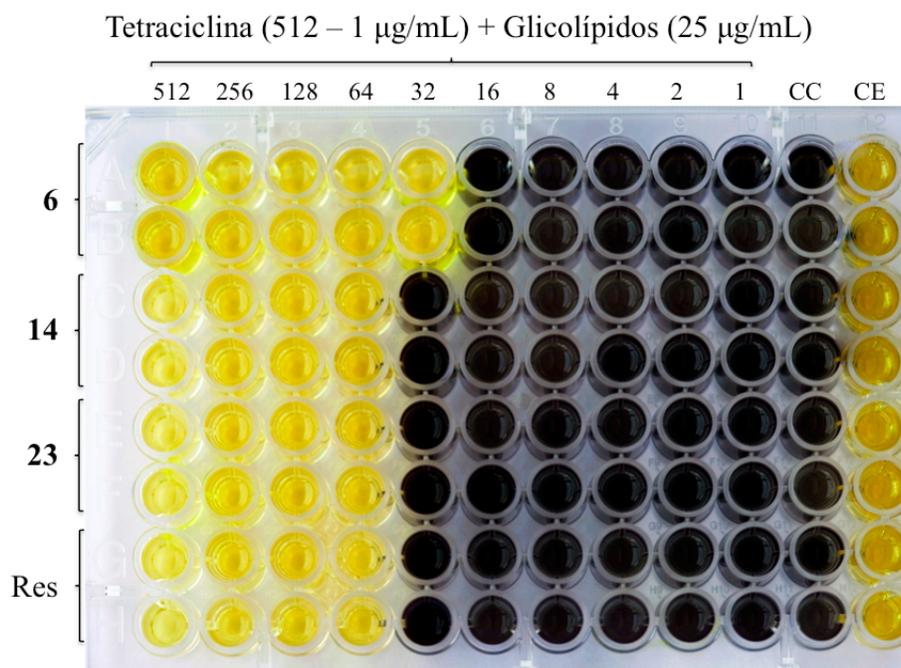


Figura 9S. Ensayo de modulación de tetraciclina con los compuestos **6**, **14** y **23** (25 $\mu\text{g/mL}$) contra *E. coli*.

Abreviaturas: Res, reserpina como control positivo (20 $\mu\text{g/mL}$); CC, control de crecimiento; CE, control de esterilidad.

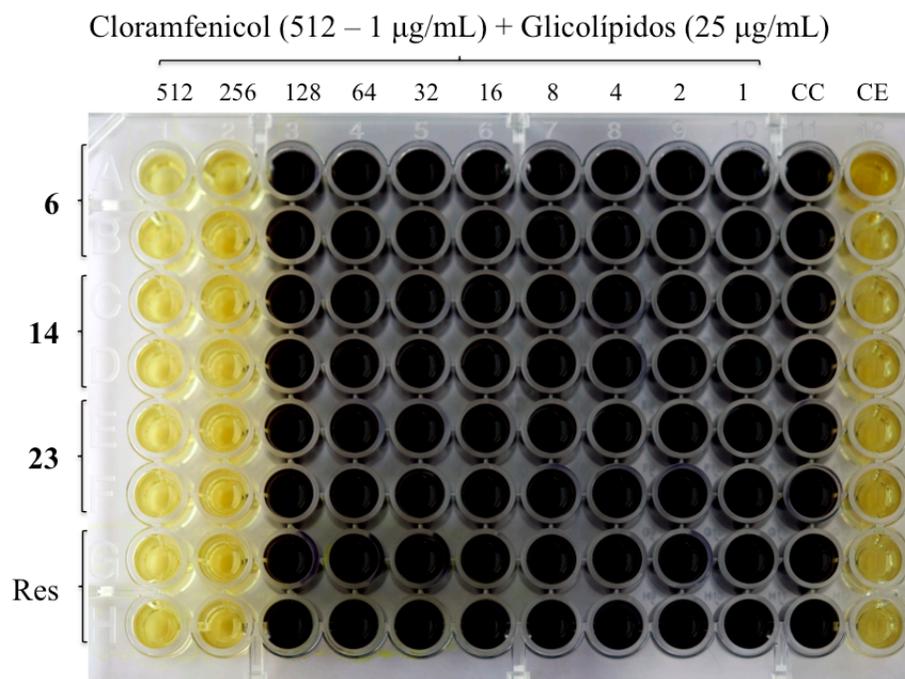


Figura 10S. Ensayo de modulación de cloramfenicol con los compuestos **6**, **14** y **23** (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra la cepa hospitalaria MDR *Salmonella typhi*.

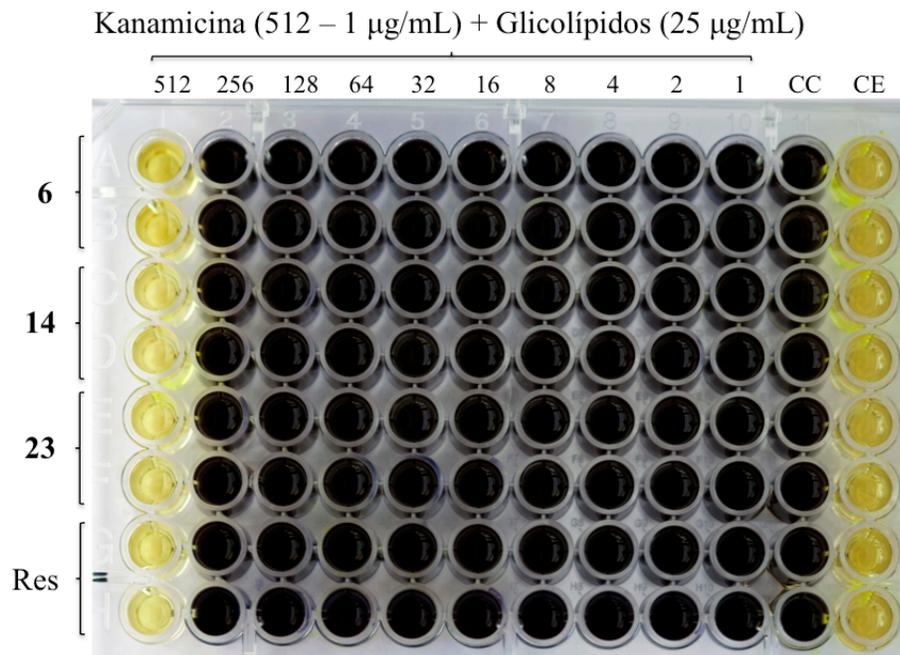


Figura 11S. Ensayo de modulación de kanamicina con los compuestos **6**, **14** y **23** (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra *S. typhi*.

Abreviaturas: Res, reserpina como control positivo (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); CC, control de crecimiento; CE, control de esterilidad.

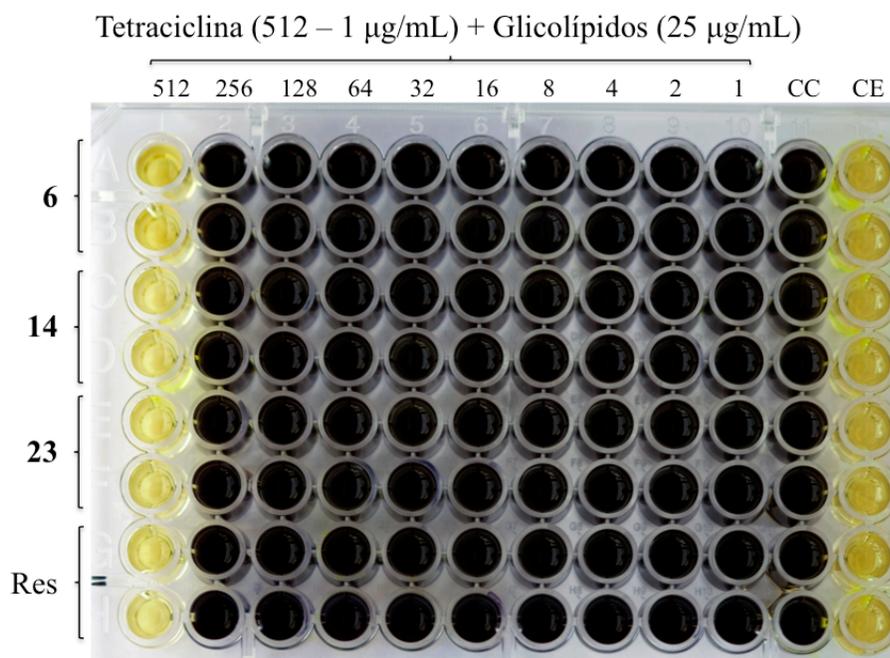


Figura 12S. Ensayo de modulación de tetraciclina con los compuestos **6**, **14** y **23** (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra *S. typhi*.

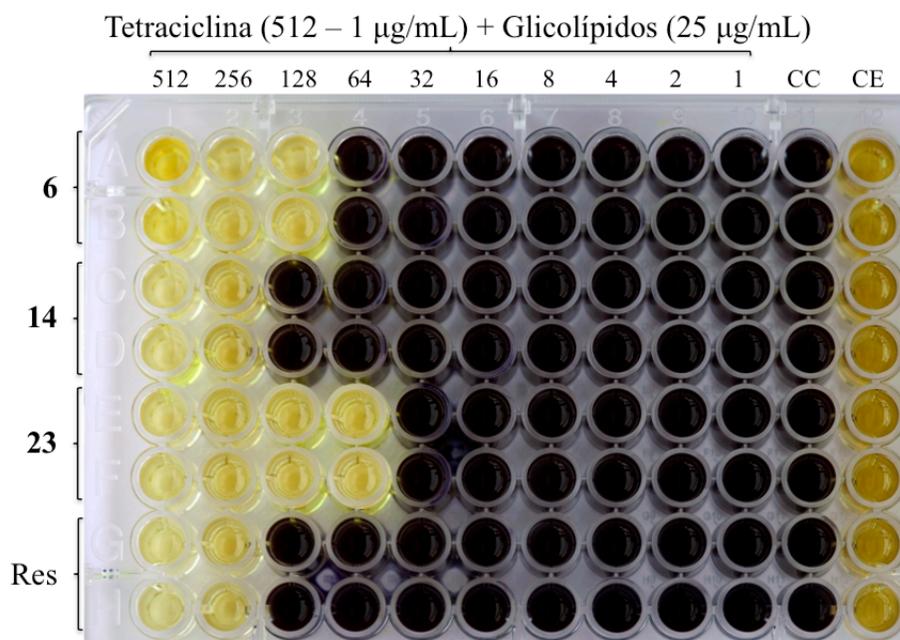


Figura 13S. Ensayo de modulación de tetraciclina con los compuestos **6**, **14** y **23** (25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) contra la cepa hospitalaria MDR *Shigella flexneri*.

Abreviaturas: Res, reserpina como control positivo (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); CC, control de crecimiento; CE, control de esterilidad.

Morning Glory Resin Glycosides as Modulators of Antibiotic Activity in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria

Berenice Corona-Castañeda, Rogelio Pereda-Miranda

Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City, Mexico

Abstract

Twenty-six microbiologically inactive (MIC > 512 µg/mL) convolvulaceous resin glycosides (1–26) were tested for resistance modulatory activity *in vitro* against *Escherichia coli* Rosetta-gami and two nosocomial pathogens, *Salmonella typhi* and *Shigella flexneri*. These compounds exerted a potentiation effect of the clinically useful antibiotics tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol against the tested gram-negative bacteria by increasing antibiotic susceptibility up to 32-fold at concentrations of 25 µg/mL. Therefore, the oligosaccharides from the morning glory family (Convolvulaceae) represent metabolites that reverse microbial resistance mechanisms, favoring an increase in the strength and effectiveness of current antibiotics that are not effective in the treatment of refractive infections caused by multidrug-resistant strains.

Key words

resin glycosides · Convolvulaceae · *Escherichia coli* Rosetta-gami · *Shigella flexneri* · *Salmonella typhi* · multidrug resistance

Supporting information available online at <http://www.thieme-connect.de/ejournals/toc/plantamedica>

Resin glycosides are complex amphipatic glycolipids of high molecular weight derived from species of the morning glory family (Convolvulaceae) [1, 2]. They have shown diverse biological activities of therapeutic interest [2, 3], an important one being their potential activity as inhibitors of multidrug resistance (MDR) in nosocomial strains of *Staphylococcus aureus* [4, 5]. One of the most frequent mechanisms in bacterial resistance development is the expression of transmembrane proteins, which produce the MDR phenotype (e.g., NorA and TetK in *Staphylococcus aureus* [6]) and, in addition, play a significant role in the acquired clinical resistance of both gram-positive and negative bacteria [7]. These proteins are activated to expel antibiotics, and in this manner prevent drugs from reaching toxic concentration within the cell [8]. Efflux is most effective when working in cooperation with other resistance mechanisms [7] as seen in nosocomial strains, e.g., decreasing passive absorption (influx) or increasing active efflux of antibiotics [9], all of which have contributed to the spread of MDR gram-negative bacteria in hospitals or other community clinical situations.

Previous studies described the enhancement of commercial antibiotics such as tetracycline and norfloxacin by the use of microbiologically inactive resin glycoside members of the tricolorin, scamonin, orizabin [4], murucoidin, [5, 10] and pescaprein [11] series as inhibitors of NorA expressed in *S. aureus* (SA-1199B). Therefore, convolvulaceous glycolipids could be considered as

leads for developing potent efflux pump inhibitors (EPs). Most of EPs from natural sources, primarily of plant origin, described in the literature are active against gram-positive bacteria, but only scarce information is available about active EPs against gram-negative bacteria [12]. Efflux pumps in gram-negative bacteria are complex due to the presence of an additional outer membrane causing them to form a sophisticated tripartite efflux pump system which drastically affects the efficacy of antibiotics in MDR strains and therefore limits their clinical use [9, 13]. The modulatory effect of resin glycosides on multidrug-resistant *S. aureus*, previously described by us [4, 5], characterized these types of compounds as substrates for efflux pumps (ethidium bromide efflux inhibition assays) and was the rationale why we further tested these oligosaccharides for resistance modulatory activity against gram-negative MDR strains. The minimum inhibitory concentration (MIC) values of all the compounds belonging to the pescaprein (1–4), murucoidin (5–11), orizabin (12–18), tricolorin (19–21), and intrapilosin (22–26) series were registered against one effluxing strain (*Escherichia coli* Rosetta-gami), and two epidemic MDR strains (*Shigella flexneri* and *Salmonella typhi*), and the data are presented in **Tables 1** and **2**. The structures for all tested compounds are included in **Figs. 15–55** (Supporting Information).

Table 1 Susceptibility of *Escherichia coli* Rosetta-gami to glycolipids 1–26.

Compound	MIC (µg/mL) <i>E. coli</i> Rosetta-gami	MIC (µg/mL)			
		(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)
1	Pescaprein II	>512	64	16	128
2	Pescaprein III	>512	64	16	128
3	Pescaprein VI	>512	64	16	128
4	Stoloniferin III	>512	64	4	128
5	Murucoidin III	>512	64	4	128
6	Murucoidin IV	>512	32	4	128
7	Murucoidin V	>512	8	32	128
8	Murucoidin VII	>512	64	8	128
9	Murucoidin VIII	>512	4	32	128
10	Murucoidin XIV	>512	8	32	128
11	Murucoidin XVI	>512	64	4	128
12	Orizabin X	>512	64	8	128
13	Orizabin XI	>512	64	16	128
14	Orizabin XIV	>512	64	16	64
15	Orizabin XVI	>512	64	16	128
16	Orizabin XVII	>512	64	32	128
17	Orizabin XX	>512	64	16	128
18	Orizabin XXI	>512	64	16	128
19	Tricolorin A	>512	64	8	128
20	Tricolorin E	>512	64	16	128
21	Tricolorin I	>512	64	16	128
22	Intrapilosin I	>512	64	16	128
23	Intrapilosin II	>512	64	16	128
24	Intrapilosin III	>512	64	16	128
25	Intrapilosin IV	>512	64	16	128
26	Intrapilosin V	>512	64	16	128
	Reserpine	>512	64	8	128
	Tetracycline		128		
	Kanamycin			32	
	Chloramphenicol				256

Abbreviations: (-) = minimum inhibitory concentration (MIC) value determined in the susceptibility testing; Tet (+) = MIC value determined for tetracycline; Kan (+) = MIC value determined for kanamycin; Cam (+) = MIC value determined for chloramphenicol in the modulation assay at the concentration of 25 µg/mL of the tested oligosaccharide

Table 2 Susceptibility of nosocomial multidrug resistant strains of *Salmonella typhi* and *Shigella flexneri* to glycolipids **4**, **6**, **14**, **16**, **18–21**, **23–25**.

Compound	MIC ($\mu\text{g/mL}$) <i>Salmonella typhi</i>				<i>Shigella flexneri</i>			
	(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)	(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)
4 Stoloniferin III	> 512	512	512	512	> 512	128	64	256
6 Murucoidin IV	> 512	512	512	256	> 512	128	512	64
14 Orizabin XIV	> 512	512	512	256	> 512	256	256	128
16 Orizabin XVII	> 512	512	512	256	> 512	256	256	128
18 Orizabin XXI	> 512	512	512	256	> 512	256	8	128
19 Tricolorin A	> 512	512	512	256	> 512	128	64	128
20 Tricolorin E	> 512	512	512	256	> 512	256	32	128
21 Tricolorin I	> 512	512	512	256	> 512	128	64	128
23 Intrapilosin II	> 512	512	512	256	> 512	64	64	128
24 Intrapilosin III	> 512	512	512	256	> 512	128	128	128
25 Intrapilosin IV	> 512	512	512	256	> 512	128	64	128
Reserpine	> 512	512	512	256	> 512	256	64	128
Tetracycline		1024				512		
Kanamycin			1024				512	
Chloramphenicol				512				256

Abbreviations: (-) = minimum inhibitory concentration (MIC) value determined in the susceptibility testing; Tet (+) = MIC value determined for tetracycline; Kan (+) = MIC value determined for kanamycin; Cam (+) = MIC value determined for chloramphenicol in the modulation assay at the concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ of the tested oligosaccharide

All glycolipids were microbiologically inactive (MIC > 512 $\mu\text{g/mL}$; Fig. 6S, Supporting Information) and potentiated the action of tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol against these gram-negative MDR strains in experiments using a subinhibitory concentration of the tested compounds (Figs. 7S–13S, Supporting Information). These potentiation effects were similar or even higher to those displayed by reserpine, a plant-derived efflux pump inhibitor used as a positive control. Thus, their efficacy is comparable to that previously observed in gram-positive bacteria [4,5,11] and provided support for an efflux pump inhibition as the possible mechanism. In most cases, the tested glycolipids (25 $\mu\text{g/mL}$) reversed antibiotic resistance twofold, although reductions of up to 32-fold were observed. For example, in the modulation assay of the three tested antibiotics against *E. coli* Rosetta-gami, compounds **8**, **12**, and **19** displayed the same efficacy as reserpine with twofold increments in the activity for tetracycline (128 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$) and chloramphenicol (256 $\mu\text{g/mL}$ to 128 $\mu\text{g/mL}$) and fourfold for kanamycin (32 $\mu\text{g/mL}$ to 8 $\mu\text{g/mL}$). The highest reductions in the MIC were for compound **9** on tetracycline (128 $\mu\text{g/mL}$ to 4 $\mu\text{g/mL}$), **4–6** and **11** on kanamycin (32 $\mu\text{g/mL}$ to 4 $\mu\text{g/mL}$), and **14** on chloramphenicol (256 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$). For the modulation assay against *S. typhi*, all tested compounds displayed the same efficacy as reserpine with a twofold reduction in MIC values for tetracycline, kanamycin (1024 $\mu\text{g/mL}$ to 512 $\mu\text{g/mL}$), and chloramphenicol (512 $\mu\text{g/mL}$ to 256 $\mu\text{g/mL}$), except for compound **4** that showed no modulatory activity for chloramphenicol. Finally, in the assay against *S. flexneri*, compounds **23**, **18**, and **6** (Fig. 1) exerted the highest potentiation effect with an eightfold reduction for tetracycline (512 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$), 32-fold reduction for kanamycin (512 $\mu\text{g/mL}$ to 8 $\mu\text{g/mL}$), and fourfold reduction for chloramphenicol (256 $\mu\text{g/mL}$ to 64 $\mu\text{g/mL}$), respectively. In terms of the relationship between the chemical structure and the observed modulatory activity, neither the size of the lactone ring nor the length of the oligosaccharide chain were crucial for activity potentiation. Nor did the degree, type, or position of saccharide core acylation indicate a clear influence on the activity of these compounds.

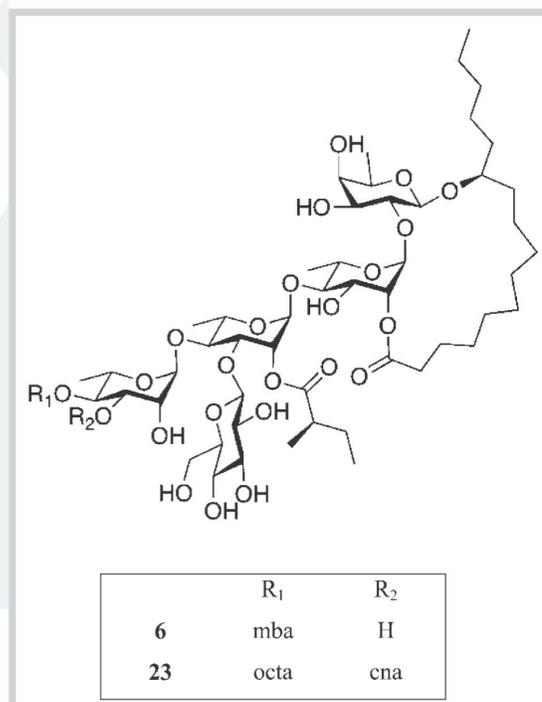


Fig. 1 Chemical structures of murucoidin IV (**6**) and intrapilosin II (**23**). Abbreviations: mba = (2S)-2-methylbutanoyl; octa = octanoyl; cna = trans-cinnamoyl.

Few EPIs and antibiotics of plant origin have been discovered, thus the convolvulaceous oligosaccharides may have potential as new phytopharmaceutical leads. The antimicrobial activity against gram-positive and negative bacteria of the resin glycoside

mixtures could be the result of synergy in which the microbiologically inactive EPIs of a plant extract disable the efflux pumps and allow for an increment in potency and effectiveness of the antibacterial plant agents. These results suggest that the use of this type of metabolites as prototypes for new EPIs could facilitate the reintroduction of therapeutically ineffective antibiotics back into clinical use and contribute to the suppression of the emergence of nosocomial MDR bacterial strains.

Materials and Methods

Escherichia coli Rosetta-gami was provided by Dr. Federico del Río Portilla, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, UNAM, and was cultured on Luria Bertani nutrient agar (Sigma) before determination of MIC values. Luria Bertani broth (LB) was used for susceptibility tests. Nosocomial strains of *Shigella flexneri* and *Salmonella typhi* were provided by Dr. Fernando Calzada Bermejo, Unidad de Investigación Médica en Farmacología y Productos Naturales, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, and were cultured on nutrient agar (Mueller-Hinton; Sigma) before determination of MIC values. Mueller-Hinton (MHB) broth was used for susceptibility tests. Tetracycline (purity >98%), kanamycin (purity >99%), chloramphenicol (purity >98%), and reserpine (purity >98%) were obtained from Sigma. Glycolipids 1–26 (Figs. 15–55) were purified as previously described by preparative recycling HPLC using a Waters 600 E multisolvent delivery system equipped with a Waters 410 refractive index detector (Waters) from their respective resin glycoside mixtures: *Ipomoea intrapilosa* [14], *I. murucoides* [5, 10, 15], *I. orizabensis* [16], *I. pes-caprae* [11, 17, 18], and *I. tricolor* [19, 20]. Glycolipid purity was assessed by HPLC, NMR, and FAB-MS as >99%. MIC values were determined at least in duplicate by standard microdilution procedures. An inoculum density of 1.5×10^8 CFU of each of the test strains was prepared in 0.9% saline by comparison with a McFarland standard. MHB or LB (125 μ L) was dispensed into 10 wells of a 96-well microtiter plate (Nunc, 0.3 mL volume per well). All test compounds were dissolved in DMSO before dilution into MHB or LB for use in MIC determinations. The highest concentration of DMSO remaining after dilution (3.125% v/v) caused no inhibition of bacterial growth. Then, glycolipids 1–26 or appropriate antibiotic (125 μ L) were individually dispensed into well 1 and serially diluted across the plate (512–1 μ g/mL), leaving well 11 empty for the growth control. The final volume was dispensed into well 12, which being free of inoculum served as the sterile control. The inoculum (125 μ L) was added into wells 1–11 and the plate was incubated at 37 °C for 24 h. The MIC was defined as the lowest concentration, which yielded no visible growth. Tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol were also tested as positive drug controls. A methanolic solution (5 mg/mL) of 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT; Sigma) was used to detect bacterial growth by a color change from yellow to dark blue. For the modulation assay, all glycolipids were tested at a final concentration of 25 μ g/mL. Twofold serial dilutions of antibiotics ranging from 512 to 1 μ g/mL were added, and the microtiter plates were then interpreted, after inoculum addition and incubation, in the same manner as for MIC determinations. The activity of reserpine at a concentration of 20 μ g/mL was also tested as an efflux pump inhibitor (positive control). All samples were tested in duplicate.

Supporting information

The structures of test compounds, susceptibility assays of compounds 6, 14, and 23 against *E. coli*, and the modulation assay of tetracycline, kanamycin, and chloramphenicol with compounds 6, 14, and 23 against *E. coli*, *S. typhi*, and *S. flexneri* are available as Supporting Information.

Acknowledgements

This research was partially supported by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (101380-Q) and Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN217310). We thank Dr. Mabel Fragoso-Serrano (Facultad de Química, UNAM) for assistance during the purification of the test compounds.

Conflict of Interest

The authors state that there is no conflict of interests.

References

- Pereda-Miranda R, Bah M. Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. *Curr Top Med Chem* 2003; 3: 111–131
- Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J. Resin glycosides from the morning glory family. In: Kinghorn A, Falk H, Kobayashi J, editors. *Progress in the chemistry of organic natural products*, Vol. 92. Wien: Springer Verlag; 2010: 77–153
- Castelli MV, Cortés JCG, Escalante AM, Bah M, Pereda-Miranda R, Ribas JC, Zacchino SA. *In vitro* inhibition of 1,3- β -glucan synthase by glycolipids from convolvulaceous species. *Planta Med* 2002; 68: 739–742
- Pereda-Miranda R, Kaatz G, Gibbons S. Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *J Nat Prod* 2006; 69: 406–409
- Chérigo L, Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Jacobo-Herrera N, Kaatz G, Gibbons S. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J Nat Prod* 2008; 71: 1037–1045
- Savjani J, Gajjar A, Savjani K. Mechanisms of resistance: useful tool to design antibacterial agents for drug-resistant bacteria. *Mini Rev Med Chem* 2009; 9: 194–205
- Lomovskaya O, Zgurskaya H, Bostian K, Lewis K. Multidrug efflux pumps: structure, mechanism, and inhibition. In: Wax R, Lewis K, Salyers A, Taber H, editors. *Bacterial resistance to antimicrobials*, 2nd edn. Boca Raton: CRC Press; 2007: 45–182
- Kieboom J, de Bont J. Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology* 2001; 147: 43–51
- Nikaido H, Pagès M. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, advance online publication July 29, 2011; DOI: 10.1111/j.1574-6976.2011.00290.x
- Chérigo L, Pereda-Miranda R, Gibbons S. Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomoea murucoides*. *Phytochemistry* 2009; 70: 222–227
- Escobedo-Martínez C, Cruz-Morales S, Fragoso-Serrano M, Mukhlesur M, Gibbons S, Pereda-Miranda R. Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry* 2010; 71: 1796–1801
- Stavri M, Piddock L, Gibbons S. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J Antimicrob Chemother* 2007; 59: 1247–1260
- Zgurskaya H. Multicomponent drug efflux complexes: architecture and mechanism of assembly. *Future Microbiol* 2009; 4: 912–932
- Bah M, Chérigo L, Cardoso Taketa A, Fragoso-Serrano M, Hammond G, Pereda-Miranda R. Intrapilosins I–VII, pentasaccharides from the seeds of *Ipomoea intrapilosa*. *J Nat Prod* 2007; 70: 1153–1157
- Chérigo L, Pereda-Miranda R. Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J Nat Prod* 2006; 69: 595–599

- 16 *Pereda-Miranda R, Hernández-Carlos B.* HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* 2002; 58: 3145–3154
- 17 *Pereda-Miranda R, Escalante-Sánchez E, Escobedo-Martínez C.* Characterization of lipophilic pentasaccharides from beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae*). *J Nat Prod* 2005; 68: 226–230
- 18 *Escobedo-Martínez E, Pereda-Miranda R.* Resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *J Nat Prod* 2007; 70: 974–978
- 19 *Bah M, Pereda-Miranda R.* Detailed FAB-Mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A–E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* 1996; 52: 13063–13080
- 20 *Bah M, Pereda-Miranda R.* Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* 1997; 53: 9007–9022

received August 24, 2011
revised September 19, 2011
accepted September 21, 2011

Bibliography

DOI <http://dx.doi.org/10.1055/s-0031-1280292>
Published online October 14, 2011
Planta Med 2012; 78: 128–131
© Georg Thieme Verlag KG Stuttgart · New York ·
ISSN 0032-0943

Correspondence

Dr. Rogelio Pereda-Miranda
Departamento de Farmacia, Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México
Ciudad Universitaria
Mexico City 04510 DF
Mexico
Phone: + 5255 5622 52 88
Fax: + 5255 5622 53 29
pereda@unam.mx

This is a copy of the author's personal reprint

This is a copy of the author's personal reprint

6. Publicación 2

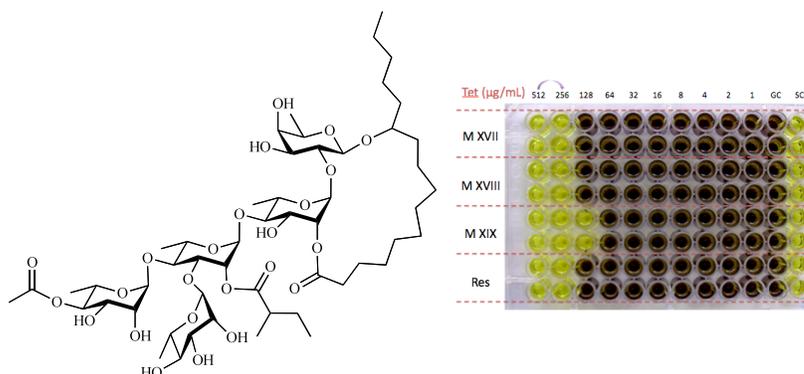
Glicolípidos de *Ipomoea murucoides* como moduladores de la actividad antibiótica.

Berenice Corona-Castañeda, Lilia Chérigo y Rogelio Pereda-Miranda.

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 DF, México.

Manuscrito realizado de acuerdo a las especificaciones de *Phytochemistry*.

Las murucoidinas XVII – XIX ejercen un efecto de potenciación de la norfloxacina y la tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol contra cepas multifármaco resistentes MDR Gram positivo y negativo, respectivamente.



Resumen

Un reinvestigación del extracto clorofórmico de las flores de la especie medicinal *Ipomoea murucoides* permitió el aislamiento y la purificación, mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC), de tres glicolípidos novedosos denominados murucoidinas XVII a XIX (1-3). La caracterización estructural de estos pentasacáridos se realizó por técnicas espectroscópicas y espectrométricas. Se identificaron a los núcleos oligosacáridos constitutivos como los ácidos operculínico A y simónico B; los grupos acilantes correspondieron a los ácidos acético, (2*S*)-

metilbutírico, (*E*)-cinámico y *n*-octanóico; los sitios de esterificación se establecieron en las posiciones C-2 de la segunda unidad de ramnosa (ram') y en C-3 y C-4 de la tercera unidad de ramnosa (ram''); y el sitio de la lactonización de la aglicona se situó en C-2 o C-3 de la primera unidad de ramnosa (ram). Se evaluó la actividad citotóxica frente a líneas de carcinoma epidermoide oral humano (KB), carcinoma laringeo (Hep-2) y carcinoma cervical (Hela), en tanto que la actividad antibacteriana y la modulación antibiótica frente a cepas multifármaco resistentes de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* Rosetta gami, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*. Los glicolípidos ensayados resultaron inactivos como agentes citotóxicos ($CI_{50} > 6 \mu\text{g/mL}$) y antimicrobianos ($MIC > 128 \mu\text{g/mL}$). Sin embargo, en ensayos de modulación, estos aumentaron la potencia de los antibióticos norfloxacin, tetraciclina y cloramfenicol a concentraciones de $25 \mu\text{g/mL}$, mostrando un efecto potenciador de hasta 16 veces y que es similar a la reserpina, un inhibidor natural de las bombas de extrusión.

Palabras clave

Ipomoea murucoides, Convolvulaceae, glicolípidos, multifármaco resistencia, cepas Gram positivo y negativo, norfloxacin, tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol.

1. Introducción

La aparición y proliferación de cepas multifármaco resistentes (MDR) de *Staphylococcus aureus* y, específicamente, resistentes a la metilina (MRSA), constituye un desafío epidemiológico tanto en el entorno hospitalario como urbano, ya que pocos agentes antibióticos son eficaces en el tratamiento de infecciones causadas por estos microorganismos. De hecho, el MRSA es resistente a prácticamente todos los tipos de antibióticos β -lactámicos, la vancomicina, la oxazolidinona y los antibióticos de tipo estreptogramina [51-56].

El tratamiento de las infecciones refractarias originadas por cepas MDR consiste, en primera instancia, en la comprensión de los mecanismos que generan dicha resistencia y a partir de este

conocimiento, diseñar nuevos fármacos que no sean susceptibles a estos mecanismos, o bien, investigar o desarrollar inhibidores eficientes y específicos de los mismos [78, 79].

La búsqueda creciente de agentes antibacterianos de origen vegetal tiene como antecedente el uso de especies vegetales medicinales en forma de remedios herbolarios y productos fitofarmacéuticos, así como reportes de la actividad antibacteriana de ciertos productos naturales [79].

En nuestro grupo de investigación, se ha desarrollado un proyecto que consiste en la búsqueda de resinas glicosídicas de las convolvuláceas con potencial modulador de la actividad antibiótica al inhibir las bombas de extrusión presentes en cepas de *S. aureus* MDR. En estudios previos, se determinó el potencial modulador antibiótico de las series de las tricolorinas, las escamoninas, las orizabinas [8], las murucoidinas [6, 7, 18] y las pescapreínas [9, 34, 42] sobre cepas Gram positivo de *S. aureus*, como la cepa hospitalaria resistente a meticilina y que contiene el gen *mecA* (EMRSA-15), la cepa resistente a meticilina y que posee la bomba de extrusión TetK (XU-212), y la cepa multifármaco resistente que sobreexpresa la proteína de extrusión NorA (SA-1199B). Los glicolípidos evaluados que fueron microbiológicamente inactivos ejercieron un efecto de potenciación de la norfloxacin contra la cepa de *S. aureus* SA-1199B mediante el aumento de su actividad antibiótica y generando una disminución en el valor de la concentración mínima inhibitoria de cuatro veces (32 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) al ser adicionados en concentraciones de 5-25 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Por ejemplo, las orizabinas IX y XIX que no mostraron actividad antibacteriana frente a la cepa SA-1199B a la concentración ensayada ($\text{MIC} > 256 \mu\text{g}/\text{mL}$), pero a las concentraciones subinhibitorias de 1 y 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ redujeron dieciséis (32 a 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cuatro veces (32 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) el valor de la concentración mínima inhibitoria de la norfloxacin, respectivamente [8].

También, se ha demostrado que estos metabolitos son sustratos para las bombas de extrusión de múltiples fármacos, incluyendo a la NorA de *S. aureus* en experimentos de inhibición del transporte extracelular de bromuro de etidio, un agente citotóxico y sustrato para varias de estas proteínas transmembranales que emite fluorescencia. La intensidad de la fluorescencia se relaciona con su salida de las células bacterianas y se puede utilizar para evaluar los compuestos que inhiben los

procesos de extrusión [53, 58, 78, 80]. Por lo tanto, en estos ensayos de inhibición de transporte, la fluorescencia de las células inicialmente saturadas con el agente fluoróforo se ve disminuida por la presencia de un inhibidor [53]. Se determinó que a concentraciones de 5 μM , las orizabinas IX y XV [8] son inhibidores más potentes y eficaces de las bombas de extrusión que la reserpina, alcaloide utilizado como control positivo [53, 58, 78, 80].

Estos hallazgos constituyen el punto de partida para el planteamiento conceptual y el establecimiento de los lineamientos que orientan la presente investigación dirigida a la evaluación de los oligosacáridos biodinámicos de especies selectas de las convolvuláceas como agentes inhibidores de las bombas de extrusión y moduladores de la actividad antibiótica en cepas MDR Gram positivo y negativo, capaces de revertir la MDR desarrollada por cepas hospitalarias, aumentando la potencia y la eficacia de antibióticos cuyo uso se ha descontinuado. El empleo en terapias de combinación de estos productos con baja o nula citotoxicidad facilitará la reintroducción al uso clínico de agentes que han perdido su eficacia como los antibióticos meticilina [51], vancomicina [55] y linezolidina [56].

2. Resultados y discusión

La reinvestigación cromatográfica del extracto clorofórmico de las flores de *I. muruoides* Roemer & Schuites, permitió la obtención de tres pentasacáridos novedosos, así como de las muruoidinas III y V [7]. Las estructuras de las muruoidinas XVII-XIX (**1-3**) fueron establecidas por técnicas espectroscópicas unidimensionales (RMN ^1H y ^{13}C) (**Cuadros 1 y 2**) y bidimensionales (RMN: COSY, TOCSY, HMBC y HSQC), así como por técnicas espectrométricas (EM-FAB modalidad negativa). Los compuestos **1 a 3** (**Figuras 1 y 2**) se identificaron como macrolactonas de los ácidos glicosídicos conocidos como ácidos operculínico A y simónico B.

Cuadro 1. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H de las murucoidinas XVII–XIX (1–3).^a

Proton^b	1	2	3	
Fuc	1	4.82 d (7.5)	4.80 d (8.0)	4.73 d (7.5)
	2	4.50 dd (7.5, 9.5)	4.51 dd (8.0, 9.5)	4.16 dd (7.5, 9.5)
	3	4.20 dd (9.5, 2.5)	4.16 dd (9.5, 3.0)	4.07 dd (9.5, 4.0)
	4	3.90*	3.91 sa	3.99 d (3.5, 1.0)
	5	3.81 dq (1.0, 6.5)	3.81 dq (1.0, 6.5)	3.78 dq (1.0, 6.5)
	6	1.52 d (6.5)	1.52 d (6.5)	1.51 d (6.0)
Ram	1	6.32 d (1.0)	6.32 d (1.5)	5.48 d (1.5)
	2	5.20 dd (1.0, 2.5)	5.29 dd (1.5, 3.0)	5.95 dd (2.0, 3.5)
	3	5.66 dd (3.0, 10.0)	5.59 dd (3.0, 9.5)	5.02 dd (3.0, 9.5)
	4	4.67 t (9.5)	4.62 t (9.5)	4.23 sa
	5	4.99 dq (9.5, 6.0)	4.99 dd (9.5, 6.0)	4.43 dq (9.5, 6.0)
	6	1.59 d (6.0)	1.57 d (6.0)	1.62 d (6.0)
Ram'	1	5.57 d (1.5)	5.64 d (1.5)	6.12 d (2.0)
	2	6.03 dd (1.5, 3.5)	5.81 dd (1.5, 3.0)	5.97 dd (2.0, 3.0)
	3	4.63 dd (3.5, 9.0)	4.49 dd (3.0, 9.5)	4.61 dd (3.0, 9.5)
	4	4.26 t (9.5)	4.21 dd (9.5, 9.5)	4.26 dd (9.5, 9.5)
	5	4.39 dq (9.5, 6.0)	4.31 dq (9.5, 6.5)	4.35 dq (9.5, 6.0)
	6	1.62 d (6.0)	1.59 d (6.5)	1.65 d (6.5)
Ram''	1	6.20 d (1.5)	5.89 sa	5.89 d (1.5)
	2	5.14 dd (1.5, 3.0)	4.64 dd (1.5, 3.5)	4.72 dd (1.5, 3.0)
	3	5.88 dd (3.0, 9.5)	4.41 sa	4.49 dd (3.0, 9.5)
	4	6.02 t (9.5)	5.76 t (9.5)	5.81 t (9.5)
	5	4.45 dq (9.5, 6.5)	4.33 dq (9.5, 6.0)	4.33 dq (9.5, 6.5)
	6	1.43 d (6.5)	1.39 d (6.0)	1.38 d (6.5)
Ram'''	1		5.55 d (1.5)	5.64 d (1.5)
	2		4.76 sa	4.85 dd (1.5, 2.5)
	3		4.38 dd (3.5, 9.5)	4.40 dd (2.5, 9.0)
	4		4.25 dd (9.5, 9.5)	4.27 dd (8.0, 9.0)
	5		4.28 dq (9.5, 6.5)	4.25 dq (9.5, 4.5)
	6		1.69 d (6.5)	1.56 d (5.5)
Glu	1	5.09 d (7.5)		
	2	3.87 dd (7.5, 8.8)		
	3	4.12 dd (8.5, 9.0)		
	4	4.14 dd (8.5, 9.0)		
	5	3.84 ddd (2.5, 5.5, 8.0)		
	6a	4.35 dd (11.0, 5.0)		
	6b	4.46 dd (12.5, 3.0)		
Jal	2a	2.26 ddd (2.8, 7.0, 15.0)	2.24 ddd (2.5, 6.5, 15.0)	2.23 ddd (3.5, 9.0, 12.5)
	2b	2.58 dd (2.8, 15.0)	2.92 ddd (2.5, 6.5, 15.0)	2.40 ddd (3.5, 9.0, 12.5)
	11	3.90*	3.87 m	3.86 m
	16	0.96 t (7.0)	0.84 t (7.0)	0.88 t (7.0)

Mba	2	2.45 tq (7.0, 7.0)	2.50 tq (7.0)	2.37 tq (6.5, 7.0)
	2-Me	1.13 d (7.0)	1.20 d (7.0)	1.07 d (7.0)
	3-Me	0.84 t (7.5)	0.94 t (7.5)	0.84 t (7.5)
Mba'	2	2.45 tq (7.0, 7.0)		
	2-Me	1.11 d (7.0)		
	3-Me	0.81 t (7.5)		
Cna	2	6.56 d (16.0)		
	3	7.84 d (16.0)		
	2'	7.32 m		
	3'	7.44 m		
	4'	7.32 m		
Ac	2			2.05 s
Octa	2		2.34 t (7.0)	
	8		0.95 t (7.0)	

^aDatos registrados a 500 MHz en C₅D₅N. * Señales sobrepuestas. Entre paréntesis las constantes de acoplamiento en Hz. sa = singulete ancho, d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dq = doblete cuarteteado. ^bAbreviaturas: Fuc = fucosa; Ram = ramnosa; Glu = glucosa; Jal = ácido 11-hidroxihexadecanoico; mba = ácido 2-metilbutanóico; cna = ácido cinámico; ac = ácido acético; octa = ácido octanóico.

La murucoidina XVII (1) fue identificada como el éster intramolecular 1,3'' de *O*-β-D-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[4-*O*-(2*S*)-2-metilbutanoil,3-*O*-cinamoil]-α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico. En el espectro de RMN ¹H se observaron los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los cinco protones anoméricos (4.82 ppm, 7.5 Hz; 6.32 ppm, 1.0 Hz; 5.57 ppm, 1.5 Hz; 6.20 ppm, 1.5 Hz; 5.09 ppm, 7.5 Hz). Adicionalmente, se observaron señales características que identificaron los residuos de ácido que esterifican el núcleo oligosacárido y que correspondieron a los ácido (2*S*)-metilbutanóico (mba) (triplete cuarteteado en 2.45 ppm para el próton H-2) y ácido cinámico (cna) (dos dobletes en 6.56 y 7.84 ppm y dos multipletes en 7.32 y 7.44 ppm). En tanto que en el espectro de RMN ¹³C, se obtuvo información sobre: los cinco carbonos anoméricos entre 99.2 y 105.1 ppm; el carbono del grupo hidroximetileno no sustituido de una hexosa en 62.5 ppm; y cuatro señales entre 166.1 y 176.1 ppm que corresponden a los carbonos de los grupos carbonilo de los ácidos que se encuentran acilando la porción glicosídica; y al carbonilo de la lactona macrocíclica de la aglicona. La asignación de las señales de RMN ¹H y ¹³C se realizó empleando los experimentos bidimensionales de RMN: HSQC, COSY, TOCSY y HMBC, experimentos que permitieron determinar inequívocamente la secuencia de glicosidación y los sitios de esterificación al determinar el acoplamiento ³J_{H-C} [49].

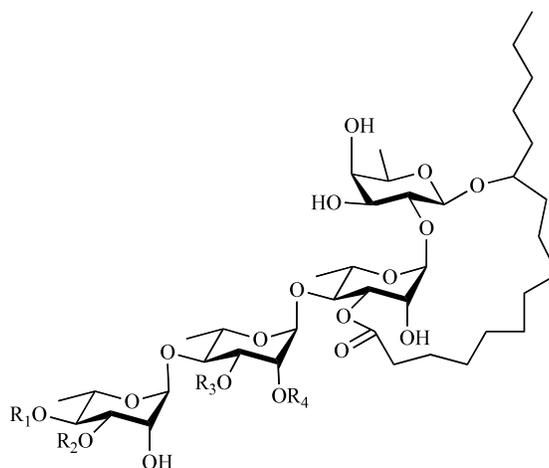
Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C de las murucoidinas XVII–XIX (1–3).

Carbono^b	1	2	3	
Fuc	1	101.5	101.6	104.3
	2	73.6	73.4	80.3
	3	76.5	76.6	73.3
	4	73.6	73.5	73.1
	5	71.2	71.2	70.8
	6	17.2	17.2	17.4
Rha	1	100.0	100.2	98.8
	2	70.0	69.7	73.9
	3	78.0	77.8	69.9
	4	76.0	77.9	79.9
	5	68.0	67.9	68.6
	6	19.2	19.2	19.5
Rha'	1	99.2	99.2	99.2
	2	72.3	73.0	73.0
	3	80.1	80.2	79.6
	4	79.1	79.2	80.0
	5	68.1	68.3	68.1
	6	18.8	18.7	18.8
Rha''	1	103.4	103.6	103.7
	2	69.9	72.6	72.9
	3	72.8	70.2	70.2
	4	71.7	74.8	75.3
	5	68.2	68.1	68.5
	6	17.9	17.9	17.8
Rha'''	1		104.3	104.9
	2		72.5	72.5
	3		72.6	72.6
	4		73.7	73.5
	5		70.8	70.5
	6		18.8	18.6
Glc	1	105.1		
	2	75.2		
	3	78.2		
	4	70.8		
	5	77.7		
	6	62.5		
Jal	1	174.4	174.9	173.1
	2a	34.5	33.7	34.3
	11	79.5	79.3	82.3
	16	14.5	14.4	14.3
Mba	1	175.9	176.3	
	2	41.3	41.6	
	2-Me	16.9	17.0	
	3-Me	11.8	11.8	

Mba'	1	176.1
	2	41.5
	2-Me	16.7
	3-Me	11.6
Cna	1	166.1
	2	118.6
	3	145.2
	1'	134.7
	2'	129.2
	3'	128.5
Ac	4'	130.7
	1	170.6
Octa	2	
	8	

^aDatos registrados a 125 MHz en C₅D₅N. ^bAbreviaturas: Fuc = fucosa; Ram = ramnosa; Glu = glucosa; Jal = ácido 11- hidroxihexadecanoico; mba = ácido 2-metilbutanóico; cna = ácido cinámico; ac = ácido acético; octa = ácido octanóico.

En tanto que la murucoidina XVIII (**2**), se identificó como el éster intramolecular 1,2'' de *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[[4-*O*-(2*S*)-2-metilbutanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-*O*-octanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranósido del ácido (1*S*)-hidroxihexadecanóico). Las señales características observadas en el espectro de RMN ¹H corresponden a los protones anoméricos: 4.80 ppm, 8.0 Hz; 6.32 ppm, 1.5 Hz; 5.64 ppm, 1.5 Hz; 5.89 ppm, 1.0 Hz; 5.55 ppm, 1.5 Hz; y a los ácidos: 2-metilbutanóico (triplete cuarteteado en 2.50 ppm para el próton H-2) y octanóico (octa) (dos tripletes en 2.34 y 0.95 ppm). Del espectro de RMN ¹³C, se obtuvo información sobre los cinco carbonos anoméricos entre 99.2 y 104.3 ppm, y tres señales entre 172.9 y 176.3 ppm que corresponden a los carbonos de los grupos carbonilo de los ácidos que se encuentran acilando la porción glicosídica y al carbonilo de la lactona macrocíclica de la aglicona. La asignación de las señales de RMN ¹H y ¹³C se realizó empleando los experimentos bidimensionales de RMN.



Murucoidina	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
XVII	mba	cna	glu	mba
XVIII	mba	H	ram	octa

Figura 1. Estructura química de las murucoidinas XVII y XVIII (1 y 2).

Y, por último, la murucoidina XIX (3), se caracterizó como el éster intramolecular 1,2'' de *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[[4-*O*-acetil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-*O*-(2*S*)-2-metilbutanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico). Las señales características observadas en el espectro de RMN ¹H corresponden a los protones anoméricos: 4.73 ppm, 7.6 Hz; 5.48 ppm, 1.5 Hz; 6.12 ppm, 2.0 Hz; 5.89 ppm, 1.5 Hz; 5.64 ppm, 1.5 Hz; y a los ácidos: 2-metilbutanóico (triplete cuarteteado en 2.37 ppm para el próton H-2) y acético (singulete en 2.05 ppm). Del espectro de RMN ¹³C, se obtuvo información sobre los cinco carbonos anoméricos entre 98.8 y 104.9 ppm, y tres señales entre 170.6 y 175.5 ppm que corresponden a los carbonos de los grupos carbonilo de los ácidos que se encuentran acilando la porción glicosídica y al carbonilo de la lactona macrocíclica de la aglicona.

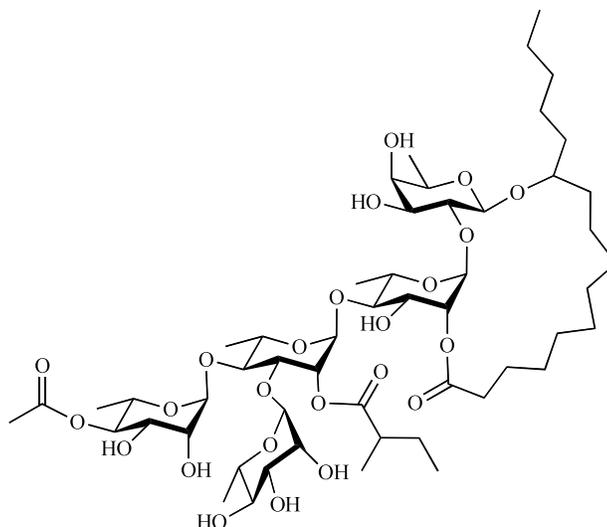


Figura 2. Estructura química de la murucoidina XIX (3).

La espectrometría de masas FAB negativo fue particularmente útil para determinar las fórmulas y pesos moleculares de los compuestos **1** a **3**. El espectro de masas del compuesto **1** mostró un ion pseudomolecular $[M - H]^-$ en m/z 1297 ($C_{65}H_{101}O_{26}$); el compuesto **2**, $[M - H]^-$ de m/z 1193 ($C_{59}H_{102}O_{24}$) y m/z 1109 ($C_{53}H_{89}O_{24}$) para el compuesto **3**. En todos los casos, los iones fragmentos característicos se observaron para el residuo ácido jalapínico (271); la lactona y una unidad de fucosa (417), y lactona, una unidad de fucosa y unidad de ramnosa (545).

Estos glicolípidos no poseen actividad citotóxica frente a líneas celulares de carcinoma ($CI_{50} > 4$ $\mu\text{g/mL}$) ni antibacteriano contra las bacterias Gram positivo ($MIC \geq 128$ $\mu\text{g/mL}$) (**Cuadro 3**) o negativo ($MIC \geq 512$ $\mu\text{g/mL}$), sin embargo todos ellos exhiben un fuerte efecto modulador de la actividad de los antibióticos a una concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ (**Cuadro 4**). Los efectos moduladores fueron similares a los mostrados por el control positivo, reserpina. Los compuestos **1** y **2** ejercen un efecto de potenciación, que aumentó la actividad de norfloxacina contra SA-1199B en cuatro veces (32 a 8 $\mu\text{g/mL}$), mientras que la combinación con reserpina disminuye de MIC en ocho veces (32 a 4 $\mu\text{g/mL}$).

Cuadro 3. Susceptibilidad de *S. aureus* a las murucoïdinas XVII-XIX (1-3) y su citotoxicidad.

Compuesto	CI ₅₀ (µg/mL)			MIC (µg/mL)				
	KB ^a	Hep-2	Hela	ATCC 25923	XU-212	EMRSA-15	SA-1199B ^b	
							Nor (-)	Nor (+)
1	15.7	6.1	>20	>128	>128	>128	128	8
2	>20	>20	>20	>128	>128	>128	128	8
3	10.8	>20	19.0	>128	>128	>128	128	16
Vinblastina	0.005	0.006	0.001					
Colchicina	0.002	0.003	0.001					
Norfloxacina								32
Reserpina								4

^aAbreviaturas: KB = carcinoma de epidermoide oral humano; Hep-2 = carcinoma de laringe; Hela = carcinoma de cervix; ATCC 25923 = cepa silvestre de *S. aureus*; EMRSA-15 = cepa hospitalaria de *S. aureus* resistente a meticilina y que contiene el gen *mecA*; XU-212 = cepa de *S. aureus* resistente a meticilina y que posee la bomba de extrusión TetK; SA-1199B = *S. aureus* multifármaco resistente que sobreexpresa la bomba de extrusión NorA.

^bNor (-) = Valor de concentración mínima inhibitoria (MIC) determinado en la prueba de susceptibilidad; Nor (+) = Valor de MIC determinado para norfloxacina en el ensayo de modulación a concentración de 25 µg/mL de los oligosacáridos.

^cValor de MIC determinado para la reserpina en el ensayo de modulación a concentración de 20 µg/mL empleada como control positivo (inhibidor de las bombas de extrusión).

Cuadro 4. Susceptibilidad de *E. coli*, *S. typhi* y *S. flexneri* a las murucoïdinas XVII-XX (1-3).

Compuesto	MIC (µg/mL)											
	<i>Escherichia coli</i> Rosetta gami				<i>Salmonella typhi</i>				<i>Shigella flexneri</i>			
	(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)	(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)	(-)	Tet (+)	Kan (+)	Cam (+)
Antibiótico	128	32	256		1024	1024	512		512	512	256	
1	>512	64	8	128	>512	512	512	256	512	256	128	256
2	>512	64	8	128	>512	512	512	256	512	256	128	256
3	>512	64	8	128	>512	512	512	256	512	128	128	256
Reserpina	>512	64	8	128	>512	512	512	256	>512	256	64	128

Abreviaturas: (-) = (MIC) Valor de la concentración mínima inhibitoria determinado en la prueba de susceptibilidad; Tet (+) = valor de la MIC determinado para tetraciclina; Kan (+) = valor de la MIC determinado para kanamicina; Cam (+) = valor de la MIC determinado para cloramfenicol en el ensayo de modulación en la concentración de 25 µg/mL del oligosacárido evaluado.

En cuanto a los ensayos de modulación antibiótica en cepas Gram negativo MDR, el efecto observado fue similar entre los glicolípidos y la reserpina, al adicionarlos conjuntamente con tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol. En la mayoría de los casos, la reducción en la MIC era doble:

- a) *E. coli* Rosetta gami: tetraciclina (128 a 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloramfenicol (256 a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$),
- b) *S. typhi*: tetraciclina y kanamicina (1024 a 512 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y cloramfenicol (512 a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$),
- c) *S. flexneri*: tetraciclina (512 a 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Las mayores reducciones en los valores de la MIC se determinaron para el compuesto **3** en combinación con tetraciclina contra *S. flexneri* (512 a 128 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y para los tres compuestos de prueba adicionados conjuntamente con kanamicina sobre *E. coli* Rosetta gami (32 a 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

La diferencia entre la modulación de la actividad de los glicolípidos probados contra bacterias Gram positivo y negativo se debe a la complejidad de los mecanismos de MDR presentes en las bacterias gram negativo. En principio, estas cepas poseen una membrana externa gruesa y altamente lipofílica, que les proporciona una barrera de permeabilidad para los compuestos hidrófilos como los antibióticos [4]. Además, la estructura de sus bombas de extrusión son más complejas, éstas incluye un transportador de membrana interno, una proteína de fusión de la membrana periplásmica y un canal de membrana externa [71]. Constituyendo una bomba de extrusión sofisticada como un sistema tripartita, que afecta drásticamente la eficacia de los antibióticos en contra de las cepas MDR y, por lo tanto, limita su uso clínico [10].

3. Conclusiones

Se realizó el aislamiento, la purificación y la caracterización de tres constituyentes individuales de la mezcla de resinas glicosídicas durante la reinvestigación del extracto clorofórmico de *I. murucoides*. Las principales diferencias estructurales entre los compuestos caracterizados se basan en el tipo de unidades sacáridas que constituyen los núcleos oligosacáridos (ácido operculínico A y simónico B), el número y posición de los residuos acilantes (ácido (2*S*)-metilbutanóico, cinámico, octanóico y acético) y el sitio de establecimiento de la macrolactona.

Se realizó la evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica y antibacteriana, así como del potencial modulador de la actividad antibiótica. Estos compuestos no citotóxicos y microbiológicamente inactivos contra *S. aureus*, *E. coli* Rosetta gami, y las cepas patógenas nosocomiales, *S. typhi* y *S. flexneri* ejercieron un efecto de potenciación de la tetraciclina, la kanamicina y el cloramfenicol contra las cepas MDR, ya que permitieron el aumento de la sensibilidad de hasta 16 veces a dichos antibióticos en concentraciones de 25 µg/mL. Por lo tanto, los glicolípidos de *I. muruoides* representan metabolitos que podrían inactivar las bombas de extrusión y revertir mecanismo de resistencia microbiana favoreciendo el aumento en la potencia y eficacia de los antibióticos que actualmente no son eficaces en el tratamiento de infecciones refractarias causadas por cepas MDR.

4. Experimental

4.1. Procedimientos experimentales generales

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y de carbono (^{13}C) se generaron en equipos Varian VXL-500 y Bruker DMX-500, operando a una frecuencia de 500 MHz en ^1H y 125 MHz en ^{13}C . Se utilizó piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 utilizando metanol y cloroformo como disolventes. Los espectros de masas fueron registrados en un aparato modelo JEOL SXIOA, utilizando como método de ionización el bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) en el modo negativo y a la trietanolamina como matriz. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher- Johns y no están corregidos.

La resolución de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas se realizó utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La instrumentación estuvo constituida por una bomba (modelo 600, Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) y un refractómetro diferencial (Waters 410), ambos integrados a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le, Dell y Pentium 4). El control del equipo, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se realizó mediante el software Millennium 2000 (Waters) y Empower 1 (Waters). Una válvula de reciclaje de muestra se adaptó al sistema cromatográfico para la purificación de los compuestos.

4.2. Material vegetal

La muestra analizada consistió en flores de *Ipomoea murucoides*, colectadas en Tepostlán, Morelos, México, el 15 de abril de 2001. El material vegetal fue identificado por el Dr. Robert Bye y uno de los autores (RP-M.) mediante la comparación con una muestra auténtica de la planta (RP-05) archivada en el Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM. Un ejemplar de la muestra (Robert Bye 35906) fue depositada en la Colección Etnobotánica del Herbario Nacional (MEXUE), Instituto de Biología, UNAM [7].

4.3. Aislamiento y purificación de los compuestos 1 a 3

La reinvestigación cromatográfica del extracto clorofórmico de las flores de *I. murucoides* consistió en la reinyección y análisis por HPLC de dos subfracciones obtenidas en un estudio previo [7]. Para la resolución de los componentes individuales, se empleó una columna Symmetry C₁₈ (Waters, 7 µm, 19 x 300 mm), una elución isocrática de CH₃CN-H₂O (95:5) con un flujo de 9 mL/min, y empleando un detector de índice de refracción. El pico con valor de t_R de 9.2 min (60 mg) de la subfracción 18, correspondiente a los compuestos **1** y **2**; y el pico con valor de t_R de 16.5 min (20 mg) de la subfracción 23, correspondiente al compuesto **3**; fueron colectados independientemente y posteriormente, reinyectados para ser purificados por la técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra por 15 ciclos consecutivos para conseguir la homogeneidad de la muestra.

4.4. Caracterización estructural

4.4.1. Murucoidina XVII (**1**)

Sólido blanco; p.f. 133-135 °C; [α]_D -98 (c 0.2, MeOH); EM-FAB (modo negativo) m/z 1297 [M - H]⁻ (C₆₅H₁₀₁O₂₆), 1167 [1297 - 130 (C₉H₆O, cna)]⁻, 1083 [1167 - 84 (C₅H₈O, mba)]⁻, 937 [1083 - 146(C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 545 [937 - 162 (C₆H₁₀O₅, desoxihexosa) - 146(C₆H₁₀O₄,

metilpentosa) – 84 (C₅H₈O, mba)⁻, 417 [545 + 18 (hidrólisis de la lactona) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 271 [417 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa); ácido jalapínico – H]⁻; HRFABMS *m/z* 1297.6576 [M – H]⁻ (calculado para C₆₅H₁₀₁O₂₆ 1297.6581).

4.4.2. *Murucoïdina XVIII (2)*

Sólido blanco; p.f. 123-126 °C; [α]_D -88 (*c* 0.2, MeOH); EM-FAB (modo negativo) *m/z* 1193 [M – H]⁻ (C₅₉H₁₀₁O₂₄), 1067 [1193 – 126 (C₈H₁₄O, octa)]⁻, 963 [1193 – 84 (C₅H₈O, mba) – 146(C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 837 [963 – 126 (C₈H₁₄O, octa)]⁻, 545 [837 – 146(C₆H₁₀O₄, metilpentosa) – 146(C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 417 [545 + 18 (hidrólisis de la lactona) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 271 [417 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa); ácido jalapínico – H]⁻; HRFABMS *m/z* 1193.6678 [M – H]⁻ (calculado para C₅₉H₁₀₁O₂₄ 1193.6683).

4.4.3. *Murucoïdina XIX (3)*

Sólido blanco; p.f. 150-153 °C; [α]_D -50 (*c* 0.12, MeOH); EM-FAB (modo negativo) *m/z* 1109 [M – H]⁻ (C₅₃H₈₉O₂₄), 1067 [1109 – 43 (C₂H₃O, ac)]⁻, 921 [1067 – 146(C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 837 [921 – 84 (C₅H₈O, mba)]⁻, 545 [837 – 146(C₆H₁₀O₄, metilpentosa) – 146(C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 417 [545 + 18 (hidrólisis de la lactona) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 271 [417 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa); ácido jalapínico – H]⁻; HRFABMS *m/z* 1109.5738 [M – H]⁻ (calculado para C₅₃H₈₉O₂₄ 1109.5744).

4.5. Ensayos biológicos

4.5.1. Cepas y medios

Staphylococcus aureus EMRSA-15 que contiene el gen *mecA* fue proporcionada por el Dr. Paul Stapleton, de la Escuela de Farmacia de la Universidad de Londres. La cepa XU-212 (resistente a la meticilina) que posee la proteína de extrusión Tetk para tetraciclina, fue proporcionada por el Dr. E. Udo (Gibbons y Udo, 2000). SA-1199B, que sobreexpresa la proteína de extrusión NorA (Chérigo, et al., 2009), y *S. aureus* ATCC 25923 fueron proporcionadas por el Dr. Gibbons de la escuela de

Farmacia de la Universidad de Londres. Todas las cepas se cultivaron en agar nutritivo (Oxoid, Basingstoke, UK) antes de la determinación de los valores de MIC.

Escherichia coli Rosetta-gami fue proporcionada por el Dr. Federico del Río Portilla, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química de la UNAM, y se cultivó en agar Luria Bertani (Sigma) antes de la determinación de los valores de MIC. Se utilizó caldo Luria Bertani (LB) para las pruebas de susceptibilidad. Las cepas hospitalarias de *Shigella flexneri* y *Salmonella typhi* fueron proporcionadas por el Dr. Fernando Calzada Bermejo, Unidad de Investigación Médica en Farmacología y Productos Naturales, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social, y se cultivaron en agar Mueller-Hinton (Sigma) antes de la determinación de los valores de MIC. Se utilizó caldo Mueller-Hinton (MH) para las pruebas de susceptibilidad.

4.5.2. Compuestos

Tetraciclina (pureza > 98%), kanamicina (pureza > 99%), cloramfenicol (pureza > 98%), y reserpina (pureza > 98%) se adquirieron en Sigma.

4.5.3. Ensayo de actividad antibacteriana y modulación antibiótica

Los valores de las MIC se determinaron por duplicado mediante procedimientos de microdilución estándar. Se ajustó la densidad de inóculo con solución salina al 0.9% a $1,5 \times 10^8$ UFC de cada una de las cepas evaluadas por comparación con un estándar de McFarland. Todos los glicolípidos de prueba se disolvieron en DMSO antes de la dilución en MH o LB para uso en determinaciones de MIC. La mayor concentración de DMSO restante después de la dilución (3,125% v/v) y no causó inhibición del crecimiento bacteriano.

Se utilizó una microplaca con 96 pozos y se adicionaron 125 μ L de LB o MH en las columnas 1 a 12, 125 μ L del glicolípidos de prueba o el antibiótico en la columna 1 y se realizaron diluciones seriadas hasta la columna 10 para obtener concentraciones finales de 512 a 1 μ g/mL. Posteriormente, se adicionaron 125 μ L del inóculo correspondiente. La placa se incubó a 37° C durante 24 h. Los valores de MIC: menor concentración en la cual no se observa crecimiento, se

determinaron al emplear una solución metanólica (5 mg/mL) de bromuro de 3-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolio (MTT, Sigma) para detectar el crecimiento bacteriano mediante el cambio en color amarillo a violeta. Para el ensayo de modulación, todos los glicolípidos se ensayaron a una concentración final de 25 µg/mL. Se empleó reserpina en una concentración de 20 µg/mL como control positivo (inhibidor de la bomba de extrusión).

4.5.4. Ensayo de citotoxicidad

Líneas celulares: adenocarcinoma humano de colon (HCT-15), carcinoma humano de mama (MCF-7), carcinoma epidermoide oral humano (KB) y carcinoma cervical (Hela).

Control positivo: vinblastina y colchicina.

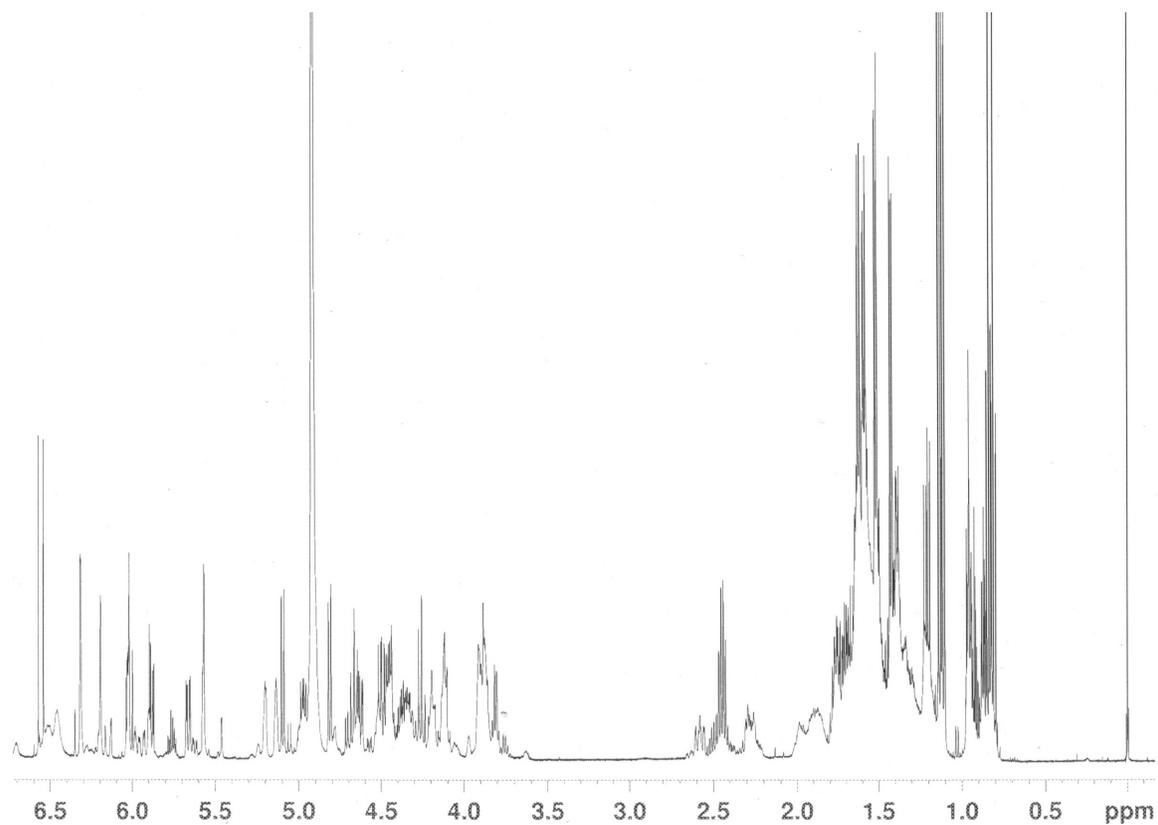
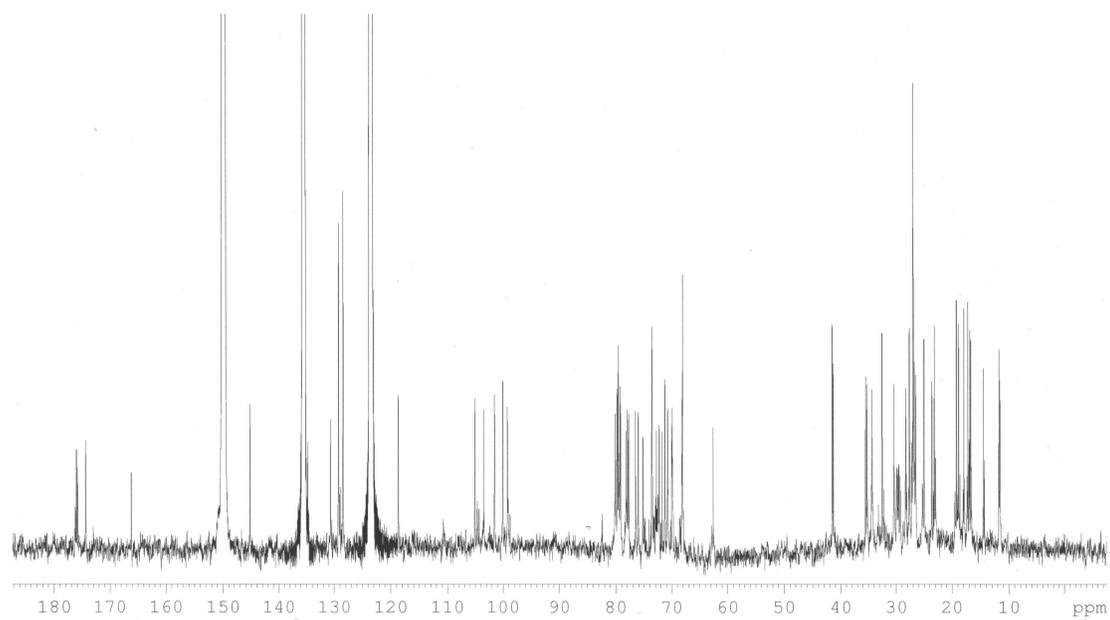
Mantenimiento de las células: medio RMPI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Incubación a 37 °C en una atmósfera al 5% de CO₂ en aire y 100% de humedad.

Las células en fase log de su ciclo de crecimiento se sometieron por triplicado a diferentes concentraciones de los compuestos de prueba (0.16 a 20 µg/mL) y se incubaron durante 72 horas en las condiciones antes mencionadas. Se utilizaron microplacas de 96 pozos con 190 µL de suspensión celular (25,000 cel/mL) y 10 µL de los glicolípidos disueltos en DMSO a diferentes concentraciones (25, 5.0, 1.0 y 0.2 µg/mL). Se determinó la concentración celular mediante la cuantificación de las proteínas totales utilizando el método de tinción con la sulforodamina B [81, 82]. Se determinó la CI₅₀ de cada compuesto de prueba y se consideraron compuestos con actividad citotóxica aquellos cuya CI₅₀ fuese menor o igual a 5 µg/mL.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (101380-Q) y la Dirección General de Asuntos Personal Académico de la UNAM (IN217310).

Información suplementaria de la publicación 2

**Figura 1S.** Espectro de RMN ^1H de la murucoidina XVII.**Figura 2S.** Espectro de RMN ^{13}C de la murucoidina XVII.

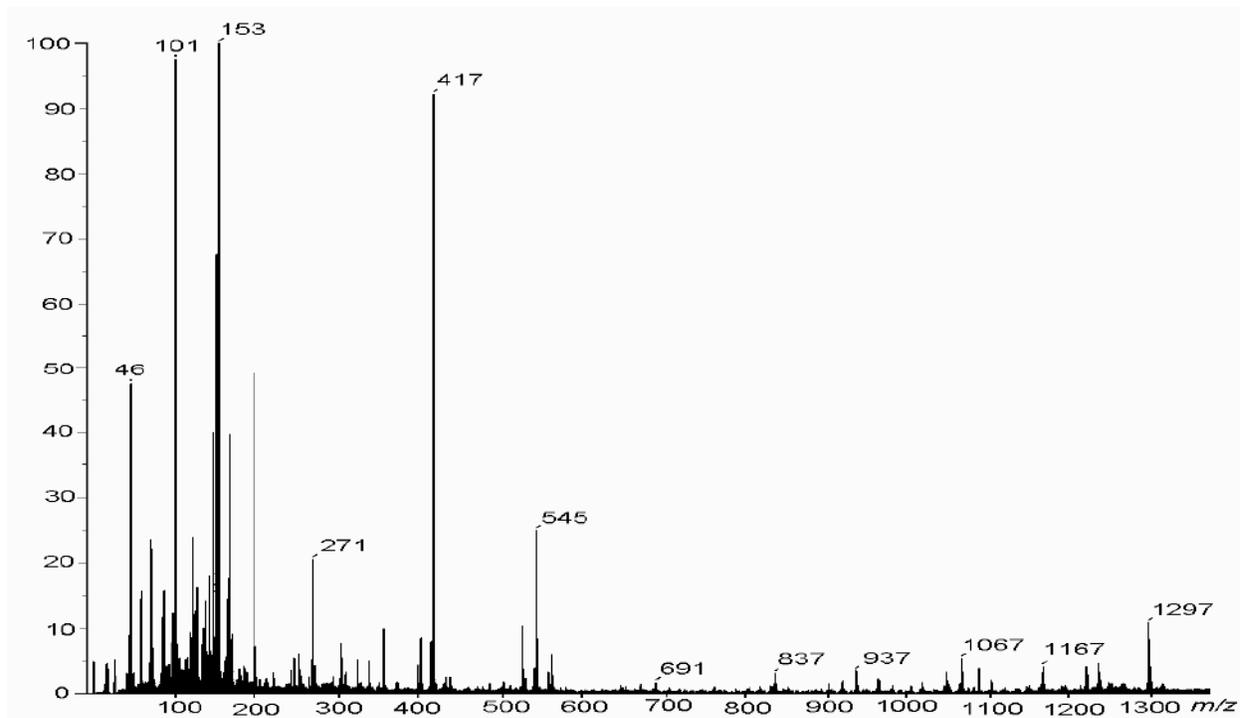


Figura 3S. Espectro de masas modo FAB negativo de la murucoidina XVII.

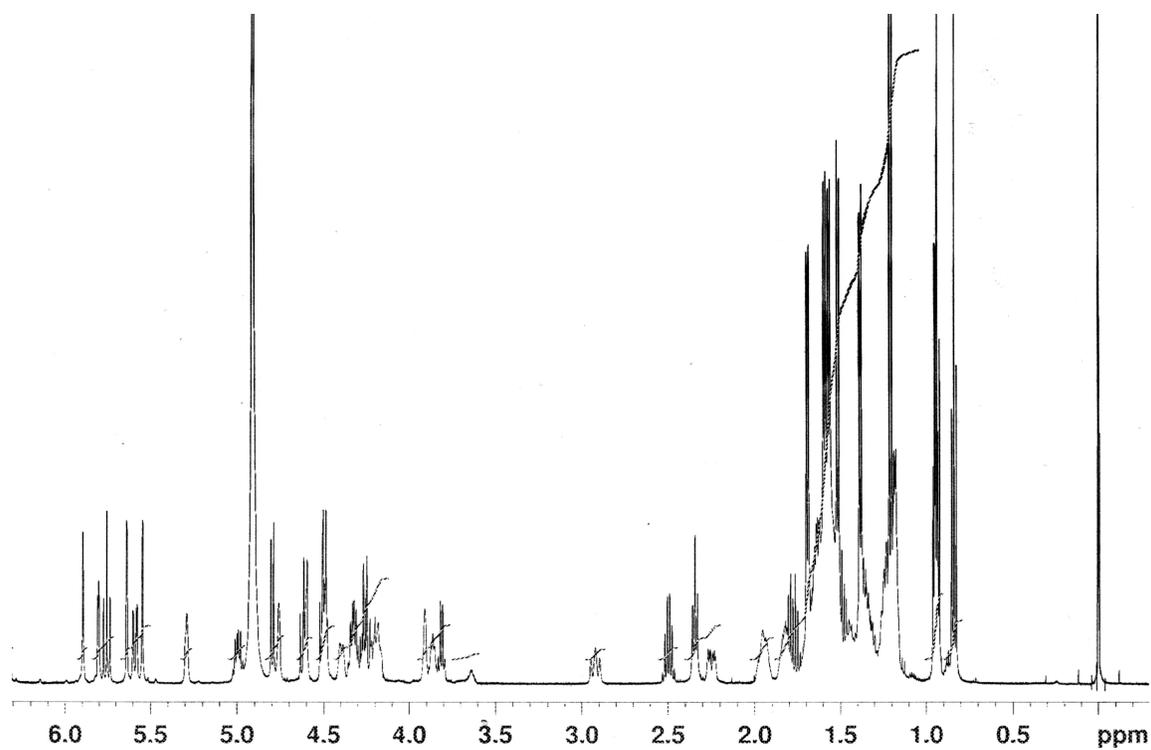


Figura 4S. Espectro de RMN ¹H de la murucoidina XVIII.

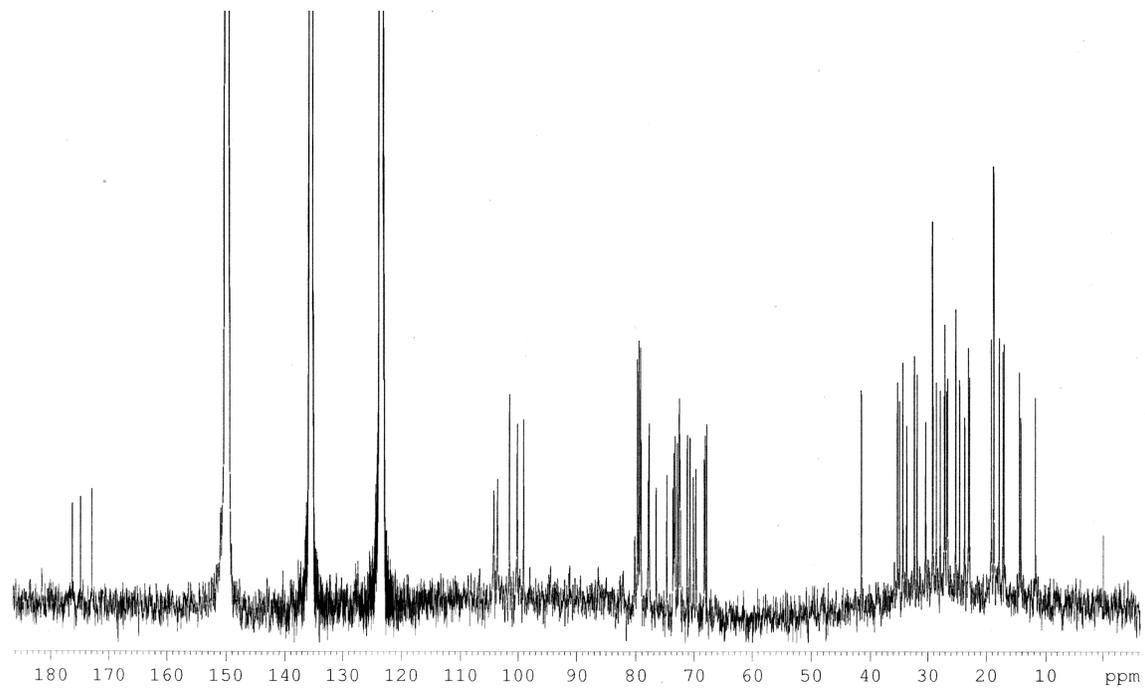


Figura 5S. Espectro de RMN ^{13}C de la murucoidina XVIII.

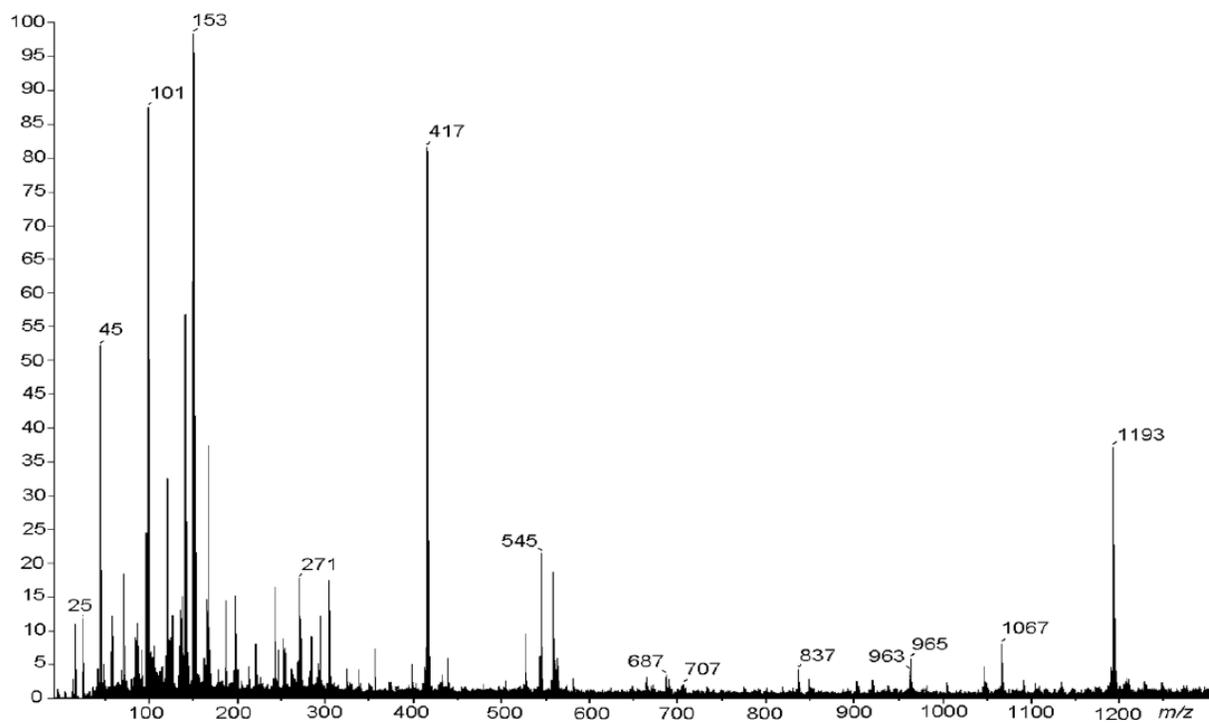


Figura 6S. Espectro de masas modo FAB negativo de la murucoidina XVIII.

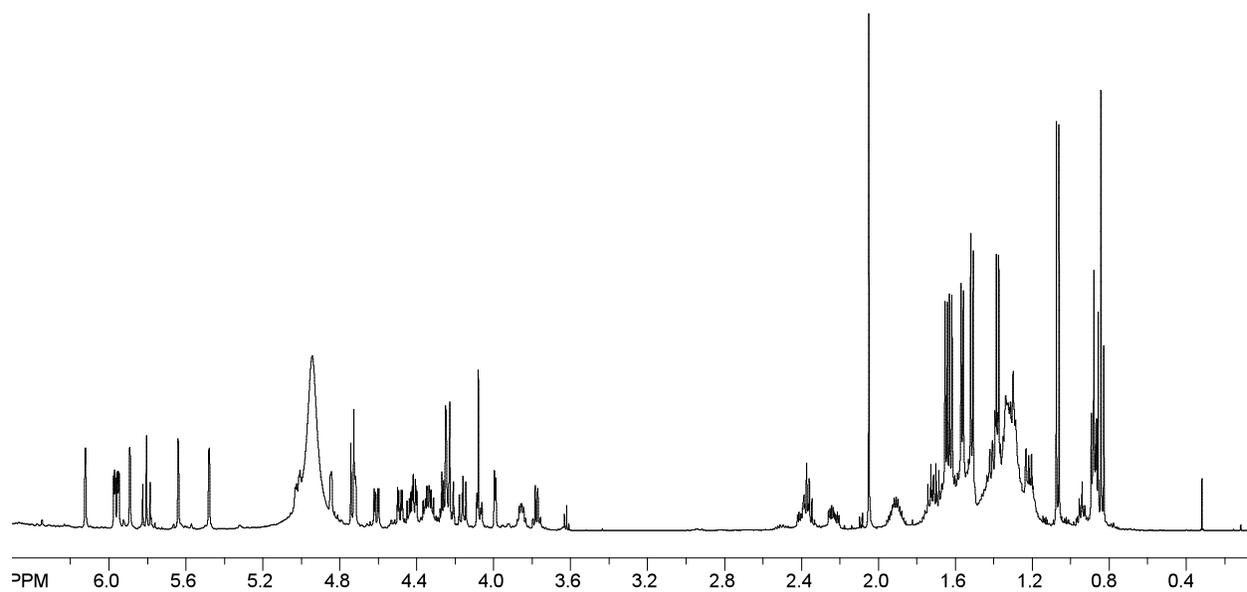


Figura 7S. Espectro de RMN ^1H de la murucoidina XIX.

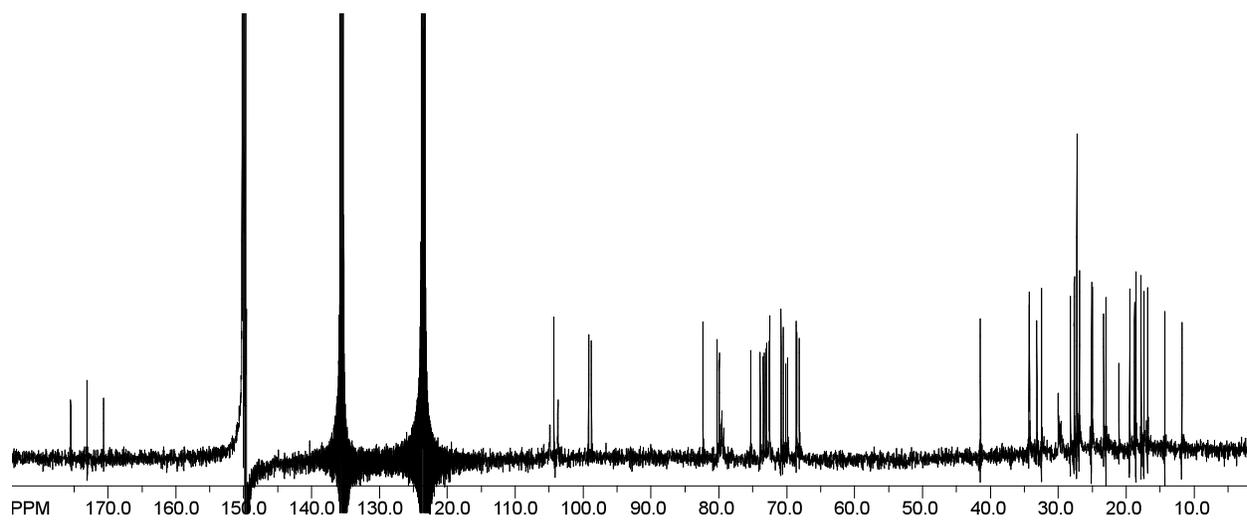


Figura 8S. Espectro de RMN ^{13}C de la murucoidina XIX.

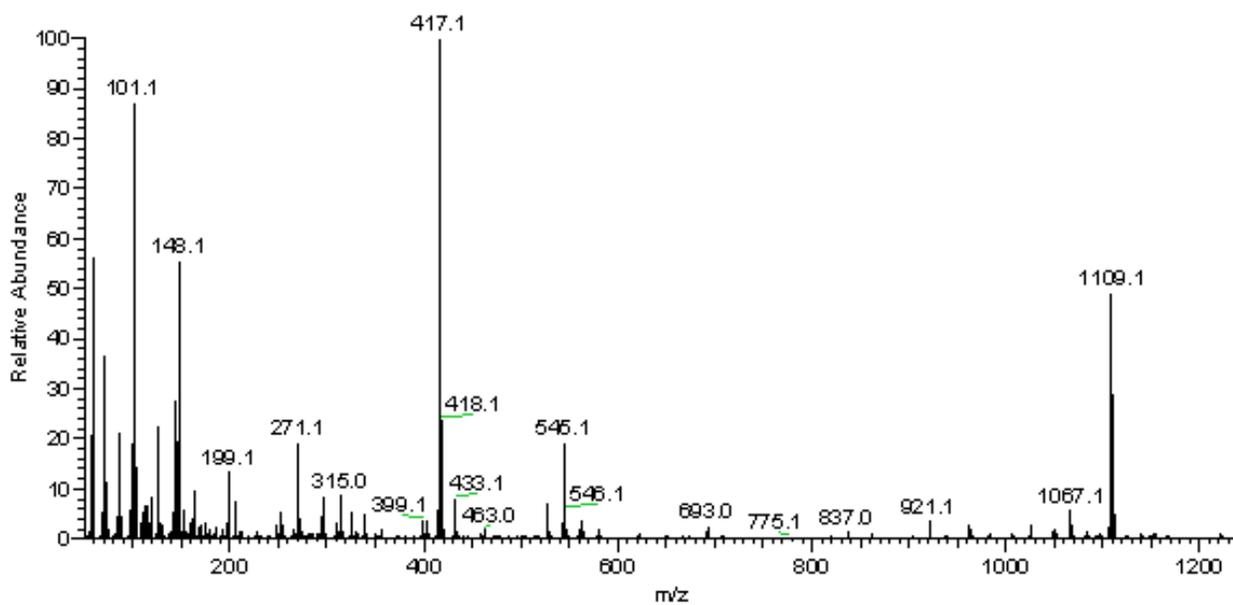


Figura 9S. Espectro de masas modo FAB negativo de la murucoidina XIX.

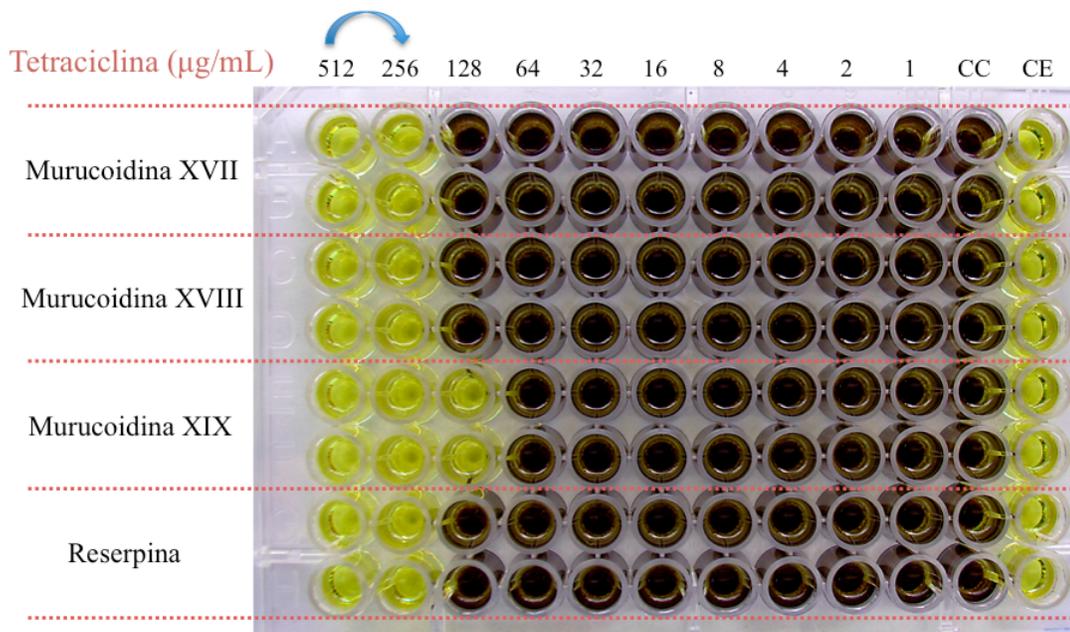


Figura 10S. Ensayo de modulación de tetraciclina con las murucoidinas XVII-XIX (25 µg/mL) y reserpina (20 µg/mL) contra la cepa hospitalaria MDR *Shigella flexneri*.

Abreviaturas: CC, control de crecimiento; CE, control de esterilidad.

7. Publicación 3

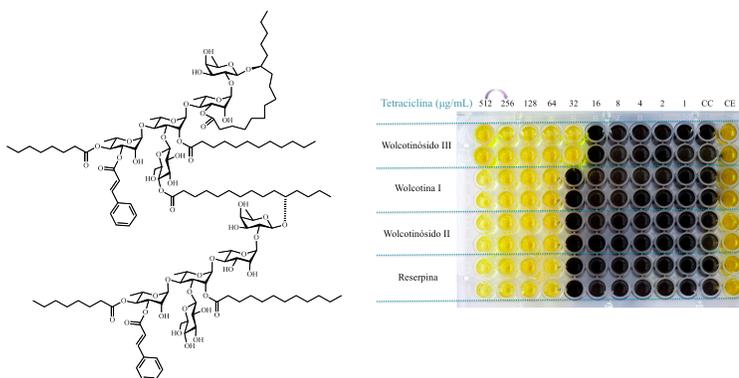
Glicolípidos de *Ipomoea wolcottiana* como moduladores del fenómeno de resistencia cruzada a fármacos.

Berenice Corona-Castañeda y Rogelio Pereda-Miranda.

Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, 04510 DF, México.

Manuscrito realizado de acuerdo a las especificaciones de *Phytochemistry*.

Los glicolípidos purificados de las flores de *Ipomoea wolcottiana* fueron caracterizados espectroscópicamente. Estos metabolitos no citotóxicos ni antibacterianos potencian la actividad antibiótica contra cepas Gram negativo multifármaco resistentes.



Resumen

Como parte del proyecto de investigación dedicado a la identificación de glicolípidos de la familia Convolvulaceae con actividad moduladora de la multifármaco resistencia en cepas Gram negativo, se encontró que los glicolípidos purificados a partir de las flores de *Ipomoea wolcottiana* aumentaron la susceptibilidad antibiótica de *E. coli* Rosetta-gami, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* de forma similar a la reserpina. La purificación por cromatografía de líquidos de alta eficiencia de una de las fracciones que concentró la actividad moduladora permitió la obtención de

los wolcotinosidos I, II y III (**1**, **4** y **5**); la wolcotina I (**3**) y la intrapilosina VII (**2**). Para los compuestos **1-5**, se identificó la acilación del ácido *n*-octanóico en la posición C-4 de la cuarta unidad monosacárida y las diferencias estructurales entre estos glicolípidos corresponden al número y la naturaleza de las unidades monosacáridas que constituyen el núcleo oligosacárido: ácidos operculínicos A, B y C; la esterificación de ácido *n*-decanóico o *n*-dodecanóico en la posición C-2 de la tercera unidad de monosacárida, ácido (*E*)-cinámico en la posición C-3 de la cuarta unidad de ramnosa de los compuestos **2** y **3**; el sitio de lactonización de la aglicona en C-2 o C-3 de la segunda unidad sacárida; y la formación de un homodímero del ácido operculínico A (compuesto **3**).

Se realizaron evaluaciones *in vitro* que permitieron determinar que ninguno de estos metabolitos posee actividad antibacteriana a 512 µg/mL pero al adicionarlos individualmente en concentraciones de 25 µg/mL y, en conjunto con la tetraciclina, la kanamicina o el cloramfenicol lograron la potenciación de la actividad antibiótica por lo menos en dos veces sobre las cepas en estudio. Del mismo modo se determinó que estos metabolitos no citotóxicos ($CI_{50} > 15$ µg/mL), modularon la actividad citotóxica de la vinblastina en concentraciones de 25 µg/mL, sobre las líneas MCF-7/sens y MCF-7/Vin⁺ de forma más eficaz que la reserpina.

Palabras clave

Ipomoea wolcottiana, Convolvulaceae, glicolípidos, multifármaco resistencia, cepas Gram negativo, tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol.

1. Introducción

Ipomoea wolcottiana Rose, es una de las trece especies arbóreas endémicas de México y una de las seis, que pertenece al complejo denominado “cazahuate” en los estados de Morelos y Veracruz, en donde se conoce con el nombre de cazahuate verde. Los usos en la medicina tradicional mexicana que se le dan a esta especie son en el tratamiento de la erisipela, se aplican las hojas molidas y mezcladas con aceite sobre la piel; se aplica tópicamente la resina, para tratar los jiones; y para disminuir el dolor de muelas se aplica la resina en la muela picada [83]. Esta especie crece en climas

semicálido, semiseco y templado, distribuyéndose en México en los estados de Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Morelos, Puebla, Oaxaca, Veracruz, Tabasco y Chiapas [13]. Como el resto de las especies arborescentes del género *Ipomoea*, es un árbol que llega a medir hasta 12 m de altura con ramas ascendentes, su tronco es robusto y torcido y su madera es blanca y pulida. Las hojas son alargadas y presenta grupos de flores muy vistosas de color pálido amarillo verdoso con corola blanca [13].

La purificación del extracto soluble en CHCl_3 de las semillas de *I. intrapilosa* permitió la identificación de siete glicolípidos denominados como las intrapilosinas I-VII. Sus estructuras fueron establecidas mediante la interpretación de sus datos espectroscópicos de RMN y EM-FAB como macrolactonas del ácido operculínico A, con diferentes ácidos grasos como grupos esterificantes en las posiciones: C-2 en la segunda unidad de ramnosa y C-3 y C-4 en la tercera unidad de ramnosa [17]. El análisis químico de las resinas glicosídicas del extracto CHCl_3 de la raíz de *i. arborescens* generó información sobre quince pentasacáridos de los ácidos glicosídicos arboresínico y murucínico esterificados en las posiciones C-2 de la segunda unidad de ramnosa y C-3 y C-4 de la tercera unidad de ramnosa. En estudios *in vitro* de citotoxicidad se demostró que las arboresinas 1 y 2, así como las murucinas 7 y 9 poseen baja actividad citotóxica ($\text{CI}_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$) sobre la línea de carcinoma de ovario (OVCAR-5) [16]. En tanto que, la investigación del extracto CHCl_3 de las flores de *i. murucoides* proporcionó evidencia sobre la variedad estructural de diecinueve glicolípidos, las murucoidinas I-XIX, cuyos núcleos oligosacáridos se identificaron como los ácidos simónico A y B y operculínico A, C y E, esterificados en las mismas posiciones que las intrapilosinas, las murucinas y las arboresinas.

Como parte de un proyecto para identificar oligosacáridos de las convolvuláceas que poseen potencial como agentes moduladores de la resistencia a diversos agentes antibióticos (metecilina, tetraciclina y norfloxacin, entre otros) sobre cepas Gram positivo y negativo [6-10], así como la desarrollada por agentes antineoplásicos (adriamicina, colchicina, y elipticina) sobre células de carcinoma de mama humano resistentes (MCF-7/Vin) [11, 84], se evaluaron las pescapreínas, las murucoidinas, las orizabinas, las tricolorinas y las intrapilosinas.

Estas series de glicolípidos microbiológicamente inactivas, favorecieron el aumento en la potencia y eficacia de la norfloxacin, la tetraciclina, la kanamicina y el cloramfenicol, ya que redujeron las concentraciones mínimas inhibitorias de los antibióticos sobre *S. aureus* multifármaco resistente que sobreexpresa la proteína de extrusión NorA (SA-1199B), *E. coli* Rosetta gammi y las cepas hospitalarias *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*, al inhibir los mecanismos de resistencia desarrollados por las cepas MDR [6-10]. Asimismo, estos metabolitos anfipáticos no citotóxicos, permitieron disminuciones significativas en las CI_{50} de la vinblastina hasta 1096 veces sobre las líneas celulares de carcinoma de mama en presencia (MCF-7/Vin⁺) o ausencia (MCF-7/Vin⁻) de la misma [11]. Por lo que el uso de estos metabolitos como moduladores de la resistencia farmacológica podría facilitar la reintroducción de antibióticos y agentes antineoplásicos ineficaces en uso clínico para el tratamiento de enfermedades causadas por cepas MDR.

2. Resultados y discusión

Los constituyentes individuales presentes en la jalapina de las flores de *I. wolcottiana* fueron separados mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y purificados a través de la técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra utilizando una columna de fase reversa. Se obtuvieron cuatro glicolípidos novedosos, los wolcotinosidos I-III y la wolcotina I, además de la intrapilosina VII, que fueron caracterizados por técnicas espectroscópicas unidimensionales (RMN ¹H y ¹³C) (**Cuadros 1 a 3**) y bidimensionales (RMN: COSY, TOCSY, HMBC y HSQC), así como por técnicas espectrométricas (EM-FAB modalidad negativa). Estos compuestos fueron identificados como:

Wolcotinosido I (**1**):

Éster intramolecular 1,3'' de *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[4-*O*-octanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[2-*O*-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-

hidroxihexadecanóico. En el espectro de RMN ^1H se observaron los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los cuatro protones anoméricos (6.33 ppm, 1.5 Hz; 6.14 ppm, 1.0 Hz; 5.52 ppm, 1.0 Hz; 4.74 ppm, 7.5 Hz). Adicionalmente, se observaron señales características que identificaron los residuos de ácido que esterifican el núcleo oligosacárido: residuos de ácido de cadena larga (dos tripletes en 0.79 y 0.84 ppm). En tanto que en el espectro de RMN ^{13}C , se obtuvo información sobre: los cuatro carbonos anoméricos con desplazamientos entre 100 y 104 ppm que confirmaron la presencia de sus correspondientes unidades sacáridas; tres señales con desplazamientos entre 173 – 175 ppm indican dos grupos carbonilo de ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona. La asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C se realizó empleando los experimentos bidimensionales de RMN: HSQC, COSY, TOCSY y HMBC, experimento que permitió determinar inequívocamente la secuencia de glicosidación y sitios de esterificación al determinar el acoplamiento $^3\text{J}_{\text{H-C}}$.

Intrapilosina VII (2):

Éster intramolecular 1,2'' de *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil, 3-*O*-cinamoil]-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico. En el espectro de RMN ^1H se observaron los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los cuatro protones anoméricos (6.32 ppm, 1.5 Hz; 5.85 ppm, 2.0 Hz; 5.52 ppm, 1.5 Hz; 5.11 ppm, 7.5 Hz; 4.75 ppm, 7.0 Hz). Las señales características de los residuos de ácido que esterifican el núcleo oligosacárido: residuos de ácido de cadena larga (dos tripletes en 0.73 y 0.88 ppm); ácido cinámico (dobletes en 6.63 y 7.83 ppm, 16.0 Hz). En tanto que en el espectro de RMN ^{13}C , se obtuvo información sobre los cinco carbonos anoméricos con desplazamientos entre 100 y 106 ppm que confirmaron la presencia de sus correspondientes unidades sacáridas; las tres señales con desplazamientos entre 173 – 174 ppm que indican dos grupos carbonilo de ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido; y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona.

Cuadro 1. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos **1** y **2**.

Posición ^a	1		2		
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	
Fuc	1	4.74 d (7.5)	101.6	4.75 d (7.0)	104.3
	2	4.49 dd (6.5, 9.5)	73.2	4.18 dd (7.0, 9.5)	79.9
	3	4.15 dd (9.5, 3.5)	76.8	4.08 dd (9.5, 3.5)	73.4
	4	3.90 d (3.5)	73.5	3.97 d (3.5)	72.9
	5	3.78 dq (3.5, 6.0)	71.3	3.75 dq (1.0, 6.5)	70.8
	6	1.49 d (6.0)	17.2	1.51 d (6.5)	17.3
Ram	1	6.33 d (1.5)	100.3	5.52 d (1.5)	98.5
	2	5.25 d (2.0)	69.6	5.94 dd (1.5, 3.0)	73.6
	3	5.56 dd (2.5, 10.0)	77.9	5.04 dd (3.0, 9.5)	69.3
	4	4.56 t (10.0)	70.9	4.16 dd (9.5, 9.5)	82.0
	5	4.97 dq (9.5, 6.0)	67.8	4.50 dq (9.5, 6.0)	68.9
	6	1.57 d (6.0)	18.9	1.65 d (6.0)	19.0
Ram [']	1	5.52 d (1.0)	100.7	5.85 d (2.0)	100.3
	2	4.54 dd	79.3	6.35 dd (2.0, 3.5)	73.3
	3	4.23 t (10.0)	80.8	4.81 dd (3.2, 9.0)	79.9
	4	5.81 t (10.0)	75.4	4.39 m*	78.9
	5	4.32 dq (9.5, 6.0)	68.5	4.39 m*	68.5
	6	1.63 d (6.0)	18.0	1.67 d (6.0)	19.1
Ram ^{''}	1	6.14 d (1.0)	103.6	6.32 d (1.5)	103.3
	2	4.75 dd (1.0, 3.0)	72.3	5.28 dd (1.5, 3.0)	69.9
	3	4.50 dd (3.0, 9.5)	70.2	6.02 dd (3.0, 10.0)	73.2
	4	5.76 dd (9.5, 10.0)	74.3	6.12 dd (10.0, 9.5)	71.9
	5	4.39 dq (10.0, 6.5)	68.0	4.52 dq (9.5, 6.0)	68.1
	6	1.43 d (6.0)	18.6	1.47 d (6.0)	17.9
Glu	1			5.11 d (7.5)	105.5
	2			3.98 dd (7.5, 9.5)	75.2
	3			4.10 dd (9.5, 9.0)	78.5
	4			3.96 dd (9.0, 9.0)	71.5
	5			3.82 ddd (9.0, 6.0, 3.5)	78.1
	6a			4.13 dd (3.5, 12.0)	62.9
	6b			4.43 dd (12.0, 2.5)	104.3
Jal	1		174.9		173.1
	2a	2.22 ddd (2.8, 7.0, 15.0)	34.1	2.28 m*	34.3
	2b	2.68 dd (2.8, 15.0)		2.46 m*	
	11	3.82*	79.4	3.85 m	82.4
	16	0.99 t (7.0)	14.5	0.88 t (7.0)	14.3
Cna	1				166.5
	2			6.63 d (16.0)	118.6
	3			7.83 d (16.0)	145.4
	2'			7.35 m*	134.7
	3'			7.46 m	129.2
	4'			7.35 m*	128.6
Octa	1		173.6		173.5
	2a	2.26 t (7.0)	34.6	2.47 t (7.0)	34.6
	8	0.79 t (7.0)	14.1	0.73 t (7.0)	14.1
Dodeca	1		173.3		173.2
	2a	2.36 t (7.0)	34.4	2.35 t (7.5)	34.6
	12	0.84 t (7.0)	14.3	0.87 t (7.0)	14.3

^aDatos registrados a 500 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . *Señales sobrepuestas. Entre paréntesis las constantes de acoplamiento en Hz. d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dq = doblete cuarteteado. ^bAbreviaturas: Fuc = fucosa; Ram = ramnosa; Glu = glucosa; Jal = ácido 11-hidroxihexadecanoico; cna = ácido cinámico; octa = ácido octanóico; dodeca = ácido dodecanóico.

Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos **4** y **5**.

Posición ^a	4		5		
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	
Glu	1	4.90 d (7.5)	103.0	4.90 d (7.5)	103.0
	2	3.88 dd (7.5, 9.0)	80.5	3.88 dd (7.5, 9.0)	80.5
	3	4.14 dd (9.0, 9.0)	75.2	4.14 dd (9.0, 9.0)	75.2
	4	4.10 dd (9.0, 9.0)	70.4	4.10 dd (9.0, 9.0)	70.4
	5	3.84 ddd (3.5, 9.0, 5.5)	76.5	3.84 ddd (3.5, 9.0, 5.5)	76.5
	6a	4.30 dd (5.5, 11.5)	61.4	4.30 dd (5.5, 11.5)	61.4
	6b	4.45 dd (3.5, 11.5)		4.45 dd (3.5, 11.5)	
Ram	1	5.59 d (1.0)	97.2	5.59 d (1.0)	97.2
	2	6.02 dd (1.5, 3.0)	72.1	6.02 dd (1.5, 3.0)	72.1
	3	5.05 dd (3.0, 9.5)	68.0	5.05 dd (3.0, 9.5)	68.0
	4	4.18 dd (9.5, 9.5)	79.9	4.18 dd (9.5, 9.5)	79.9
	5	4.43 dq (9.5, 6.0)	67.9	4.43 dq (9.5, 6.0)	67.9
	6	1.62 d (6.0)	17.7	1.62 d (6.0)	17.7
Ram'	1	5.93 d (1.0)	98.5	5.93 d (1.0)	98.5
	2	6.31 dd (1.5, 3.5)	71.7	6.31 dd (1.5, 3.5)	71.7
	3	4.79 dd (3.5, 9.5)	78.8	4.79 dd (3.5, 9.5)	78.8
	4	4.37 dd (9.5, 9.5)	77.1	4.37 dd (9.5, 9.5)	77.1
	5	4.37*	67.1	4.37*	67.1
	6	1.67 d (6.0)	17.5	1.67 d (6.0)	17.5
Ram''	1	6.25 d (1.5)	101.8	6.25 d (1.5)	101.8
	2	4.95 dd (1.5, 3.0)	71.0	4.95 dd (1.5, 3.0)	71.0
	3	4.55 dd (3.0, 9.5)	68.9	4.55 dd (3.0, 9.5)	68.9
	4	5.80 dd (9.5, 9.5)	74.0	5.80 dd (9.5, 9.5)	74.0
	5	4.40*	66.9	4.40*	66.9
	6	1.45 d (6.0)	16.6	1.45 d (6.0)	16.6
Glu'	1	5.02 d (7.5)	104.0	5.02 d (7.5)	104.0
	2	3.97 dd (7.5, 8.5)	73.8	3.97 dd (7.5, 8.5)	73.8
	3	4.04 dd (8.5, 8.5)	77.0	4.04 dd (8.5, 8.5)	77.0
	4	3.94 dd (8.5, 8.5)	70.0	3.94 dd (8.5, 8.5)	70.0
	5	3.75 ddd (2.5, 8.5, 6.0)	76.8	3.75 ddd (2.5, 8.5, 6.0)	76.8
	6a	4.09 dd (6.0, 12.0)	61.5	4.09 dd (6.0, 12.0)	61.5
	6b	4.38 dd (2.5, 12.0)		4.38 dd (2.5, 12.0)	
Jal	1		173.7		173.7
	2a	2.30 ddd (4.0, 8.0, 12.0)		2.30 ddd (4.0, 8.0, 12.0)	
	2b	2.44 ddd (4.0, 8.0, 12.0)		2.44 ddd (4.0, 8.0, 12.0)	
	11	3.86 m	81.4	3.86 m	81.4
Octa	16	0.88 t (7.0)	12.8	0.88 t (7.0)	12.8
	1		173.4		173.4
	2a	2.35 t (7.0)	33.1	2.35 t (7.0)	33.1
Deca	8	0.83 t (7.0)	12.8	0.83 t (7.0)	12.8
	1		173.5		173.5
	2a	2.47 t (7.5)	33.0		
Dodeca	10	0.83 t (7.0)	12.9		
	1				173.5
	2a			2.47 t (7.5)	33.0
	12			0.83 t (7.0)	12.9

^aDatos registrados a 500 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . *Señales sobrepuestas. Entre paréntesis las constantes de acoplamiento en Hz. d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dq = doblete cuarteteado. ^bAbreviaturas: Ram = ramnosa; Glu = glucosa; Jal = ácido 11- hidroxihexadecanoico; octa = ácido octanoico; deca = ácido decanoico; dodeca = ácido dodecanoico.

Cuadro 3. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H y ^{13}C del compuesto **3**.

Posición ^a	UNIDAD A		UNIDAD B		
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	
Fuc	1	4.70 d (8.0)	101.5	4.70 d (8.0)	101.5
	2	4.49 dd (9.7, 8.0)	73.6	4.49 dd (9.7, 8.0)	73.6
	3	4.18 dd (9.7, 3.5)	76.5	4.18 dd (9.7, 3.5)	76.5
	4	3.90 d (3.5)	74.0	3.90 d (3.5)	74.0
	5	3.80 q (6.5)	71.2	3.80 q (6.5)	71.2
	6	1.51 d (6.0)	17.2	1.51 d (6.0)	17.2
Ram	1	6.38 d (1.5)	100.1	6.37 d (1.5)	100.1
	2	5.24 dd (3.5, 1.5)	65.0	4.71 dd (3.5, 1.5)	65.0
	3	5.66 dd (9.5, 3.0)	77.9	5.66 dd (9.5, 3.0)	77.9
	4	4.67 t (9.5)	76.2	4.66 t (9.5)	76.2
	5	5.03 dq (9.5, 6.0)	68.0	5.03 dq (9.5, 6.0)	68.0
	6	1.55 d (6.0)	19.2	1.55 d (6.0)	19.2
Ram'	1	5.57 d (2.0)	99.2	5.49 d (2.0)	99.2
	2	5.94 dd (3.0, 2.0)	72.6	5.94 dd (3.0, 2.0)	72.6
	3	4.60 dd (9.0, 3.0)	80.3	4.60 dd (9.0, 3.0)	80.3
	4	4.34 t (9.0)	77.9	4.34 t (9.0)	77.9
	5	4.33 *	68.3	4.33 *	68.3
	6	1.58 d (6.0)	18.7	1.58 d (6.0)	18.7
Ram''	1	5.89 d (1.2)	103.4	5.89 d (1.2)	103.4
	2	5.04 dd (3.0, 1.2)	72.4	5.04 dd (3.0, 1.2)	72.4
	3	5.92 dd (9.5, 3.0)	72.8	5.92 dd (9.5, 3.0)	72.8
	4	5.95 t (9.5)	74.0	5.95 t (9.5)	74.0
	5	4.52 dq (9.5, 6.5)	70.8	4.52 dq (9.5, 6.5)	70.8
	6	1.72 d (6.5)	18.5	1.72 d (6.5)	18.5
Glu	1	5.06 d (7.5)	104.9	5.06 d (7.5)	104.9
	2	3.90 dd (9.0, 8.5)	75.2	3.90 dd (9.0, 8.5)	75.2
	3	4.16 *	77.9	4.16 *	77.9
	4	5.64 *	70.8	4.18 *	70.8
	5	3.89 m	76.5	3.80 m	76.5
	6a	4.34 t (10.0)	62.5	4.34 t (10.0)	62.5
	6b	4.42 dd (10.0, 8.0)		4.42 dd (10.0, 8.0)	
Jal	1		174.9		174.9
	2a	2.26 ddd (14.5, 7.0, 2.0)	34.2	2.26 ddd (14.5, 7.0, 2.0)	34.2
	2b	2.81 ddd (14.5, 10.5, 3.0)		2.81 ddd (14.5, 10.5, 3.0)	
	11	3.80 m	79.6	3.80 m	79.6
	16	0.71 t (7.0)	14.3	0.71 t (7.0)	12.8
Octa	1		172.1		172.1
	2a	2.39 ddd (16.0, 7.5, 2.0)	34.5	2.39 ddd (16.0, 7.5, 2.0)	34.5
	8	0.79 t (7.0)	13.0	0.79 t (7.0)	13.0
Dodeca	1		173.5		173.5
	2a	2.40 ddd (16.0, 7.5, 2.0)	34.5	2.40 ddd (16.0, 7.5, 2.0)	34.5
	12	0.84 t (7.0)	14.5	0.84 t (7.0)	14.5
Cna	1		166.0		166.0
	2	6.57 d (16.0)	118.3	6.54 d (15.9)	118.3
	3	7.85 d (15.9)	144.8	7.85 d (16.0)	145.1

^aDatos registrados a 500 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . *Señales sobrepuestas. Entre paréntesis las constantes de acoplamiento en Hz. d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dq = doblete cuarteteado. ^bAbreviaturas: Fuc = fucosa; Ram = ramnosa; Glu = glucosa; Jal = ácido 11- hidroxihexadecanoico; octa = ácido octanóico; deca = ácido decanóico; dodeca = ácido dodecanóico; cna = ácido cinámico.

Wolcotina I (3):

Éster intramolecular 1,3'' de 11-*O*-[4-*O*-11*S*-hidroxihexadecanoil]-11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil,3-*O*-cinamoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[2-*O*-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido]- *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil,3-*O*-cinamoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[2-*O*-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico.

En el espectro de RMN ^1H se observaron los desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de siete protones anoméricos (4.70 ppm, 8.0 Hz; 5.06 ppm, 7.5 Hz; 5.49 ppm, 2.0 Hz; 5.57 ppm, 2.0 Hz; 5.89 ppm, 1.2 Hz; 6.37 ppm, 1.5 Hz; 6.38 ppm, 1.5 Hz). Adicionalmente, se observaron señales características que identificaron los residuos de ácido que esterifican el núcleo oligosacárido: residuos de ácido de cadena larga (dos tripletes en 0.79 y 0.84 ppm; 7.0 Hz) y ácido cinámico (tres dobletes en 6.54, 6.57 y 7.85 ppm; 16.0 Hz). En tanto que en el espectro de RMN ^{13}C , se obtuvo información sobre cinco carbonos anoméricos con desplazamientos entre 99 y 105 ppm; tres señales con desplazamientos entre 172 – 175 ppm indican dos grupos carbonilo de ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido; y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona y una señal adicional en 166 ppm característica del grupo carboxilo del ácido cinámico. La asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C se realizó empleando los experimentos bidimensionales de RMN: HSQC, COSY, TOCSY y HMBC, experimento que permitió determinar inequívocamente la secuencia de glicosidación y sitios de esterificación al determinar el acoplamiento $^3\text{J}_{\text{H-C}}$.

Wolcotinósido II (4):

Éster intramolecular 1,2'' de *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-decanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-

glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico. Los de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los cuatro protones anoméricos observados en el espectro de RMN ^1H : (6.25 ppm, 1.5 Hz; 5.93 ppm, 1.0 Hz; 5.59 ppm, 1.0 Hz; 5.02 ppm, 7.5 Hz; 4.90 ppm, 7.5 Hz). Adicionalmente, se observaron señales características que identificaron los residuos de ácido que esterifican el núcleo oligosacárido: residuos de ácido de cadena larga (dos tripletes en 0.89 y 0.83 ppm). En tanto que en el espectro de RMN ^{13}C , se obtuvo información sobre los cinco carbonos anoméricos con desplazamientos entre 98 y 106 ppm que confirmaron la presencia de sus correspondientes unidades sacáridas; los carbonos de los grupos hidroximetileno no sustituido correspondiente a la glucosa en 61.4 y 61.5 ppm; tres señales con desplazamientos entre 173 – 174 ppm indican dos grupos carbonilo de ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido; y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona.

Wolcotinosido III (5):

Éster intramolecular 1,2'' de *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico. Los de desplazamientos químicos y constantes de acoplamiento de los cuatro protones anoméricos observados en el espectro de RMN ^1H : (6.25 ppm, 1.5 Hz; 5.93 ppm, 1.0 Hz; 5.59 ppm, 1.0 Hz; 5.02 ppm, 7.5 Hz; 4.90 ppm, 7.5 Hz). Adicionalmente, se observaron señales características que identificaron los residuos de ácido que esterifican el núcleo oligosacárido: residuos de ácido de cadena larga (dos tripletes en 0.88 y 0.83 ppm). En tanto que en el espectro de RMN ^{13}C , se obtuvo información sobre: los cinco carbonos anoméricos con desplazamientos entre 97 y 106 ppm que confirmaron la presencia de sus correspondientes unidades sacáridas; los carbonos de los grupos hidroximetileno no sustituido correspondiente a la glucosa en 61.4 y 61.5 ppm; tres señales con desplazamientos entre 173 – 175 ppm indican dos grupos carbonilo de ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido; y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona.

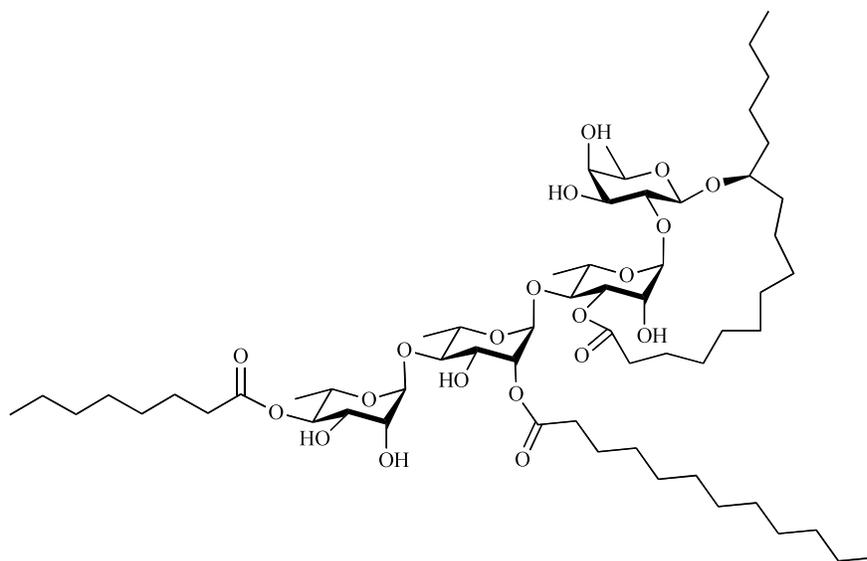
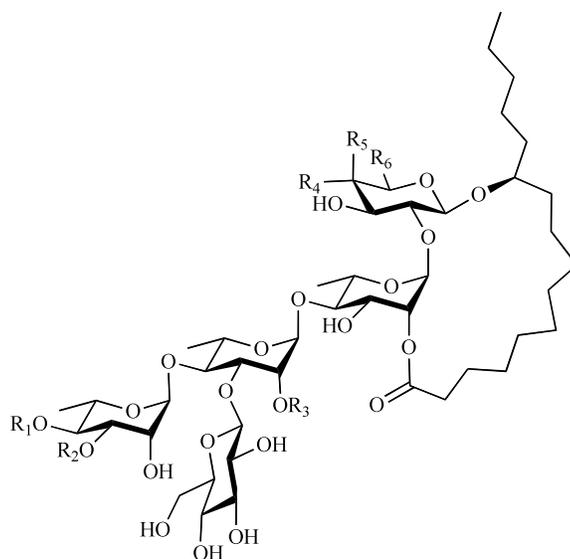


Figura 1. Estructura molecular del wolcotinosido I.



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
2	octa	cna	dodeca	H	OH	CH ₃
4	octa	H	deca	OH	H	CH ₂ OH
5	octa	H	dodeca	OH	H	CH ₂ OH

Figura 2. Estructura molecular de la intrapilosina VII y los wolcotinosidos II y III.

Cuadro 4. Susceptibilidad de las cepas MDR Gram negativo a los compuestos 1–5.

Compuesto	MIC ($\mu\text{g/mL}$)								
	<i>E. coli</i> (Rosetta-gami)			<i>Salmonella typhi</i>			<i>Shigella flexneri</i>		
	Tet	Kan	Cam	Tet	Kan	Cam	Tet	Kan	Cam
Antibióticos	128	32	256	1024	1024	512	512	512	256
1	64	16	128	512	512	256	64	64	128
2	32	16	128	512	512	256	64	128	128
3	64	16	128	512	512	256	128	128	128
4	64	8	128	512	512	256	128	256	128
5	32	16	128	512	512	256	64	128	128
Extracto	64	16	128						
Fracción VII	64	16	128						
Reserpina	64	8	128	512	512	256	256	64	128

Abreviaturas: (-) = Concentración mínima inhibitoria (MIC); Tet = MIC determinado para tetraciclina; Kan = MIC determinado para kanamicina; Cam = MIC determinado para cloramfenicol en el ensayo de modulación a concentración de 25 $\mu\text{g/mL}$ de los glicolípidos evaluados.

En el **Cuadro 5** se muestran los resultados de los ensayos de citotoxicidad de los cinco compuestos de prueba sobre las líneas de carcinoma de colon (HCT-15), carcinoma epidermoide oral (KB), carcinoma cervical (Hela), carcinoma humano de mama (MCF-7 sens), carcinoma humano de mama que crece en ausencia de vinblastina (MCF-7/Vin⁻) y carcinoma humano de mama que crece en presencia de vinblastina (MCF-7/Vin⁺). En tanto que en el **Cuadro 6** se muestran los resultados de la modulación citotóxica de los compuestos de prueba y el control positivo (reserpina) sobre las líneas celulares de carcinoma humano de mama.

Cuadro 5. Concentraciones inhibitorias 50 de las líneas celulares a los compuestos de prueba.

Compuesto	(CI ₅₀ µg/mL)					
	HCT-15	KB	Hela	MCF-7/sens	MCF-7/Vin ⁻	MCF-7/Vin ⁺
1	15	15.45	16.87	25	>25	>25
2	24.36	17.53	23.9	24.05	25.5	>25
3	>25	>25	>25	>25	>25	>25
4	>25	>25	>25	>25	>25	>25
5	>25	>25	18.86	>25	>25	>25
Vinblastina	0.022	0.0081	0.026	0.047	1.08	1.37

^a HCT-15= Carcinoma humano de colon, KB= Carcinoma epidermoide oral humano, Hela= Carcinoma cervical, MCF-7 sens= Carcinoma humano de mama, MCF-7/Vin⁻= Carcinoma humano de mama que crece en ausencia de vinblastina, MCF-7/Vin⁺= Carcinoma humano de mama que crece en presencia de vinblastina.

Cuadro 6. Modulación de la citotoxicidad de la vinblastina en MCF-7/Sensible y MCF-7/Vin MDR.

Compuesto ^a	CI ₅₀ (µg/mL)		
	MCF-7/sens	MCF-7/Vin ⁻	MCF-7/Vin ⁺
Vinblastina	0.047	1.08	1.37
1	<0.00064	0.75	0.643
2	<0.00064	0.038	0.041
3	0.0022	0.24	0.35
4	0.014	0.69	0.75
5	0.023	0.16	0.54
Reserpina ^b	0.003 ± 0.001	0.037 ± 0.01	0.31 ± 0.19

^aDiluciones en serie de 0.00064 a 10 µg/mL de vinblastina en presencia o ausencia del glicolípido (25 µg/mL). ^bReserpina (5 µg/mL) como control positivo.

Estas evaluaciones *in vitro* permitieron la identificación de una serie de moduladores de la actividad antibiótica similar a la reserpina ya que en la mayoría de las determinaciones se redujo el valor de la MIC en 2 veces. El extracto crudo, la fracción VII y los compuestos **1-5** actúan de forma sinérgica con tetraciclina, kanamicina y cloramfenicol, aumentando sustancialmente su actividad contra las cepas de estudio. Para la modulación contra *E. coli*, se obtuvo la misma respuesta que con la reserpina: reducción de dos veces con los compuestos **1, 3** y **4**, con el extracto y la fracción (128 a 64 µg/mL) al adicionarse conjuntamente con tetraciclina; reducción de cuatro veces, compuesto **4** con kanamicina (38 a 8 µg/mL) y reducción de dos veces, compuestos **1-5**, extracto y fracción (256 a 128 µg/mL). En la modulación contra *S. typhi* se determinó que los compuestos **1-5** potenciaron el efecto de los tres antibióticos observando reducciones en la MIC de dos veces (tetraciclina y kanamicina de 1024 a 512 µg/mL y cloramfenicol de (512 a 256 µg/mL). El compuesto **1** mostró la misma eficacia que la reserpina con una reducción de ocho veces de la MIC de kanamicina sobre *S. flexneri* (512 a 64 µg/mL).

Los mejores efectos de potenciación determinados por reducciones mayores que la reserpina, el control positivo, se observaron en las cepas:

- a) *E. coli*: Tetraciclina con los compuestos **2** y **5** (128 a 32 µg/mL; reducción de cuatro veces).
- b) *S. flexneri*: Tetraciclina con los compuestos **3** y **4** (512 a 128 µg/mL; reducción de cuatro veces) y con los glicolípidos **1, 2** y **5** (512 a 64 µg/mL; reducción de ocho veces).

Se estableció que los compuestos **1-3**, en concentraciones de 25 µg/mL, modularon la actividad citotóxica de la vinblastina sobre las líneas MCF-7/sens y MCF-7/Vin⁺ de forma más eficaz que la reserpina. Por ejemplo, los compuestos **1** y **2** potenciaron la actividad de la vinblastina sobre la línea MCF-7/sens en más de 73 veces (0.047 a <0.00064 µg/mL); el compuesto **3**, en más de 21 veces (0.047 a 0.0022 µg/mL); mientras que la combinación con reserpina disminuye la CI₅₀ en 15 veces (0.047 a 0.003 µg/mL). Únicamente el compuesto **2** mostró la mejor potenciación sobre la línea MCF-7/Vin⁺, ya que redujo 33 veces la CI₅₀ (1.37 a 0.041 µg/mL) en comparación con la reserpina cuya modulación se calculó en 4 veces (1.37 a 0.31 µg/mL). Estos resultados son más modestos que los observados para las murucoidinas IV, VIII y XVI cuyas reducciones fueron mayores de 73, 1593 y 1096 veces para las líneas MCF-7/sens, MCF-7/Vin⁻ y MCF-7/Vin⁺, respectivamente [11]; o bien, los determinados para el albinósido III, que ha resultado ser el glicolípido inhibidor más potente de la GpP, con reducciones de hasta 2140 veces para la línea MCF-7/Vin⁺ [84].

Debido a que se desconoce el mecanismo molecular por el cual las bombas de extrusión tienen la capacidad de reconocer fármacos de estructura química diversa, no existe un enfoque general para diseñar un único inhibidor capaz de revertir este mecanismo [85]. Aunque se ha demostrado que la reserpina es un potente inhibidor de las bombas de extrusión, por ejemplo, de los transportadores de fluoroquinolonas [72] y tetraciclina y del transportador en células de mamíferos, (la glicoproteína P) [74]; desafortunadamente, no puede utilizarse en clínica para potenciar las actividades de diversos fármacos debido a la neurotoxicidad que genera [85, 86]. Por lo tanto, en este estudio hemos tratado de identificar moduladores de la actividad antibiótica con una baja o nula citotoxicidad ($CI_{50} > 15 \mu\text{g/mL}$) contra líneas celulares derivadas de tumores humanos. El empleo de estos productos en combinación con agentes terapéuticos facilitará la reintroducción al uso clínico de agentes que han perdido su eficacia, e.g. los antibióticos como la meticilina. No se encontraron diferencias significativas en la actividad moduladora que se pudieran asociar a los cambios estructurales encontrados en los compuestos **1-5** y que se encuentran asociadas a las variantes en el núcleo oligosacárido, el sitio de esterificación de la lactona macrocíclica, la cantidad y el tipo de grupos acilantes, o la dimerización de los núcleos oligosacáridos.

3. Conclusiones

En concordancia con los estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación, en los que se evaluó la actividad antibacteriana y la modulación antibiótica y citotóxica desarrollada por los glicolípidos aislados de las especies arborescentes *I. intrapilosa* e *i. muruoides*; se determinó que los metabolitos identificados en el presente trabajo, son microbiológica y citotóxicamente inactivos, sin embargo, poseen potencial modulador de las actividades antibiótica y citotóxica. Y en algunos casos, resultaron ser más potentes que la reserpina ya que disminuyeron en mayor proporción los valores de concentraciones requeridas de la tetraciclina, la kanamicina y la vinblastina para inhibir el crecimiento de bacterias MDR Gram negativo o de las líneas celulares de carcinoma de mama resistentes. Estos compuestos biodinámicos pueden representar la fuente de prototipos químicos para desarrollar inhibidores más eficaces de las proteínas transmembranales transportadoras de múltiples fármacos, clínicamente útiles para el tratamiento de enfermedades refractarias, particularmente las causadas por las células resistentes de enfermedades refractarias.

4. Experimental

4.1. Procedimientos experimentales generales

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y de carbono (^{13}C) se generaron en equipos Varian VXL-500 y Bruker DMX-500, operando a una frecuencia de 500 MHz en ^1H y 125 MHz en ^{13}C . Se utilizó piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin-Elmer 241 utilizando metanol y cloroformo como disolventes. Los espectros de masas fueron registrados en un aparato modelo JEOL SXIOA, utilizando como método de ionización el bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) en el modo negativo y a la trietanolamina como matriz. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher- Johns y no están corregidos.

La resolución de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas se realizó utilizando la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La instrumentación estuvo constituida por una bomba (modelo 600, Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) y un refractómetro diferencial (Waters 410), ambos integrados a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le, Dell y Pentium 4). El control del equipo, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se hicieron a través de los software Millennium 2000 (Waters) y Empower 1 (Waters). Una válvula de reciclaje de muestra se adaptó al sistema cromatográfico para la purificación de los compuestos.

4.2. Material vegetal

La muestra analizada consistió en flores secas (1103.3 g) de *Ipomoea wolcottiana*, colectadas en el municipio de Carrizal, Emiliano Zapata, estado de Veracruz. La colecta del material fue realizada en el mes de Octubre de 2005 por la Dra. Blanca Nader e identificada por el Biólogo Roberto Ortega Ortiz de la Universidad Veracruzana.

4.3. Aislamiento y purificación de los compuestos 1 a 5

Las flores secas y pulverizadas de *Ipomoea wolcottiana* se sometieron a extracciones sucesivas con cloroformo (preparación de jalapinas) por periodos de tres días hasta lograr la maceración exhaustiva. Seguido, se filtró el disolvente y se concentró a presión reducida y sometió a análisis cualitativo preliminar mediante CCF que permitió identificar la presencia de resinas glicosídicas al humedecer las placas eluidas con una solución de sulfato cérico como agente cromógeno (mezcla $\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 - \text{H}_2\text{SO}_4$ al 0.5%) y se desarrolló el color por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de 80 °C. 79.01 g del extracto clorofórmico fueron sometidos a un fraccionamiento en columna abierta para lograr la separación preliminar de los constituyentes presentes en el mismo de acuerdo a su polaridad, obteniendo 54 eluatos que posteriormente fueron reunidos en nueve fracciones primarias de acuerdo a su perfil cromatográfico en CCF. La separación de los glicolípidos individuales de la jalapina de *I. wolcottiana* se realizó haciendo cortes de la fracción primaria VII, utilizando la cromatografía líquida de alta eficiencia. Las condiciones instrumentales consistieron en: columna C-18 preparativa Symmetry Waters (19 x 300 mm, 7 μm); fase móvil: MeOH; flujo: 9.0 mL/min; detector: Índice de refracción; volumen de inyección: 500 μL ; concentración de la muestra: 0.1 mg/ μL . El fraccionamiento secundario a nivel preparativo permitió la obtención de mezclas de menor complejidad y cada uno de los eluatos colectados individualmente, fueron reinyectados en la columna C-18 Symmetry con el sistema de elución MeOH; flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección 500 μL . En todos los casos se aplicó la técnica de reciclaje de muestra. Esta técnica consistió en hacer pasar la muestra problema por la misma columna preparativa (de 11 a 15 ciclos) para obtener la máxima separación y purificación de los constituyentes individuales en cada una de las fracciones secundarias seleccionadas para su purificación.

4.4. Caracterización estructural

4.4.1. Wolcotinosido I (1):

Sólido blanco; EM-FAB (modo negativo) m/z 1145 $[\text{M} - \text{H}]^- (\text{C}_{60}\text{H}_{106}\text{O}_{20})$, 963 $[\text{1145} - 182 (\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}, \text{dodeca})]^-$, 837 $[\text{963} - 126 (\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}, \text{octa})]^-$, 691 $[\text{837} - 146 (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4, \text{metilpentosa})]^-$, 545 $[\text{691} - 146 (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4, \text{metilpentosa})]^-$, 417 $[\text{545} + 18 (\text{hidrólisis de la lactona}) - 146 (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4, \text{metilpentosa})]^-$, 271 $[\text{417} - 146 (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4, \text{metilpentosa})]^-$; ácido jalapínico - $\text{H}]^-$.

4.4.2. Intrapilosina VII (2):

Sólido blanco; EM-FAB (modo negativo) m/z 1437 $[\text{M} - \text{H}]^- (\text{C}_{75}\text{H}_{121}\text{O}_{26})$, 1307 $[\text{1437} - 130 (\text{C}_9\text{H}_6\text{O}, \text{cinámico})]^-$, 1255 $[\text{1437} - 182 (\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}, \text{dodeca})]^-$, 1181 $[\text{1307} - 126 (\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}, \text{octa})]^-$,

1125 [1255 – 130 (C₉H₆O, cinámico)]⁻, 1035 [1181 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 999 [1181 – 182 (C₁₂H₂₂O, dodeca)]⁻, 853 [999 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 545 [853 – 162 (C₆H₁₀O₅, desoxihexosa) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 417 [545 + 18 (hidrólisis de la lactona) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 271 [417 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa); ácido jalapínico – H]⁻.

4.4.3. *Wolcotina I (3)*:

Sólido blanco; EM-FAB (modo negativo) m/z 2879 [M – H]⁻(C₁₅₀H₂₄₄O₅₂), 1437 [unidad B]⁻, 1307 [1437 – 130 (C₉H₆O, cinámico)]⁻, 1255 [1437 – 182 (C₁₂H₂₂O, dodeca)]⁻, 853 [1437 – 182 (C₁₂H₂₂O, dodeca) – 126 (C₈H₁₄O, octa) – 130 (C₉H₆O, cinámico) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 545 [853 – 162 (C₆H₁₀O₅, desoxihexosa) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 417 [545 + 18 (hidrólisis de la lactona) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 271 [417 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa); ácido jalapínico – H]⁻.

4.4.4. *Wolcotínosido II (4)*:

Sólido blanco; EM-FAB (modo negativo) m/z 1295 [M – H]⁻(C₆₄H₁₁₂O₂₆), 1141 [1295 – 154 (C₁₀H₁₈O, deca)]⁻, 1015 [1141 – 126 (C₈H₁₄O, octa)]⁻, 853 [1015 – 162 (C₆H₁₀O₅, desoxihexosa)]⁻, 561 [853 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 433 [561 + 18 (hidrólisis de la lactona) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 271 [433 – 162 (C₆H₁₀O₅, desoxihexosa); ácido jalapínico – H]⁻.

4.4.5. *Wolcotínosido III (5)*:

Sólido blanco; EM-FAB (modo negativo) m/z 1323 [M – H]⁻(C₆₆H₁₁₆O₂₆), 1141 [1323 – 182 (C₁₂H₂₂O, dodeca)]⁻, 1015 [1141 – 126 (C₈H₁₄O, octa)]⁻, 853 [1015 – 162 (C₆H₁₀O₅, desoxihexosa)]⁻, 561 [853 – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 433 [561 + 18 (hidrólisis de la lactona) – 146 (C₆H₁₀O₄, metilpentosa)]⁻, 271 [433 – 162 (C₆H₁₀O₅, desoxihexosa); ácido jalapínico – H]⁻.

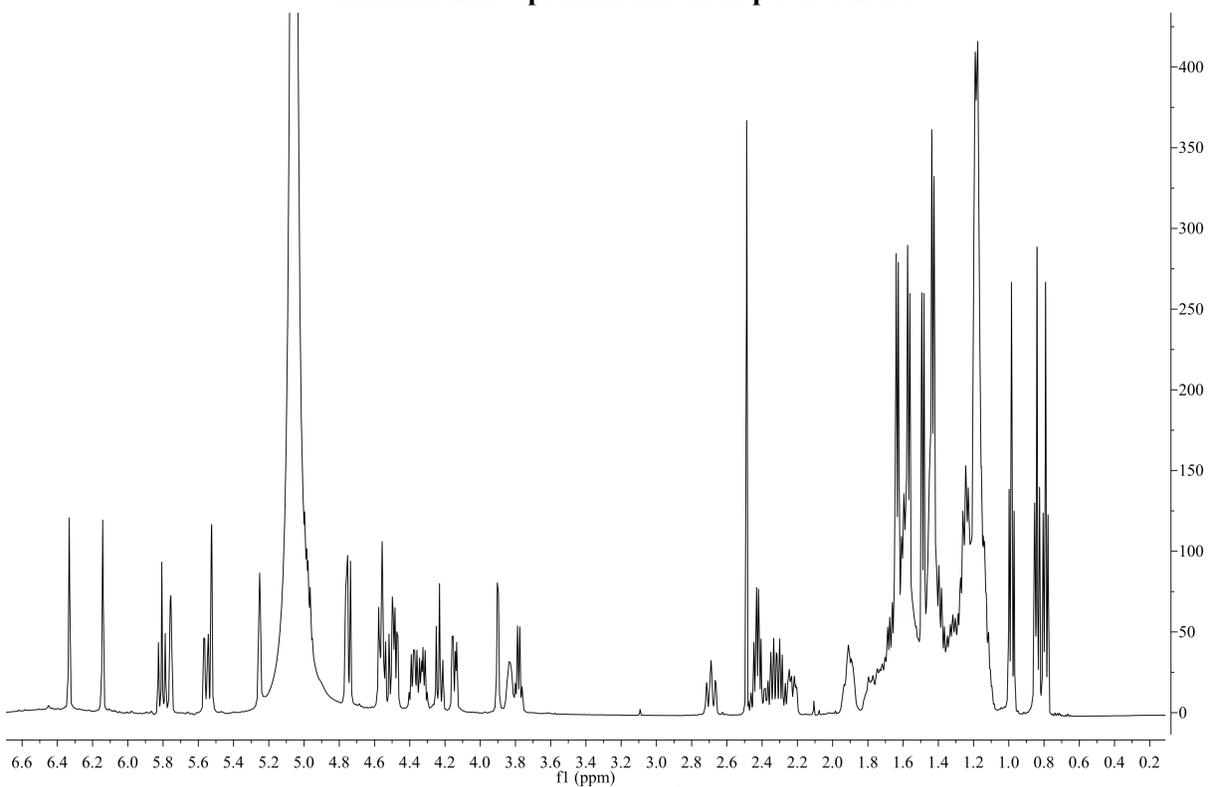
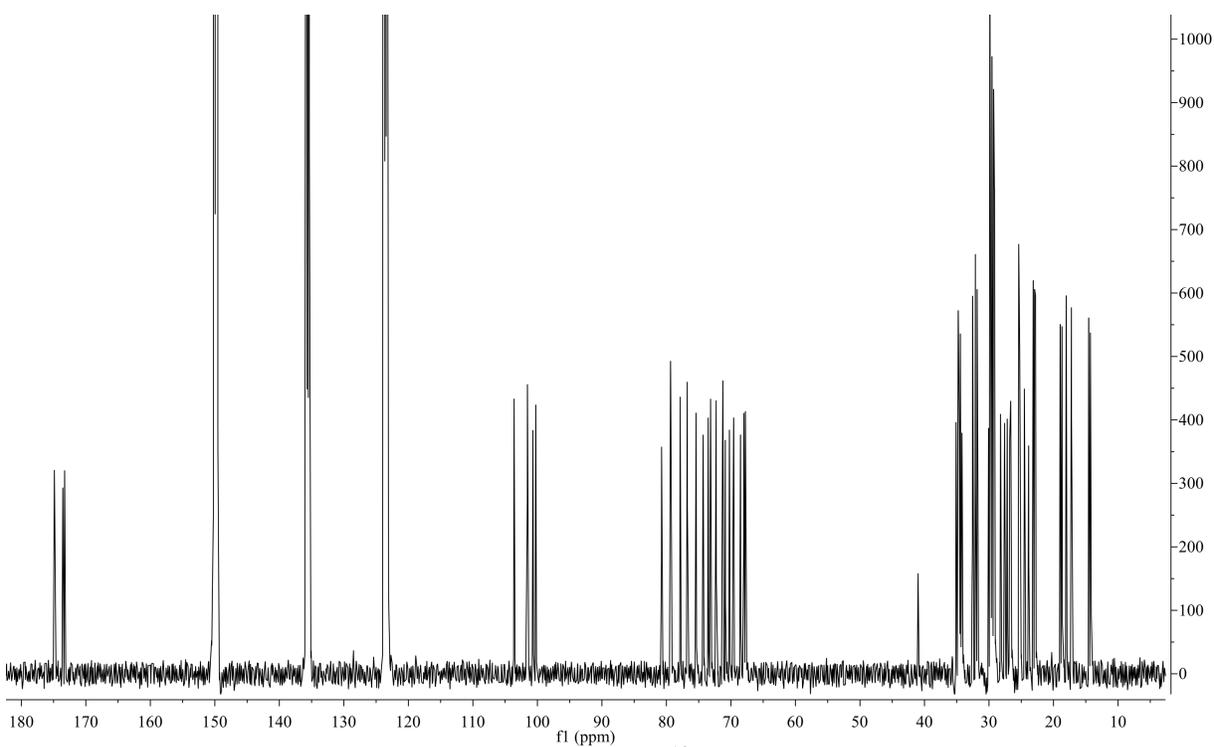
4.5. Ensayos biológicos

Véase la descripción en la sección 4.5. de la publicación 2.

Agradecimientos

Esta investigación fue financiada parcialmente por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (101380-Q) y la Dirección General de Asuntos Personal Académico de la UNAM (IN217310).

Información suplementaria de la publicación 3

Figura 1S. Espectro de RMN ^1H del wolcotinosido I.Figura 2S. Espectro de RMN ^{13}C del wolcotinosido I.

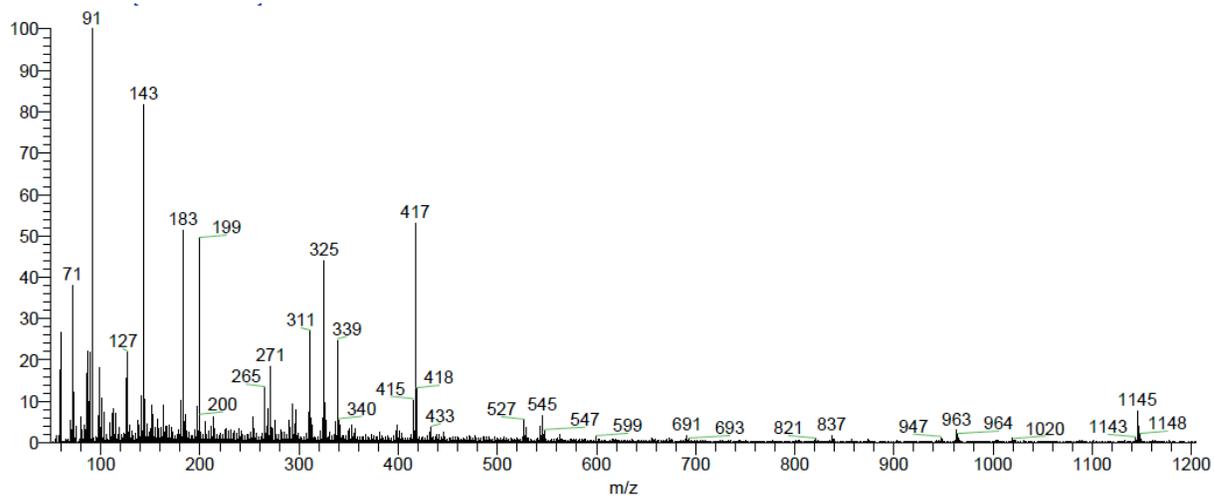


Figura 3S. Espectro de masas modo FAB negativo del wolcotinosido I.

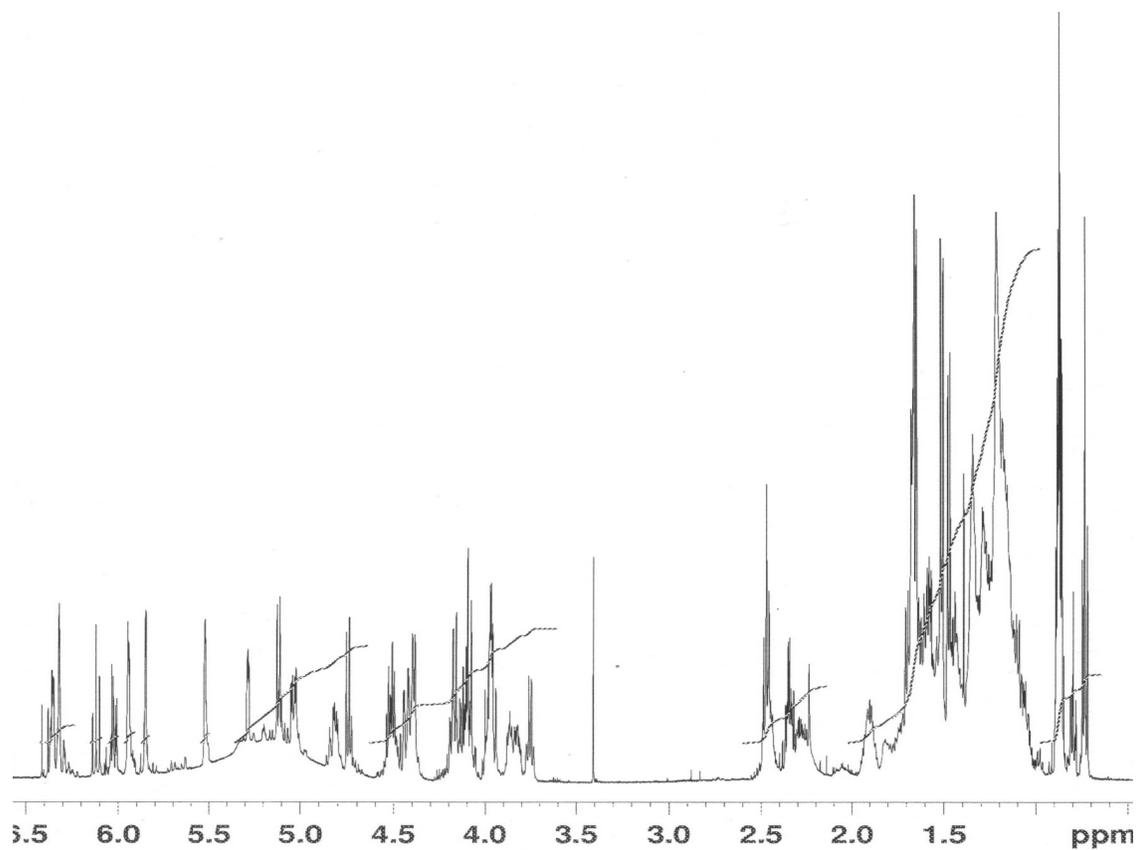


Figura 4S. Espectro de RMN ¹H de la intrapilosina VII.

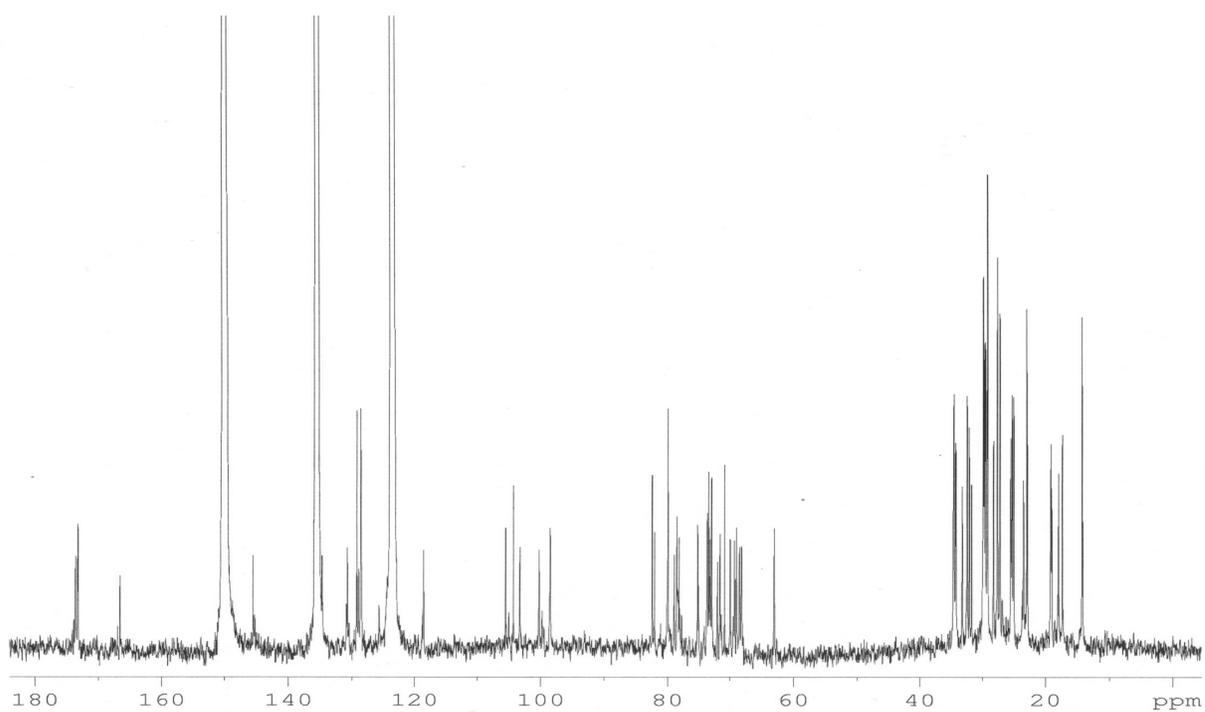


Figura 5S. Espectro de RMN ^{13}C de la intrapilosina VII.

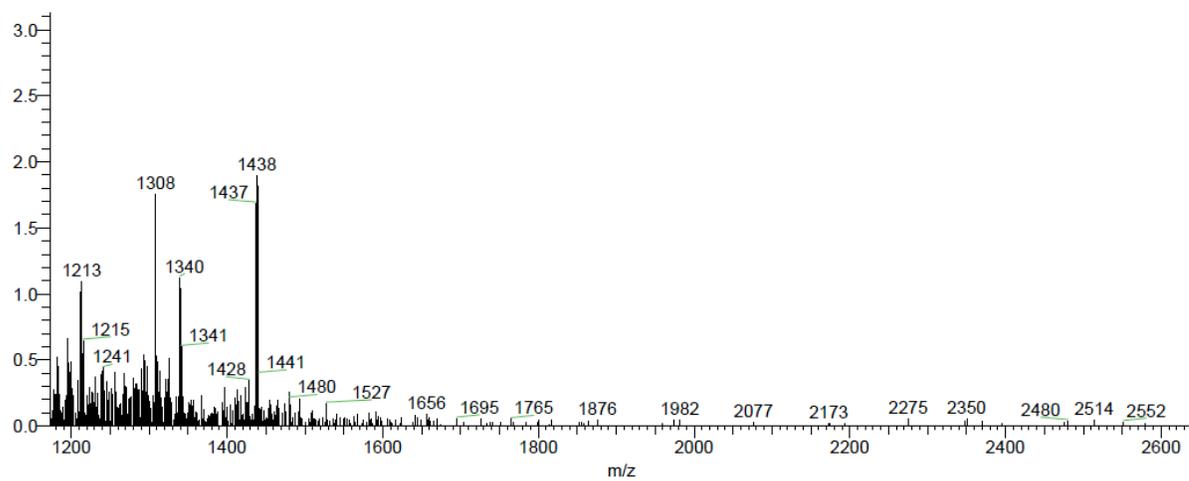


Figura 6S. Espectro de masas modo FAB negativo de la intrapilosina VII.

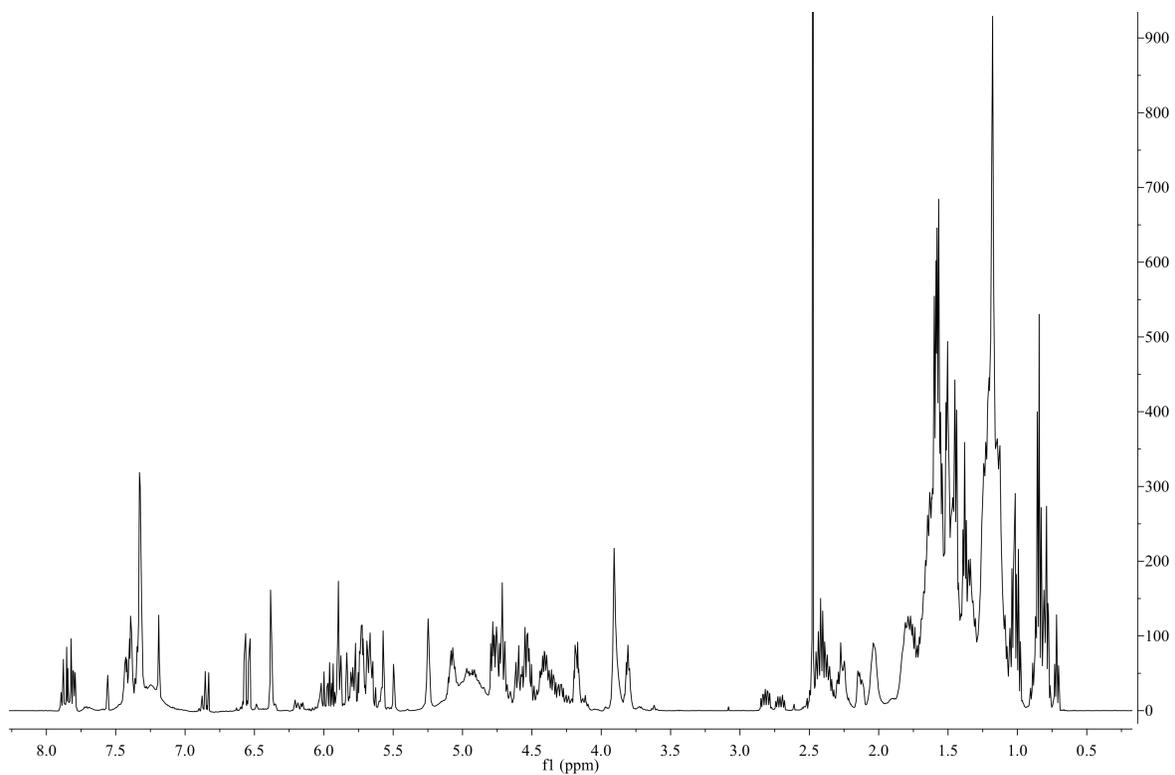


Figura 7S. Espectro de RMN ^1H de la wolcotina I.

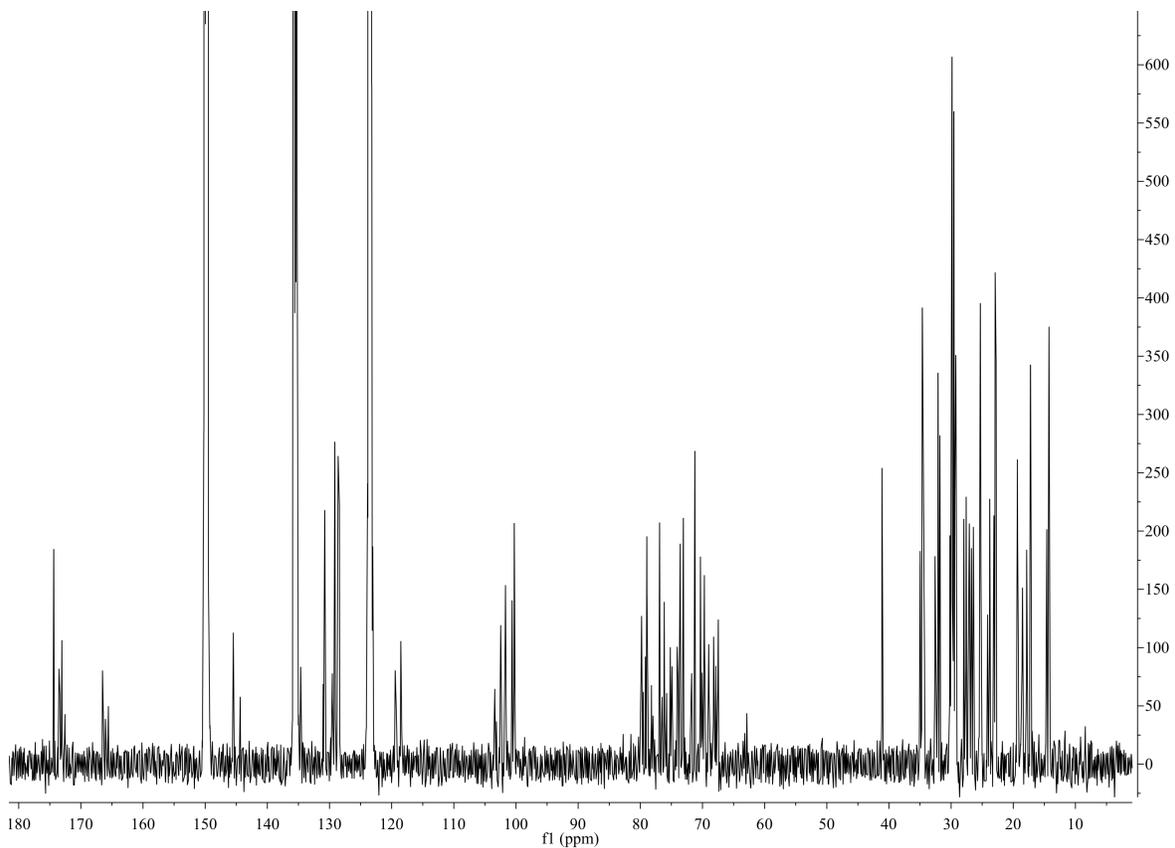


Figura 8S. Espectro de RMN ^{13}C de la wolcotina I.

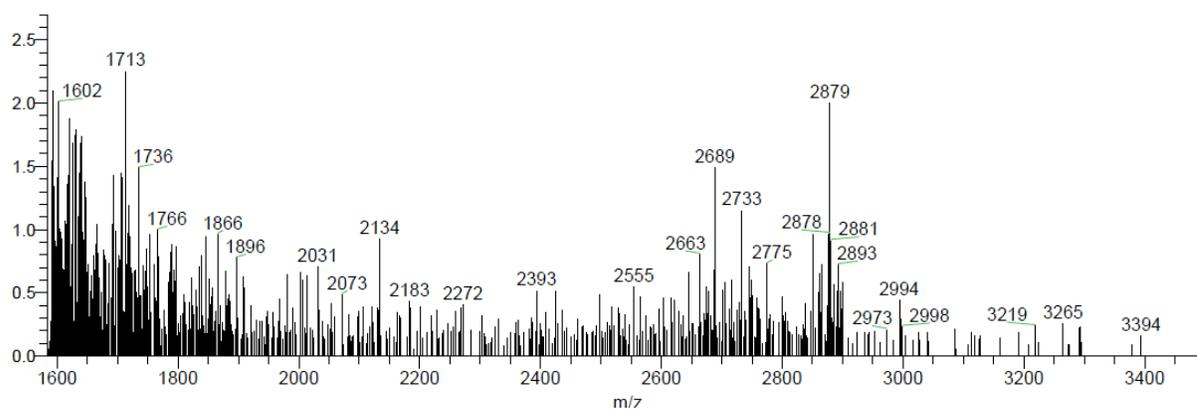


Figura 9S. Espectro de masas modo FAB negativo de la wolcotina I.

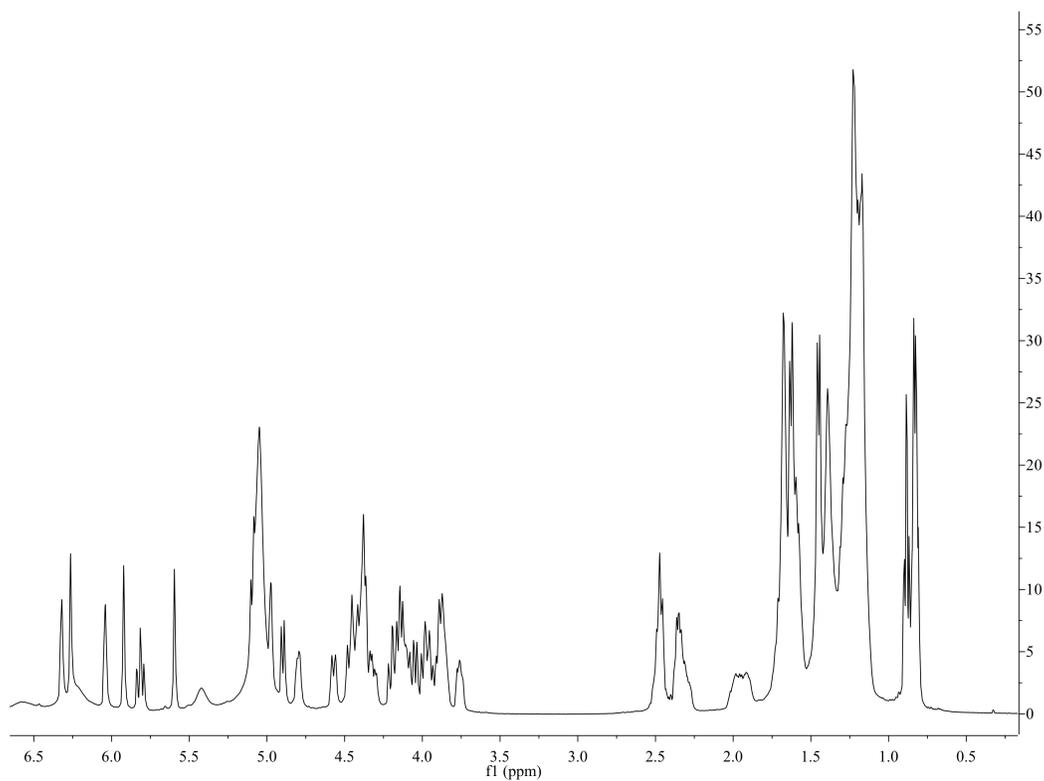


Figura 10S. Espectro de RMN ¹H del wolcotinosido II.

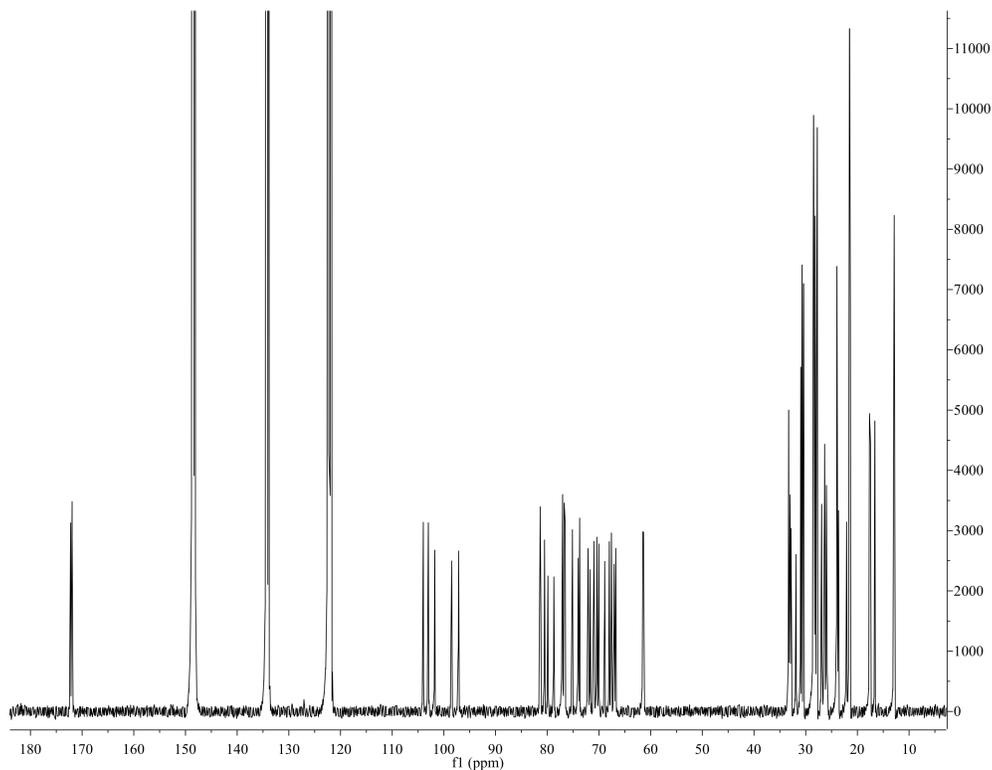


Figura 11S. Espectro de RMN ^{13}C del wolcotinosido II.

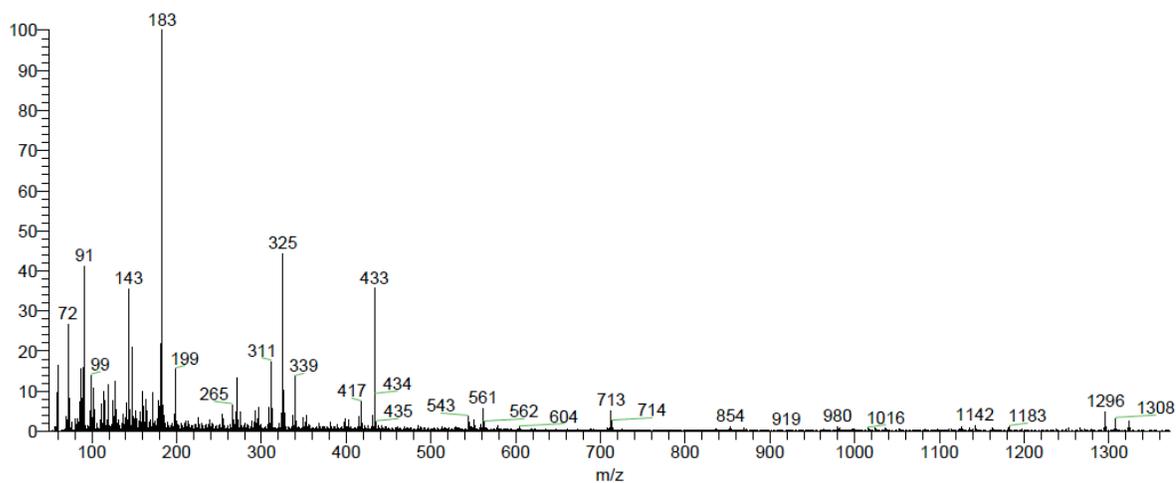


Figura 12S. Espectro de masas modo FAB negativo del wolcotinosido II.

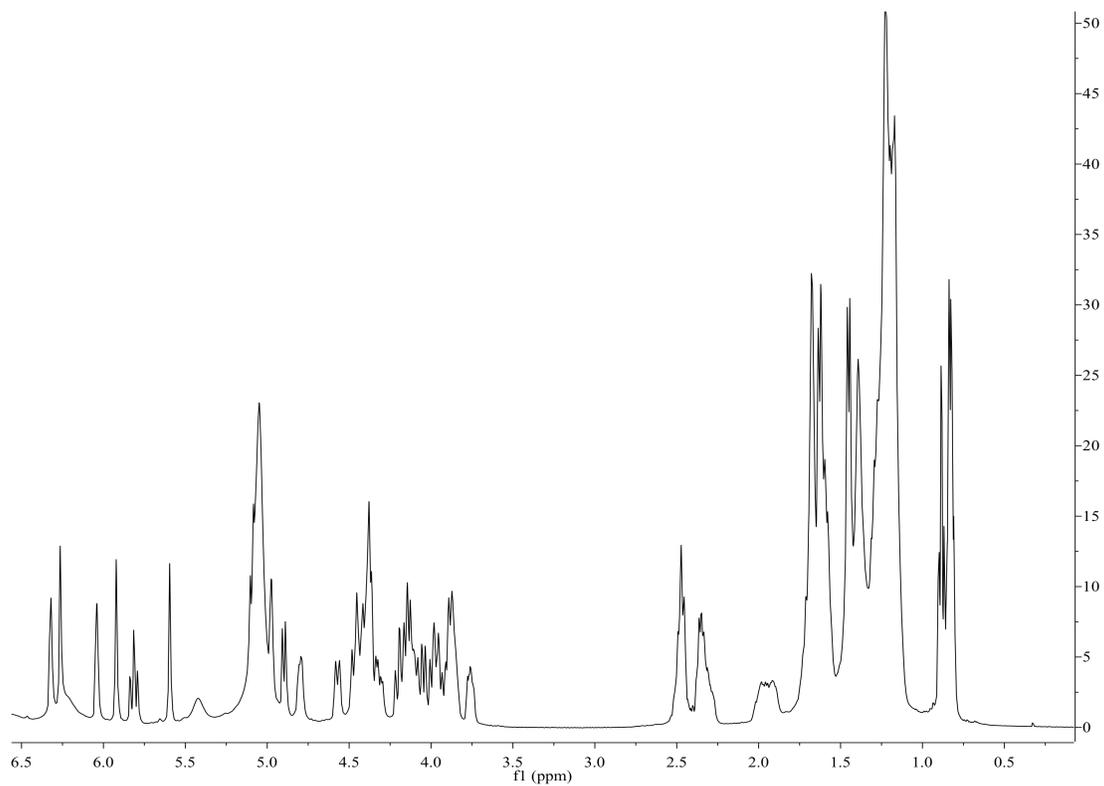


Figura 13S. Espectro de RMN ^1H del wolcotinosido III.

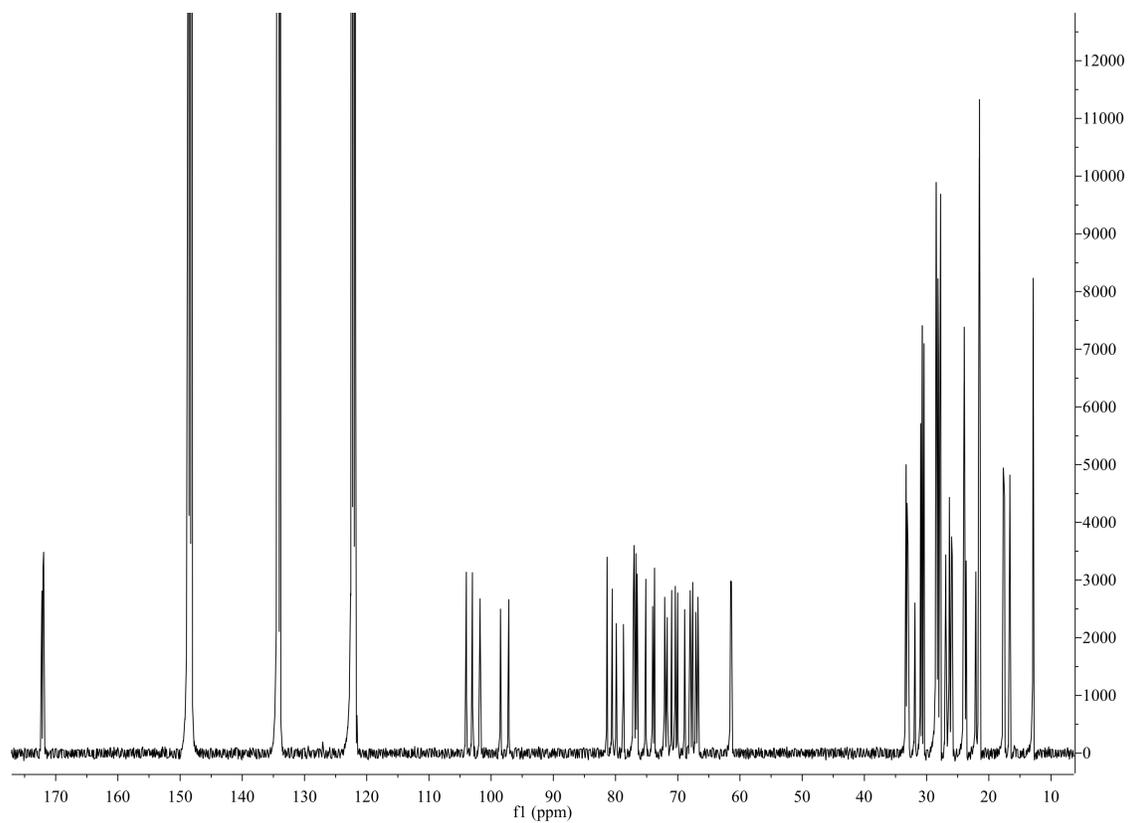


Figura 14S. Espectro de RMN ^{13}C del wolcotinosido III.

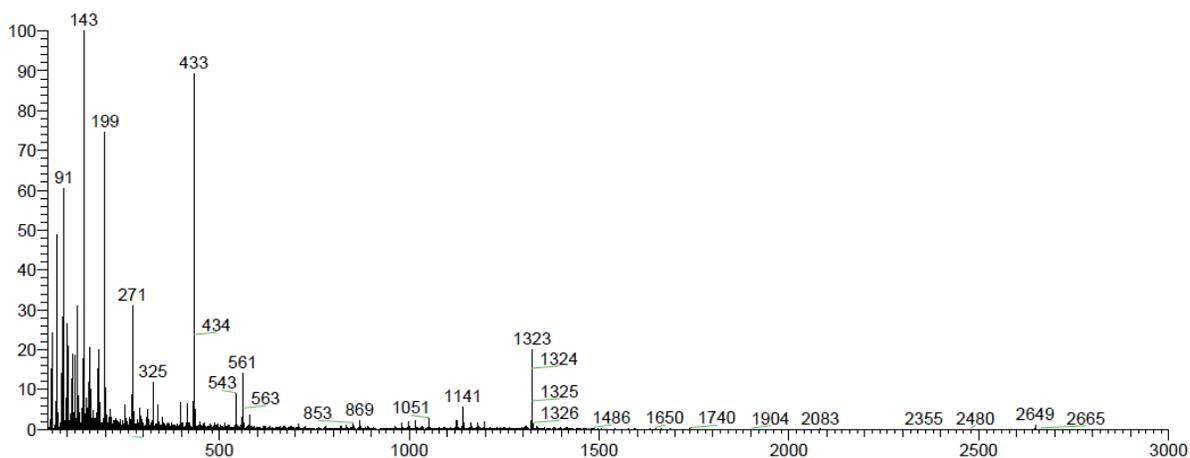


Figura 15S. Espectro de masas modo FAB negativo del wolcotinosido III.

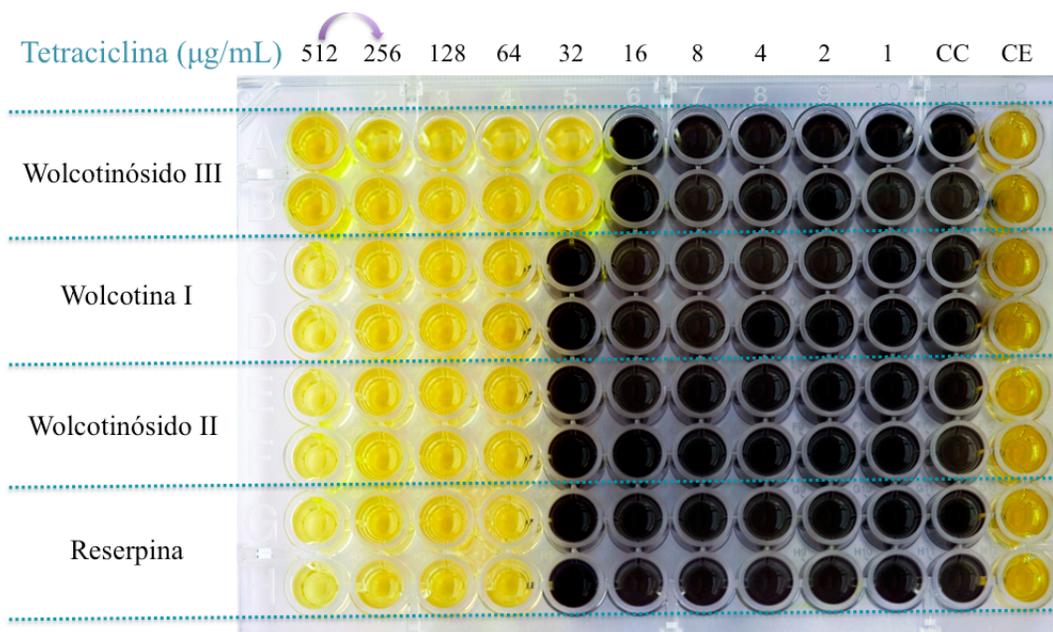


Figura 16S. Ensayo de modulación de tetraciclina con los compuestos 3-5 (25 µg/mL) y reserpina (20 µg/mL) contra la cepa *Escherichia coli* Rosetta gami.

Abreviaturas: CC, control de crecimiento; CE, control de esterilidad.

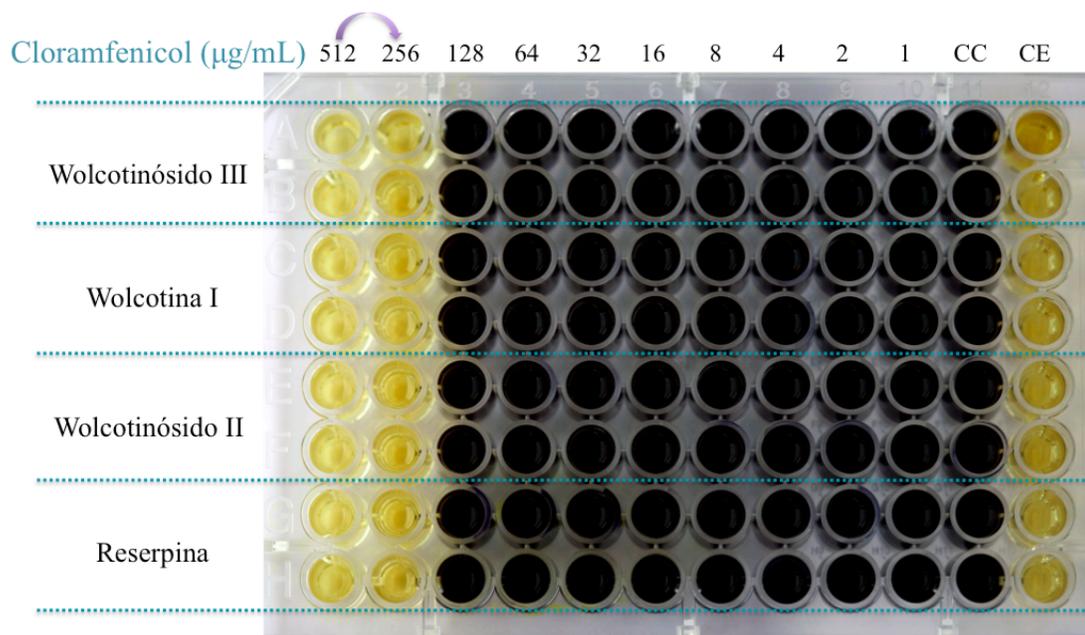


Figura 17S. Ensayo de modulación de cloramfenicol con los compuestos 3-5 (25 µg/mL) y reserpina (20 µg/mL) contra la cepa hospitalaria *Salmonella typhi*.

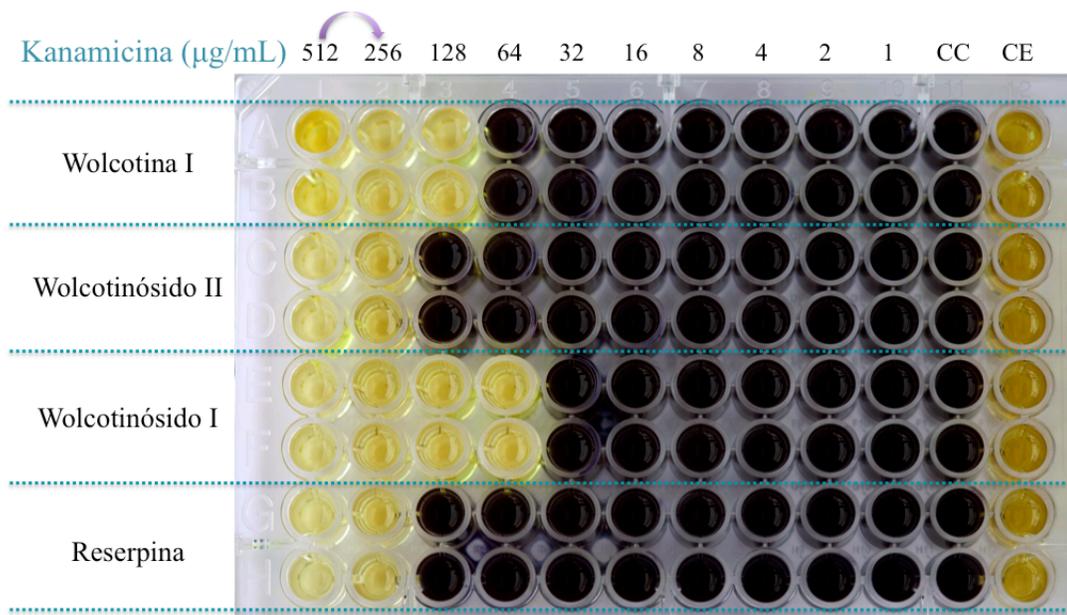


Figura 18S. Ensayo de modulación de kanamicina con los compuestos 1, 3 y 4 (25 µg/mL) y reserpina (20 µg/mL) contra la cepa hospitalaria *Sigella flexneri*.

Abreviaturas: CC, control de crecimiento; CE, control de esterilidad.

8. Conclusiones

- Durante la investigación química de los extractos clorofórmicos de las flores de dos especies medicinales pertenecientes al complejo cazahuate: *Ipomoea murucoides* e *ipomoea wolcottiana*, se realizó el aislamiento y la purificación de diez glicolípidos, mediante la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC).
- En *I. murucoides* se identificaron los pentasacáridos conocidos como murucoidinas III y V, así como tres glicolípidos novedosos denominados murucoidinas XVII a XIX. Cuyos núcleos oligosacáridos corresponden a los ácidos operculínico A y simónico B, estos núcleos concuerdan con los reportados previamente para esta especie arborescente.
- En tanto que en *I. wolcottiana* se identificó el glicolípido conocido como intrapilosina VII aislado inicialmente en *i. intrapilosa*, además de cuatro compuestos novedosos nombrados wolcotinosidos I a III y la wolcotina I, la cual corresponde a un homodímero del ácido operculínico A. Los núcleos oligosacáridos de los monómeros, fueron identificados como los ácidos operculínicos A y B (pentasacáridos), así como el ácido operculínico C (tetrasacárido).
- La caracterización estructural de estos metabolitos se realizó por técnicas espectroscópicas unidimensionales (RMN ^1H y ^{13}C) y bidimensionales (RMN: COSY, TOCSY, HMBC y HSQC), así como por técnicas espectrométricas (EM-FAB modalidad negativa), permitiendo establecer las estructuras de:

Murucoidina XVII: éster intramolecular 1,3'' de *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-(2*S*)-2-metilbutanoil,3-*O*-cinamoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico.

Murucoïdina XVIII: éster intramolecular 1,2'' de *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[[4-*O*-(2*S*)-2-metilbutanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-*O*-octanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanico.

Murucoïdina XIX: éster intramolecular 1,2'' de *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[[4-*O*-acetil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-*O*-(2*S*)-2-metilbutanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanico.

Wolcotinósido I: Éster intramolecular 1,3'' de *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[4-*O*-octanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[2-*O*-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanico.

Wolcotina I: Éster intramolecular 1,3'' de 11-*O*-[4-*O*-11*S*-hidroxihexadecanoil]-11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil,3-*O*-cinamoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[2-*O*-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido]- *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil,3-*O*-cinamoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-[2-*O*-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanico.

Wolcotinósido II: Éster intramolecular 1,2'' de *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-decanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanico.

Wolcotinósido III: Éster intramolecular 1,2'' de *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-octanoil- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[2-dodecanoil]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanico.

- Las diferencias estructurales de estos compuestos incluyen los núcleos oligosacáridos (ácidos operculínico A, B y C y ácido simónico B), el número y posición de los residuos acilantes y el sitio de establecimiento de la macrolactona.
- En todos los compuestos, los sitios de esterificación se establecieron en las posiciones C-2 de la segunda unidad de ramnosa (ram') y en C-3 y C-4 de la tercera unidad de ramnosa (ram''); y el sitio de la lactonización de la aglicona se situó en C-2 o C-3 de la primera unidad de ramnosa (ram). Los grupos acilantes identificados correspondieron a los ácidos acético, (2*S*)-metilbutírico, (*E*)-cinámico, *n*-octanóico; *n*-decanóico y *n*-dodecanóico.
- Una característica estructural interesante de todos los glicolípidos purificados de la jalapina de *I. wolcottiana*, es la esterificación de ácido octanóico en la posición C-4 de la tercera unidad de ramnosa (ram'') y de ácido decanóico o dodecanóico en la posición C-2 de la segunda unidad de ramnosa (ram').
- El presente trabajo constituye la primera investigación que determina el potencial modulador antibiótico de las resinas glicosídicas provenientes de la familia Convolvulaceae sobre cepas Gram negativo multifármaco resistentes.
- Se realizaron diversos ensayos *in vitro* con la finalidad de identificar oligosacáridos presentes en las convolvuláceas pertenecientes a las series de las intrapilosinas, las murucoidinas, las orizabinas, las pescapreínas, las tricolorinas y los wolcotinósidos; que poseen potencial como agentes moduladores de la resistencia a diversos agentes antibióticos sobre cepas Gram positivo y negativo, así como la desarrollada por agentes antineoplásicos sobre células de carcinoma de mama humano resistentes (MCF-7/Vin).
- En estudios previos se determinó que los glicolípidos de las series tricolorinas, orizabinas y algunos miembros de la serie murucoidinas (I, VI, VII y XIV) poseen actividad antibacteriana; sin embargo, en la presente investigación, se observó que ninguno de los

metabolitos evaluados, posee actividad antibacteriana sobre las cepas *Staphylococcus aureus* (MIC >128 µg/mL), ni sobre las cepas Gram negativo multifármaco resistentes: *Escherichia coli* Rosetta gami, ni sobre las dos cepas patógenas hospitalarias, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri* (MIC ≥ 512 µg/mL).

- Estos compuestos microbiológicamente inactivos contra *S. aureus*, *E. coli* Rosetta gami, *S. typhi* y *S. flexneri* ejercieron un efecto de potenciación de la tetraciclina, la kanamicina y el cloramfenicol contra las cepas MDR, ya que permitieron el aumento de la sensibilidad de hasta 64 veces de dichos antibióticos al emplear concentraciones de 25 µg/mL.
- Se encontró que tanto el extracto clorofórmico de *Ipomoea wolcottiana*, la fracción primaria VII y algunos de sus glicolípidos constitutivos, potenciaron la actividad de la tetraciclina, la kanamicina y el cloramfenicol sobre cepas MDR Gram negativo en la misma proporción, por lo cual se sugiere que no existe un efecto aditivo entre dos o más glicolípidos que genere un aumento sustancial en la actividad moduladora.
- Se determinó que estos metabolitos anfipáticos no poseen actividad citotóxica (CI₅₀> 15 µg/mL), frente a las líneas de carcinoma epidermoide oral humano (KB), carcinoma laríngeo (Hep-2) y carcinoma cervical (Hela), carcinoma humano de colon (HCT-15), carcinoma humano de mama (MCF-7). Sin embargo, permitieron disminuciones significativas en la CI₅₀ de la vinblastina hasta 1096 veces sobre las líneas celulares de carcinoma de mama en presencia (MCF-7/Vin⁺) o ausencia (MCF-7/Vin⁻) de la misma. Modulando por tanto, la actividad citotóxica de la vinblastina de forma más eficaz que la reserpina.
- En términos de la relación entre la estructura química y la actividad moduladora observada, ni el tamaño del anillo de lactona, ni la longitud de la cadena de oligosacáridos fueron determinantes para la potenciación de la actividad. Tampoco el grado, el tipo o la posición de acilación en el núcleo oligosacárido tienen una clara influencia en la actividad de estos compuestos.

- Se han descubierto pocos inhibidores de las bombas de extrusión de origen vegetal, por lo que los glicolípidos no citotóxicos obtenidos de las convolvuláceas pueden tener un potencial como nuevos prototipos fitofarmacéuticos.
- El uso de estos metabolitos en terapias de combinación como moduladores de la resistencia farmacológica, podría facilitar la reintroducción de antibióticos y agentes antineoplásicos ineficaces en uso clínico para el tratamiento de enfermedades causadas por cepas MDR.
- Actualmente, se desconoce el mecanismo molecular por el cual las bombas de extrusión tienen la capacidad de reconocer fármacos de estructura química diversa, y aunque se ha demostrado que la reserpina es un potente inhibidor de las bombas de extrusión, se desconoce también el mecanismo mediante el cual revierte el fenotipo de multifármaco resistencia. Sin embargo, se sugiere que debido a su naturaleza anfipática, los glicolípidos pueden formar complejos agregados o micelas que al fundirse con la bicapa lipídica de la membrana celular dan lugar a la formación de poros no selectivos que alteran la homeostasis celular.

Perspectivas

Debido a complicaciones técnicas y falta de reproducibilidad en el método fluorométrico desarrollado con Rodamina 123 para determinar la inhibición del transporte extracelular en la cepa *Escherichia coli* Rosetta gami, se ha diseñado un nuevo procedimiento metodológico mediante citometría de flujo para su implementación a corto plazo.

9. Publicación y presentaciones en congresos

Publicación:

- Corona-Castañeda B, Pereda-Miranda R. Morning glory resin glycosides as modulators of antibiotic activity in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Planta Medica*. 2012; 78(2): 128-131. doi: 10.1055/s-0031-1280292.

Presentación en congresos:

- Corona-Castañeda B, Pereda-Miranda R. Morning glory resin glycosides as modulators of antibiotic activity in multidrug-resistant gram-negative bacteria. En: The 52nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. San Diego, California, EE.UU, 2011.
- Corona-Castañeda B, Pereda-Miranda R. Glycolipids from *Ipomoea murucoides* as modulators of antibiotic activity in multidrug-resistant strains. En: The 53rd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. Nueva York, EE.UU, 2012.

10. Referencias

1. Harvey A, 2008. Natural products in drug discovery. *Drug Discov. Today*. 13, 894-901.
2. Pereda-Miranda R, Bah M, 2003. Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 111-131.
3. Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J, 2010. Resin glycosides from the morning glory family, in: Kinghorn A, Falk H, Kobayashi J, (Eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Vol. 92. Wien: Springer Verlag, 77-153.
4. Stavri M, Piddock L, Gibbons S, 2007. Bacterial efflux pump inhibitors from natural sources. *J. Antimicrob. Chemother.* 59, 1247-1260.
5. Nikaido H, Pagès M, 2012. Broad-specificity efflux pumps and their role in multidrug resistance of Gram negative bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 340-363.
6. Chérigo L, Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Jacobo-Herrera N, Kaatz G, Gibbons S, 2008. Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 71, 1037-1045.
7. Chérigo L, Pereda-Miranda R, Gibbons S, 2009. Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomoea murucoides*. *Phytochemistry*. 70, 222-227.
8. Pereda-Miranda R, Kaatz G, Gibbons S, 2006. Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* 69, 406-409.
9. Escobedo-Martínez C, Cruz-Morales S, Fragoso-Serrano M, Mukhlesur M, Gibbons S, Pereda-Miranda R, 2010. Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*, from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry*. 71, 1796-1801.
10. Corona-Castañeda B, Pereda-Miranda R, 2012. Morning glory resin glycosides as modulators of antibiotic activity in multidrug-resistant Gram negative bacteria. *Planta Med.* 78, 128-131.
11. Figueroa-González G, Jacobo-Herrera N, Zentella-Dehesa A, Pereda-Miranda R, 2012. Reversal of multidrug resistance by morning glory resin glycosides in human breast cancer cells. *J. Nat. Prod.* 75, 93-97.
12. Trease GE, Evans WC, 2002. *Pharmacognosy*. 15th ed. WB Saunders, Edinburgo, pp. 288.
13. Cronquist A, 1981. *An integrated system of classification of flowering plants*. Columbia University Press. New York. pp. 895-898.
14. McDonald A, 1991. Origin and diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Inst. Biol. Univ. Autón. México, Sec. Bot.* 62, 65-82.
15. Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Escalante-Sánchez E, Hernández-Carlos B, Linares E, Bye R, 2006. Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *J. Nat. Prod.* 69, 1460-1466.
16. León I, Mirón G, Alonso D, 2006. Characterization of pentasaccharide glycosides from the roots of *Ipomoea arborescens*. *J. Nat. Prod.* 69, 896-902.
17. Bah M, Chérigo L, Cardoso Taketa A, Fragoso-Serrano M, Hammond G, Pereda-Miranda R, 2007. Intrapilosins I-VII, pentasaccharides from the seeds of *Ipomoea intrapilosa*. *J. Nat. Prod.* 70, 1153-1157.
18. Chérigo L, Pereda-Miranda R, 2006. Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 69, 595-599.
19. León I, Enríquez RG, Nieto DA, Alonso D, Reynolds WF, Aranda E, Villa J, 2005.

- Pentasaccharide glycosides from the roots of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 68, 1141-1146.
20. Yin YQ, Wang JS, Luo JG, Kong LY, 2009. Novel acylated lipo-oligosaccharides from the tubers of *Ipomoea batatas*. *Carbohydr. Res.* 344, 466-473.
 21. Escalante-Sánchez E, Rosas-Ramírez D, Linares E, Bye R, Pereda-Miranda R. 2008. Batatinosides II-VI, acylated lipooligosaccharides from the resin glycosides of sweet potato. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9423-9428.
 22. Barnes CC, Smalley MK, Manfredi KP, Kindscher K, Loring H, Sheeley DM, 2003. Characterization of an anti-tuberculosis resin glycoside from the prairie medicinal plant *Ipomoea leptophylla*. *J. Nat. Prod.* 66, 1457-1462.
 23. Ono M, Kubo K, Miyahara K, Kawasaki T, 1989. Operculin I and II, new ether-soluble resin glycosides (“jalapin”) with fatty acid ester groups from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 37, 241-244.
 24. Ono M, Kawasaki T, Miyahara K, 1991. Resin Glycosides XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII. New ether-soluble resin glycosides of rhizoma jalapae braziliensis (root of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 39, 2534-2539.
 25. Noda N, Takahashi T, Kawasaki T, Miyahara K, Yang CR, 1994. Stoloniferins I-VII, resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry.* 36, 365-371.
 26. Kitagawa I, Ohashi K, In N, Sakagami M, Yoshikawa M, Shibuya H, 1997. Indonesian medicinal plants. XIX. Chemical structures of four additional resin-glycosides, mammosides A, B, H1 and H2, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 45, 786-794.
 27. Ono M, Kuwabata K, Kawasaki T, Miyahara K, 1992. Resin Glycosides XVI. Quamoclins I-IV, new ether-soluble resin glycosides (jalapin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2674-2680.
 28. Noda N, Tsuji K, Miyahara K, Yang CR, 1994. Resin glycosides XXI. Tuguajalapins I-X, the resin glycosides having long-chain fatty acid groups from the root of *Merremia hungaiensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 2011-2016.
 29. Ono M, Fukuda H, Murata H, Miyahara K, 2009. Resin glycosides from the leaves and stems of *Ipomoea digitata*. *J. Nat. Med.* 63, 176-180.
 30. Castañeda-Gómez J, Pereda-Miranda R, 2011. Resin glycosides from the herbal drug jalap (*Ipomoea purga*). *J. Nat. Prod.* 74, 1148-1153.
 31. Ono M, Kawasaki T, Miyahara K, 1989. Resin glycosides. V. Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the ether-soluble crude resin glycosides (“jalapin”) from rhizoma jalapae brasiliensis (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 37, 3209-3213.
 32. Ono M, Fujimoto K, Kawata M, Fukunaga T, Kawasaki T, Miyahara K, 1992. Resin glycosides. XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the ether-soluble resin glycosides (“jalapin”) from rhizoma jalapae brasiliensis (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 40, 1400-1403.
 33. Noda N, Takahashi N, Miyahara K, Yang CR, 1998. Stoloniferins VIII-XII, resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry.* 48, 837-841.
 34. Escobedo-Martínez C, Pereda-Miranda R, 2007. Resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *J. Nat. Prod.* 70, 974-978
 35. Noda N, Yoda S, Kawasaki T, Miyahara K, 1992. Resin glycosides XV. Simonins I-V, ether-soluble resin glycosides (jalapins) from the roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chem. Pharm. Bull.* 40, 3163-3168.
 36. Noda N, Horiuchi Y, 2008. The resin glycosides from the sweet potato (*Ipomoea batatas* L.

- Lam.). Chem. Pharm. Bull. 56, 1607-1610.
37. Rosas-Ramírez D, Escalante-Sánchez E, Pereda-Miranda R. 2011. Batatins III-VI, glycolipid ester-type dimers from *Ipomoea batatas*. Phytochemistry. 72, 773-780
 38. Ono M, Ueguchi T, Murata H, Kawasaki T, Miyahara K, 1992. Resin glycosides XVI. Marubajalapins I-VII, new ether-soluble resin glycosides from *Pharbitis purpurea*. Chem. Pharm. Bull. 40, 3169-3173.
 39. Ono M, Ueguchi T, Kawasaki T, Miyahara K, 1992. Resin Glycosides XVII. Marubajalapins VIII-XI, jalapins from the aerial part of *Pharbitis purpurea*. Yakugaku Zasshi. 112, 866-872.
 40. Escalante-Sánchez E, Pereda-Miranda R, 2007. Batatins I and II, ester-type dimers of acylated pentasaccharides from the resin glycosides of sweet potato. J. Nat. Prod. 70, 1029-1034.
 41. Yin Y, Li Y, Kong L, 2008. Pentasaccharide glycosides from the tubers of sweet potato (*Ipomoea batatas*). J. Agric. Food Chem. 56, 2363-2368.
 42. Pereda-Miranda R, Escalante-Sánchez E, Escobedo-Martínez C, 2005. Characterization of lipophilic pentasaccharides from beach Morning Glory (*Ipomoea pes-caprae*). J. Nat. Prod. 68, 226-230.
 43. Tao H, Hao X, Liu J, Ding J, Fang Y, Gu Q, Zhu W, 2008. Resin glycoside constituents of *Ipomoea pes-caprae* (Beach Morning Glory). J. Nat. Prod. 71, 1998-2003.
 44. Meyer V, 1994. Practical high-performance liquid chromatography. 5th ed. J. Wiley. Inglaterra. pp. 5-10.
 45. Kubo Y, Nakatsu T, 1990. Recent examples of preparative-scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. LC-GC. 8, 933-939.
 46. White CA, Kennedy JF, 1986. Oligosaccharides. In: Chaplin MF, Kennedy JF (eds) carbohydrate analysis. A practical approach. IRL Press, Oxford, United Kingdom.
 47. Bah M, Pereda-Miranda R, 1996. Detailed FAB-Mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Tetrahedron. 52, 13063-13080.
 48. Agrawal P, 1992. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. Phytochemistry. 31, 3307-3330.
 49. Duus JO, Gotfredsen CH, Bock K, 2000. Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern methods and limitations. Chem. Rev. 100, 4589-4614.
 50. Savjani J, Gajjar A, Savjani K, 2009. Mechanisms of resistance: useful tool to design antibacterial agents for drug-resistant bacteria. Mini. Rev. Med. Chem. 9, 194-205.
 51. Freixas N, Sopena N, Limón E, Bella F, Matas L, Almirante B, Pujol M. 2012. Surveillance of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in acute care hospitals. Results of the VINCat Program (2008-2010). Enferm. Infecc. Microbiol. Clin. Suppl. 3, 39-42.
 52. Shibata H, Kondo K, Katsuyama R, Kawazoe K, Sato Y, Murakami K, Takaishi Y, Arakaki N, Higuti T. 2005. Alkyl gallates, intensifiers of beta-lactam susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 49, 549-555.
 53. Kaatz GW, Seo SM, Ruble CA, 1993. Efflux-mediated fluoroquinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. Antimicrob. Agents Chemother. 37, 1086-1094.
 54. Hiramatsu K, Cui L, Kuroda M, Ito T, 2001. The emergence and evolution of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. Trends Microbiol. 9, 486-493.
 55. Liu C, Chambers HF, 2003. *Staphylococcus aureus* with heterogeneous resistance to vancomycin: epidemiology, clinical significance, and critical assessment of diagnostic methods. Antimicrob. Agents Chemother. 47, 3040-3045.
 56. Tsiodras S, Gold HS, Sakoulas G, Eliopoulos GM, Wennersten C, Venkataraman L,

- Moellering RC, Ferraro MJ, 2001. Linezolid resistance in a clinical isolate of *Staphylococcus aureus*. *Lancet*. 358, 207-208.
57. Eliopoulos G, 2008. Antimicrobial resistance in the Enterococcus, in: Wax R, Lewis K, Salyers A, Taber H, (Eds.), *Bacterial resistance to antimicrobials*, 2nd ed. CRC Press: Boca Raton, pp. 255-289.
58. Li XZ, Nikaido H, 2009. Efflux-mediated drug resistance in bacteria: an update. *Drugs* 69,1555-1623.
59. Isturiz R, 2008. Global resistance trends and the potential impact on empirical therapy. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 32, S201-S206.
60. Summers W, 2008. Microbial drug resistance: A historical perspective, in: Wax R, Lewis K, Salyers A, Taber H, (Eds.), *Bacterial resistance to antimicrobials*, 2nd ed. CRC Press: Boca Raton, pp. 1-10.
61. Madigan MT, Martinko JM, Parker J, 2008. *Biología de los microorganismos*. 8^a ed. Prentice Hall Iberia, Madrid, pp. 414-419.
62. Nikaido H, 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119-146.
63. Tenover F, 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control*. 34(5 Suppl 1): S3-10.
64. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK, 2004. *Farmacología*. 5^a ed. Elsevier. España, pp. 620-653.
65. Hooper DC, 2008. Target modification as a mechanism of antimicrobial resistance, in: Wax R, Lewis K, Salyers A, Taber H, (Eds.), *Bacterial resistance to antimicrobials*, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, pp. 133-167.
66. Taber H, 2008. Antibiotic permeability. in: Wax R, Lewis K, Salyers A, Taber H, (Eds.), *Bacterial resistance to antimicrobials*, 2nd ed. CRC Press: Boca Raton, pp. 169-182.
67. Lewis K, 1994. Multidrug resistance pumps in bacteria: variations on a theme. *Trends. Biochem. Sci.* 19, 119-123.
68. Paulsen I, Brown M, Skurray R, 1996. Proton-dependent multidrug efflux systems. *Microbiol. Rev.* 60, 575-608.
69. Lomovskaya O, Zgurskaya H, Bostian K, Lewis K, 2007. Multidrug efflux pumps: structure, mechanism, and inhibition. In: Wax R, Lewis K, Salyers A, Taber H, (Eds.) *Bacterial resistance to antimicrobials*, 2nd ed. Boca Raton, CRC Press, pp. 45-182.
70. Sánchez P, 2003. Sistemas MDR y resistencia a los antimicrobianos. *Rev. Esp. Quimioterap.* 16, 172-187.
71. Piddock LJ, 2006. Clinically Relevant Chromosomally Encoded Multidrug Resistance Efflux Pumps in Bacteria. *Clin. Microbiol. Rev.* 19, 382-402.
72. Piddock LJ, 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance: an update 1994-1998. *Drugs*. 58 Suppl 2:11-18.
73. Zgurskaya H, 2009. Multicomponent drug efflux complexes: architecture and mechanism of assembly. *Future. Microbiol.* 4, 912-932.
74. Breier A, Gibalova L, Seres M, Barancik M, Sulova Z, 2012. New insight into P-Glycoprotein as a drug target. *Anticancer Agents Med. Chem.* In press.
75. Bah M, Pereda-Miranda R, 1997. Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*. 53, 9007-9022.
76. Kieboom J, de Bont J, 2001. Identification and molecular characterization of an efflux system involved in *Pseudomonas putida* S12 multidrug resistance. *Microbiology*. 147, 43-51.
77. Pereda-Miranda R, Hernández-Carlos B, 2002. HPLC isolation and structural elucidation of

- diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron*. 58, 3145-3154.
78. Gibbons S, 2008. Phytochemicals for bacterial resistance-strengths, weaknesses and opportunities. *Planta Med.* 74, 594-602.
79. Savoia D, 2012. Plant-derived antimicrobial compounds: alternatives to antibiotics. *Future Microbiology*. 7, 979-990.
80. Gibbons S, Oluwatuyi M, Kaatz GW, 2003. A novel inhibitor of multidrug efflux pumps in *Staphylococcus aureus*. *J. Antimicrob. Chemother.* 51, 13-17.
81. Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR. 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* 82, 1107-1112.
82. Vichai V, Kirtikara K. 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112-1116.
83. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana: http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/flora2.php?l=4&t=&po=&id=6352&clave_region=31
84. Cruz-Morales S, Castañeda-Gómez J, Figueroa-González G, Mendoza-García AD, Lorence A, Pereda-Miranda R, 2012. Mammalian multidrug resistance lipopentasaccharide inhibitors from *Ipomoea alba* seeds. *J. Nat. Prod.* 75, 1603-1611.
85. Markham PN, Westhaus E, Klyachko K, Johnson ME, Neyfakh AA, 1999. Multiple novel inhibitors of the NorA multidrug transporter of *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43, 2404-2408.
86. Neyfakh AA, 1992. The multidrug efflux transporter of *Bacillus subtilis* is a structural and functional homolog of the *Staphylococcus* NorA protein. *Antimicrob. Agents Chemother.* 36, 484-485.