

00582



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA

Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de dos miembros representativos del complejo mexicano de jalapas, especies de Convolvuláceas con propiedades purgantes, como una evidencia para distinguir entre la auténtica raíz de jalapa y sus adulterantes.

Tesis
Que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas
(Farmacia)
Presenta

M. en C. Beatriz Hernández Carlos

Asesor: Dr. Rogelio Pereda Miranda

286468

México, D. F.

2000



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.

El presente trabajo se hizo en el laboratorio 123 del edificio E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Agradecimientos:

El logro de este trabajo sólo se ha alcanzado gracias al apoyo de las siguientes instituciones y personas a las que deseo expresar mi más sincero reconocimiento:

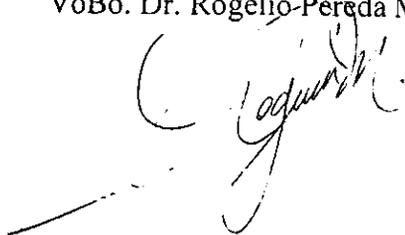
- ◆ Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN205197).
- ◆ Dirección General de Estudios de Posgrado UNAM (PADEP 5301, PAEP207341 y 20705).
- ◆ Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (400313-S-25118-N y Beca escolar).
- ◆ Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM quién proporcionó la muestra vegetal de *Ipomoea orizabensis*.
- ◆ Dr. Thor Arnason de la Universidad de Ottawa, Canadá por el registro de algunos FAB-MS modo positivo.
- ◆ Al I.Q. Francisco Sosa Vázquez quién hizo las secuencias de degradación química en la caracterización del núcleo oligosacárido principal de *Ipomoea orizabensis*.
- ◆ A la Q.F.B. Harlem Cruz Bailón y al Q.F.B. Oscar García Yañez por efectuar las secuencias de degradación en la caracterización de los ésteres púrgicos A y B.
- ◆ Por la asistencia en la determinación de las rotaciones ópticas de los compuestos aislados, al Dr. Carlos Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV).
- ◆ A la Q.F.B. Graciela Chávez Alvarez y a la Q.F.B. Marisela Gutiérrez de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM por el registro de las rotaciones ópticas.

- ◆ En la determinación de los espectros de RMN: a los M. en C. Atilano Gutierrez de la Universidad Autónoma Metropolitana, M en C. Isabel Chavéz y M. en C. Beatriz Quiroz del Instituto de Química de la UNAM y de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), UNAM, al Q.F.B. Oscar Yañez y a la M. en C. Rosa Isela del Villar.
- ◆ A la M. en C. Georgina Duarte y al M. en C. José Luis Gallegos de la USAI UNAM, por el registro de los espectros de masas EI-MS y FAB-MS alta y baja resolución.
- ◆ A la Dra. María Luisa Villarreal del Centro de Investigación Biomédica del Sur (CIBIS) del Instituto Mexicano del Seguro Social por la evaluación de la actividad citotóxica de los glicolípidos de *Ipomoea orizabensis*.
- ◆ A los Doctores John M. Pezzuto y Hee-Byung Chai de la Universidad de Illinois, Chicago por la asistencia en las evaluaciones citotóxicas efectuadas en la Facultad de Química de la UNAM.
- ◆ A la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología (UPIBI) del Instituto Politécnico Nacional (beca COTEPABE).

Abstracts

The present work describes a comparative chemical study among the constituents of the roots of *Ipomoea orizabensis* (Pelletan) Steud. Ex Ledanois (*I. tyrianthinae* Lindley) and *Ipomoea purga* (Wender) Hayne. The roots of *I. purga* (jalap roots) are widely valued in folk medicine as a purgative agent due to its high contents of resin glycosides. The increased demand for jalap promoted the substitution of *I. purga* with other species of the jalap medicinal plant complex, e. g. Mexican escammony, a less potent species and hence its common name of false jalap. In the first part of this study, orizabins V-XXI (3-19) were isolated as new natural products together with scamonins I (1) and II (2) from the jalapin (chloroform-soluble resin) of *I. orizabensis*. The cytotoxic activity of the orizabins V-XXI (7-19) was significant. All compounds have the same oligosaccharide core, (11*S*)-11-[*O*-6-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-6-deoxy- β -D-glucopyranoside]-hydroxyhexadecanoic acid. The convolvulin (methanol-soluble resin) of *I. purga* was partitioned and the fractions showed a significant cytotoxic. The chemical study of the convolvulin major fraction allowed the characterization of two novel glycosidic esters, purgic esters A (26) and B (27) as the products of alkaline hydrolysis of the resin glycosides mixture followed by treatment with diazomethane. The structures of purgic esters A and B were very similar. They are non-linear hexasaccharides with the same glycosidation sequence but different aglycon (jalapinic or convolvulinic acid). Purgic ester A, the major constituent, had convolvulinic acid, (11*S*)-11-hydroxyhexadecanoic acid, while purgic ester B was an oligosaccharide of jalapinic acid, (11*S*)-hydroxytetradecanoic acid. The structures of the oligosaccharides cores of the resins from the roots of *I. purga* were characterized as (11*S*)-11{-*O*-6-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-6-deoxy- β -D-glucopyranoside}-hydroxytetradecanoic (26) and hydroxyhexadecanoic (27) methyl esters.

VoBo. Dr. Rogelio Pereda Miranda



Resumen.

La presente investigación forma parte del proyecto "Desarrollo de los oligosacáridos biodinámicos de especies selectas de las convolvuláceas como agentes terapéuticos y agroquímicos" que se conduce en la Facultad de Química de la UNAM. En esta investigación, se efectuó un estudio químico comparativo entre los constituyentes de las resinas glicosídicas de las raíces de *Ipomoea orizabensis* (Pelletan) Steud. Ex Ledanois (*Ipomoea tyrianthinae* Lindley) y de *Ipomoea purga* (Wender) Hayne. La importancia del presente estudio se fundamentó en el hecho de que la raíz de *I. purga*, conocida como "raíz de jalapa", es una materia prima muy estimada en la medicina tradicional mexicana por sus efectos purgantes. Durante su comercialización, esta planta es substituida o alterada por especies similares con menor actividad purgante. Identificándose un complejo de plantas medicinales conocido con el nombre popular de jalapas y una de estas jalapas falsas es la raíz de la escamonea mexicana (*Ipomoea orizabensis* o *Ipomoea tyrianthinae*).

En la primera parte del estudio se obtuvieron veintiún glicolípidos de la jalapina (porción de la resina soluble en éter) de *I. orizabensis* (*I. tyrianthinae*). La purificación de estos metabolitos se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta presión e incluyó el uso de columnas de fase inversa (C₁₈, amino) y la aplicación de las técnicas cromatográficas de sobrecarga de columna, corte de núcleo y reciclaje de la muestra. De los compuestos obtenidos, se caracterizaron a las orizabinas V-XXI (3-19) como nuevos productos naturales y a las escamoninas I (1) y II (2). Todas las resinas glicosídicas aisladas a partir de la escamonea mexicana presentaron el mismo núcleo oligosacárido, el cual se caracterizó como un tetrasacárido lineal del ácido jalapínico: el ácido (11S)-11-

[O-6-desoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-glucopiranosido]-hidroxihexadecanoico. Esta secuencia de glicosidación correspondió a la descrita para los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de *Convolvulus scammoniae*, el representante europeo de mayor importancia comercial del complejo de plantas purgantes agrupadas bajo el nombre de "escamonea".

Las orizabinas V–VIII (3–6) se encontraron esterificadas en dos posiciones, mientras que las orizabinas IX–XXI (7–19) en tres, con residuos que corresponden a los siguientes ácidos orgánicos: 2-metilbutanoico (mb), 3-hidroxi-2-metilbutanoico (nilico, nl), 2-metilpropanoico (ib) y 2(*E*)-metilbutanoico (tiglico, tg). Sólo uno de los compuestos aislados, la orizabina VIII (6), presentó un modo de lactonización diferente al resto de los constituyentes de esta serie en la unidad de la aglicona (ácido jalapινόlico), el C-3 de la glucosa. Se caracterizaron tres grupos de compuestos diastereoisoméricos, las orizabinas X–XIII (8–11), las orizabinas XIV–XVII (12–15) y las orizabinas XVIII–XXI (16–19), cuyas diferencias estructurales fueron la localización y la configuración absoluta del grupo niloilo perteneciente a la serie *treo* 2*S*,3*S* ó 2*R*,3*R*.

Se efectuó la evaluación del potencial citotóxico de los compuestos 1–19 en las líneas celulares cancerosas siguientes: colon (HCT-15), cervix celular escamoso (SQC-1 UISO), ovario (OVCAR) y nasofaríngeo (KB). Estas pruebas proporcionaron resultados significativos ($CE_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$) para los glicolípidos de mayor lipofilicidad (7–19).

En el estudio de *I. purga* se determinó la actividad citotóxica de la convolvulina (porción de la resina insoluble en éter) y de cada una de las fracciones obtenidas a partir de un fraccionamiento primario en columna de gel de sílice. Los resultados demostraron

un importante potencial citotóxico para los glicolípidos que se encuentran presentes en estas mezclas ($CE_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$). La fracción mayoritaria, que desarrolló una mayor actividad citotóxica, se saponificó y esterificó para obtener los ésteres púrgicos A (**26**) y B (**27**). Estos compuestos son hexasacáridos ramificados con la misma secuencia de glicosidación, siendo la única diferencia entre ellos la longitud de la cadena del ácido graso que representa la aglicona. Así, el componente mayoritario (éster púrgico A) presentó como aglicona al ácido convolvulínico, ácido (11*S*)-11-hidroxitetradecanoico, y el minoritario (éster púrgico B) al ácido jalapínico, ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico. Los núcleos oligosacáridos de la convolvulina de la raíz de *I. purga* correspondieron a los ésteres metílicos de los ácidos (11*S*)-11{-*O*-6-desoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-glucopiranosido}-hidroxitetra-decanoico (**26**) y (11*S*)-11{-*O*-6-desoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-glucopiranosido}-hidroxihexa-decanoico (**27**).

La caracterización estructural de los glicolípidos naturales y de sus derivados sintetizados se realizó mediante la aplicación de métodos espectrométricos (EI-MS y FAB-MS) y espectroscópicos (Resonancia Magnética Nuclear) de alta resolución.

Abstracts

This work is part of the project "Investigation of the biodinamic oligosaccharides from select convolvulaceae species as therapeutical and agrochemical agents" which is carried out at the School of Chemistry, National University of Mexico. The present work describes a comparative chemical study among the constituents of the roots of *Ipomoea orizabensis* (Pelletan) Steud. Ex Ledanois (*I. tyrianthinae* Lindley) and *Ipomoea purga* (Wender) Hayne. The roots of *Ipomoea purga* (jalap roots) are widely valued in folk medicine as a purgative agent due to its high contents of resin glycosides. The increased demand for jalap promoted the substitution of *I. purga* with other species of the jalap medicinal plant complex, e. g. Mexican escammony, a less potent species and hence its common name of false jalap.

In the first part of this study, the isolation and structural elucidation of the glycosides from the jalapin (chloroform-soluble resin) of *I. orizabensis* is described. Orizabins V-XXI (3-19) were isolated as new natural products, together with scamonins I (1) and II (2). All resin glycosides were subject to cytotoxic evaluation in colon carcinoma (HCT-15), squamous cell cervical carcinoma (SQC-1 UISO), nasopharyngeal carcinoma (KB) and ovarian cancer (OVCAR). The cytotoxic activity of the orizabins V-XXI (7-19) was significant. The isolation and purification of these closely structural related compounds were done through inverse phase columns (C₁₈, amino) and recycle mode in the chromatographic system. All compounds have the same oligosaccharide core, (11S)-11-[O-6-deoxy-β-D-glucopyranosyl-(1 → 4)-O-6-deoxy-α-L-mannopyranosyl-(1 → 2)-O-β-D-gluco-pyranosyl-(1 → 2)-6-deoxy-β-D-glucopyranoside]-

hydroxyhexadecanoic acid. The site of lactonization in the oligosaccharide was the same in all compounds except for the orizabin VIII (6). The differences among the isolated glycolipids were the number and the position of the acid residues that support the oligosaccharide core. These residues were identified as 2-methylbutanoic, 3-hydroxy-2-methylbutanoic (nilic), 2(*E*)-methylbutenoic (tiglic) and 2-methylpropanoic acids. The orizabins V–VIII (3–6) had two residues, while the others presented three. Orizabins IX–XXI (7–19) were found to be present as enantiomeric pairs of *threo* niloyl group: 2*R*,3*R* and 2*S*,3*S*.

The convolvulin (methanol-soluble resin) of *Ipomoea purga* was partitioned and the fractions showed a significant cytotoxic activity ($CE_{50} < 5 \mu\text{g/L}$) against HCT-15, SQC-1 UISO and KB cell lines. The chemical study of the convolvulin major fraction allowed the characterization of two novel glycosidic esters, purgic esters A (26) and B (27) as the products of alkaline hydrolysis of the resin glycosides mixture followed by treatment with diazomethane. The structures of purgic esters A and B were very similar. They are non-linear hexasaccharides with the same glycosidation sequence but different aglycon (jalapinic or convolvulinic acid). Purgic ester A, the major constituent, had convolvulinic acid, (11*S*)-11-hydroxyhexadecanoic acid, while purgic ester B was an oligosaccharide of jalapinic acid, (11*S*)-hydroxytetradecanoic acid. The structures of the oligosaccharides cores of the resins from the roots of *I. purga* were characterized as (11*S*)-11{-*O*-6-deoxy- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopyranosyl-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopyranosyl-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-deoxy- α -L-mannopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glu-copyranosyl-

(1→2)-6-deoxy-β-D-glucopyranoside}-hydroxytetradecanoic (26) and hydroxyhexadecanoic (27) methyl esters.

The structure elucidation of all natural glycolipids and their derivatives was achieved by high resolution spectrometric (EI-MS and FAB-MS) and spectroscopic (NMR) techniques.

| Indice | Página |
|--|-----------|
| Lista de figuras..... | i |
| Lista de cuadros..... | vi |
| Lista de espectros..... | viii |
| Prólogo..... | x |
| 1. Antecedentes..... | 1 |
| 1.1. La familia Convolvulácea y el género <i>Ipomoea</i> | 1 |
| 1.2. Las resinas glicosídicas en la familia Convolvulácea..... | 3 |
| 1.3. Estudios fitoquímicos de <i>Ipomoea orizabensis</i> e <i>Ipomoea purga</i> | 16 |
| 2. Hipótesis..... | 19 |
| 3. Objetivos..... | 21 |
| 4. Parte experimental..... | 23 |
| 4.1. Determinación de las constantes físicas..... | 23 |
| 4.2. Métodos cromatográficos..... | 23 |
| 4.3. Material vegetal..... | 24 |
| 4.4. Obtención de las resinas glicosídicas: jalapina y convolvulina..... | 25 |
| 4.5. Separación y purificación de los glicolípidos de la jalapina de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 27 |
| 4.5.1. Obtención de las escamoninas I (1) y II (2) y de las orizabinas V- VIII (3-6)..... | 27 |
| 4.5.2. Obtención de las orizabinas IX-XXI (7-19)..... | 30 |
| 4.6. Preparación de derivados de la jalapina de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 35 |
| 4.6.1. Hidrólisis alcalina de las orizabinas V-XXI (7-19)..... | 35 |
| 4.6.1.2. Determinación de la configuración absoluta de los ácidos 2- metilbutanoico y 3-hidroxi-2-metilbutanoico..... | 36 |
| 4.6.1.2.1. Preparación de los ésteres de Mosher del nilato de <i>p</i> -bromofenacilo. | 38 |
| 4.6.2. Acetilación de la orizabina VIII (6) y de las subfracciones E y F..... | 39 |
| 4.6.2.1. Separación de los compuestos 20-25 mediante CLAP..... | 40 |
| 4.7. Preparación de derivados a partir de la convolvulina de <i>Ipomoea</i> <i>purga</i> | 41 |

| | | |
|------------|---|-----|
| 4.7.1. | Hidrólisis básica de las fracciones I-VII..... | 41 |
| 4.7.2. | Hidrólisis ácida de los ésteres púrgicos A (26) y B (27)..... | 41 |
| 4.7.2.1. | Análisis de los carbohidratos presentes en 26 y 27 mediante CLAP.. | 42 |
| 4.7.3. | Reacciones de esterificación..... | 43 |
| 4.7.3.1. | Generación del diazometano..... | 43 |
| 4.7.3.2. | Esterificación de G1..... | 43 |
| 4.7.3.2.1. | Separación y purificación de los derivados esterificados (26-28)..... | 43 |
| 4.7.3.3. | Esterificación de los ácidos jalapινόico y convolvulínico..... | 45 |
| 4.7.3.3.1. | Purificación mediante CLAP del convolvulinato (31) y jalapinolato (32) de metilo..... | 45 |
| 4.7.4. | Reacciones de acetilación de 27 y 28..... | 46 |
| 4.7.4.1 | Purificación de 29 y 30..... | 46 |
| 4.7.5. | Reacciones de sililación..... | 46 |
| 4.7.6. | Preparación de los ésteres de Mosher de 31 y 32..... | 47 |
| 4.8. | Prueba de citotoxicidad..... | 49 |
| 5. | Resultados y discusiones | 51 |
| 5.1. | Estudio fitoquímico de la raíz de <i>Ipomoea orizabensis</i> (<i>Ipomoea tyrianthinae</i>)..... | 51 |
| 5.1.1. | Separación de las escamoninas I (1) y II (2) y las orizabinas V-VIII (3-6)..... | 55 |
| 5.1.2. | Separación de las orizabinas IX-XXI (7-19)..... | 57 |
| 5.1.3. | Elucidación estructural de las orizabinas V-VIII (3-6)..... | 63 |
| 5.1.4. | Elucidación estructural de las orizabinas IX-XXI (7-19)..... | 77 |
| 5.1.4.1. | Análisis de los residuos niloilo y metilbutiroilo..... | 105 |
| 5.1.5. | Actividad citotóxica de las escamoninas I (1) y II (2) y las orizabinas V-XXI (3-19)..... | 113 |
| 5.2. | Análisis fitoquímico de la raíz de <i>Ipomoea purga</i> | 117 |
| 5.2.1. | Obtención de los ésteres glicosídicos de la convolvulina..... | 117 |
| 5.2.2. | Análisis de los carbohidratos presentes en los ésteres púrgicos A (26) y (27)..... | 119 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 5.2.3. | Análisis de las agliconas de los ésteres púrgicos A (31) y B (32)..... | 121 |
| 5.2.4. | Elucidación estructural de los ésteres glicosídicos constitutivos de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> | 123 |
| 6. | Conclusiones | 163 |
| 7. | Apéndice | 165 |
| 8. | Bibliografía | 177 |
| 9. | Espectros | 187 |

Lista de figuras

| | Página |
|---|---------------|
| Figura 1. Distribución del género <i>Ipomoea</i> en México..... | 2 |
| Figura 2. Orizabinas I–IV aisladas de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 5 |
| Figura 3. Ácidos operculínicos A y C..... | 6 |
| Figura 4. Ácido simónico B, núcleo oligosacárido presente en <i>Ipomoea batatas</i> e <i>Ipomoea stolonifera</i> | 6 |
| Figura 5. Ácido escamónico A de <i>Ipomoea stans</i> y ácido orizábico A de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 8 |
| Figura 6. Ácidos glicosídicos obtenidos de los tubérculos de <i>Merremia mammosa</i> (Mamósidos I y J) y de las hojas de <i>Quamoclit x multifida</i> (Ácidos multifidínicos)..... | 10 |
| Figura 7. Ácidos cuscúticos A-D | 11 |
| Figura 8. Ácido cuscútico A ₁ (<i>Cuscuta australis</i>) y Tricolorina G (<i>Ipomoea tricolor</i>)..... | 12 |
| Figura 9. Estructura de las resinas glicosídicas de <i>Exogonium purga</i> Benth de acuerdo con Mannich y Schuman (1938)..... | 13 |
| Figura 10. Estructura de la merremina aislada de <i>Merremia hungaiensis</i> | 14 |
| Figura 11. Estructuras diméricas aisladas de <i>Ipomoea tricolor</i> ; tricolorina H (Superior) e I (Inferior)..... | 15 |
| Figura 12. Cromatograma en capa fina de los eluatos obtenidos durante el fraccionamiento en columna (gel de sílice) de la jalapina de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 26 |
| Figura 13. Cromatografía en placa fina de las fracciones obtenidas de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> y de sus respectivos productos de hidrólisis básica..... | 26 |
| Figura 14. Análisis mediante CLAP de la fracción primaria de la jalapina (FPJ) que constituye la jalapina de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 53 |
| Figura 15. Resolución de la fracción primaria (FPJ) mediante CLAP..... | 54 |
| Figura 16. Cromatograma de la fracción primaria (FPJ) al nivel preparativo..... | 55 |
| Figura 17. Cromatograma de la subfracción C. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la orizabina V (3)..... | 56 |

| | | |
|-------------------|--|----|
| Figura 18. | Cromatograma de la subfracción F..... | 57 |
| Figura 19. | Cromatograma de la subfracción F, utilizando la técnica de reciclaje de la muestra..... | 59 |
| Figura 20. | Cromatograma correspondiente a la resolución de la subfracción F mediante el empleo de una columna C ₁₈ Spherisorb ^R (Waters)..... | 60 |
| Figura 21. | Cromatograma que muestra la resolución de la subfracción I para la purificación de las orizabinas IX–XIII (7–11)..... | 61 |
| Figura 22. | Cromatograma correspondiente a la obtención de las orizabinas X (8) y XI (9) con el empleo de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de muestra..... | 62 |
| Figura 23. | Compuestos aislados de las subfracciones de mayor polaridad (A–D) de la jalapina de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 65 |
| Figura 24. | Espectro de masas FAB (modo negativo) del ácido escamónico A (Sosa–Vasquez, 1993). Patrón de fragmentación propuesto para los tetrasacáridos lineales de las convolvuláceas..... | 66 |
| Figura 25. | Espectro de masas FAB (modo negativo) de la orizabina VIII (6) y el patrón de fragmentación propuesto para este glicolípido..... | 67 |
| Figura 26. | Espectros de RMN ¹ H de la escamonina II (2) y de las orizabinas V–VIII (3–6)..... | 70 |
| Figura 27. | Sección del espectro HMBC de la orizabina VIII (6) utilizado para la asignación de los carbonos carboxílicos (jal, mb y nl) a través de las correlaciones ² J _{C-H} en las unidades que esterifican el núcleo oligosacárido..... | 73 |
| Figura 28. | Sección del espectro HMBC de la orizabina VIII (6) utilizado para la asignación de los carbonos carboxílicos (jal, mb y nl) a través de las correlaciones ³ J _{C-H} con los protones geminales del núcleo oligosacárido..... | 74 |
| Figura 29. | Secciones de campo alto de los espectros RMN ¹ H de la orizabina VIII (6) y su derivado peracetilado (21)..... | 75 |
| Figura 30. | Sección de campo bajo del espectro HMBC del derivado peracetilado de la orizabina VIII (21)..... | 75 |
| Figura 31. | Cromatograma de los derivados peracetilados de la subfracción F..... | 77 |
| Figura 32. | Derivados obtenidos a partir de la acetilación de las subfracciones E (20) y F (22–25)..... | 78 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 33. | Espectros de RMN ^1H de los derivados peracetilados 20 y 22–25 | 80 |
| Figura 34. | Regiones de campo bajo en el espectro de correlación bidimensional heteronuclear $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (HMBC) del derivado 23 | 82 |
| Figura 35. | Glicolípidos obtenidos a partir de la fracción de menor polaridad (F) de la jalapina de <i>Ipomoea orizabensis</i> | 87 |
| Figura 36. | Espectros de RMN ^1H de las orizabinas IX–XIII (7–11)..... | 88 |
| Figura 37. | Regiones a campo bajo en el espectro de correlación bidimensional heteronuclear $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (HMBC) de las orizabinas X (8) y XI (9)..... | 94 |
| Figura 38. | Espectros de RMN ^1H de las orizabinas XIV–XVI (12–15)..... | 96 |
| Figura 39. | Espectros de RMN ^1H de las orizabinas XVIII–XXI (16–19)..... | 97 |
| Figura 40. | Estructuras propuestas para las orizabinas IX–XXI (7–19)..... | 99 |
| Figura 41. | Sección de los espectros de RMN ^{13}C correspondiente a los carbonos anoméricos (C-1) de las orizabinas XVIII (17) y XXI (19)..... | 104 |
| Figura 42. | Nilato de <i>p</i> -bromofenacilo..... | 106 |
| Figura 43. | Modelo para el establecimiento de la configuración absoluta del C- α en alcoholes secundarios mediante la generación de los ésteres de Mosher y el empleo de la RMN ^1H | 107 |
| Figura 44. | Determinación de la configuración absoluta (<i>R</i>) del centro C-3 del éster de Mosher proveniente del nilato presente en la orizabina X (8)..... | 108 |
| Figura 45. | Cromatograma de los ácidos glicosídicos metilados obtenidos a partir de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> | 118 |
| Figura 46. | Análisis mediante CLAP de los carbohidratos presentes en la mezcla de hidrólisis ácida de los ésteres púrgicos A (26) y B (27)..... | 119 |
| Figura 47. | Cromatogramas de los monosacáridos de referencia y coelución con la mezcla problema..... | 120 |
| Figura 48. | Espectro de masas por impacto electrónico (EI, 70eV) y patrón de fragmentación generado por el derivado sililado del éster metílico del ácido convolvulínico (31)..... | 122 |
| Figura 49. | Espectro de masas por impacto electrónico (EI, 70eV) y patrón de fragmentación generado por el derivado sililado del éster metílico del ácido convolvulínico (32)..... | 122 |

| | | |
|-------------------|--|-----|
| Figura 50. | Espectro de RMN ^1H de los ésteres púrgicos A (26) y B (27) y del artefacto del éster púrgico A (28)..... | 124 |
| Figura 51. | Espectros de RMN ^{13}C de los ésteres púrgicos A (26) y B (27) y para el artefacto 28..... | 125 |
| Figura 52. | Sección del espectro COSY para el núcleo oligosacárido del éster púrgico B (27)..... | 126 |
| Figura 53. | Sección del espectro TOCSY para el núcleo oligosacárido del éster púrgico B (27)..... | 127 |
| Figura 54. | Sección del espectro HMBC del éster púrgico A (26)..... | 128 |
| Figura 55. | Secuencias probables de glicosidación para los ésteres púrgicos A (26) y B (27)..... | 130 |
| Figura 56. | FAB-MS modo negativo y patrón de fragmentación de los ésteres púrgicos A (26) y B (27)..... | 131 |
| Figura 57. | Correlaciones $^3J_{\text{C-H}}$ observadas en el espectro HMBC del éster púrgico B (27, $n = 4$)..... | 134 |
| Figura 58. | Sección del espectro HMQC del éster púrgico A (26)..... | 136 |
| Figura 59. | Sección del espectro HMBC del éster púrgico A (26)..... | 137 |
| Figura 60. | Sección del espectro HMBC para la asignación de los carbonos C-4 y C-5 de la fucosa..... | 138 |
| Figura 61. | NOESY y correlaciones observadas del éster púrgico B (27)..... | 139 |
| Figura 62. | Espectros de RMN ^1H de los derivados peracetilados de los ésteres púrgicos A (29) y B (30)..... | 143 |
| Figura 63. | Espectros de RMN ^{13}C de los derivados peracetilados de los ésteres púrgicos A (29) y B (30)..... | 144 |
| Figura 64. | Sección del espectro COSY del derivado peracetilado del éster púrgico A (29)..... | 145 |
| Figura 65. | Sección del espectro HMQC para la región oligosacárida del compuesto 30..... | 146 |
| Figura 66. | Sección del espectro HMBC del compuesto 29..... | 147 |
| Figura 67. | Sección del espectro HMBC del éster púrgico A (29) peracetilado..... | 148 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Figura 68. | Espectro ROESY y correlaciones observadas en el derivado peracetilado del éster púrgico A, (29)..... | 149 |
| Figura 69. | Espectro de masas FAB-MS (modo negativo) del artefacto del éster púrgico A (26)..... | 150 |
| Figura 70. | Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida del derivado 28..... | 151 |
| Figura 71. | Sección del espectro HMBC del compuesto 28..... | 152 |
| Figura 72. | Sección del espectro HMBC del compuesto 28..... | 153 |
| Figura 73. | Sección del espectro NOESY y conectividades observadas en el compuesto 28..... | 158 |
| Figura A1. | Estructura de la soldanelita..... | 165 |
| Figura A2. | DEPT de la soldanelita..... | 166 |
| Figura A3. | Espectro de RMN ¹ H de la soldanellita..... | 167 |
| Figura A4. | Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la soldanelita..... | 171 |
| Figura A5 | Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la soldanelita..... | 172 |
| Figura A6. | Sección del espectro HMBC para la determinación de los sitios de acilación..... | 173 |
| Figura A7 | ROESY de la soldanelita..... | 174 |
| Figura A8. | Sección del espectro ROESY de la soldanelita..... | 175 |
| Figura A9. | Correlaciones observadas en el espectro ROESY para mostrar la orientación del anillo de la ramnosa en la soldanelita..... | 176 |

Lista de cuadros

| | Página |
|--|---------------|
| Cuadro 1. Saponificación de 7-19..... | 35 |
| Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H de las orizabinas V-VIII (3-6)..... | 71 |
| Cuadro 3. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C de las escamoninas I (1), II (2) y las orizabinas V-VIII (3-6)..... | 72 |
| Cuadro 4. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H para la parte oligosacárida de los derivados peracetilados de la orizabina VIII (6), escamonina I (21) y 22-25..... | 83 |
| Cuadro 5. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H para la aglicona y los residuos ácidos de los derivados peracetilados de la orizabina VIII (6), escamonina I (21) y 22-25..... | 84 |
| Cuadro 6. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C de los derivados peracetilados de la orizabina VIII (20), escamonina I (21) y 22-25..... | 85 |
| Cuadro 7. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H para la parte oligosacárida de las orizabinas IX-XIII (7-11)..... | 90 |
| Cuadro 8. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H para la aglicona y los residuos ácidos de las orizabinas IX-XIII (7-11)..... | 91 |
| Cuadro 9. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C de las orizabinas IX-XIII (7-11)..... | 92 |
| Cuadro 10. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H de las orizabinas XIV-XVII (12-15)..... | 100 |
| Cuadro 11. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H de las orizabinas XVIII-XXI (16-19)..... | 101 |
| Cuadro 12. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C de las orizabinas XVIII-XXI (16-19)..... | 102 |
| Cuadro 13. Efectos en el desplazamiento químico (δ) de los núcleos vecinos al centro C-3 de los ésteres de Mosher del nilato de <i>p</i> -bromofenacilo derivados a partir de las orizabinas X (8) y XI (9)..... | 108 |
| Cuadro 14. Actividad citotóxica de las escamoninas I (1) y II (2) y las orizabinas V (1)-XXI (19)..... | 115 |

| | | |
|-------------------|---|-----|
| Cuadro 15. | Actividad citotóxica de las fracciones del extracto metanólico de <i>Ipomoea purga</i> | 117 |
| Cuadro 16. | Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H para los ésteres púrgicos A (26), B (27) y sus correspondientes derivados peracetilados (29 y 30)..... | 140 |
| Cuadro 17. | Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C para la porción oligosacárida de los ésteres púrgicos A (26), B (27) y sus correspondientes derivados peracetilados (29 y 30)..... | 141 |
| Cuadro 18. | Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C para la aglicona de los ésteres púrgicos A (26), B (27) y sus correspondientes derivados peracetilados (29 y 30)..... | 142 |
| Cuadro 19. | Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H del éster púrgico A (26) y el compuesto 28..... | 154 |
| Cuadro 20. | Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C del éster púrgico A (26) y el compuesto 28..... | 155 |
| Cuadro 21. | Acoplamiento C-H (¹ J _{C-H}) presentados por los carbonos anoméricos de los monosacáridos presentes en los compuestos 26-28..... | 159 |
| Cuadro A1. | Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H y ¹³ C de la soldanelita para la porción oligosacárida..... | 169 |
| Cuadro A2. | Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H y ¹³ C de la soldanelita para la aglicona y residuos ácidos..... | 170 |

Lista de espectros

| | Página |
|---|---------------|
| Espectro 1. COSY de la orizabina V (3)..... | 189 |
| Espectro 2. HMBC de la orizabina V (3)..... | 190 |
| Espectro 3. HMBC de la orizabina VI (4)..... | 191 |
| Espectro 4. HMBC de la orizabina VII (5)..... | 192 |
| Espectro 5. COSY de la orizabina VIII (6)..... | 193 |
| Espectro 6. HMBC de la orizabina VI (6)..... | 194 |
| Espectro 7. HMBC de la orizabina IX (7)..... | 195 |
| Espectro 8. HMBC de la orizabina X (8)..... | 196 |
| Espectro 9. HMBC de la orizabina XI (9)..... | 197 |
| Espectro 10. HMBC de la orizabina XII (10)..... | 198 |
| Espectro 11. HMBC de la orizabina XIII (11)..... | 199 |
| Espectro 12. HMBC de la orizabina XIV (12)..... | 200 |
| Espectro 13. HMBC de la orizabina XV (13)..... | 201 |
| Espectro 14. HMBC de la orizabina XVI (14)..... | 202 |
| Espectro 15. HMBC de la orizabina XVII (15)..... | 203 |
| Espectro 16. HMBC de la orizabina XVIII (16)..... | 204 |
| Espectro 17. HMBC de la orizabina XIX (17)..... | 205 |
| Espectro 18. HMBC de la orizabina XX (18)..... | 206 |
| Espectro 19. HMBC de la orizabina XXI (19)..... | 207 |
| Espectro 20. COSY del derivado peracetilado de la escamonina I (20)..... | 208 |
| Espectro 21. HMBC del derivado peracetilado de la escamonina I (20)..... | 209 |
| Espectro 22. COSY del derivado peracetilado de la orizabina VIII (21)..... | 210 |
| Espectro 23. HMBC del derivado peracetilado de la orizabina VIII (21)..... | 211 |
| Espectro 24. COSY del derivado peracetilado 22..... | 212 |
| Espectro 25. COSY del derivado peracetilado 23..... | 213 |
| Espectro 26. COSY del derivado peracetilado 24..... | 214 |
| Espectro 27. HMBC del derivado peracetilado 24..... | 215 |
| Espectro 28. HMBC del derivado peracetilado 25..... | 216 |

| | | |
|---------------------|--|-----|
| Espectro 29. | HMBC del éster púrgico B (27)..... | 217 |
| Espectro 30. | COSY del derivado peracetilado del éster púrgico B (30)..... | 218 |

Prólogo

El descubrimiento de sustancias bioactivas a partir de fuentes naturales como los extractos de plantas ha generado el conocimiento de drogas útiles en la clínica. Se calcula que aproximadamente el 60 % de los agentes antiinfecciosos y antitumorales comerciales y en etapa de desarrollo clínico son de origen natural (Shu, 1998). El presente trabajo se efectuó siguiendo el método de estudio que ha sido usado desde hace tiempo, el cual se inicia con aquellas especies que se sabe tienen antecedentes farmacológicos de acuerdo al conocimiento adquirido en la medicina natural practicada empíricamente. Las especies seleccionadas son sometidas a algún ensayo *in vitro* (actividad antibacteriana, antifúngica, antiviral, antiparasitaria o citotóxica) para asegurar la obtención de sustancias bioactivas. La actividad biológica de estos productos naturales está asociada a las propiedades inherentes de los metabolitos secundarios que tienen diversas funciones, como de defensa y como promotores del crecimiento en sus organismos productores. Es interesante hacer notar que una gran cantidad de estos compuestos se presentan en forma de glicósidos, cuya porción carbohidrato ha demostrado tener un papel importante en los procesos de reconocimiento celular, siendo un ejemplo la participación de la fucosa en procesos cancerosos (Listinsky *et al.*, 1998). La importancia del papel biológico de los carbohidratos se reconoce al igual que la que tienen las proteínas y los ácidos nucleicos, surgiendo así nuevas áreas de estudio como la glicobiología (Reinhold *et al.*, 1995).

El estudio de compuestos que poseen cadenas oligosacáridas en las plantas de la familia Convolvulaceae en nuestro país se inició gracias a los beneficios que se obtienen de las mismas siendo de las primeras especies estudiada la raíz de *Ipomoea stans* por el grupo del Dr. Enríquez del Instituto de Química y por el grupo del Doctor Pereda la raíz

de *Ipomoea tricolor* (Pereda-Miranda *et al.*, 1993; Bah y Pereda-Miranda 1995;1997). Esta última planta es utilizada ampliamente en el Estado de Morelos como cultivo de cubierta al impedir la proliferación de la maleza. El resultado del estudio en *I. tricolor* fué el conocimiento del compuesto mayoritario y responsable de las propiedades alelopáticas, la tricolorina A que ha tenido una trascendencia importante que se refleja en las diversas rutas de síntesis descritas para la misma (Larson y Heathcock 1996; Fürster y Müller 1998; Lu *et al.*, 1997; 1997a), así como en la reciente obtención de su estructura cristalina (Lehmann *et al.*, 2000). Como se aprecia, la naturaleza de estos glicolípidos ha llamado mucho la atención de los químicos para desarrollar estrategias de síntesis nuevas, además de la caracterización estructural, siendo otro ejemplo la síntesis y el estudio conformacional de la calictionina que fue aislada de *Calonyction aculeatum* y es un glicolípido con una estructura muy similar a las encontrados en las plantas de las convolvuláceas (Jiang *et al.*, 1995).

1. Antecedentes

1.1. La familia Convolvuláceae y el género *Ipomoea*.

Dentro de las angiospermas, la familia Convolvulaceae representa una de las más grandes y diversas de México, reportándose quince géneros y aproximadamente 217 especies. En el mundo se estiman alrededor de 40 géneros y 1400 especies, por lo que en nuestro país existe una importante variedad de las especies de convolvuláceas (McDonnald, 1991). El género *Ipomoea* es uno de los mayoritarios con un grado de endemismo de aproximadamente el 65 %, esto es la relación entre el número de especies presentes en México y el número aproximado de especies en el género (104/160). La distribución de estas especies en el país se presenta en la figura 1, de la cual se deduce que el endemismo de *Ipomoea* está concentrado en las regiones subtropicales de la costa del pacífico. Así, en el Estado de Veracruz sólo hay dos especies endémicas, *I. eximia* e *I. purga*, mientras que en un área igual de Jalisco a Oaxaca existen por lo menos 20 especies endémicas. A nivel subgenérico existen complejos de especies que pueden ser caracterizadas por preferencias de hábitat. Por ejemplo, las especies de la serie *Tyrianthinae* están mejor representadas en las praderas y desiertos del Centro y Norte de México.

La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* no presentan una variedad importante en su morfología, siendo que la mayoría de estas plantas son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Existen una cuantas especies como *I. phillomega* e *I. santillanii* que se presentan como lianas tropicales y alcanzan alturas de

hasta 15 metros. Otras especies como *I. imperata* e *I. pescaprae* crecen a iguales longitudes pero han perdido su capacidad de enroscarse creciendo de manera tendida para formar extensas cubiertas sobre arenas costeras. Otras especies de las zonas áridas (*I. stans*, *I. duranguensis* e *I. sescossiana*) son arbustos perennes leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1.0 metro. La especie *I. carnea* existe como un arbusto leñoso tropical que crece de 2 a 4 metros. Otras especies de *Ipomoea* de la serie Arborescentes crecen en forma de árboles de madera suave y alcanzan de 3 a 9 metros de altura.

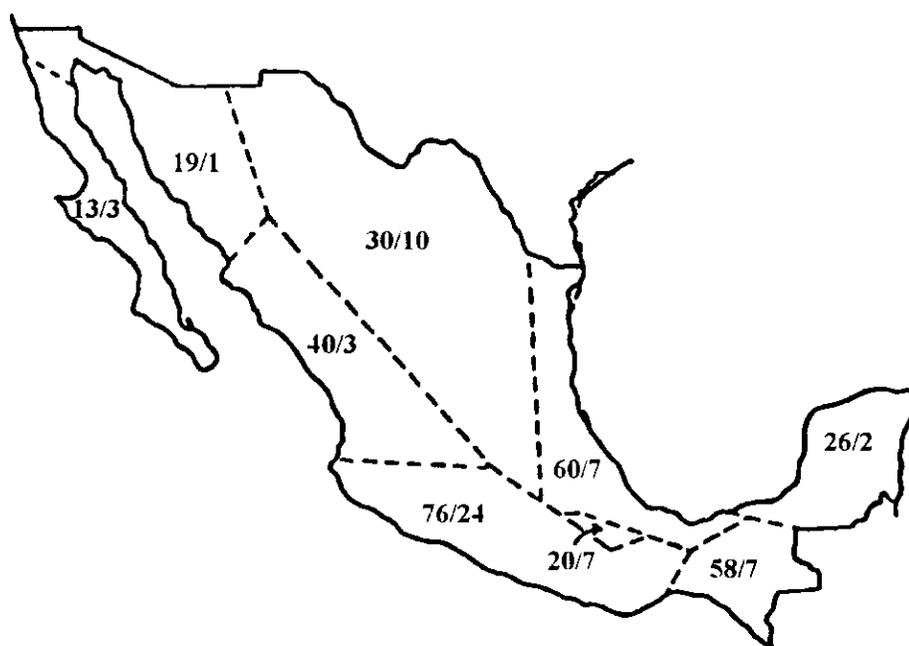


Figura 1. Distribución del género *Ipomoea* en México. El primer número representa el número de especies que existen en cada región y el segundo el número de especies endémicas en la misma.

1.2. Las resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae.

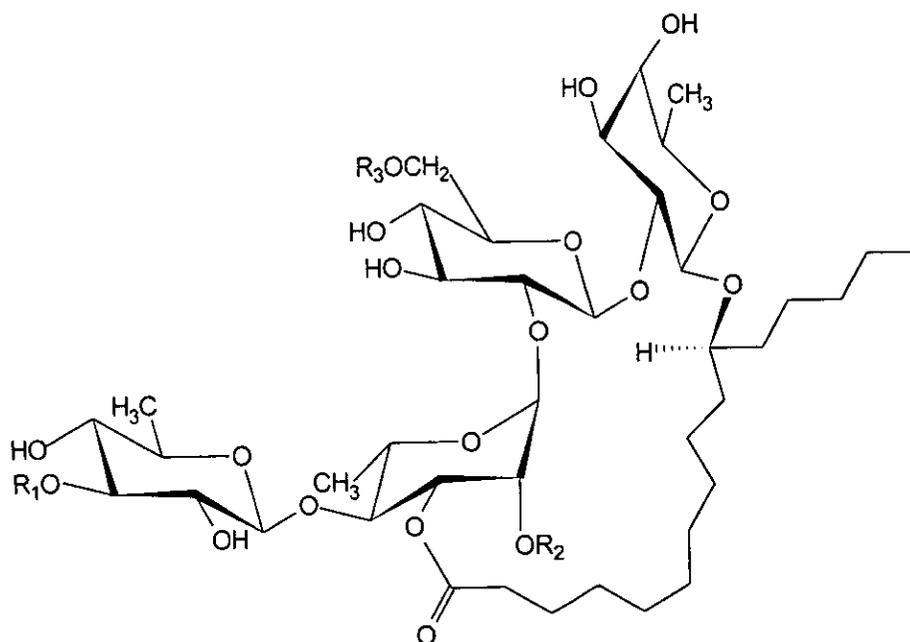
Es bien conocido el uso de estas plantas como alimento y como agentes terapéuticos en la medicina tradicional en muchas partes del mundo. En algunos casos, la actividad biológica descrita se debe a la presencia de alcaloides, compuestos característicos de la familia (Stauffacher *et al.*, 1965; Chao y DerMaderosian 1973; Schimming *et al.*, 1998; Botz *et al.*, 1990-1991; Jenett-Siems *et al.*, 1993; 1994a; 1994b; Henrici *et al.*, 1994). Ejemplos de la actividad biológica de los alcaloides presentes en las convolvuláceas son la intoxicación de ciertos animales con *I. parasitica* (Amor-Prats y Harborne, 1993) o la actividad analgésica de *I. intrapilosa* (Osuna *et al.*, 1996). En el caso de la actividad alelopática de *I. tricolor* (Anaya *et al.*, 1990), se demostró que los compuestos responsables son las resinas glicosídicas presentes en la raíz (Pereda-Miranda *et al.*, 1993; 1995). En *I. stans* estas resinas han demostrado propiedades anticonvulsivas (Contreras *et al.*, 1996), citotóxicas (Reynolds *et al.*, 1995) y efectos vasoactivos (Perusquía *et al.*, 1995).

Uno de los primeros estudios en donde se pretende relacionar a los glicolípidos con cierta actividad biológica es el efectuado en las partes aéreas de *I. leari* donde se aisló un glicósido denominado "Ipolearósido". Este glicolípido demostró poseer actividad anticancerígena (Sarin *et al.*, 1973). Otro ejemplo es el estudio de la actividad anticancerígena (sarcoma 180 en ratón) y antimicrobiana en *Staphylococcus aureus*, *Neurospora crassa* y *Streptococcus faecalis* de las glicorresinas de *Ipomoea bahiensis* (Bieber *et al.*, 1986). Sin embargo, en estos estudios no se determinó la estructura de los glicolípidos responsables de tales efectos biológicos ya que en aquella época la

elucidación estructural dependía exclusivamente del estudio de los productos de hidrólisis básica o ácida de tales resinas. El aislamiento y la caracterización estructural de los glicolípidos en su forma natural se inició a partir de la utilización de las técnicas de cromatografía líquida de alta presión (CLAP), de los métodos espectrométricos (FAB-MS ó SIMS-MS) (Costello, 1997; Baldwin, 1995) y espectroscópicos (RMN) (Agrawal, 1992; Agrawal y Pathak, 1996) de alta resolución. Así los primeros glicolípidos caracterizados íntegramente fueron las orizabinas I-IV (ver fig. 2) por el grupo de Noda y colaboradores (1987) y se demostró que los constituyentes de las resinas glicosídicas son liposacáridos cuyas agliconas son los ácidos grasos hidroxilados (C_{14} o C_{16}) derivados de la hidrólisis ácida. El núcleo oligosacárido se encuentra acilado en la mayoría de los casos y se combina con el grupo carboxilo de la aglicona para formar un éster macrocíclico. A partir de estas investigaciones, el empleo de la cromatografía líquida de alta presión como método de purificación se convirtió en una técnica esencial para el estudio químico de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas. Durante estos estudios se han generado las definiciones de “jalapina” para describir la porción de la resina soluble en cloroformo o éter y “convolvulina” para describir la porción insoluble en estos disolventes lipofílicos.

El aislamiento y la elucidación estructural de las resinas de la familia Convolvulaceae ha llamado la atención no sólo por la actividad biológica que han demostrado tener, sino también por el interés quimiotaxonómico que permitirá relacionar la estructura química de los núcleos oligosacáridos con la clasificación botánica de las fuentes naturales. Tal como lo describe Bah (1997), el estudio de los constituyentes de las

resinas glicosídicas se ha incrementado y es posible iniciar una correlación de tipo quimiotaxonómico entre los núcleos oligosacáridos y la sistemática de la familia.



nl: niloilo (3-hidroxi-2-metilbutanoilo); *ib*: isobutiroilo (2-metilpropanoilo); *tg*: tigloilo (2*E*-metilbutenoilo)

| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-------------|----------------|----------------|----------------|
| Orizabina I | H | <i>tg</i> | nl |
| II | <i>ib</i> | <i>tg</i> | nl |
| III | nl | <i>tg</i> | nl |
| IV | H | <i>tg</i> | nl |

Figura 2. Orizabinas I–IV aisladas de *Ipomoea orizabensis*.

En la literatura se describen una gran cantidad de núcleos oligosacáridos en diversas especies de convolvuláceas. En *Ipomoea operculata* (Ono *et al.*, 1990a; 1991), los ácidos operculínicos A–G fueron generados como productos de hidrólisis básica de las

operculinas I–XVIII y uno de estos ácidos, el ácido operculínico A (fig. 3), se describió también en las especies *Ipomoea stolonifera* (Noda *et al.*, 1994a) e *Ipomoea quamoclit* (Ono, *et al.*, 1992c) entre otras. De la misma forma, el ácido operculínico C está presente en *Ipomoea batatas*, además de los ácidos simónicos A y B (fig. 4) (Noda *et al.*, 1992a). Este último también se encuentra como uno de los núcleos oligosacáridos constitutivos de las resinas de *Ipomoea stolonifera* (Noda *et al.*, 1994a).

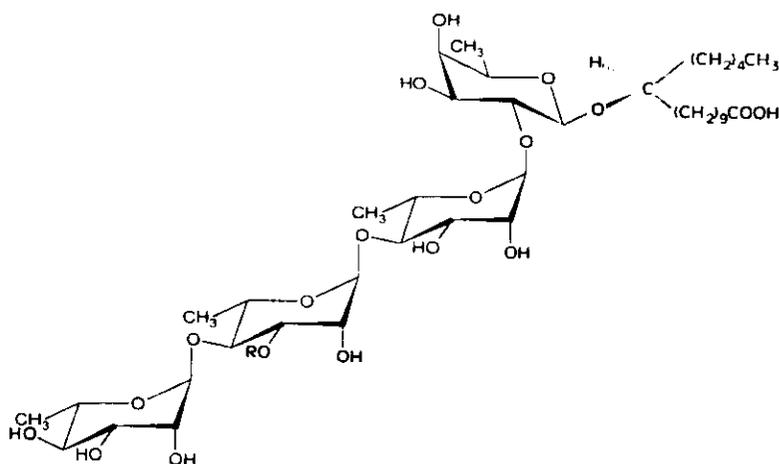


Figura 3. Ácidos operculínicos A (R= glucosa) y C (R = H).

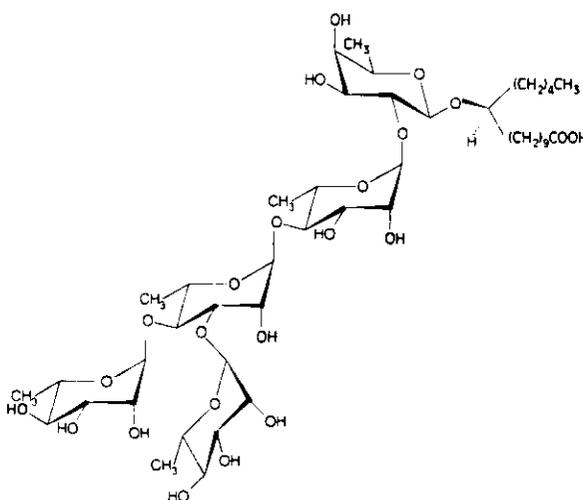


Figura 4. Ácido simónico B, núcleo oligosacárido presente en *Ipomoea batatas* e *Ipomoea stolonifera*.

La diversidad en las estructuras de los glicolípidos de las diferentes especies de convolvuláceas hace que no sea posible establecer una correlación de tipo quimiosistemático. Sin embargo, al analizar los núcleos oligosacáridos principales (mayoritarios) en cada planta, se puede deducir lo siguiente: el ácido operculínico A caracteriza a *Ipomoea operculata* (Ono *et al.*, 1989^a; 1989b; 1990a; 1990b), *Merremia hungaiensis* (Noda *et al.*, 1994b; 1995) y *Merremia mammosa* (Kitakawa *et al.*, 1989). Aún cuando *Merremia* es un género diferente a *Ipomoea*, existe una incertidumbre en la clasificación de las especies incluidas en estos géneros. Así por ejemplo, una de las especies estudiadas por el mismo grupo de investigadores, *Merremia tuberosa* (L.) Rendle (Ono *et al.*, 1993b), también se ha clasificado como *Ipomoea tuberosa* L.. Por lo tanto, es probable que en el caso de *Ipomoea operculata* existan diversas sinonimias. Otras especies estudiadas y que se han caracterizado por poseer núcleos oligosacáridos exclusivos son: *Ipomoea pes-caprae* (L.) Sweet, serie *Setosae* (Pescaprosido E) (Srivastava *et al.*, 1991); *Pharbitis nil*, la cual probablemente corresponda a *Ipomoea nil* (L.) Roth, serie *Pharbitis* (ácido farbitico D) (Ono *et al.*, 1990b); *Ipomoea tricolor* Cav., sección *Tricolor* (ácido tricolórico A) (Pereda-Miranda *et al.*, 1993); *Ipomoea batatas* (L) Lam, sección *Batatas* (ácido simónico B) (Noda *et al.*, 1992a) e *Ipomoea muricata* (L.) Jacq., sección *Calonyction* (ácido muricático A) (Noda *et al.*, 1988a; 1988b; 1988c). En el caso de las especies de *Ipomoea stans* y de *Ipomoea orizabensis* que se encuentran en la misma serie *Tyrianthinae*, existe diferencia entre sus núcleos oligosacáridos principales. Mientras que en la primera planta se describió el ácido escamónico A (Enríquez *et al.*, 1992; León-Rivera, 1998), en la segunda fue el ácido orizábico A (Noda *et al.*, 1990) (fig.

5). Un estudio reciente en una especie mexicana de *Ipomoea orizabensis* (Sosa-Vasquez, 1994) demostró que el núcleo oligosacárido principal es el ácido escamónico A como en el caso de *Ipomoea stans*. Lo anterior demuestra la necesidad de establecer de manera precisa la clasificación botánica de las especies sometidas a investigación química.

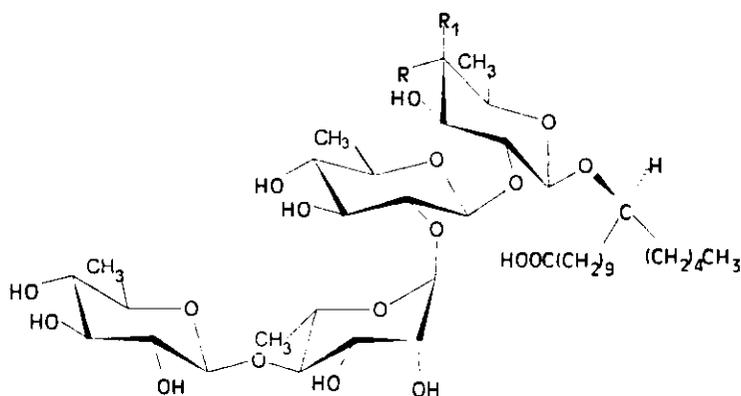


Figura 5. Ácido escamónico A (R = OH y R₁ = H) y ácido orizábico A (R = H y R₁ = OH) obtenidos de *Ipomoea stans* e *Ipomoea orizabensis*, respectivamente.

Posterior a la revisión hecha por Bah (1997), que describió los glicolípidos aislados hasta esa fecha, se han caracterizado compuestos adicionales de esta naturaleza y como parte complementaria al proyecto principal de la presente investigación, a continuación se presentan algunos datos interesantes sobre estos compuestos.

Mamósidos A, B, H₁ y H₂.

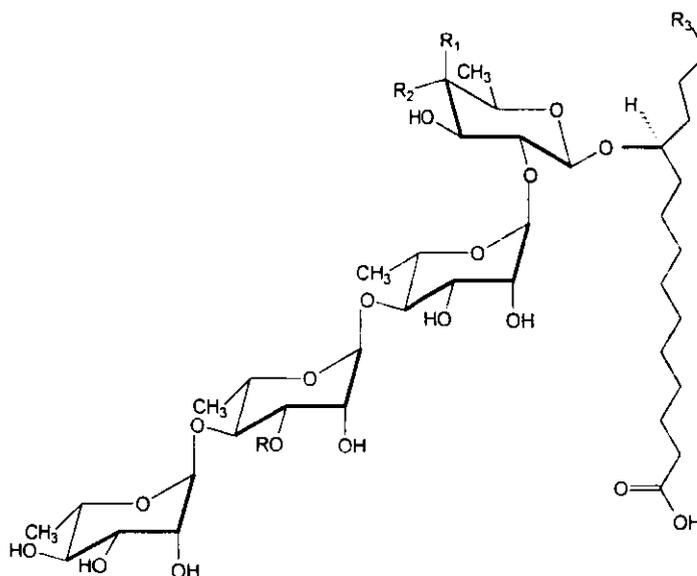
Los tubérculos de *Merremia mammosa* han sido estudiados desde hace algunos años por el grupo de Kitawaga (1988; 1989; 1996a; 1996b). Así en las primeras publicaciones se menciona la interesante actividad ionofórica de los compuestos presentes

en esta resina y la existencia de los mamósidos A, B, H₁ y H₂. Sin embargo, la elucidación estructural de estos compuestos se efectuó recientemente (Kitakawa *et al.*, 1997). Las técnicas de análisis principales que fueron aplicadas para la elucidación estructural de los glicolípidos incluyeron la espectrometría de masas FAB, su variante SIMS, el análisis de los productos de degradación y la síntesis de uno de los ácidos glicosídicos (mamósido I) a partir del (11S)-jalapinolato de metilo. La secuencia de glicosidación en los compuestos se estableció a través de la metilación del ácido glicosídico respectivo seguida de la metanólisis para formar los monosacáridos metilados en las posiciones hidroxílicas libres (Bah, 1997). Es importante mencionar que aún cuando en la actualidad existe metodología en la RMN para lograr la elucidación estructural de estos glicolípidos, esta investigación se basó exclusivamente en los métodos degradativos tradicionales y de síntesis. Los núcleos oligosacáridos de estos compuestos (mamósidos I y J) difieren en una unidad de glucosa (fig. 6). Se demostró que estas macrolactonas poseen actividad sobre el transporte de los iones Na⁺, K⁺ y Ca²⁺ a través de la membrana del eritrocito humano (Kitakawa *et al.*, 1997).

Multifidinas I y II

De la jalapina de las hojas de *Quamoclit x multifida*, planta decorativa que es un híbrido de *Quamoclit pennata* (L.) Bojer (*Ipomoea* (L.) *quamoclit* L.) y *Q. coccinea* Moench (*I. hederifolia* L.), se obtuvieron las multifidinas I y II junto con las quamoclinas I–IV. A partir de estos oligosacáridos se obtuvieron los productos de degradación básica, entre los que se identificaron dos ácidos glicosídicos conocidos: los ácidos quamoclínico

A (Noda *et al.*, 1994b; Ono *et al.*, 1992b) y operculínico A (Ono *et al.*, 1989b; Ono *et al.*, 1992a). Los ácidos multifidínicos A y B se obtuvieron como pentasacáridos novedosos con las mismas unidades monosacáridas y secuencia de glicosidación (fig. 6), pero diferente aglicona. La elucidación estructural de estos compuestos se hizo a través de métodos químicos, el análisis de la RMN bidimensional y FAB-MS (Ono *et al.*, 1997).

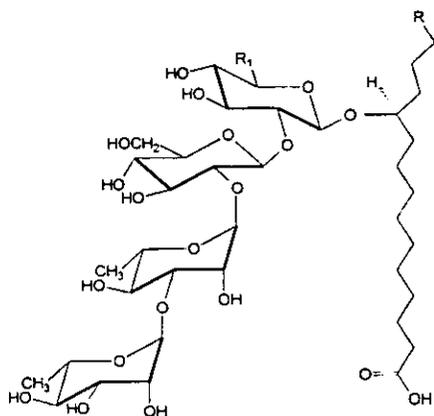


- Mamósido I; R = H, R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = C₂H₅.
Mamósido J; R = Glc, R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = C₂H₅.
Ácido multifidínico A; R = Glc, R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = H.
Ácido multifidínico B; R = Glc, R₁ = H, R₂ = OH, R₃ = C₂H₅.

Figura 6. Ácidos glicosídicos obtenidos de los tubérculos de *Merremia mammosa* (Mamósidos I y J) y de las hojas de *Quamoclit x multifida* (Ácidos multifidínicos A y B).

Componentes de la resina insoluble en éter de las hojas de *Cuscuta chinensis* y *cuscuta australis*.

De las hojas de *Cuscuta chinensis* se describió el aislamiento de los glicósidos Cus-1 y -2 a partir de la jalapina (Miyahara, *et al.*, 1996). Sin embargo, en el estudio de la convolvulina, sólo se lograron identificar los núcleos oligosacáridos como productos de degradación debido a las dificultades en la separación que presentaron estas mezclas complejas. Un indicio sobre la composición de las mismas se obtuvo a partir de los iones generados del espectro de masas (MALDI TOF) (Costello *et al.*, 1997; Baldwin, 1995). Como productos de hidrólisis básica de la convolvulina de *Cuscuta chinensis*, se identificaron los ácidos cuscúticos A-D (fig. 7) y los ácidos acético, (2*S*)-2-metilbutanoico, (2*R*,3*R*) 3-hidroxi-2-metilbutanoico y el trisacárido *O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-D-glucopiranosido.



A: R = H, R₁ = CH₂OH; B: R = R₁ = H; C: R = H, R₁ = CH₃ y D: R = C₂H₅, R₁ = CH₂OH

Figura 7. Ácidos Cuscúticos A-D.

Recientemente se discutió la dificultad para lograr la separación de los constituyentes individuales presentes en las mezclas de las resinas glicosídicas de la convolvulina de *Ipomoea lonchophylla* (MacLeod y Ward, 1997) y de *Cuscuta australis* (Du *et al.*, 1999). En la convolvulina de esta última planta, los iones pseudomoleculares obtenidos por MALDI TOF indicaron la presencia de compuestos con un peso molecular de hasta 5580 Daltons. Dentro de los componentes obtenidos como productos de degradación, además de los ácidos 2-metilpropanoico, 2(*E*)-metilbutanoico, (2*S*)-2-metilbutanoico y (2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutanoico, se identificaron los ácidos cuscúticos A₁-A₃, en donde el primero de ellos correspondió al ya descrito en la tricolorina G y H de *Ipomoea tricolor* (Du *et al.*, 1999)(fig. 8).

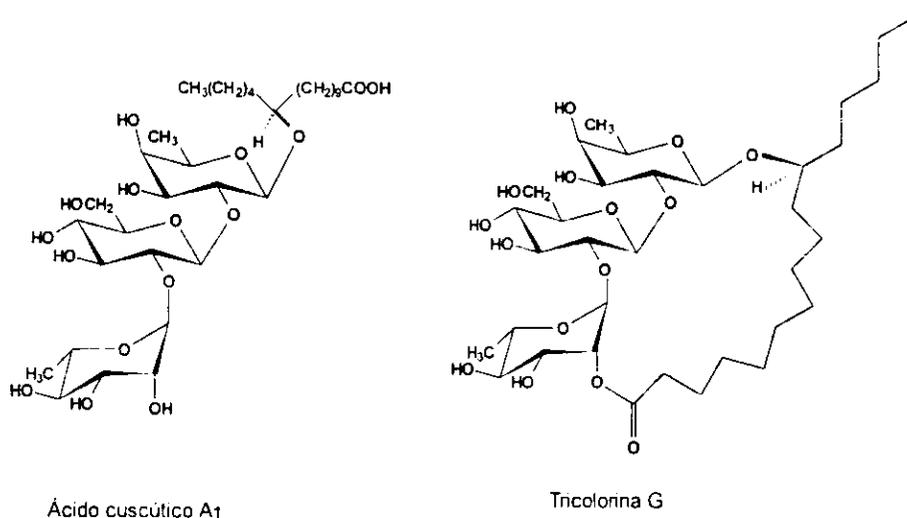


Figura 8. Ácido cuscútico A₁ (*Cuscuta australis*) y tricolorina G (*Ipomoea tricolor*).

La existencia de estos glicolípidos en forma de oligómeros fue una propuesta hecha inicialmente por Mannich y Schumann (1938), la cual consideraba que las resinas glicosídicas de *Exogonium Purga* (*I. purga*) representaban mezclas complejas de oligómeros de un ácido glicosídico esencial (fig. 9). Los resultados obtenidos en estas

especies de *Cuscuta*, además de los dímeros merremina (Noda *et al.*, 1995) (fig. 10) y las tricolorinas H-J (Bah y Pereda-Miranda, 1997) (fig. 11) representan ejemplos adicionales que permitieron apoyar esta postulación.

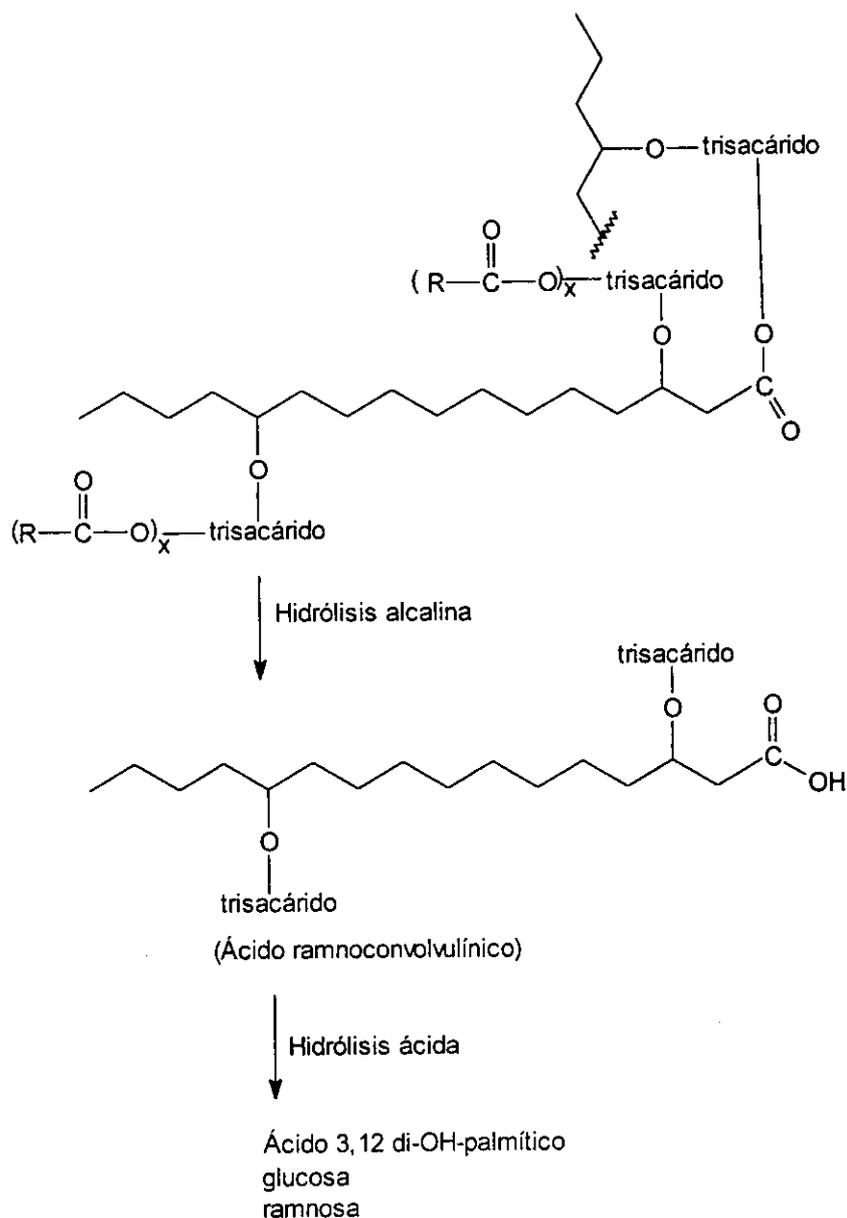
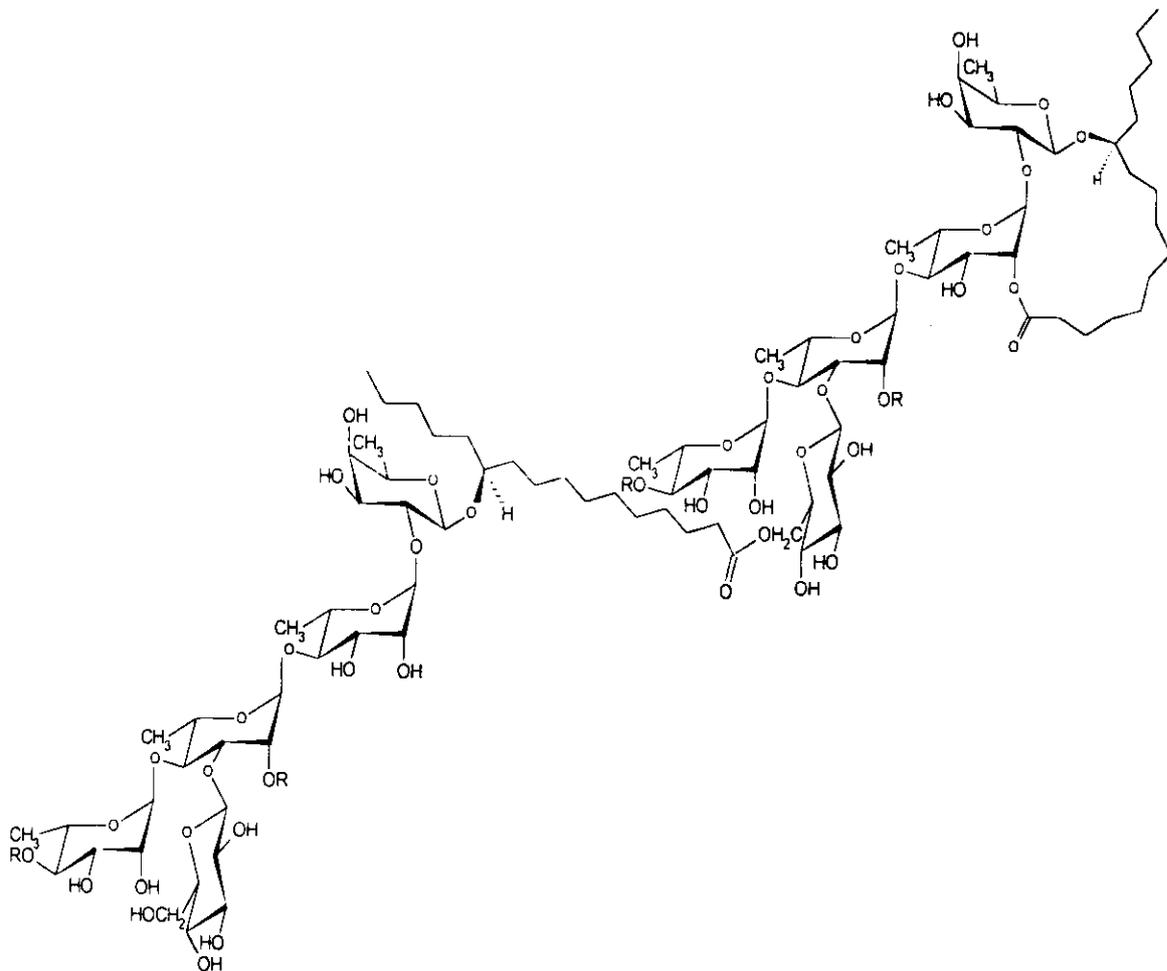
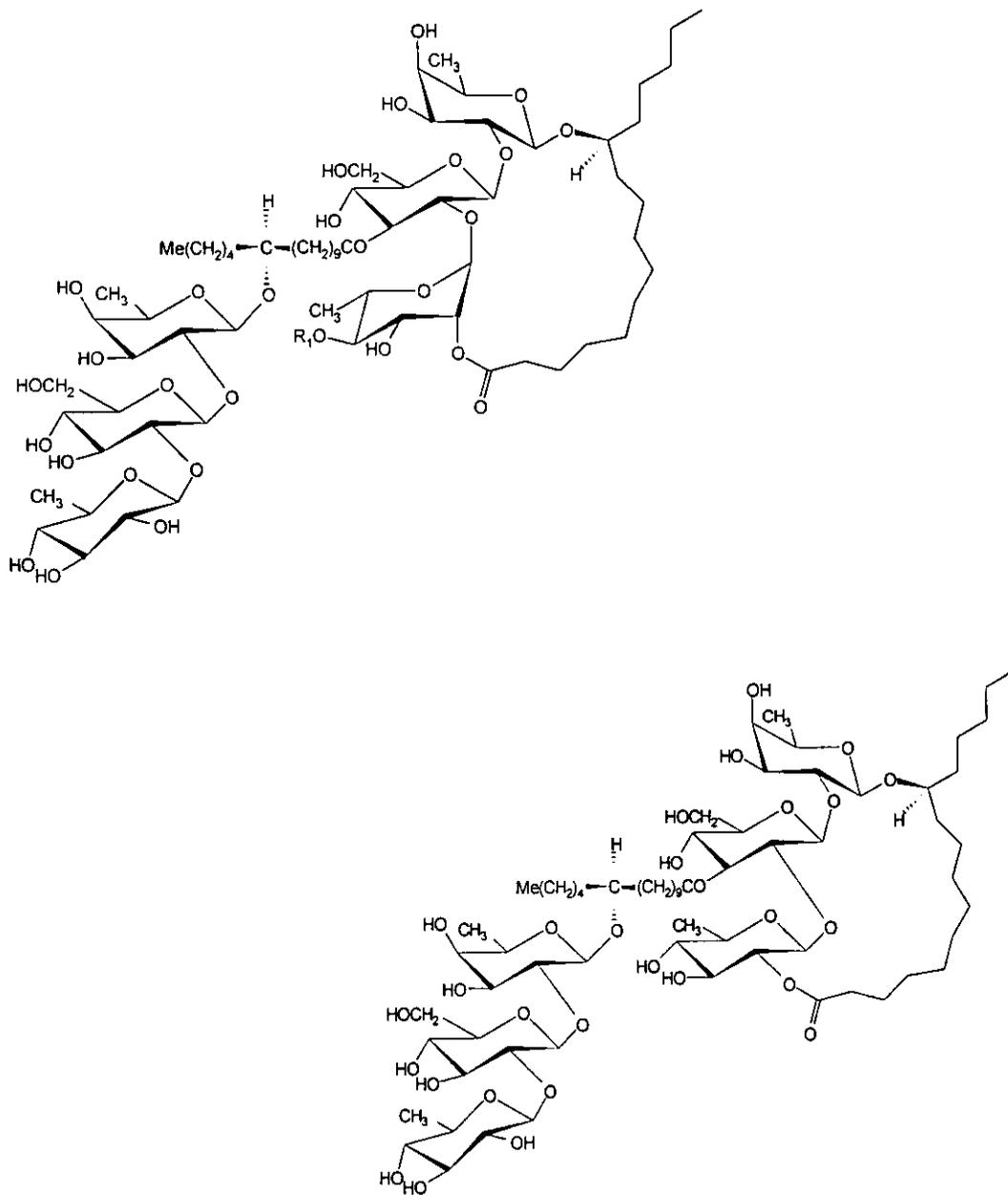


Figura 9. Estructura de las resinas glicosídicas de *Exogonium purga* Benth, de acuerdo con Mannich y Schuman (1938).



Donde $R = \text{CO}(\text{CH}_2)_{14}\text{CH}_3$

Figura 10. Estructura de la merremina aislada de *Merremia hungaiensis*.



Donde R₁ = 2-metilbutiroilo

Figura 11. Estructuras diméricas aisladas de *Ipomoea tricolor*: tricolorina H (Superior) e I (Inferior).

1.3. Estudios fitoquímicos de *Ipomoea purga* e *Ipomoea orizabensis*.

La raíz de jalapa se cultiva de manera tradicional en México (Linajes, *et al.*, 1993) y es la raíz tuberosa de *I. purga* o *Exogonium purga* (Wendoroth) Bentham, cuyas propiedades catárticas se conocen desde 1552 (Cruz, de la, 1965) cuando los españoles la llevaron a Europa, donde se usó ampliamente junto con otra especie similar (*I. jalapa*), según Monardes (1990). También es usada como emético, antihelmíntico, emenagogo y diurético (Martínez, 1959). Los ingredientes activos de esta planta son las resinas glicosídicas que están contenidas en un 8–11 % (Martínez, 1969), a diferencia de la jalapa de orizaba o *I. orizabensis* que contiene entre un 6–8 % (Tyler *et al.*, 1979). Esta última resina es más soluble en éter que la de *I. purga*, pero con menor actividad purgante y a pesar de esto *Ipomoea orizabensis* se sigue utilizando como sustituto de *I. purga*. La sustitución de la raíz auténtica de jalapa con especies similares ha sido un problema desde el inicio de su comercialización en el siglo XVI (Noriega, 1903), describiéndose tres jalapas en ese tiempo: la jalapa hembra u oficial (*Exogonium purga*, Hayne), la macho o fusiforme (*I. orizabensis*, Ledanois) y la de Tampico (*I. simulans*, Hamb). Sin embargo, las comparaciones hechas se basaron en los caracteres anatómicos de los tubérculos y en la apariencia de los extractos. En cuanto a los estudios fitoquímicos de las resinas de estas plantas, uno de los primeros fue la descripción de los constituyentes de las resinas de *I. purga* por Mannich y Schumann (1938), seguido por la descripción de un β -quinovósido del ácido 11-hidroxitetradecanoico en la porción de la resina soluble en metanol (convolvulina) (Shing y Stacey, 1973). No se han efectuado estudios fitoquímicos

más detallados. Otro nombre común de *I. orizabensis* es el de escamonea mexicana de la que se describe que el 71 % de la resina es soluble en un 71 % en éter (Tyler *et al.*, 1979). Power y Rogerson (1912) describen que esta resina generó como productos de hidrólisis básica los ácidos 2-metilbutanoico, 2(*E*) metilbutenoico y el ipuranol y como productos de la hidrólisis ácida, ácido jalapínico, dextrosa y una metilpentosa. Esta raíz llamó la atención como fuente de ácidos grasos hidroxilados (Boog *et al.*, 1991; Roos y Baker, 1991) después de la descripción de los primeros glicolípidos aislados y caracterizados (orizabinas I–IV) en su forma natural por el grupo de Noda (1987).

Los estudios farmacológicos de estas especies han involucrado la evaluación de la actividad citotóxica de las resinas; la *I. purga* mostró un efecto inhibitor significativo ($CE_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$) para los cultivos de células cancerosas de mama (MCF-7) y carcinoma nasofaríngeo (KB) (Pereda-Miranda, 1995). En el caso de *I. orizabensis*, la jalapina se sometió a pruebas de evaluación citotóxica en 10 líneas celulares, demostrando una actividad citotóxica significativa en carcinoma epidermoide (A-431, CE_{50} 2.8 $\mu\text{g/mL}$), cáncer mamario (BC-1, CE_{50} 2.4 $\mu\text{g/mL}$) y leucemia de múridos (P-388, CE_{50} 2.2 $\mu\text{g/mL}$) (Sosa-Vazquez, 1993).

2. Hipótesis

A partir del conocimiento de la composición química de las resinas de *Ipomoea tyrianthinae* e *Ipomoea purga* será posible establecer la diferencia entre una jalapa falsa y la raíz auténtica (*I. purga*). El aislamiento y la caracterización estructural de los núcleos oligosacáridos principales de las resinas glicosídicas de las dos especies permitirán establecer un criterio quimiosistemático para ambas. La implementación de una metodología sencilla como la hidrólisis ácida para obtener la aglicona de los extractos resinosos determinará si la especie en cuestión pertenece a alguna de las que forman el complejo escamonea (*I. jalapa*, *I. longepedunculata* e *I. orizabensis*, Díaz, 1976), cuyos núcleos oligosacáridos principales están constituidos por el ácido jalapínico. La raíz de jalapa auténtica (*I. purga*) deberá poseer un núcleo oligosacárido diferente y probablemente con la presencia del ácido convolvulínico como la aglicona del mismo. La autenticidad de la raíz de jalapa será garantizada con la recolección de la planta en el sitio de su cultivo (Municipio de Xico, Edo de Veracruz).

3. Objetivos

El objetivo general del presente proyecto es el establecimiento de las diferencias químicas entre la raíz de jalapa auténtica (*I. purga*) e *I. orizabensis* o *I. tyrianthinae* y se llevará a cabo con el cumplimiento de los siguientes objetivos particulares:

3.1. Estudio químico y evaluación citotóxica de los glicolípidos de la raíz de *Ipomoea orizabensis*.

3.1.1. Establecer las condiciones instrumentales al nivel analítico y preparativo en la cromatografía líquida de alta presión para aislar los constituyentes individuales presentes en la jalapina.

3.1.2. Establecer la estructura molecular de los constituyentes individuales aislados mediante métodos químicos y técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (FAB-MS).

3.1.3. Evaluar el potencial citotóxico de los glicolípidos mayoritarios aislados.

3.2. Estudio químico de la raíz de *Ipomoea purga*.

3.2.1. Efectuar la hidrólisis básica de las fracciones activas (actividad citotóxica) de la convolvulina y purificar los ácidos glicosídicos mayoritarios mediante cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP).

3.2.2. Efectuar el análisis espectroscópico (RMN ^1H y ^{13}C) y espectrométrico (FAB-MS, EI-MS) de los derivados obtenidos para establecer su estructura molecular.

4. Parte experimental

4.1. Determinación de las constantes físicas.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y de carbono-13 (^{13}C) se generaron en equipos Varian Unity plus 500 o Bruker AMX-500, que operaron a una frecuencia de 500 y 125 MHz. Se utilizó piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) o cloroformo (CDCl_3) como disolventes y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm utilizando como referencia el tetrametilsilicio (TMS). Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 241 utilizando cloroformo o metanol como disolventes. Los espectros de masas fueron registrados en un aparato modelo JEOL SXIOA, utilizando como métodos de ionización el impacto electrónico (EI) y el bombardeo rápido de átomos (FAB-MS); en el modo negativo se utilizó una matriz de trietanolamina; en el modo positivo, la matriz correspondió al glicerol. Los puntos de fusión no están corregidos y fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns.

4.2. Métodos cromatográficos.

Las pruebas en cromatografía en placa fina (CCF) se efectuaron en cromatoplasmas cubiertas de gel de sílice 60 F254 Merck desactivadas con H_3BO_3 0.036 N (Ghebregzabher *et al.*, 1976).

En las separaciones en cromatografía líquida de alta presión (CLAP), se utilizaron las siguientes columnas:

Columna analítica de gel de sílice ($\mu\text{Porasil}^{\text{TM}}$, 3.9×300 mm, $10 \mu\text{m}$).

Columna analítica de fase inversa C_{18} (3.9×300 mm, $10 \mu\text{m}$).

Columna analítica de aminopropilmetilsilano NH₂ (μBondapak™, 3.9 × 300 mm, 10 μm).

Columna analítica para análisis de carbohidratos (Waters, 3.9 × 300 mm, 10 μm).

Columna preparativa de aminopropilmetilsilano (μBondapak™, 19 × 150 mm, 10 μm).

Columna preparativa de gel de sílice (ISCO, 21.2 × 250 mm, 10 μm).

Los disolventes utilizados fueron cloroformo, acetona, *n*-hexano, acetonitrilo y agua (grado analítico y CLAP).

La instrumentación estuvo formada por un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de distribución de disolvente y un refractómetro diferencial Waters 410 integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le, Dell). El control del equipo, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se hicieron a través del programa de software Millenium 2000 (Waters). Un recirculador de muestra y uno de disolvente se adaptaron en línea al sistema cromatográfico.

4.3. Material vegetal.

La raíz de *Ipomoea orizabensis* (5 kg) se obtuvo del noroeste del estado de Veracruz cerca del estado de Hidalgo y fue clasificada por el Dr. R. Bye. Un ejemplar se depositó en la colección etnobotánica del Herbario Nacional del Instituto de Biología de la UNAM (R. Bye 17761).

La muestra analizada de la raíz de jalapa fue de 10 kg de tubérculos frescos de *Ipomoea purga* que se colectaron en el municipio de Xico, Estado de Veracruz. La identificación del material fue hecha por el Biólogo Alberto Linajes y el Dr. Victor Rico.

Un ejemplar se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología, A.C. (Ortega 475, XAL).

4.4. Obtención de las resinas glicosídicas: jalapina y convolvulina.

El material vegetal (*I. orizabensis* e *I. purga*) seco y pulverizado fue sometido a una extracción preliminar con *n*-hexano para eliminar constituyentes de baja polaridad. Se prepararon los extractos clorofórmico y metanólico de los tubérculos mediante un proceso de maceración de cuatro semanas para cada disolvente. Una vez concluido el tiempo de extracción, la solución se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvieron los extractos clorofórmicos (jalapina) con un peso de 743.7 g (*I. orizabensis*) y 4.41 g (*I. purga*). El peso del extracto metanólico (convolvulina) de la raíz de *Ipomoea purga* fue de 169.55 g.

El fraccionamiento primario de la jalapina de *I. orizabensis* se hizo previamente en cromatografía en columna sobre gel de sílice usando un sistema de elución de CHCl_3 -MeOH- H_2O (Sosa-Vasquez, 1993). Así, se obtuvieron 7 fracciones primarias (I-VII). En la figura 12 se presenta la cromatografía en capa fina de las mismas. El trabajo experimental en esta planta se efectuó con las fracciones III, IV y V para obtener los glicolípidos mayoritarios presentes en las mismas. Todas las fracciones se trabajaron como una sola y la mezcla que resultó de la reunión de éstas se denominó como la fracción primaria de la jalapina (FPJ).

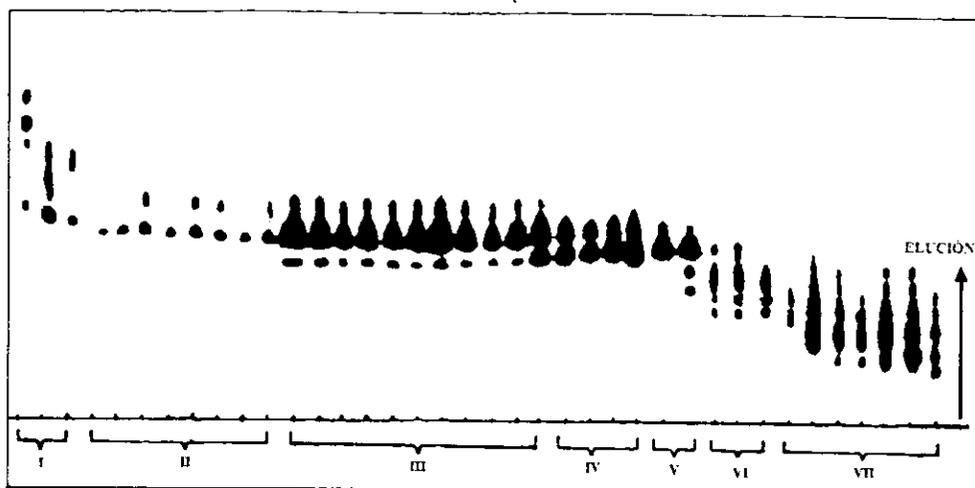


Figura 12. Cromatograma en capa fina de los eluatos obtenidos durante el fraccionamiento en columna (gel de sílice) de la jalapina de *Ipomoea orizabensis*. Sistema de elución: CHCl_3 -MeOH- H_2O (7:3:1).

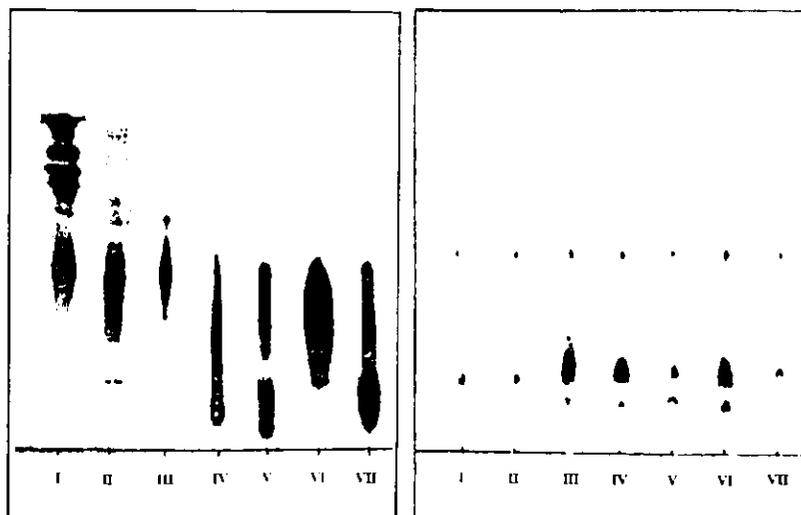


Figura 13. Cromatografía en placa fina de las fracciones obtenidas de la convolvulina de *Ipomoea purga* (izquierda) y de sus respectivos productos de hidrólisis básica (derecha). Sistema de elución: CHCl_3 -MeOH- H_2O (6:4:1).

El fraccionamiento de la convolvulina de *Ipomoea purga* se hizo en columna de gel de sílice con un sistema de elución constituido por MeOH-CHCl₃-Me₂CO. Se obtuvieron 7 fracciones que fueron hidrolizadas con KOH (ver fig. 13). Los análisis mediante cromatografía en capa fina y CLAP de los productos de saponificación permitió la detección de dos ácidos glicosídicos mayoritarios, los ácidos púrgicos **A** y **B** (Cruz-Bailon, 1998; Yañez-García, 1998). La fracción II de la convolvulina se utilizó para el desarrollo del presente trabajo y se nombro como la fracción primaria de la convolvulina (**FPC**)

4.5 Separación y purificación de los glicolípidos de la jalapina de *Ipomoea orizabensis*.

4.5.1 Obtención de las escamoninas I (1) y II (2) y de las orizabinas V-VIII (3-6).

Las pruebas preliminares para lograr la separación de los principios presentes en la fracción primaria de la jalapina (**FPJ**) se efectuaron en columnas analíticas de fase normal (SiO₂) e inversa (C₁₈) con un sistema de detección inicial de UV (254 nm) y flujos de 0.5 mL. El modo de detección se cambió al índice de refracción cuando se encontró el sistema cromatográfico adecuado que consistió en columna analítica C₁₈ (3.9 × 300 mm, 10 μm); flujo: 0.5 mL/min; fase móvil: CH₃CN-H₂O (88:12); volumen de inyección: 20 μL (2 mg/200 μL).

El escalamiento al nivel preparativo se hizo aplicando las fórmulas siguientes:

Cantidad de muestra a inyectar

Flujo al nivel preparativo

$$M_p = M_a (L_p/L_a)(d_p^2/d_a^2)$$

$$F_p = F_a (L_p/L_a)(d_p^2/d_a^2)$$

En donde:

Mp = masa de escalamiento en (mg)

Fp = flujo al nivel preparativo

Ma = masa inyectada al nivel analítico (mg)

Fa = flujo al nivel analítico

Lp = longitud de la columna preparativa (mm)

La = longitud de la columna analítica (mm)

dp = diámetro interno de la columna preparativa (mm)

da = diámetro interno de la columna analítica (mm)

Las condiciones instrumentales al nivel preparativo adecuadas fueron las siguientes: columna C₁₈ preparativa ISCO, (19 × 250 mm, 10 μm); fase móvil: CH₃CN–H₂O (88:12); flujo: 8.0 mL/min; detector: índice de refracción; concentración de la muestra: 80 mg/500 μl y volumen de inyección: 500 μl.

La aplicación de las técnicas de sobrecarga de la columna y corte del núcleo (Bidlingmeyer, 1992; Hostettmann, 1986) permitieron colectar las subfracciones correspondientes a los tiempos de retención (t_R) de 8 min (**A**, 50.2 mg), 11 min (**B**, 53.1 mg), 14 min (**C**, 29.4 mg), 17 min (**D**, 195.2 mg) y dos mayoritarias, 24 min (**E**, 250 mg) y 30 min (**F**, 350 mg).

Las subfracciones **A–D** fueron reinyectadas en la columna NH₂ preparativa con un sistema de elución binario constituido por CH₃CN–H₂O (92:8); flujo: 4 mL/min; volumen de inyección: 500 μL (20 mg/mL). Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra (Kubo y Nakatsu, 1990), utilizándose de 8 a 10 ciclos para obtener la máxima separación y garantizar una pureza >99% de los constituyentes presentes en estas subfracciones. Se obtuvieron 15 mg de la escamonina I (**1**) a partir de la subfracción **D** y 15.2 mg de la

escamonina II (2) a partir de la subfracción A. El análisis de la subfracción C proporcionó 12 mg de la orizabina V (3) y por último, el tratamiento de la subfracción B permitió el aislamiento de las orizabinas VI (4; 7 mg), VII (5; 21.3 mg) y VIII (6; 11.8 mg).

Escamonina I (1) ($t_R = 16$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 132–135 °C; $[\alpha]_D -30$ (c 0.1, MeOH); FAB-MS (modo negativo) m/z : $[M - H]^-$ 1019 ($C_{50}H_{83}O_{21}$), 917, 835, 689, 579, 561, 417, 271. Las constantes espectroscópicas de RMN de 1H y ^{13}C corresponden a las descritas para la escamonina I aislada de *Convolvulus scammonia* (Noda *et al.*, 1990).

Escamonina II (2) ($t_R = 36$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 156–162 °C; $[\alpha]_D -30$ (c 0.1, MeOH); FAB-MS (modo negativo) m/z : $[M - H]^-$ 937 ($C_{45}H_{77}O_{20}$), 835 $[M - H - C_5H_8O - H_2O]^-$, 689, 579, 561, 417, 271. Las constantes espectroscópicas de RMN de 1H y de ^{13}C corresponden a las descritas para la escamonina II, aislada de *Convolvulus scammonia* (Noda *et al.*, 1990).

Orizabina V (3) ($t_R = 20$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 128–130 °C; $[\alpha]_D -33$ (c 0.1, MeOH); RMN 1H y ^{13}C (ver los cuadros 2 y 3); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1037 $[M - H]^-$, 993 $[M - H - C_2H_4O]^-$, 937 $[M - H - C_5H_8O_2]^-$, 909 $[993 - C_5H_8O]^-$, 891 $[909 - H_2O]^-$, 835 $[937 - C_5H_8O - H_2O]^-$, 617, 561, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1037.5525 $[M - H]^-$; $C_{50}H_{85}O_{22}$ requiere 1037.5533.

Orizabina VI (4) ($t_R = 22$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 128–133 °C; $[\alpha]_D -38.6$ (c 0.1, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 2 y 3); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1037 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1023 $[\text{M} - \text{CH}_3]^-$, 993 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^-$, 937 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 909 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}]^-$, 891 $[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$, 887, 789, 661, 617, 561, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1023.5365 $[\text{M} - \text{CH}_3]^-$, $\text{C}_{49}\text{H}_{83}\text{O}_{22}$ requiere 1023.5376.

Orizabina VII (5) ($t_R = 22$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 127–134 °C; $[\alpha]_D -29$ (c 0.1, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 2 y 3); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1037 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1023 $[\text{M} - \text{CH}_3]^-$, 937 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 891 $[\text{M} - \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^-$, 789, 679, 661, 617, 561, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1023.5353 $[\text{M} - \text{CH}_3]^-$, $\text{C}_{49}\text{H}_{83}\text{O}_{22}$ requiere 1023.5376.

Orizabina VIII (6) ($t_R = 30$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 110–115 °C; $[\alpha]_D -21.3$ (c 0.1, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 2 y 3); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1037 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 993 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^-$, 937 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 891, 661, 617, 561, 417, 271; HRFAB m/z : 1037.5547 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\text{C}_{50}\text{H}_{85}\text{O}_{22}$ requiere 1037.5533.

4.5.2 Obtención de las orizabinas IX–XXI (7–19).

El análisis de las subfracciones **E** y **F** utilizando el mismo sistema cromatográfico que permitió la resolución de las subfracciones **A–D** (inciso 4.5.1) no resultó adecuado y, por tal motivo se incrementó la proporción de CH_3CN a 95% en la fase móvil. El tamaño de la muestra que se inyectó fue de 8 mg/500 μL . El empleo del reciclaje no mejoró la resolución de las subfracciones **E** y **F**. Por tal motivo, se fraccionó la mezcla **FPJ**

mediante la técnica de corte de núcleo en una columna C₁₈ (19 × 250 mm, 10 μm) de mayor resolución (Spherisorb^R Waters). Las condiciones analíticas seleccionadas fueron las siguientes: fase móvil: CH₃CN–H₂O (95:5); flujo: 0.5 mL/min; volumen de inyección: 20 μL (2 mg/200 μL). El escalamiento al nivel preparativo utilizó un flujo de 8 mL/min y se inyectaron 40 mg/500 μL de muestra. El procesamiento de 2.183 g de la fracción **FPJ** permitió la obtención de las **subfracciones I** (t_R = 23.8 min, 305 mg), **II** (t_R = 26.7 min, 259.2 mg), **III** (t_R = 29.8 min, 806 mg) y **IV** (t_R = 33.4 min, 659.3 mg).

Se logró la separación de los constituyentes individuales de las subfracciones **I**, **III** y **IV** con el empleo de las condiciones siguientes: columna NH₂ preparativa (19 × 250 mm, 10 μm); fase móvil: CH₃CN–H₂O (95:5); flujo: 4 mL/min; volumen de inyección: 8 mg/500 μL. De 8 a 10 ciclos se necesitaron para lograr separar los compuestos **7** (47 mg), **8** (36 mg), **9** (49 mg), **10** (59 mg) y **11** (32 mg) a partir de la **subfracción I**. De la **subfracción III** se purificaron los constituyentes **12** (62 mg), **13** (130 mg), **14** (130 mg) y **15** (136 mg). De la **subfracción IV** se lograron aislar los compuestos **16** (50 mg), **17** (120 mg), **18** (84 mg) y **19** (84 mg).

Orizabina IX (7): Sólido amorfo blanco; p.f. 124–127 °C; [α]_D –29 (c 0.2, MeOH); RMN ¹H y ¹³C (ver los cuadros 7, 8 y 9); FAB-MS (modo negativo) *m/z*: 1119 [M – H][–], 1075 [M – H – C₂H₄O][–], 1019 [M – H – C₃H₈O₂][–], 973 [1019 – C₂H₄ – H₂O][–], 919 [1109 – C₅H₆O – H₂O][–], 661, 617, 561, 417, 271; HRFAB-MS *m/z*: 1119.5968 [M – H][–], C₅₅H₉₁O₂₃ requiere 1119.5951.

Orizabina X (8): Sólido amorfo blanco; p.f. 118–120 °C; $[\alpha]_D -54.5$ (c 0.1, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 7, 8 y 9); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1105 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1019 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O} - \text{C}_3\text{H}_6]^-$, 1005 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 661, 617, 561, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1105.5751 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\text{C}_{54}\text{H}_{89}\text{O}_{23}$, requiere 1105.5794.

Orizabina XI (9): Sólido amorfo blanco; p.f. 118–122 °C; $[\alpha]_D -49$ (c 0.26, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 7, 8 y 9); FAB-MS (modo positivo) m/z : 1107 $[\text{M} + \text{H}]^+$; 961, 861, 681, 491, 453, 427, 299; positivo HRFAB-MS m/z : 1107.5812 $[\text{M} + \text{H}]^+$ $\text{C}_{54}\text{H}_{91}\text{O}_{23}$, requiere 1107.5951.

Orizabina XII (10): Sólido amorfo blanco; p.f. 123–125 °C; $[\alpha]_D -49.4$ (c 0.61, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 7, 8 y 9); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1105 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1019 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O} - \text{C}_3\text{H}_6]^-$, 1005 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 973 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O} - \text{C}_4\text{H}_6\text{O} - \text{H}_2\text{O}]^-$, 679, 661, 617, 561, 417, 271; negativo HRFAB-MS m/z : 1106.5875 $[\text{M}]^-$ requiere 1106.5872.

Orizabina XIII (11): Sólido amorfo blanco; p.f. 120–123 °C; $[\alpha]_D -49$ (c 0.2, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 7, 8 y 9); FAB-MS (modo positivo) m/z : 1107 $[\text{M} + \text{H}]^+$, 961, 861.6, 699, 581, 427, 299, 272, 229, 199; positivo HRFAB-MS m/z : 1107.4532 $[\text{M} + \text{H}]^+$, $\text{C}_{54}\text{H}_{91}\text{O}_{23}$, requiere 1107.5951.

Orizabina XIV (12): Sólido amorfo blanco; p.f. 119–122 °C; $[\alpha]_D -35.2$ (c 0.2, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 10 y 12); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1119 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1019 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 973 $[\text{1019} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{H}_2\text{O}]^-$, 789, 680, 661, 617, 561, 417, 271; negativo HRFAB-MS m/z : 1119.6008 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\text{C}_{55}\text{H}_{91}\text{O}_{23}$, requiere 1119.5951.

Orizabina XV (13): Sólido amorfo blanco; p.f. 110–112 °C; $[\alpha]_D -34.7$ (c 0.2, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 10 y 12); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1119 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1019 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 973 $[\text{1019} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{H}_2\text{O}]^-$, 661, 617, 561, 417, 271; negativo HRFAB-MS m/z : 1119.6001 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\text{C}_{55}\text{H}_{91}\text{O}_{23}$, requiere 1119.5951.

Orizabina XVI (14): Sólido amorfo blanco; p.f. 120–122 °C; $[\alpha]_D -20.7$ (c 0.2, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 10 y 12); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1119 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1019 $[\text{1119} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 973 $[\text{1019} - \text{C}_2\text{H}_4 - \text{H}_2\text{O}]^-$, 789, 679, 661, 561, 417, 271; negativo HRFAB-MS m/z : 1119.5968 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\text{C}_{55}\text{H}_{91}\text{O}_{23}$, requiere 1119.5951.

Orizabina XVII (15): Sólido amorfo blanco; p.f. 124–127 °C; $[\alpha]_D -26$ (c 0.2, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 10 y 12); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1119 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1075 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_2\text{H}_4\text{O}]^-$, 1019 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2]^-$, 661, 617, 417, 271; negativo HRFAB-MS m/z : 1119.6072 $[\text{M} - \text{H}]^-$, $\text{C}_{55}\text{H}_{91}\text{O}_{23}$, requiere 1119.5951.

Orizabina XVIII (16): Sólido amorfo blanco; p.f. 112–115 °C; $[\alpha]_D -26.5$ (c 0.2, MeOH); RMN ^1H y ^{13}C (ver los cuadros 11 y 12); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1121

$[M - H]^-$, 1021 $[M - H - C_5H_8O_2]^-$, 975 $[1021 - C_2H_4 - H_2O]^-$, 679, 661, 561, 271;
negativo HRFAB-MS m/z : 1121.6088 $[M - H]^-$, $C_{55}H_{93}O_{23}$, requiere 1121.6107.

Orizabina XIX (17): Sólido amorfo blanco; p.f. 114–116 °C; $[\alpha]_D -30.6$ (c 0.2, MeOH);
RMN 1H y ^{13}C (ver los cuadros 11 y 12); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1121 $[M - H]^-$,
1021 $[M - H - C_5H_8O_2]^-$, 789, 679, 661, 617, 561, 417, 271; negativo HRFAB-MS m/z :
1121.6194 $[M - H]^-$, $C_{55}H_{93}O_{23}$, requiere 1121.6107.

Orizabina XX (18): Sólido amorfo blanco; p.f. 117–120 °C; $[\alpha]_D -26.5$ (c 0.2, MeOH);
RMN 1H y ^{13}C (ver los cuadros 11 y 12); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1121 $[M - H]^-$,
1021 $[M - H - C_5H_8O_2]^-$, 975 $[1021 - C_2H_4 - H_2O]^-$, 789, 679, 661, 561, 271; negativo
HRFAB-MS m/z : 1121.6085 $[M - H]^-$, $C_{55}H_{93}O_{23}$, requiere 1121.6107.

Orizabina XXI (19): Sólido amorfo blanco; p.f. 111–113 °C; $[\alpha]_D -21.5$ (c 0.2, MeOH);
RMN 1H y ^{13}C (ver los cuadros 11 y 12); FAB-MS m/z (modo negativo) 1121 $[M - H]^-$,
1021 $[1121 - C_5H_8O_2]^-$, 790, 679, 661, 618, 561, 417, 271; negativo HRFAB-MS m/z :
1121.6130 $[M - H]^-$, $C_{55}H_{93}O_{23}$, requiere 1121.6107.

4.6. Preparación de derivados de la jalapina de *Ipomoea orizabensis*.

4.6.1. Hidrólisis alcalina de las orizabinas V-XXI (7-19).

Entre 15.7 y 82 mg de 7-19 fueron tratados de manera independiente bajo reflujo a 95 °C durante 2 horas con 5-10 mL de K₂CO₃ (0.5 %). Al final de la reacción, en cada caso se ajustó a un pH de 3-4 con solución de HCl (0.5 N) y se diluyó con H₂O hasta 10 mL. Se efectuaron tres extracciones con éter etílico (3 × 10 mL), la fase orgánica se lavó con H₂O dos veces (2 × 10 mL) y se concentró permitiendo la obtención de una fracción orgánica de consistencia oleosa. El cuadro 1 presenta la cantidad de cada glicolípido hidrolizado y del residuo orgánico obtenido.

Cuadro 1. Saponificación de 7-19

| Compuesto | Cantidad hidrolizada (mg) | Fracción orgánica (mg) |
|-----------|---------------------------|------------------------|
| 7 | 55.8 | 4.5 |
| 8 | 58.3 | 7.0 |
| 9 | 45.5 | 8.0 |
| 10 | 52.0 | 16.0 |
| 11 | 17.5 | 2.0 |
| 12 | 51.8 | 5.8 |
| 13 | 82.0 | 14.0 |
| 14 | 45 | 4.0 |
| 15 | 57.9 | 9.3 |
| 16 | 36.2 | 12.9 |
| 17 | 15.7 | 2.6 |
| 18 | 42.0 | 4.5 |
| 19 | 22.9 | 1.6 |

4.6.1.2. Determinación de la configuración absoluta de los ácidos 2-metilbutanoico y 3-hidroxi-2-metilbutanoico.

El residuo orgánico proveniente de la hidrólisis alcalina de cada una de las orizabinas IX–XXI (7-19) (inciso 4.6.1) se sometió a una reacción de esterificación con el bromuro de *p*-bromofenacilo. Cada una de las fracciones orgánicas se disolvió en 10 mL de acetona seca y la solución se neutralizó con trietilamina. Se adicionaron entre 10 y 30 mg de bromuro de *p*-bromofenacilo. Después de 2 horas, la mezcla de reacción se concentró y se extrajo con 10 mL de éter etílico (tres veces). Las mezclas de reacción fueron sometidas a CLAP utilizando una columna de SiO₂ (19 × 150 mm, 10 μm), una fase móvil de *n*-hexano–AcOEt (7:3) y un flujo de 2.0 mL/min para generar dos picos: **fr1** (3–14 mg, $t_R = 6$ min) y **fr2** (1.2–3.4 mg, $t_R = 12$ min). La fracción de mayor polaridad correspondió al nilato de *p*-bromofenacilo.

Nilato de *p*-bromofenacilo: Sólido cristalino blanco; p.f. 68–70 °C; RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.79 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar), 7.65 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar), 5.45 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, CH₂), 5.34 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, CH₂), 3.97 (1H, dq, $J = 6.3, 6.3$ Hz, H-3), 2.63 (1H, dq, $J = 7.2, 6.3$ Hz, H-2), 1.30 (3H, d, $J = 6.30$ Hz, 3Me), 1.25 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 2Me). Las constantes espectroscópicas de los residuos de niloilo son idénticas a las descritas para el isómero *treo* (Du *et al.*, 1998; Miyahara *et al.*, 1996; Noda *et al.*, 1988a). Debido a la cantidad mínima de muestra no se determinó la rotación óptica de cada residuo esterificado. Posterior a la determinación de la configuración absoluta de cada residuo niloilo, se encontró que las orizabinas IX (7), X (8), XIII (11), XIV (12), XVII

(15), XVIII (16) y XXI (19) generaron el diasteroisómero 2*R*,3*R*, mientras que las orizabinas XI (9), XII (10), XV (13), XVI (14), XIX (17) y XXI (18) el 2*S*,3*S*.

La fr1 se sometió a un segundo análisis en CLAP en una columna de fase normal (SiO₂) (150 × 19 mm, 10 μm) con un sistema de elución de *n*-hexano–AcOEt (92:8) y un flujo de 2.0 mL/min para obtener tres picos: el primero (*t_R* = 13.4 min) correspondió al metilbutirato de *p*-bromofenacilo generado a partir de los compuestos 7 y 12-19, el segundo pico (*t_R* = 15.2 min) resultó ser el isobutirato de *p*-bromofenacilo presente en las mezclas obtenidas de los compuestos 8–11 y el último pico (*t_R* = 16.1 min) correspondió al tigolato de *p*-bromofenacilo observado en las mezclas obtenidas de los compuestos 7–15.

(2*S*) Metilbutirato de *p*-bromofenacilo: Sólido amorfo blanco; $[\alpha]_D +18.6$ (c 1.0, MeOH); ¹H NMR (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.78 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar), 7.64 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar), 5.29 (2H, s), 2.56 (1H, dq, *J* = 6.9, 6.9 Hz, H-2), 1.24 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, 2Me), 0.98 (3H, t, *J* = 7.5 Hz, 3Me). Los datos físicos y espectroscópicos corresponden a los descritos para el (2*S*)-metilbutirato de *p*-bromofenacilo (Ono *et al.*, 1990b).

Isobutirato de *p*-bromofenacilo: Sólido amorfo blanco; NMR ¹H (CDCl₃, 300 MHz): δ 7.78 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar), 7.63 (2H, d, *J* = 8.7 Hz, Ar), 5.29 (2H, s), 2.74 (1H, sept., *J* = 6.9 Hz), 1.26 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me), 1.24 (3H, d, *J* = 6.9 Hz, Me).

Tiglato de *p*-bromofenacilo: Sólido amorfo blanco; NMR ^1H (CDCl_3 , 300 MHz): δ 7.80 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar), 7.64 (2H, d, $J = 8.7$ Hz, Ar), 7.04 (1H, qq, $J = 6.9, 1.5$ Hz, H-3), 5.34 (2H, s), 1.9 (3H, m, 2Me), 1.84 (3H, dd, $J = 6.9, 1.5$ Hz, 3Me).

4.6.1.2.1. Preparación de los ésteres de Mosher del nilato de *p*-bromofenacilo

A una solución del nilato de *p*-bromofenacilo (0.5–1.6 mg) en diclorometano seco se adicionaron 4-(dimetilamino) piridina (DMAP, 2 mg), dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 6 mg) y cloruro de (*R*)(–)- α -metoxi- α -trifluorometilfenilacetilo (MTPA-Cl, 4–8 mg). Después de 12 horas de reposo se agregaron 5 mL de H_2O y 10 mL de éter etílico y se agitó vigorosamente por 10 min (Dale y Mosher 1973; Ohtani *et al.*, 1991; Rieser *et al.*, 1992). La fase orgánica se trató en CLAP en una columna semipreparativa de SiO_2 con una fase móvil de *n*-hexano–AcOEt (95:5) y un flujo de 2.5 mL/min para producir 0.3–1.3 mg del éster (*S*)-MTPA del nilato de *p*-bromofenacilo. El tratamiento con el (*S*)-(+)-MTPA-Cl utilizando la metodología descrita anteriormente produjo 0.3–1.2 mg del correspondiente éster (*R*)-MTPA. Los compuestos **9**, **10**, **13**, **14**, **17** y **18** proporcionaron el siguiente par de ésteres de Mosher diastereoisoméricos:

Ester (*S*)-MTPA del nilato de *p*-bromofenacilo (2*S*, 3*S*): Sólido cristalino blanco; $[\alpha]_D -8.8$ (c 1.2, CHCl_3); RMN ^1H (CDCl_3 , 300 MHz) δ 5.47 (1H, dq, $J = 7.2, 6.3$ Hz, H-3), 5.27 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, CH_2), 5.18 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, CH_2), 2.96 (1H, dq, $J = 7.2, 7.2$ Hz, H-2), 1.36 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, 3Me), 1.31 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, 2Me).

Ester (*R*)-MTPA del nilato de *p*-bromofenacilo (2*S*, 3*S*): Sólido cristalino blanco; $[\alpha]_D^{25} +8.8$ (c 1.1, CHCl₃) RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.47 (1 H, d, $J = 7.2, 6.6$, H-3), 5.13 (1H, d, $J = 16.5$, CH₂), 5.04 (1H, d, $J = 16.5$, CH₂), 2.93 (1H, dq, $J = 7.2, 7.2$, H-2), 1.44 (3H, d, $J = 6.6$, 3Me), 1.24 (3H, d, $J = 7.2$, 2Me).

A partir de los compuestos **7**, **8**, **11**, **12**, **15**, **16** y **19** se obtuvo un segundo par de diastereoisómeros:

Ester (*R*)-MTPA del nilato de *p*-bromofenacilo (2*R*, 3*R*): Sólido cristalino blanco; $[\alpha]_D^{25} +7.0$ (c 1.0, CHCl₃), ¹H-NMR (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.47 (1 H, dq, $J = 7.2, 6.3$ Hz, H-3), 5.27 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, CH₂), 5.18 (1H, d, $J = 16.2$ Hz, CH₂), 2.96 (1H, dq, $J = 7.2, 7.2$ Hz, H-2), 1.36 (1H, d, $J = 6.3$ Hz, 3Me), 1.31 (1H, d, $J = 7.2$ Hz, 2Me).

Ester (*S*)-MTPA del nilato de *p*-bromofenacilo (2*R*, 3*R*): Sólido cristalino blanco; $[\alpha]_D^{25} -6.6$ (c 2.2, CHCl₃) RMN ¹H (CDCl₃, 300 MHz) δ 5.47 (1 H, d, $J = 7.2, 6.6$ Hz, H-3), 5.13 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, CH₂), 5.04 (1H, d, $J = 16.5$ Hz, CH₂), 2.93 (1H, dq, $J = 7.2, 7.2$ Hz, H-2), 1.44 (3H, d, $J = 6.6$ Hz, 3Me), 1.24 (3H, d, $J = 7.2$ Hz, 2Me).

4.6.2. Acetilación de la orizabina VIII (6) y de las subfracciones E y F.

A 17.2 mg de **6** se adicionaron 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación continua a temperatura ambiente durante 24 horas. Posteriormente, el exceso de anhídrido acético se eliminó con 2 mL de H₂O

destilada y se agitó durante 5 min, la mezcla se extrajo con acetato de etilo (3×5 mL). La fase orgánica se trató con HCl 0.1 N (2×5 mL), seguida de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO_3 (2×5 mL) y por último, se lavó con H_2O (2×5 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a sequedad bajo presión reducida. Esta reacción produjo el compuesto **21** (derivado peracetilado de la orizabina VIII), el cual se purificó mediante CLAP (inciso 4.6.2.1)

El mismo procedimiento se hizo con las subfracciones **E** (61.5 mg) y **F** (82.1 mg) para preparar sus derivados acetilados correspondientes, pero incrementando la cantidad de piridina y anhídrido acético a 1 mL en cada uno. Las mezclas de reacción fueron analizadas por CLAP para obtener los derivados **20** y **22–25** (ver inciso 4.6.2.1.).

4.6.2.1. Separación de los compuestos 20-25 mediante CLAP.

Se hicieron pruebas en CLAP al nivel analítico para los derivados **20–25** y la columna adecuada resultó ser la de gel de sílice ($\mu\text{Porasil}^{\text{TM}}$, 3.9×300 mm, $10 \mu\text{m}$.) con las siguientes condiciones: fase móvil, *n*-hexano–AcOEt (1:1), concentración de la muestra: $10 \mu\text{g/mL}$, volumen de inyección: $20 \mu\text{l}$. Al nivel preparativo: columna de gel de sílice (ISCO, 21.2×250 mm, $10 \mu\text{m}$), flujo: 6.0 mL/min , concentración de la muestra: 20 mg/mL y volumen de inyección: $500 \mu\text{l}$. De esta forma fueron purificados los peracetatos **20** ($t_{\text{R}} = 34.32$ min, 15 mg), **21** ($t_{\text{R}} = 30$ min, 12 mg), **22** ($t_{\text{R}} = 31.23$ min, 13 mg), **23** ($t_{\text{R}} = 32.50$ min, 14 mg), **24** ($t_{\text{R}} = 34.65$ min, 11.5 mg) y **25** ($t_{\text{R}} = 36.45$ min, 16 mg) cuyas constantes espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) se incluyen en los cuadros 4, 5 y 6

4.7. Preparación de derivados a partir de la convolvulina de *Ipomoea purga*.

4.7.1. Hidrólisis básica de las fracciones I-VII.

Las fracciones obtenidas (I-VII) del extracto metanólico (convolvulina) se sometieron a hidrólisis básica. Cada fracción (10 mg) se trató con 3 mL de KOH (5 %) y la mezcla de reacción se dejó bajo reflujo (95 °C) durante una hora. Se ajustó el pH a 4.0 con HCl (4N) y se extrajo con éter etílico (2 × 5 mL). La fase acuosa se extrajo con *n*-butanol (2 × 5 mL) y el disolvente se eliminó con ayuda de una bomba de alto vacío. Cada fracción (I-VII) proporcionó una mezcla de ácidos glicosídicos que fueron analizados por cromatografía en placa, utilizando un sistema de elución constituido por CHCl₃-MeOH-H₂O (6:4:1) (ver fig. 13).

La fracción II (400 mg) se sometió al mismo tratamiento alcalino descrito anteriormente, conservando las relaciones de volúmenes de reactivo a utilizar, y se obtuvieron 421.9 mg del producto de hidrólisis (**G1**). Este producto fue esterificado con diazometano para posteriormente efectuar la separación de los compuestos **26-28** mediante cromatografía de líquidos (CLAP) (ver inciso 4.7.3.2.1.).

4.7.2. Hidrólisis ácida de los ésteres púrgicos A (**26**) y B (**27**).

De manera independiente, a 40 mg de **26** y 15 mg de **27** se les agregaron 10 mL de HCl (4 N) y cada mezcla se calentó bajo reflujo a 90 °C durante dos horas. La mezcla en cada caso se diluyó con 5 mL de H₂O y se extrajo con éter etílico (3 × 10 mL). La fase acuosa se neutralizó con KOH (1 N) y se extrajo con *n*-BuOH (3 × 10 mL). Esta fase

orgánica se lavó con H₂O (2 × 5 mL) y el disolvente se evaporó al vacío para obtener una mezcla de monosacáridos que fue analizada por CLAP (ver inciso 4.7.2.1.).

La fase orgánica de la primera extracción (etérea) se disolvió en 10 mL de cloroformo y se esterificó con un exceso de CH₂N₂ (ver inciso 4.7.3.3.). La mezcla de reacción se concentró al vacío y se analizó mediante CLAP (ver inciso 4.7.3.3.1.). De esta forma se lograron obtener los ésteres metílicos de los ácidos convolvulínico (**31**) y jalapινόico (**32**) de **26** y **27**, respectivamente.

4.7.2.1. Análisis de los carbohidratos presentes en 26 y 27 mediante CLAP.

Los extractos butanólicos obtenidos de las hidrólisis ácidas de **26** y **27** (ver inciso 4.7.2.) fueron analizados en CLAP en una columna para carbohidratos (Waters) (3.9 × 300 mm, 10 μm) con las siguientes condiciones: fase móvil: CH₃CN–H₂O (85:15), flujo: 1 mL/min, concentración de la muestra: 5 mg/mL y volumen de inyección: 20 μl. Para la identificación de los monosacáridos presentes, se inyectaron de manera independiente diversos estándares de referencia y las mezclas de monosacáridos. Posteriormente, se efectuaron coeluciones con los estándares que desarrollaron tiempos de retención (t_R) similares a los detectados en la mezcla de hidrólisis. De esta forma, se identificaron: la L-ramnosa (t_R = 6.9 min), la D-quinovosa (t_R = 7.3 min), la D-fucosa (t_R = 8.3 min) y la D-glucosa (t_R = 13.6 min).

4.7.3. Reacciones de esterificación.

4.7.3.1. Generación del diazometano.

Para la generación del diazometano, a una solución de KOH (5 g en 7.5 mL de agua), 25 mL de EtOH y 15 mL de éter, se adicionaron 30 mL de una solución etérea de *N*-metil-*N*-nitroso-*O*-toluensulfonamida (21.5 g). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua en baño maría (58-60 °C). Después de 5 minutos, el CH₂N₂ se colectó mediante destilación en 20 mL de éter en baño de hielo.

4.7.3.2. Esterificación de G1.

A la mezcla **G1** (400 mg) disuelta en 10 mL de metanol se adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano para llevar a cabo la reacción de esterificación. La adición del diazometano se hizo hasta que cesó el desprendimiento de N₂ en el medio de reacción. Se obtuvieron 423.5 mg de la mezcla esterificada (**G2**) y la purificación de **26-28** se hizo mediante CLAP (ver inciso 4.7.3.2.1.).

4.7.3.2.1. Separación y purificación de los derivados esterificados (26-28).

Las condiciones al nivel analítico que permitieron la separación de los componentes de la mezcla **G2** fueron las siguientes: columna amino (NH₂), fase móvil: CH₃CN-H₂O (78:22), flujo: 0.5 mL/min, concentración de la muestra: 10 µg/ml y volumen de inyección: 20 µL. El escalamiento de las condiciones analíticas al nivel preparativo permitió obtener cantidades suficientes de cada componente de la mezcla **G2** para su caracterización.

La muestra **G2** se resolvió en tres picos mayoritarios que se colectaron para posteriormente inyectarlos en las mismas condiciones y lograr su purificación mediante la técnica de reciclaje de muestra. Los compuestos aislados y purificados fueron los siguientes:

Ester metílico del ácido púrgico A (26) (52 mg, $t_R = 25.73$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 152-154 °C; $[\alpha]_D -77$ (c 1, MeOH); RMN 1H y ^{13}C (ver cuadros 16, 17 y 18); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1165 $[M - H]^-$, 1019 $[M - H - C_6H_{10}O_4]^-$, 857 $[1019 - C_6H_{10}O_5]^-$, 711 $[857 - C_6H_{10}O_4]^-$, 565 $[711 - C_6H_{10}O_4]^-$, 403 $[565 - C_6H_{10}O_5]^-$, 257 $[403 - C_6H_{10}O_4]^-$.

Éster metílico del ácido púrgico B (27) (30 mg, $t_R = 23.38$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 145-148 °C; $[\alpha]_D -29$ (c 1, MeOH); RMN 1H y ^{13}C (ver cuadros 16, 17 y 18); FAB-MS (modo negativo) m/z : 1193 $[M - H]^-$, 1047 $[M - H - C_6H_{10}O_4]^-$, 901 $[1047 - C_6H_{10}O_4]^-$, 739 $[901 - C_6H_{10}O_5]^-$, 593 $[739 - C_6H_{10}O_4]^-$, 431 $[593 - C_6H_{10}O_5]^-$, 285 $[431 - C_6H_{10}O_4]^-$.

Éter monometílico del éster metílico del ácido púrgico A (28) (30 mg, $t_R = 18.8$ min): Sólido amorfo blanco; p.f. 117-120 °C; RMN 1H y ^{13}C (ver cuadros 19 y 20); FAB-MS modo negativo m/z : 1179 $[M - H]^-$, 857 $[M - H - C_6H_{10}O_5 - C_6H_{10}O_4 - CH_2]^-$, 565 $[857 - C_6H_{10}O_4 - C_6H_{10}O_4]^-$.

4.7.3.3. Esterificación de los ácidos jalapinólico y convolvulínico.

Una muestra de 5 mg del ácido convolvulínico obtenido de **27** y 10 mg de ácido jalapinólico de **28** se disolvieron en 5 mL de éter etílico y a cada solución se adicionó un exceso de CH_2N_2 . Las mezclas fueron analizadas mediante CLAP (ver inciso 4.7.3.3.1.) y se obtuvieron los derivados **31** y **32** a partir de **28** y **27**, respectivamente.

4.7.3.3.1. Purificación mediante CLAP del convolvulinato (**31**) y jalapinolato (**32**) de metilo.

Los compuestos **31** y **32** se purificaron en una columna de SiO_2 preparativa (ISCO, 21.2×250 mm, $10 \mu\text{m}$); fase móvil: *n*-hexano-cloroformo-acetona (6:3:1), flujo: 6 mL/min e inyección: $500 \mu\text{L}$. Se obtuvieron 2 mg de **31** ($t_R = 16.4$ min) y 4 mg de **32** ($t_R = 15$ min).

Éster metílico del ácido convolvulínico (31): Sólido blanco; p.f. $27-29^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D +1.5$ (c 2.0, CHCl_3) RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 0.93 (t, $J = 6.6$ Hz, Me-14), 1.64-1.24 (m, H-3 a H-10 y H-12 y H-13), 2.3 (t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 3.6 (m, H-11), 3.7 (s, CO_2CH_3).

Éster metílico del ácido jalapinólico (32): Sólido blanco; p.f. $46-47^\circ\text{C}$; $[\alpha]_D +1.0$ (c 2.0, CHCl_3) RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3 , TMS) δ 0.89 (t, $J = 6.9$ Hz, Me-16), 1.64-1.23 (m, H-3-10 y H-12-15), 2.30 (t, $J = 7.2$ Hz, H-2), 3.59 (m, H-11), 3.67 (s, $-\text{CO}_2\text{CH}_3$).

4.7.4. Reacciones de acetilación de 27 y 28.

De manera independiente 19 mg de **26** y 25 mg de **27** se disolvieron en 0.5 mL de piridina y 0.5 mL de anhídrido acético. Cada mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. Se adicionaron 2 mL de H₂O destilada y se extrajo con AcOEt (5 mL) dos veces. La fase orgánica se lavó con HCl (0.1 N) (2 × 5 mL), posteriormente con una solución saturada de NaHCO₃ (2 × 5 mL) y por último, con H₂O (2 × 5 mL). Se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a a presión reducida. Esta reacción produjo los compuestos **29** y **30**, de **26** y **27** respectivamente, que fueron purificados mediante CLAP (ver inciso 4.7.4.1.).

4.7.4.1. Purificación de 29 y 30.

La purificación al nivel preparativo de los derivados **29** y **30** se hizo con el sistema cromatográfico descrito anteriormente (ver inciso 4.6.2.1.) a excepción de la fase móvil utilizada y que correspondió al sistema binario de CHCl₃-Me₂CO (9:1). De esta forma, se purificaron **29** (t_R = 17.6 min, 26 mg) y **30** (t_R = 29.86 min, 28.3 mg), cuyas constantes espectroscópicas de RMN ¹H y ¹³C se presentan en los cuadros 16, 17 y 18.

4.7.5. Reacciones de sililación.

De manera independiente 3 mg de **31** y 1 mg de **32** se hicieron reaccionar con 0.2 mL del reactivo SIGMA SIL-A, una mezcla de trimetilclorosilano-hexametildisilano-piridina (1:3:9), a 70 ° C durante 5 minutos para formar los derivados **33** y **34**, respectivamente. Estos compuestos fueron sometidos a análisis mediante cromatografía

de gases acoplada a espectrometría de masas (EI-MS). La temperatura en la columna fue de 100 °C durante el primer minuto y se programó para alcanzar 250 °C a una velocidad de 10 °C/min. El compuesto **33** mostró el patrón de fragmentación; EM-IE m/z (%) M^+ 330 (0.27), 315 (3.46), 287 (66.79), 258 (9.51), 145 (100), 73 (35.45); en tanto que el espectro de masas del derivado **34** presentó los siguientes picos: EM-IE m/z (%) M^+ 326 (24.39), 311 (73.17), 287 (59.75), 173 (100), 73 (46.34).

4.7.6. Preparación de los ésteres de Mosher de **31** y **32**.

De forma independiente **31** (0.8 mg) y **32** (2.0 mg) se disolvieron en 0.5 mL de CH_2Cl_2 seco, se adicionaron 4 mg del reactivo (*R*)-MTPA-Cl, 2 mg de DDC (diciclohexilcarbodiimida) y 5 mg de DMAP (dimetilaminopiridina). Cada reacción se dejó reposar a temperatura ambiente durante 24 horas. A cada mezcla se adicionó 5 mL de agua y se dejó en agitación 10 minutos. Se efectuaron extracciones de las mezclas con éter (3 × 5 mL). El disolvente se eliminó y los productos de reacción se purificaron mediante cromatografía en placa utilizando *n*-hexano–AcOEt (9:1) como sistema de elución. El mismo procedimiento se usó para preparar y purificar el derivado diastereoisomérico con el (*S*)-MTPA-Cl para el jalapinolato de metilo (**32**) y el derivado (*R*)-MTPA del convolvulinato de metilo (a partir de **31**). Se logró obtener 0.9 mg y 1.0 mg de los derivados del (*S*)-MTPA y (*R*)-MTPA de **32** respectivamente, y 0.8 mg del (*R*)-MTPA de **31**. Las constantes espectroscópicas (RMN ^1H) de los compuestos obtenidos se presentan a continuación:

(S)-MTPA de 31 (convolvulínico): Sólido cristalino blanco; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.85 (3H, t, $J = 7.3$ Hz, 14Me), 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, 2CH $_2$), 3.55 (3H, q, $J = 1.2$ Hz, OMe), 3.66 (3H, s, COOMe), 5.09 (1H, tt, $J = 5.3, 7.0$ Hz, H-11).

(R)-MTPA de 32 (jalapινόlico): Sólido cristalino blanco; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.88 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, 16Me), 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, 2CH $_2$), 3.56 (3H, q, $J = 1.2$ Hz, OMe), 3.66 (3H, s, COOMe), 5.08 (1H, tt, $J = 5.5, 6.7$ Hz, H-11).

(S)-MTPA de 32 (jalapινόlico): Sólido cristalino blanco; RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) δ 0.84 (3H, t, $J = 6.9$ Hz, 16Me), 2.29 (2H, t, $J = 7.5$ Hz, 2CH $_2$), 3.56 (3H, q, $J = 1.2$ Hz, OMe), 3.66 (3H, s, COOMe), 5.08 (1H, tt, $J = 5.5, 6.7$ Hz, H-11).

4.8. Prueba de citotoxicidad.

Las líneas celulares derivadas de tumores humanos usadas para estas evaluaciones fueron: cáncer cérvico uterino (UIISO-SQC-1), carcinoma nasofaríngeo (KB), cáncer de útero (OVCAR) y cáncer de colon (HCT-15). De acuerdo a la técnicas descritas en la literatura (Likhyywitayawuid *et al.*, 1993; Suffness y Pezzuto, 1991), las células se mantuvieron en medio RMPI 1640 (10X) complementado con suero fetal bovino al 10 %. Todas las líneas celulares se cultivaron 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 las muestras a evaluar (0.16 a 20 µg/ml) y se incubaron durante 72 horas a 37° C en una atmósfera humidificada al 5 % de CO₂. Este ensayo se efectuó por dos métodos:

- i) Evaluación en tubo de ensayo. Por triplicado, se adicionaron 2.85 mL de la suspensión celular (25,000 cel/mL) a los tubos de ensayo que previamente contenían 0.15 mL de la muestra de prueba disuelta en DMSO en diferentes concentraciones (20, 4 y 2 µg/mL). Se prepararon tubos control conteniendo únicamente la suspensión celular.
- ii) Evaluación en microplacas de plástico. Se usaron microplacas de 96 cavidades con capacidad para 1.7 mL con 190 µL de suspensión celular (25,000 cel/mL) y 10 µL de la muestra disuelta en DMSO en diferentes concentraciones (20, 4.0, 0.8 y 0.16 µg/mL). De la misma forma, se preparó un control con suspensión celular.

La concentración celular se determinó mediante la cuantificación de las proteínas totales (Lowry *et al.*, 1951) en la evaluación en tubo y mediante el método de tinción con la sulforodamina B (Skehan, *et al.*, 1990) en la evaluación en microplacas. Los resultados se expresaron como la concentración que inhibió el 50 % del crecimiento del control después del periodo de incubación (CE_{50}). Los valores fueron estimados a partir de una gráfica semilogarítmica de la concentración del glicolípido ($\mu\text{g/ml}$) contra el porcentaje de células viables y de acuerdo con los procedimientos establecidos por el NCI (National Cancer Institute, EE. UU; Geran *et al.*, 1972), se consideró como un criterio de actividad aquellos valores que presentaron una concentración efectiva media (CE_{50}) menor de 20 $\mu\text{g/ml}$ para los extractos y de 4 $\mu\text{g/mL}$ para los compuestos puros (Suffness y Pezuto, 1991).

5. Resultados y discusiones

5.1. Estudio fitoquímico de la raíz de *Ipomoea orizabensis* (*Ipomoea tyrianthinae*).

Un estudio preliminar de las resinas de *I. tyrianthinae* (*I. orizabensis*) (Sosa-Vasquez, 1993) demostró que los glicolípidos de esta resina presentan el mismo núcleo oligosacárido que se encuentra en la jalapina de *I. stans* (Enríquez *et al.*, 1992) y *Convolvulus scammonia* (Noda *et al.*, 1990), el ácido (11*S*) 11-*O*-6-deoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-6-deoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-deoxi- β -D-glucopiranosido hidroxihexadecanoico (ácido escamónico A, fig. 5), por lo que el presente estudio químico de esta raíz se enfocó a la separación de los glicolípidos presentes en la mezcla de resinas glicosídicas que constituyen la jalapina. La elucidación estructural se hizo mediante técnicas de RMN multinuclear para el establecimiento del sitio de lactonización de la aglicona en el núcleo oligosacárido y la posición de esterificación para los diferentes ácidos de bajo peso molecular: ácidos 2-metilbutanoico (mb), 2-metilpropanoico (*isobutírico*, *ib*), 3-hidroxi-2-metilbutanoico (nílico, *nl*) y 2(*E*)-metilbutanoico (tíglico, *tg*).

Una vez efectuado el fraccionamiento inicial de la jalapina por cromatografía en columna (SiO_2) (Sosa Vasquez, 1992), se iniciaron las primeras pruebas de separación en cromatografía líquida de alta presión en fase normal (SiO_2) y en fase inversa (C_{18}) con la fracción primaria **FPJ**. La cromatografía en placa de esta fracción demostró dos componentes visibles al UV y por tal, razón las primeras pruebas de separación en CLAP se efectuaron con un detector de UV-VIS.

De acuerdo con las investigaciones previas (Bah, 1997), las condiciones cromatográficas que han resultado adecuadas para la separación de los constituyentes presentes en las jalapinas de otras convolvuláceas incluyen el uso de columnas de fase normal con soporte de gel de sílice (Noda *et al.*, 1987). La inyección de una muestra disuelta en alcohol *isopropílico* en una columna analítica (SiO_2) demostró una escasa afinidad de la fase estacionaria por los compuestos presentes en la mezcla. Esta prueba en una columna de fase inversa (C_{18}) resultó en una alternativa para la resolución de la muestra problema, ya que condiciones instrumentales análogas han sido utilizadas con éxito (Kogetsu *et al.*, 1991). De esta forma, en una columna analítica C_{18} se iniciaron una serie de evaluaciones para establecer la composición de la fase móvil ($\text{MeOH-H}_2\text{O}$) que permitiera una separación inicial de los componentes de la mezcla. Así se encontró que el sistema binario seleccionado en una proporción de 92:8 permitió el fraccionamiento en dos grupos principales: subfracciones **E** ($t_R=79.9$ min) y **F** ($t_R=105$ min), junto con cuatro minoritarias (**A-D**). Para optimizar la resolución de las subfracciones mayoritarias se incrementó la proporción de agua hasta 14% provocando una mejor separación de la mezcla (fig. 14).

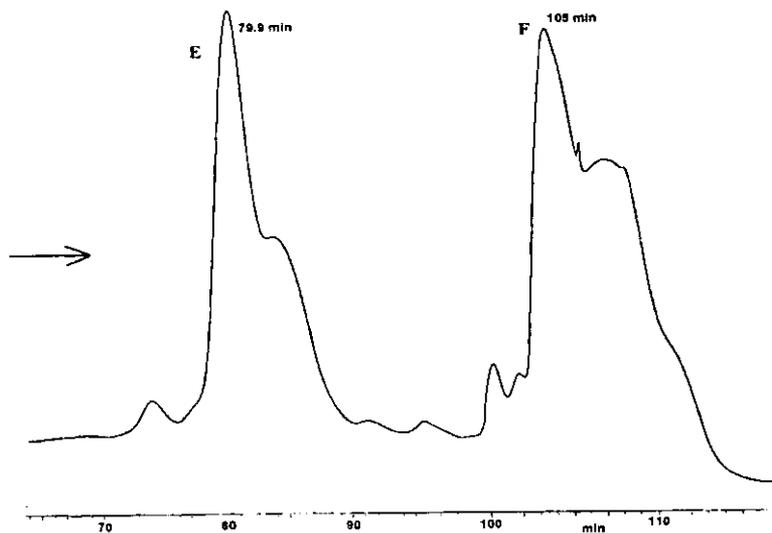
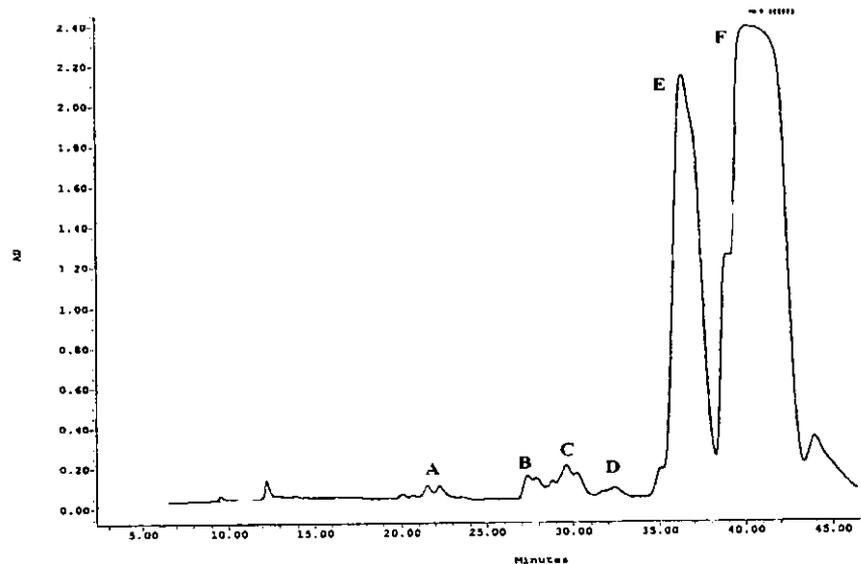


Figura 14. Análisis mediante CLAP de la fracción primaria de la jálapina (FPJ) de *Ipomoea orizabensis*. Condiciones: columna C₁₈ (3.9 × 300 mm, 10 μm), fase móvil: MeOH-H₂O (92:8) (Superior) y (86:14) (Inferior), flujo: 0.2 mL/min, detector: UV (254 nm) e inyección: 20 μL (4.3 mg/110 μL).

Con el propósito de disminuir los tiempos de retención obtenidos con el sistema MeOH-H₂O se optó por un cambio en la fase móvil a la mezcla binaria constituida por CH₃CN-H₂O (4:1) para generar el perfil cromatográfico mostrado en la figura 15.

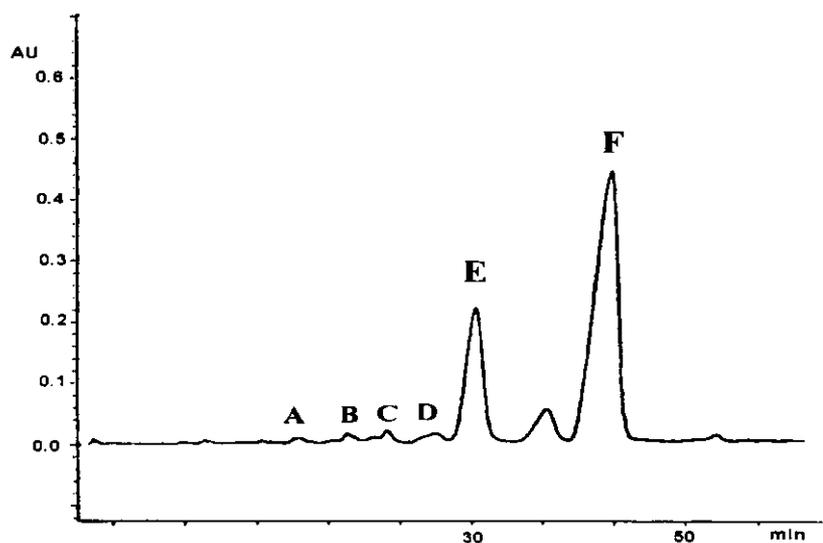


Figura 15. Resolución de la fracción primaria (FPJ) mediante CLAP. Condiciones: columna C₁₈ (3.9 × 300 mm, 10 μm), fase móvil: CH₃CN-H₂O (80:20), flujo: 0.5 mL/min, inyección: 20 μL (6.2 mg/200 μL) y detector: UV (254 nm).

Con el incremento en la proporción del disolvente aprótico (CH₃CN), los tiempos de retención disminuyeron aproximadamente a la mitad sin afectar la resolución del cromatograma. En la figura 16 se ilustra el perfil cromatográfico al nivel preparativo empleando un detector de índice de refracción y la fase móvil compuesta por CH₃CN-H₂O (88:12).

El fraccionamiento de FPJ en columna C₁₈ al nivel preparativo mediante la técnica de corte de núcleo se efectuó para reunir cantidades suficientes de las subfracciones A (t_R = 8 min), B (t_R = 11 min), C (t_R = 14 min), D (t_R = 17 min), E (t_R = 24 min) y F (t_R = 30

min). Se inyectaron cada una de éstas subfracciones de manera independiente utilizando la técnica de reciclaje de muestra (Bah y Pereda-Miranda 1996; Kubo y Nakatsu, 1990).

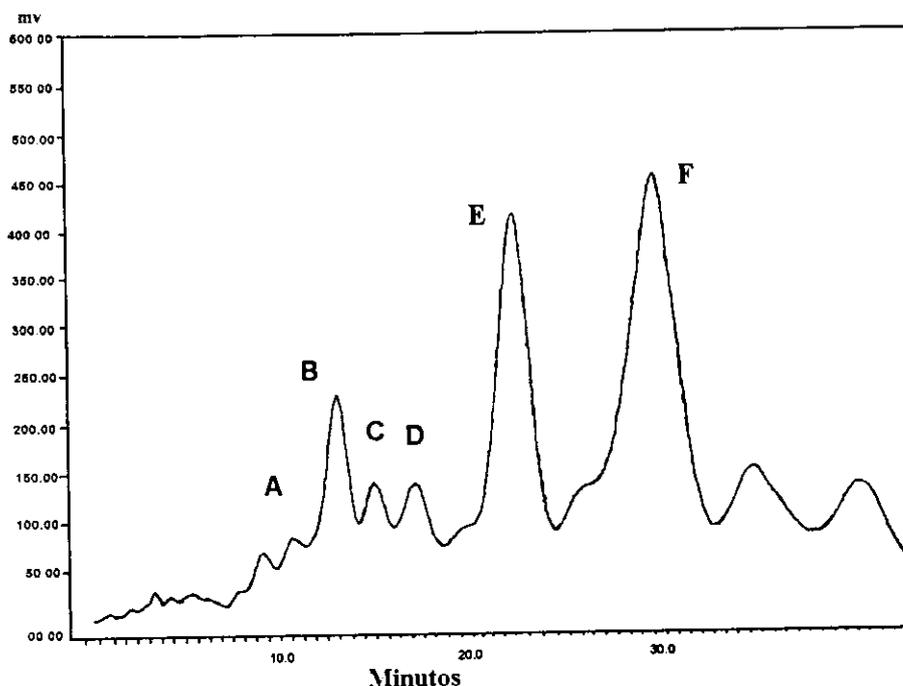


Figura 16. Cromatograma de la fracción primaria (FPJ) al nivel preparativo. Condiciones: columna C_{18} (21.2 × 30 mm, 10 μ m), fase móvil; CH_3CN-H_2O (88:12), flujo: 8 mL/min; inyección, 500 μ L (100 mg/mL) y detector: índice de refracción.

5.1.1. Separación de las escamoninas I (1) y II (2) y las orizabinas V-VIII (1-6).

Los tiempos de retención cortos de las subfracciones A–D ($t_R < 18$ min) en el sistema cromatográfico de fase inversa (C_{18}) no resultaron adecuados para la reinyección de las muestras en el modo de recirculación de muestra y así lograr la separación de sus constituyentes debido a la sobreposición de los picos provocada después de cada reciclaje. Por lo tanto, se investigó una segunda fase estacionaria que permitiera incrementar el

tiempo de retención de cada subfracción. La fase de aminopropilmetilsilano (NH_2) usada en la separación de las tricolorinas A–J (Bah, 1997) representó una alternativa que se ensayó al nivel analítico y resultó adecuada al nivel preparativo con las siguientes condiciones: columna NH_2 (19×250 mm, $10\mu\text{m}$), fase móvil: $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (92:8), flujo: 4 mL/min e inyección: 500 μL (40 mg/mL). El reciclaje de las muestras (A–D) permitió la purificación de los compuestos 1–6 (fig. 17).

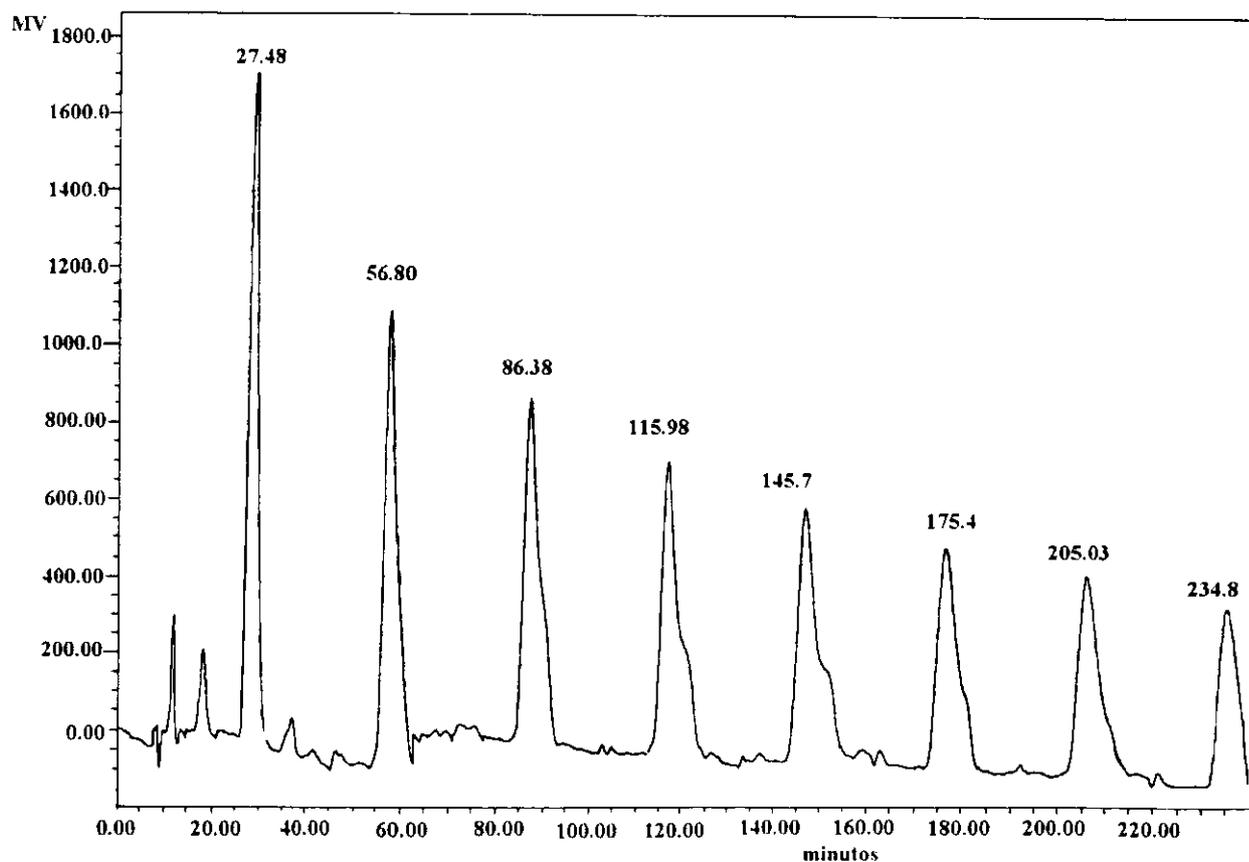


Figura 17. Cromatograma de la subfracción C. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la orizabina V (3). Condiciones: columna NH_2 (19×250 mm, $10\mu\text{m}$), fase móvil: $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (92:8), flujo: 4 mL/min e inyección: 500 μL (40 mg/mL).

5.1.2. Separación de las orizabinas IX–XXI (7–19).

Las condiciones cromatográficas usadas en la separación de los oligosacáridos 1–6, no fueron adecuadas para resolver los componentes de las subfracciones E y F debido a que estas mezclas presentaban una polaridad menor y probablemente también una mayor complejidad. La retención en la columna NH₂ fue muy pobre, incluso la recirculación de la muestra no provocó una mejoría en la resolución de las mezclas.

La separación en columna C₁₈ de las subfracciones E y F resultó satisfactoria (fig. 18) con el empleo de un sistema ternario constituido por CH₃CN–MeOH–H₂O (50:34:16) como fase móvil. Sin embargo, los tiempos de retención resultaron demasiado largos y se presentó el inconveniente de manejar un sistema móvil de tres componentes que dificultó la recuperación y reciclaje de los disolventes.

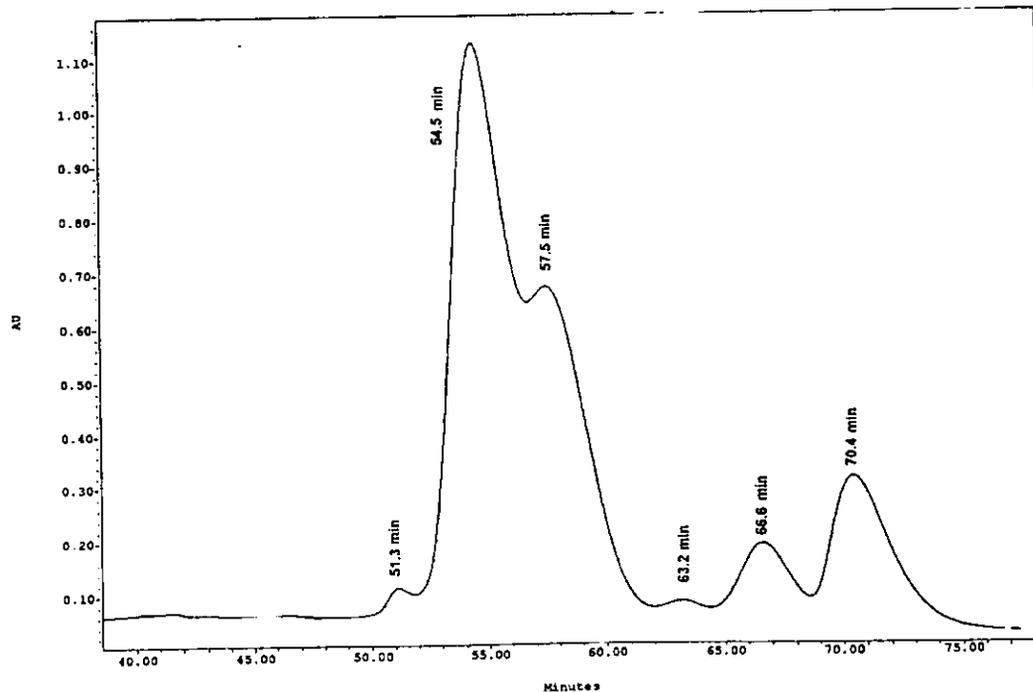


Figura 18. Cromatograma de la subfracción F. Condiciones: columna C₁₈ (3.9 × 300 mm, 10 μm); fase móvil: CH₃CN–MeOH–H₂O (50:34:16), flujo: 0.2 mL/min, inyección: 20 μL (1.2 mg/180 μL) y detector: UV (254 nm).

Ante los resultados poco halagadores en las pruebas de separación de las subfracciones E y F se decidió analizar la complejidad de las mezclas. En primer lugar, se efectuó la peracetilación de estas subfracciones cuyos constituyentes se resolvieron con mayor facilidad al utilizar la cromatografía en fase normal. La elucidación estructural de los mismos se discutirá posteriormente. El éxito obtenido en la separación de los derivados peracetilados permitió proponer la hipótesis de la probable existencia de pares de compuestos diastereoisoméricos donde la diferencia estructural se encontraría en la configuración absoluta de los grupos que esterifican el núcleo oligosacárido. Esta postulación había sido propuesta con anterioridad para los tetrasacáridos constituyentes de la jalapina de *Ipomoea stans* (Reynolds *et al.*, 1992). Sin embargo, en aquella ocasión no se realizó ningún experimento que permitiera demostrar esta observación. También se demostró mediante los derivados peracetilados que la subfracción E se encontraba constituida esencialmente por la escamonina I (1).

Como intento adicional para lograr la separación de los componentes de la subfracción F se inyectaron 8 mg de la misma en una columna NH₂ preparativa con una fase móvil de CH₃CN-H₂O (95:5) utilizando el modo de reciclaje de la muestra. En la figura 19 se ilustra el perfil cromatográfico que permitió un fraccionamiento primario de esta subfracción.

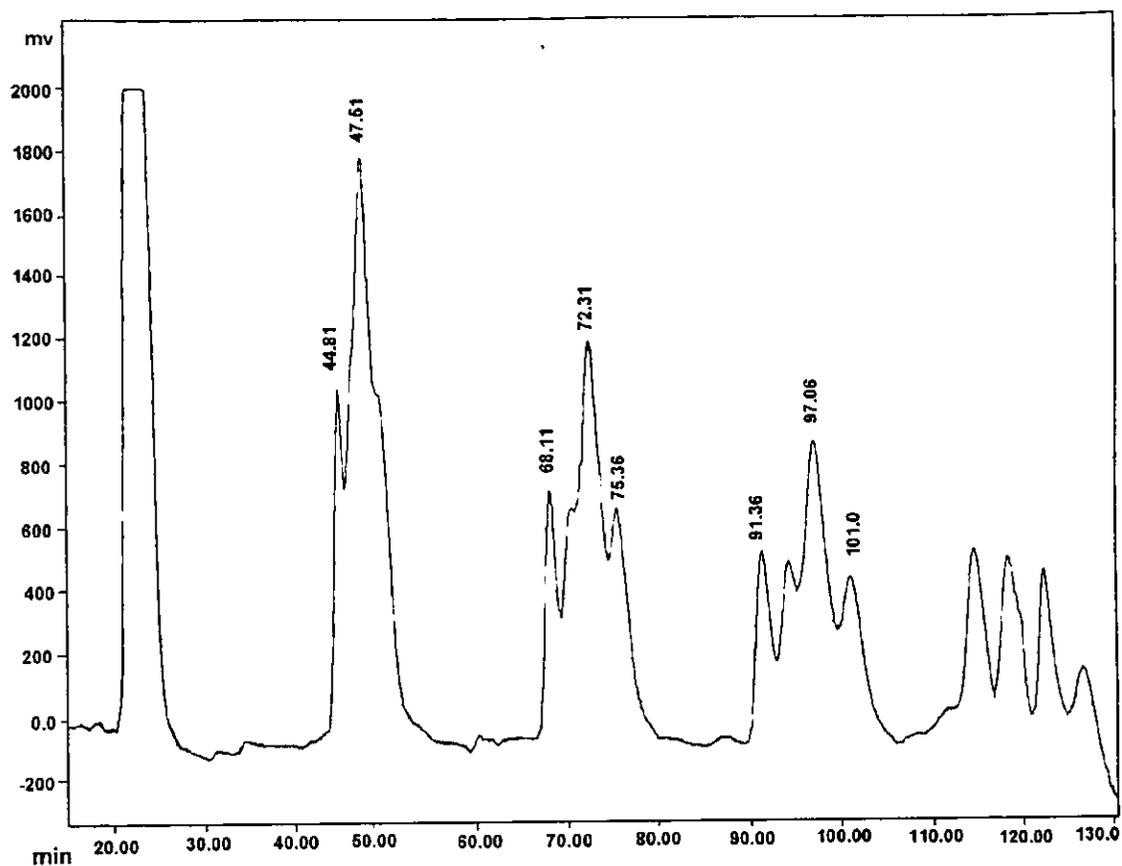


Figura 19. Cromatograma de la subfracción F, utilizando la técnica de reciclaje de muestra. Condiciones: columna C_{NH_2} (19×150 mm, $10 \mu m$), fase móvil: CH_3CN-H_2O (95:5), flujo: 4 mL/min, inyección: $500 \mu L$ (16 mg/mL) y detector: índice de refracción.

En este proceso de separación cada uno de los picos colectados debía ser inyectado para lograr su purificación. Este procedimiento complicaba el proceso de separación y, por lo tanto, se intentó obtener subfracciones de menor complejidad a partir de la subfracción F con un soporte que proporcionara una mayor resolución (C_{18} Spherisorb^R) que la obtenida con la columna ISCO. De esta manera, el perfil obtenido con el cambio de soporte cromatográfico mostró cuatro componentes que se designaron con los números I-IV (fig. 20).

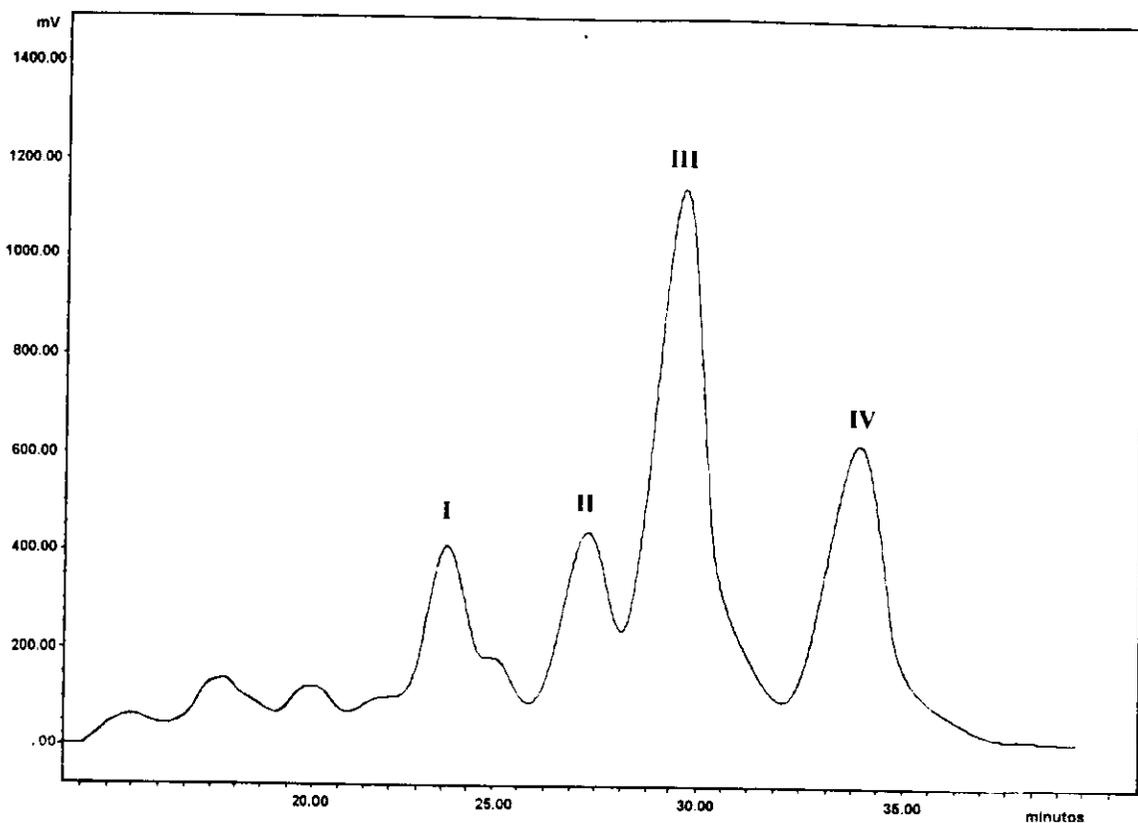


Figura 20. Cromatograma correspondiente a la resolución de la subfracción F mediante el empleo de una columna C₁₈ Spherisorb^R (Waters), fase móvil: CH₃CN-H₂O (88:12), flujo: 8 mL/min e inyección: 40 mg/500 μL.

Las pruebas para lograr la separación de los componentes de las subfracciones I ($t_R = 23.8$ min), III ($t_R = 28.9$ min) y IV ($t_R = 33.4$ min) se hicieron en la misma columna usada para la obtención de las orizabinas V-VIII (3-6), con un sistema de elución constituido por CH₃CN-H₂O (92:8). En la figura 21 se presenta el perfil cromatográfico obtenido durante la resolución de la fracción I mediante la aplicación de la técnica de reciclaje de muestra. De esta forma, se logró la obtención de la orizabina IX (7, $t_R = 25$ min) y la resolución del pico con un $t_R = 30$ min en dos subfracciones adicionales ($t_R = 182$ min y $t_R = 195$ min) después de siete ciclos. El reciclaje en las mismas condiciones de cada una de éstas permitió la purificación de la orizabinas X y XI (8 y 9) a partir del pico

de menor polaridad y de las orizabinas XII–XIII (10–11) a partir del segundo. La figura 22 ilustra la resolución de la primera subfracción al nivel analítico y la aplicación conjunta de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de muestra para garantizar la purificación de las orizabinas X (8) y XI (9). La aplicación de estos procedimientos cromatográficos en la resolución de las subfracciones III y IV permitió la obtención de las orizabinas XIV–XVII (12–15) y XVIII–XXI (16–19), respectivamente.

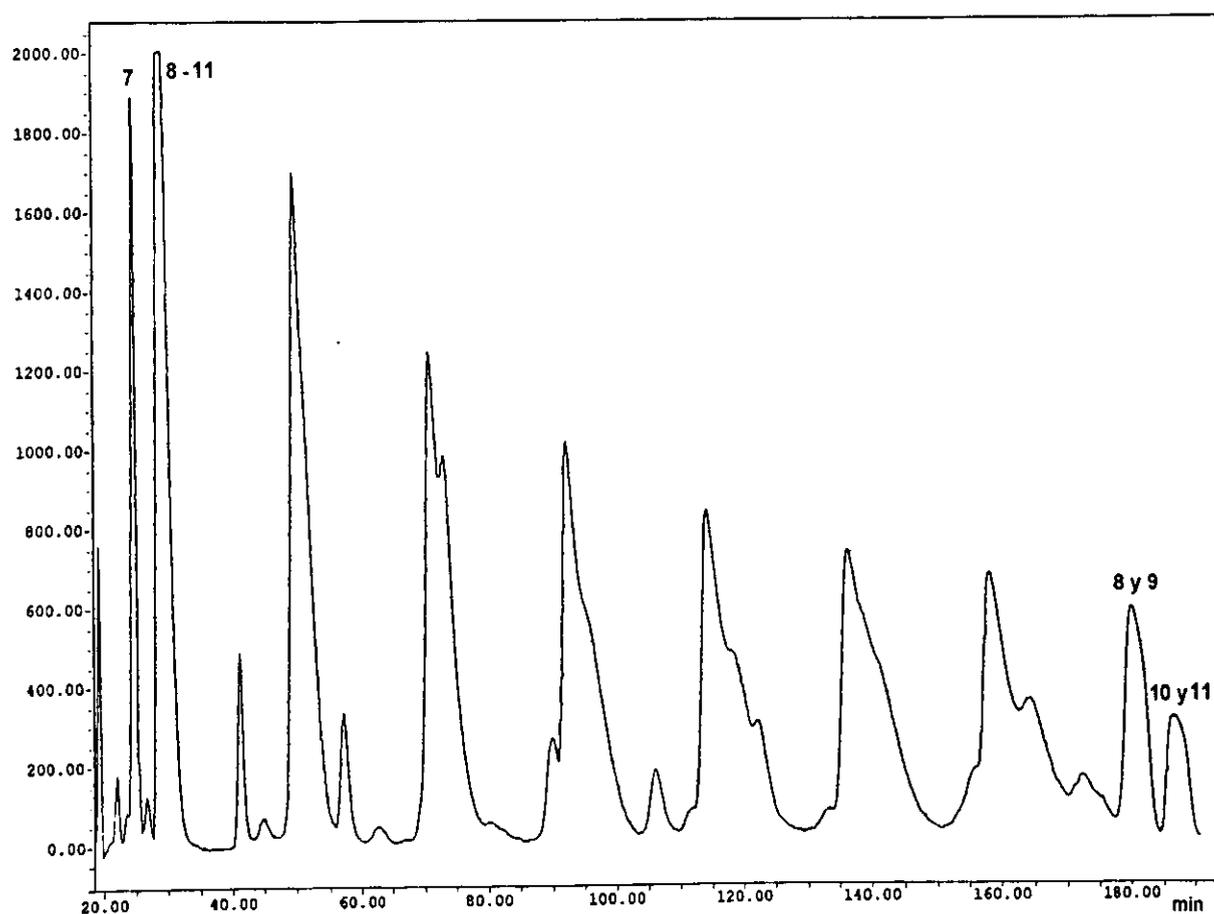


Figura 21. Cromatograma de la subfracción I para la purificación de las orizabinas IX–XIII (7–11). Condiciones: columna C_{NH_2} (19 × 150 mm, 10 μ m), modo: reciclaje de muestra, fase móvil: CH_3CN-H_2O (92:8), flujo: 4 mL/min e inyección: 8mg/500 μ L.

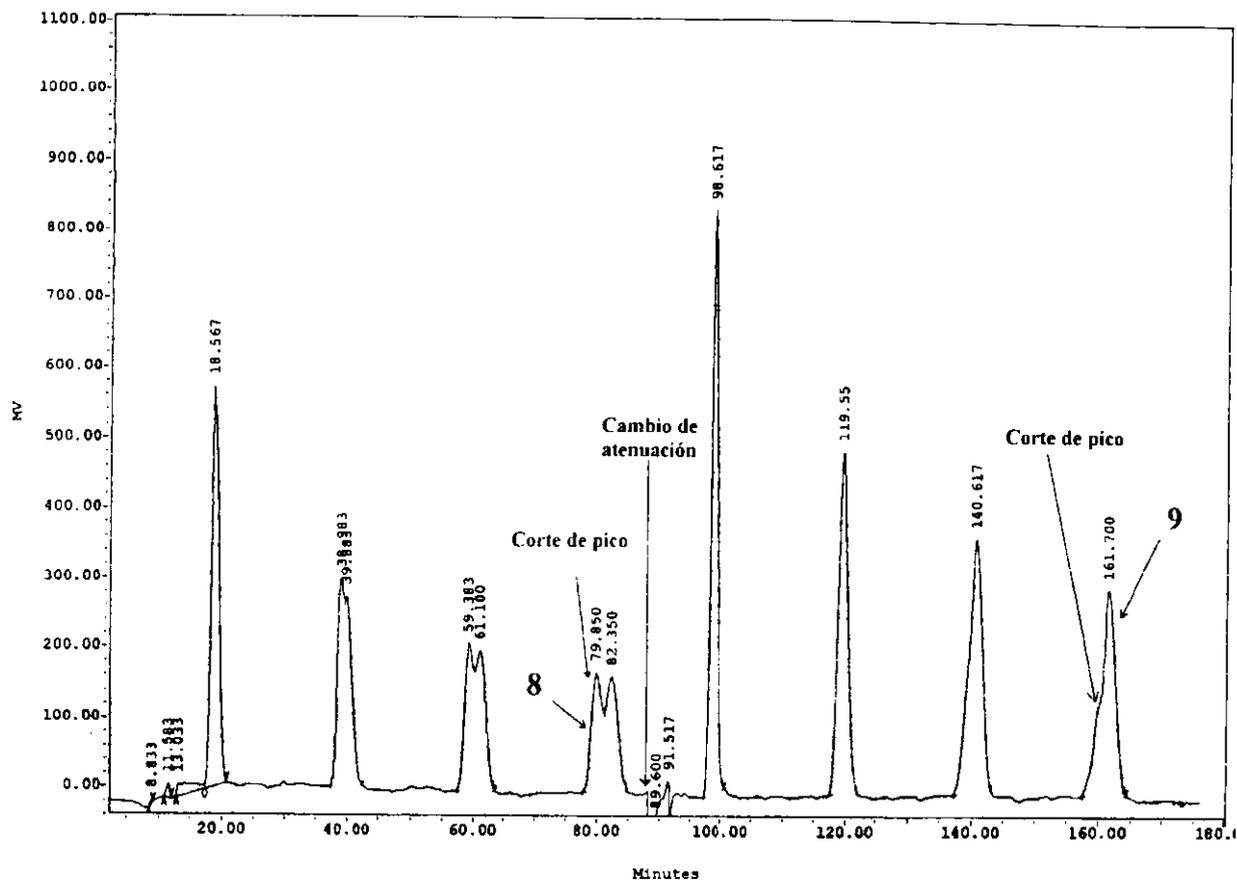


Figura 22. Cromatograma correspondiente a la obtención de las orizabinas X (8) y XI (9) con el empleo de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de muestra. Condiciones: columna C_{NH_2} (3.9×300 mm, $10 \mu\text{m}$), fase móvil: CH_3CN-H_2O (92:8), flujo: 0.5 mL/min e inyección: $20 \mu\text{L}$ ($1 \text{ mg}/100 \mu\text{L}$).

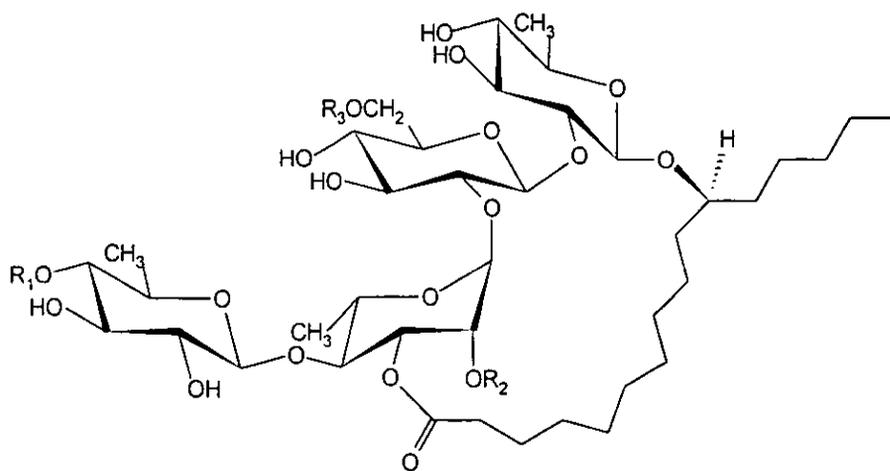
5.1.3. Elucidación estructural de las orizabinas V–VIII (3–6).

Las constantes espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) y espectrométricas (FAB–MS) registradas para los compuestos **1** y **2** demostraron que estos productos correspondían a las escamoninas I y II que habían sido aisladas de la jalapina de *Convolvulus scammonia* (Noda *et al.*, 1990). Debido a que todos los compuestos presentes en la jalapina de *I. orizabensis* (fig. 23) poseen el ácido escamónico A como el núcleo oligosacárido (Sosa-Vasquez, 1993), la elucidación estructural de cada uno de los constituyentes individuales obtenidos a partir de las mezclas de glicolípidos (FPJ) de esta planta se hizo mediante la comparación de sus constantes espectrométricas y espectroscópicas con las descritas para el ácido escamónico A y la escamonina II (**2**).

Los espectros de masas FAB (modo negativo) de las orizabinas V–VIII (3–6) permitieron calcular la misma fórmula molecular para estos glicolípidos ($\text{C}_{50}\text{H}_{86}\text{O}_{22}$), ya que todos mostraron un mismo ion pseudomolecular de m/z 1037 $[\text{M} - \text{H}]^-$. Estos compuestos diastereoisoméricos mostraron un peso molecular de 100 Daltons mayor que el correspondiente a la escamonina II (**2**) y que evidenció la presencia de un residuo niloilo adicional (Bah y Pereda-Miranda, 1996). También, en los respectivos espectros se observaron los picos comunes de fragmentación provocadas por las rupturas de los enlaces glicosídicos (Dell, 1987) y que son similares a los generados por el ácido escamónico A (fig. 24). La figura 25 ilustra el espectro de masas FAB de la orizabina VIII (**6**) donde se ilustran las principales fragmentaciones que sufre la molécula y la ubicación del sitio de lactonización del núcleo oligosacárido con la aglicona en la unidad de hexosa. Esto se observó por la diferencia de 18 Daltons ($-\text{H}_2\text{O}$) entre el fragmento de m/z 579 del

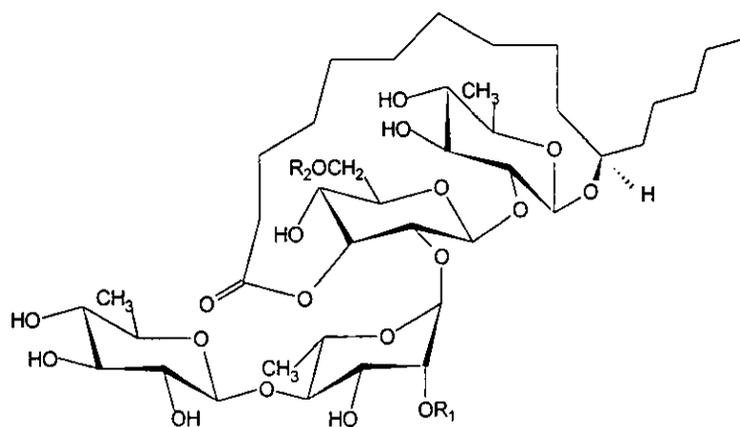
ácido escamónico A y el detectado en el compuesto **6** de m/z 561. Los iones m/z de 993, 847 y 617 contribuyeron a la identificación del grupo niloilo en las orizabinas V–VIII (**3–6**) al representar las pérdidas de 44 Daltons ($m - C_2H_4O$) desde los iones de m/z 1037 $[M - H]^-$, 891 y 661.

Los compuestos **3–5** presentaron un patrón de fragmentación similar entre sí y análogo al descrito para las orizabinas I–IV (Noda *et al.*, 1987) y la escamonina II (Noda *et al.*, 1990), de tal suerte que las diferencias estructurales entre las orizabinas V–VIII (**3–6**) deberían corresponder a las posiciones de esterificación para la aglicona (jal), el 2-metilbutanoilo (mb) y el niloilo (nl) en el núcleo oligosacárido.



| | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-------------------|----------------|----------------|----------------|
| 1 (escamonina I) | tg | mb | H |
| 2 (escamonina II) | H | mb | H |
| 3 (orizabina V) | nl | mb | H |
| 4 (orizabina VI) | H | nl | mb |
| 5 (orizabina VII) | H | mb | nl |

nl = 2-metil-3-hidroxi-butanoilo (niloilo), mb = 2-metilbutanoilo y tg = 2(*E*)-metilbutenoilo



| Compuesto | R ₁ | R ₂ |
|--------------------|----------------|----------------|
| 6 (orizabina VIII) | mb | nl |

Figura 23. Compuestos aislados de las subfracciones de mayor polaridad (A–D) de la jalapina de *Ipomoea orizabensis*.

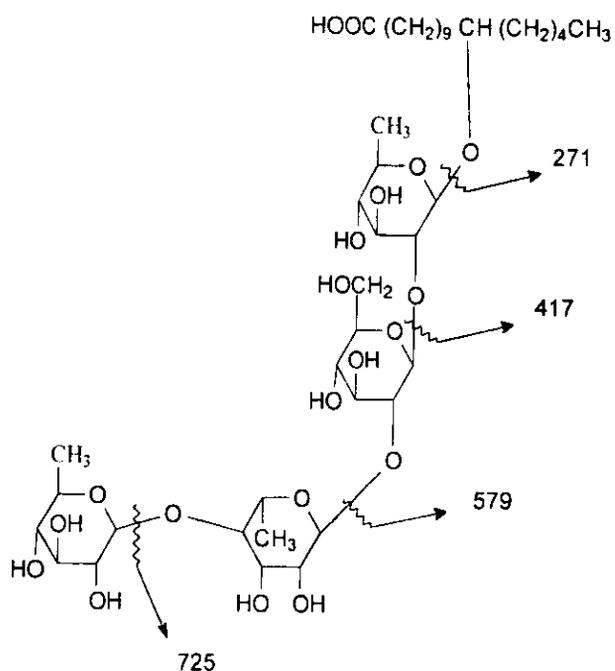
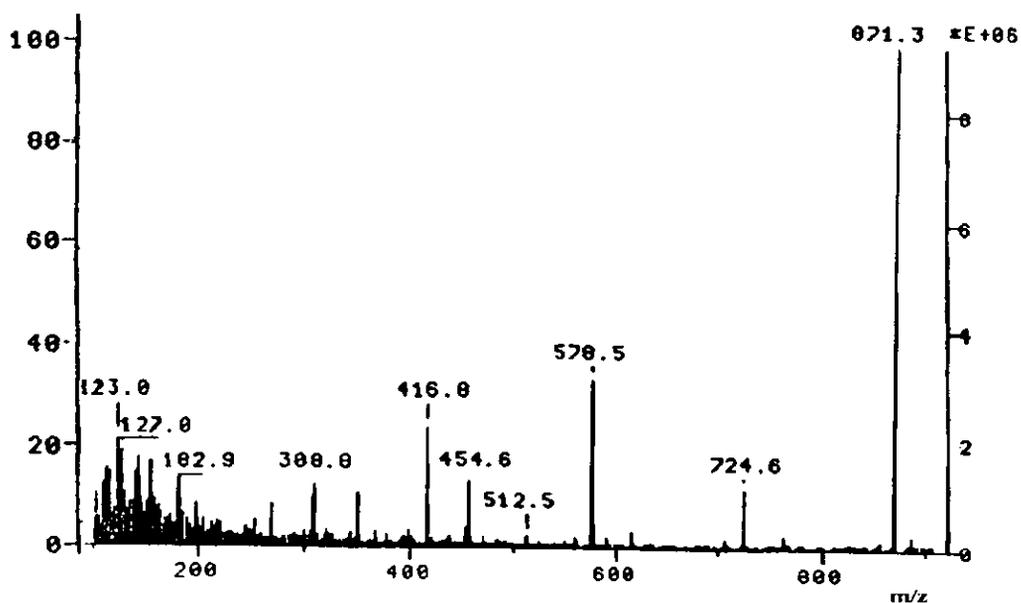


Figura 24. Espectro de masas FAB (modo negativo) del ácido escamónico A (Sosa-Vasquez, 1993). Patrón de fragmentación propuesto para los tetrasacáridos lineales de las convulváceas.

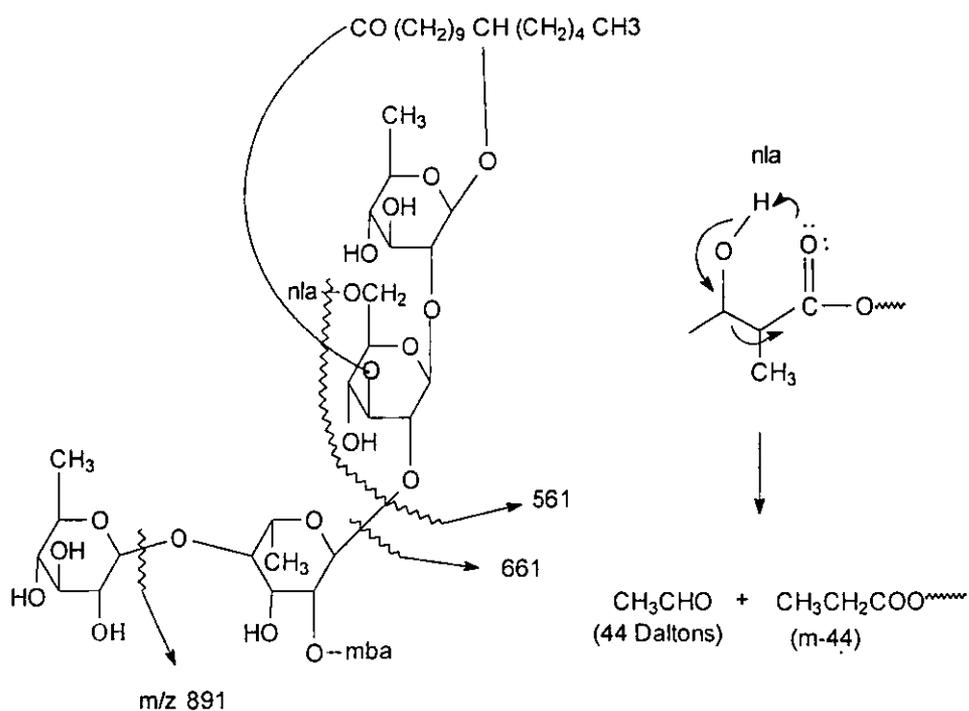
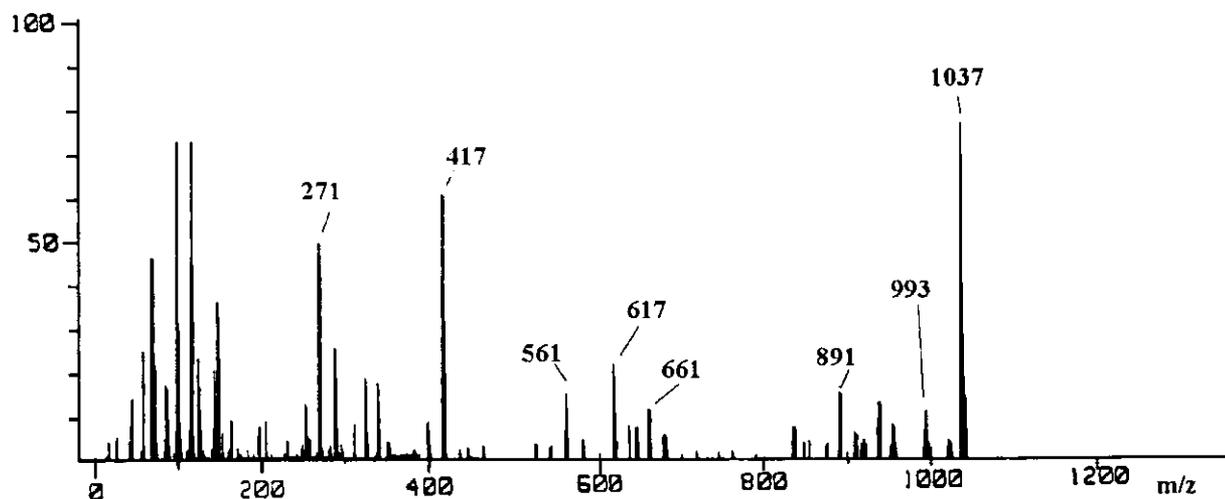


Figura 25. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la orizabina VIII (6) y su patrón de fragmentación propuesto.

La asignación de las señales de RMN ^1H (cuadro 2) y la localización de los sitios de esterificación en las orizabinas V-VIII (3-6) se hicieron mediante técnicas bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY) y heteronucleares (HMQC, HMBC). Así las orizabinas V-VIII (3-6) mostraron en los espectros de RMN ^1H (fig. 26) las siguientes características comunes a la escamonina II (2):

- a) Un par de señales entre δ 2.4-2.9 correspondientes a los dos protones no equivalentes del grupo metileno en posición alfa al grupo carboxilo de la aglicona. De esta manera, se evidenció la naturaleza macrolactónica para todos los compuestos.
- b) La señal que demuestra la presencia del residuo mb, el protón H-2 centrado en δ 2.3-2.5 (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

Los compuestos 3-5, al igual que en la escamonina II (2), presentaron un mismo patrón entre δ 5.0-6.8, por lo que, los hidroxilos de las posiciones C-2 y C-3 de la ramnosa se deben encontrar acilados como en el compuesto de referencia (2). Por otra parte, mientras que los desplazamientos de los núcleos de ^1H y ^{13}C de la posición C-2 de la ramnosa resultan similares a los de la escamonina II (2) (δ_{H} 6.14-6.27 y δ_{C} 69.5-70) son diferentes a los registrados para la orizabina VIII (6) ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0.44-0.57, $\Delta\delta_{\text{C}}$ 2.88-3.40 ppm) donde la lactonización ocurre en la posición C-3 de la glucosa. Esta propuesta se dedujo a partir del desplazamiento hacia campo bajo observado para H-3 ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 1.5 ppm) de la glucosa en 6 con respecto a la misma señal de los glicolípidos restantes 3-5. Los desplazamientos paramagnéticos de las señales del C-6 (δ ca 64), con respecto a los observados en los compuestos 1-3 (δ ca 63), de la unidad de glucosa para los compuestos 4-6 (cuadro 3) dio una evidencia de la esterificación en esa posición.

La confirmación de los sitios de lactonización con la aglicona y la localización de las dos posiciones de esterificación en el núcleo oligosacárido para las orizabinas V–VIII (3–6) se hicieron mediante la secuencia de pulsos HMBC que permitió detectar las conectividades ^1H – ^{13}C a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$) (Agrawal, 1992; Agrawal y Pathak, 1996; Bah y Pereda-Miranda, 1996). La figura 27 ilustra la asignación que se hizo para las resonancias de los carbonos carboxílicos de la aglicona (δ 172.3) del niloilo (δ 175.3) y del 2-metilbutanoilo (δ 176.04) en la orizabina VIII (6) a partir de sus acoplamientos $^2J_{\text{C-H}}$ con los hidrógenos del metileno de la aglicona (H–2, δ 2.86 y 2.36) y los protones H–2 de cada uno de los ésteres, es decir, la señal séxtuple para el 2-metilbutanoilo en δ 2.5 y la señal quintuple observada para el isómero *treo* del niloilo en δ 2.79 (Massiot *et al.*, 1992).

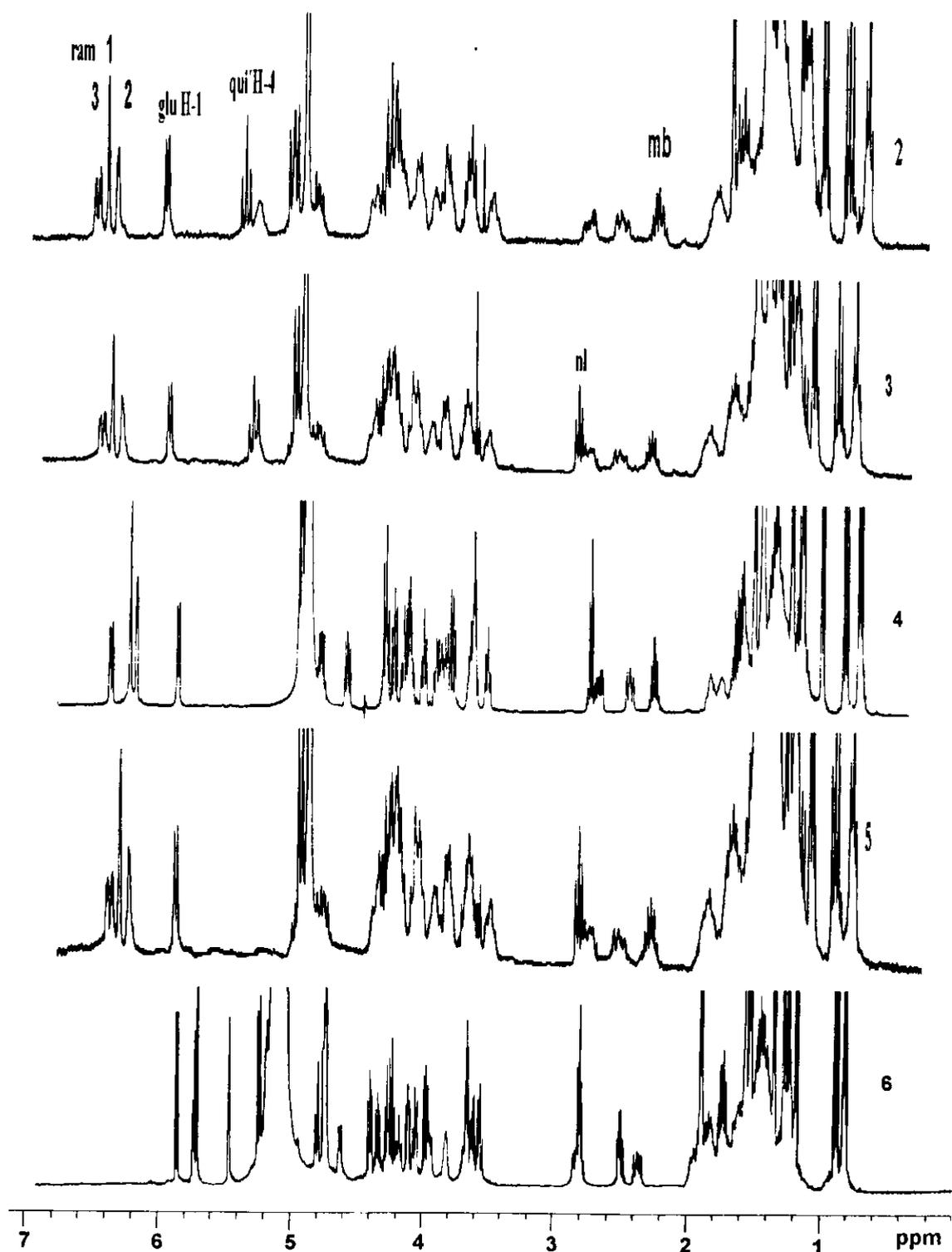


Figura 26. Espectros de RMN ^1H de la escamoina II (2) y de las orizabinas V-VIII (3-6). Abreviaciones, ram = ramnosa, glu = glucosa, qui = quinovosa externa, mb = 2-metilbutanoilo y nl = niloilo. 500 Mz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H de las orizabinas V–VIII (3–6)^a.

| Protón ^b | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Qui-1 | 4.98 d (7.5) | 4.93 d (7.7) | 5.02 d (8.0) | 4.73 d (8.0) |
| 2 | 4.29 dd (9.0, 7.5) | 4.24 dd (9.0, 7.7) | 4.32 dd (9.0, 8.0) | 4.39 dd (9.0, 8.0) |
| 3 | 4.10 dd (9.0, 9.0) | 4.11 dd (9.0, 9.0) | 4.18 dd (9.0, 9.0) | 4.26 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 3.55 dd (9.0, 9.0) | 3.54 dd (9.0, 9.0) | 3.62 dd (9.0, 9.0) | 3.55 dd (9.0, 9.0) |
| 5 | 3.67-3.80* | 3.63-3.70* | 3.68-3.78* | 3.60 m |
| 6 | 1.58 d (6.5) | 1.58 d (6.0) | 1.58 d (6.0) | 1.52 d (5.5) |
| Glu-1 | 5.92 d (7.5) | 5.84 d (7.4) | 5.91 d (7.0) | 5.85 d (7.5) |
| 2 | 4.24 dd (9.0, 7.5) | 4.12 dd (9.0, 7.4) | 4.18 dd (9.0, 7.0) | 4.10 dd (9.0, 7.5) |
| 3 | 4.30 dd (9.0, 9.0) | 4.16 dd (9.0, 9.0) | 4.24 dd (9.0, 9.0) | 5.71 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 4.08 dd (9.0, 8.5) | 3.83 dd (10.0, 9.0) | 3.92 dd (9.0, 9.0) | 4.17 dd (9.5, 9.0) |
| 5 | 3.87ddd (8.5, 6.5, 3.0) | 3.92 dd (10.0, 6.8, 2.0) | 3.96-4.1* | 3.93 ddd (9.5, 6.0, 2.5) |
| 6 | 4.42 dd (11.5, 3.0) | 4.59 dd (12.0, 6.8) | 4.98-5.03* | 4.80 dd (11.7, 2.5) |
| 6 | 4.24 dd (11.5, 6.5) | 4.85-4.93* | 4.60 dd (11.5, 6.5) | 4.71-4.76* |
| Ram-1 | 6.34* | 6.19 d (1.0) | 6.24 d (1.5) | 5.45 d (1.5) |
| 2 | 6.27 dd (3.0, 1.5) | 6.14 dd (3.0, 1.0) | 6.18 dd (3.0, 1.5) | 5.70 dd (3.5, 1.5) |
| 3 | 6.41 dd (9.5, 3.0) | 6.33 dd (10.0, 3.0) | 6.40 dd (10.0, 3.0) | 4.62 dd (9.5, 3.5) |
| 4 | 4.29 dd (9.5, 9.5) | 4.29 dd (10.0, 9.8) | 4.36 dd (10.0, 9.5) | 4.22 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 4.80 dq (9.5, 6.5) | 4.77 dq (9.8, 6.0) | 4.85 dq (9.5, 6.5) | 4.71-4.76* |
| 6 | 1.59 d (6.5) | 1.57 d (6.0) | 1.64 d (6.5) | 1.88 d (6.5) |
| Qui'-1 | 4.99 d (7.5) | 4.94 d (7.8) | 5.0 d (8.0) | 5.34 d (8.0) |
| 2 | 3.86 dd (8.0, 7.5) | 3.80 dd (8.9, 7.8) | 3.87 dd (9.0, 8.0) | 3.96 dd (9.0, 8.0) |
| 3 | 4.12 dd (9.0, 8.0) | 4.01 dd (8.9, 8.7) | 4.08 dd (9.0, 8.5) | 4.05 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 5.30 dd (9.0, 9.0) | 3.62 dd (9.0, 8.7) | 3.71 dd (9.0, 8.5) | 3.65 dd (9.0, 9.0) |
| 5 | 3.67-3.8 m | 3.63-3.70* | 3.68-3.78* | 3.66 m |
| 6 | 1.42 d (6.0) | 1.51* | 1.60 d (6.0) | 1.55 d (5.5) |
| Jal-2a | 2.82 ddd (15.0, 7.5, 3.0) | 2.71 ddd (15.0, 8.0, 3.0) | 2.77 ddd (15.0, 8.5, 3.0) | 2.80-2.86* |
| 2b | 2.58 ddd (15.0, 10.5, 2.5) | 2.48 ddd (15.0, 10.0, 3.0) | 2.55 ddd (15.0, 9.5, 2.5) | 2.36 ddd (17.8, 10.0, 2.0) |
| 11 | 3.98-3.94* | 3.85-3.88 m | 4.18-4.22* | 3.82 m |
| 16 | 0.851 t (7.0) | 0.89 t (7.0) | 0.87 t (7.0) | 0.82 t (7.0) |
| mb-2 | 2.34-2.39 m | 2.30 tq (7.0, 7.0) | 2.37 tq (7.0, 7.0) | 2.50 tq (7.0, 7.0) |
| 2-Me | 1.16 d (7.5) | 1.07 d (7.0) | 1.15 d (7.0) | 1.18 d (7.5) |
| 3-Me | 0.99 t (7.5) | 0.79 t (7.0) | 0.97 t (7.5) | 0.88 t (7.5) |
| nl-2 | 2.89 dq (7.0, 7.0) | 2.77 dq (7.0, 7.0) | 2.84 dq (7.0, 6.5) | 2.79 dq (7.0, 7.0) |
| 3 | 4.37 dq (7.0, 7.0) | 4.28-4.32* | 4.30-4.40* | 4.33 dq (7.0, 7.0) |
| 2-Me | 1.34 d (7.0) | 1.22 d (7.0) | 1.31 d (7.0) | 1.27 d (7.5) |
| 3-Me | 1.44 d (6.5) | 1.29 d (6.0) | 1.36 d (6.0) | 1.34 d (6.0) |

^aDatos registrados a 500 MHz en C₅D₅N. Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm en relación al TMS. Los acoplamientos (J) se encuentran en paréntesis y están expresados en Hz.

* indican señales sobrepuestas.

^bAbreviaciones; s = señal simple d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuádruple, m = señal múltiple

Las asignaciones se basaron en los experimentos ¹H-¹H COSY y TOCSY

Qui = quinovosa, Glu = glucosa, Ram = ramnosa, Jal = 11-hidroxihexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo; nl = 3-hidroxi-2-metilbutanoilo.

Cuadro 3. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C de las escamoninas I (1), II (2) y orizabinas V–VIII (3–6)^a.

| Carbon ^b | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Qui-I | 101.1 | 101.02 | 101.2 | 100.95 | 100.92 | 102.28 |
| 2 | 77.33 | 77.26 | 77.30 | 79.00 | 78.62 | 76.51 |
| 3 | 78.32 | 78.03 | 78.31 | 78.58 | 78.87 | 78.84 |
| 4 | 77.24 | 77.15 | 77.21 | 77.41 | 77.30 | 77.07 |
| 5 | 72.50 | 72.51 | 72.50 | 73.08 | 72.93 | 72.48 |
| 6 | 18.52 | 18.44 | 18.52 | 18.74 | 18.56 | 18.41 |
| Glu-I | 101.69 | 101.58 | 101.69 | 101.21 | 100.92 | 99.84 |
| 2 | 79.27 | 79.23 | 79.27 | 77.41 | 79.30 | 80.55 |
| 3 | 79.29 | 79.10 | 79.20 | 77.41 | 77.30 | 78.96 |
| 4 | 72.59 | 72.44 | 72.59 | 72.43 | 72.38 | 70.21 |
| 5 | 77.52 | 77.50 | 77.48 | 75.02 | 74.90 | 73.93 |
| 6 | 63.22 | 63.11 | 63.21 | 64.96 | 64.66 | 64.22 |
| Ram-I | 96.22 | 96.17 | 96.21 | 96.59 | 96.43 | 99.23 |
| 2 | 69.52 | 69.49 | 69.52 | 70.01 | 70.04 | 72.92 |
| 3 | 71.24 | 71.29 | 71.24 | 71.53 | 71.46 | 69.67 |
| 4 | 79.03 | 78.94 | 79.05 | 78.81 | 78.44 | 84.31 |
| 5 | 68.66 | 68.75 | 68.66 | 68.97 | 68.84 | 68.01 |
| 6 | 18.52 | 18.44 | 18.52 | 18.74 | 18.56 | 18.66 |
| Qui'-I | 105.23 | 105.31 | 105.20 | 105.55 | 105.35 | 105.93 |
| 2 | 75.18 | 75.00 | 74.99 | 75.20 | 75.08 | 76.08 |
| 3 | 75.39 | 78.28 | 75.36 | 78.23 | 78.10 | 78.05 |
| 4 | 76.93 | 76.59 | 76.62 | 76.80 | 76.65 | 76.51 |
| 5 | 70.47 | 72.86 | 70.35 | 72.65 | 72.50 | 73.09 |
| 6 | 18.00 | 18.44 | 17.97 | 18.74 | 18.56 | 18.41 |
| Jal-I | 173.26 | 173.37 | 173.26 | 173.58 | 173.42 | 172.29 |
| 2 | 34.55 | 34.42 | 34.52 | 34.65 | 34.46 | 34.31 |
| 11 | 79.29 | 79.23 | 79.27 | 79.40 | 79.30 | 80.32 |
| 16 | 14.28 | 14.20 | 14.28 | 14.52 | 14.31 | 14.16 |
| mb-I | 175.32 | 175.37 | 175.32 | 175.77 | 175.43 | 176.04 |
| 2 | 41.16 | 41.04 | 41.13 | 41.24 | 41.10 | 41.20 |
| 2-Me | 17.08 | 16.97 | 17.05 | 17.20 | 16.96 | 16.96 |
| 3-Me | 11.79 | 11.67 | 11.79 | 11.91 | 11.70 | 11.57 |
| nl-I | | | 174.98 | 175.60 | 175.41 | 175.29 |
| 2 | | | 48.60 | 48.72 | 48.76 | 48.56 |
| 3 | | | 69.52 | 69.23 | 69.06 | 69.06 |
| 2-Me | | | 13.20 | 13.63 | 13.33 | 13.24 |
| 3-Me | | | 21.05 | 21.10 | 20.92 | 20.81 |
| tg-I | 167.51 | | | | | |
| 2 | 129.10 | | | | | |
| 3 | 137.52 | | | | | |
| 2-Me | 12.25 | | | | | |
| 3-Me | 25.35 | | | | | |

^aDatos registrados a 125 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm relativos al TMS.

Todas las asignaciones están basadas en los experimentos HMQC.

^bAbreviaciones: Glu = glucosa, Qui = quinovosa, Ram = ramnosa, Jal = 11-hidroxi-hexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo; nl = 3-hidroxi-2metilbutanoilo, tg = 2(E)-metil-2-butenoilo.

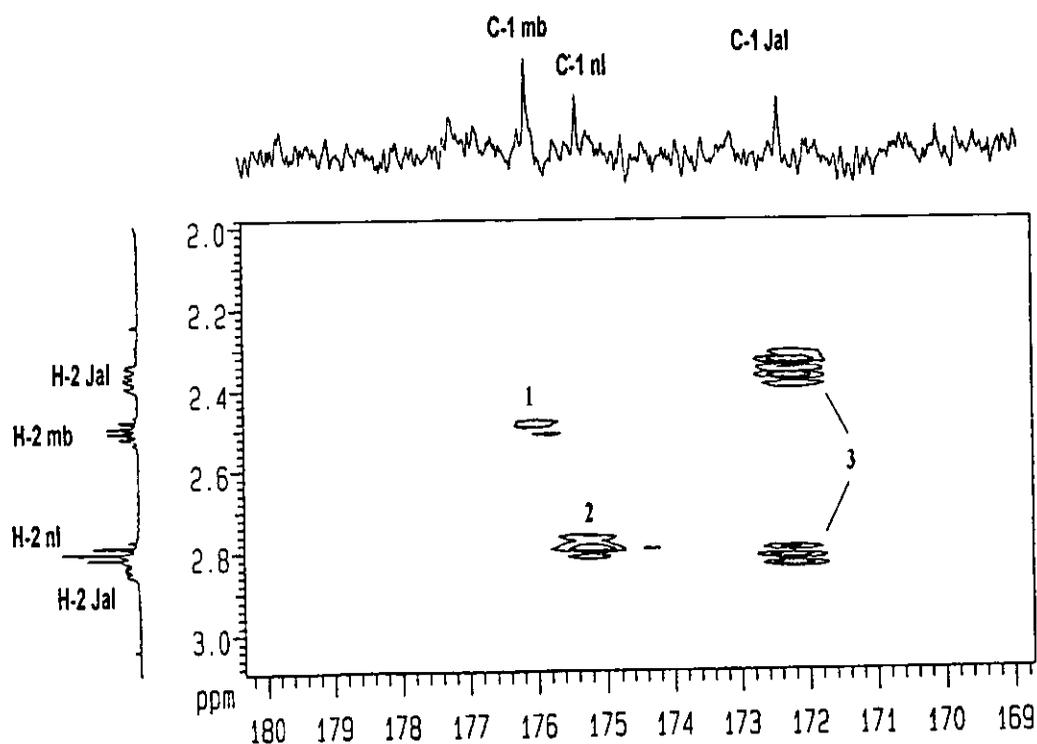


Figura 27. Sección del espectro de HMBC de la orizabina VIII (6) utilizado para la asignación de los carbonos carboxílicos (jal, mb y nl) a través de las correlaciones $^2J_{C-H}$ en las unidades que esterifican el núcleo oligosacárido. Correlaciones: 1; H₂mb-C₁mb, 2; H₂nl-C₁nl y 3; H₂jal-C₁jal. Abreviaciones: Jal = jalapinoilo, mb = 2-metilbutanoilo, nl = niloilo.

Posteriormente, los sitios de esterificación se dedujeron a partir de las correlaciones $^3J_{H-C}$ entre los carbonos C-1 del carboxilo de cada uno de los ésteres (jal, mb y nl) con las señales protónicas geminales a estos grupos. La figura 28 ilustra estas conectividades para la orizabina VIII (6) en donde la interacción $^3J_{H-C}$ entre el H-3 de la glucosa (δ 5.71) con el C-1 de la aglicona (δ 172.29) permitió identificar el sitio de lactonización en la posición C-3 de la glucosa, la segunda unidad sacárida. Lo anterior representa una característica estructural única entre todos los derivados del ácido escamónico A que presentan el C-3 de la ramnosa como sitio de esterificación común con la aglicona (Enriquez *et al.*, 1992; Kogetsu *et al.*, 1991; Reynolds *et al.*, 1995).

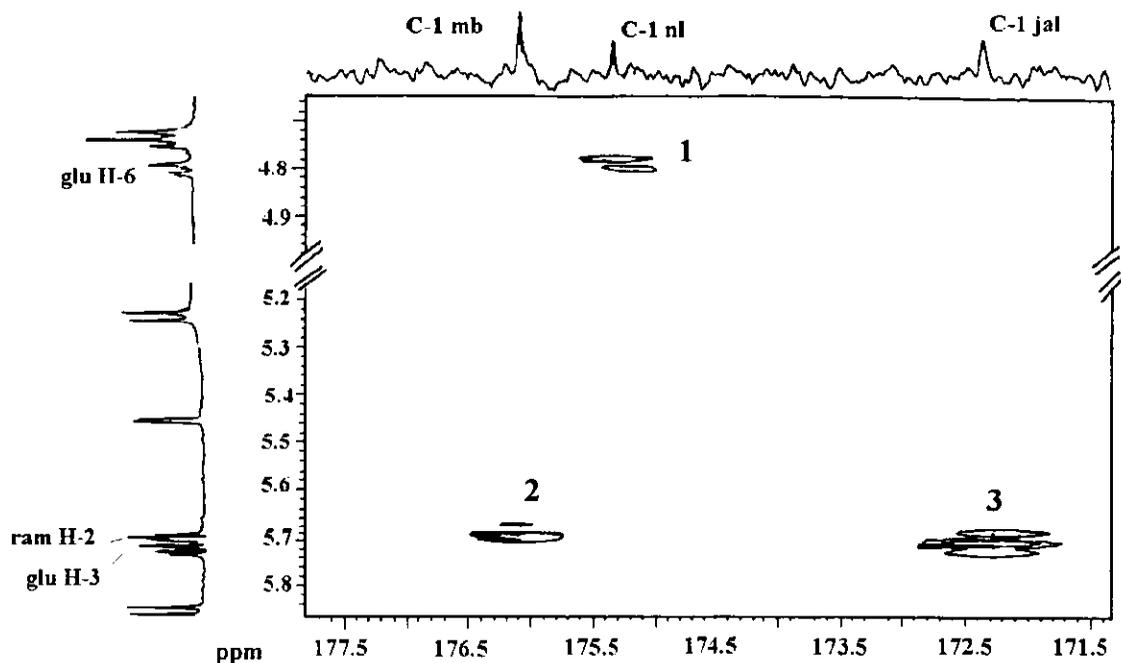


Figura 28. Sección del espectro HMBC de la orizabina VIII (**6**) utilizado para la asignación de los carbonos carboxílicos (jal, mb y nl) a través de las correlaciones $^3J_{C-H}$ con los protones del núcleo oligosacárido. Conectividades: 1; H₆glu-C₁nl, 2; H₂ram-C₁mb y 3; H₃glu-C₁jal. Abreviaciones: glu = glucosa, ram = ramnosa, mb = 2-metilbutanoilo, nl = niloilo y jal = jalapinoilo.

El mismo procedimiento se usó para la asignación de los carbonos carboxílicos de los ésteres en los compuestos restantes (**3-5**) y para la determinación de los sitios de esterificación del jalapinoilo, 2-metilbutanoilo y niloilo (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

A fin de sustentar la estructura propuesta para la orizabina VIII (**6**) y debido a que las señales H-2 de la ramnosa y H-3 de la glucosa presentaron una sobreposición parcial, se preparó el derivado peracetilado (**21**) a partir del producto natural (**6**). El espectro de RMN 1H mostró una resolución adecuada para estas dos señales (fig. 29) y la correlación entre el protón H-3 de la glucosa con el carbono C-1 de la aglicona en el espectro de HMBC (fig. 30) demostró que la lactonización efectivamente se encuentra en la unidad de glucosa. Los desplazamientos químicos de 1H y ^{13}C para el derivado **21** se incluyen en los cuadros 4 y 5.

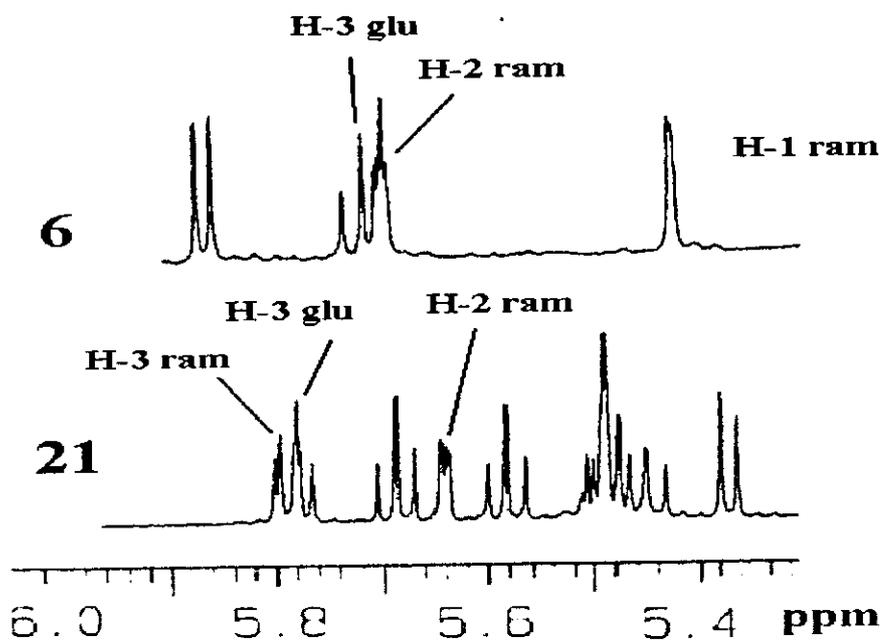


Figura 29. Secciones de campo alto de los espectros de RMN ^1H de la orizabina VIII (6) y su derivado peracetilado (21). Abreviaciones: glu = glucosa, ram = ramnosa.

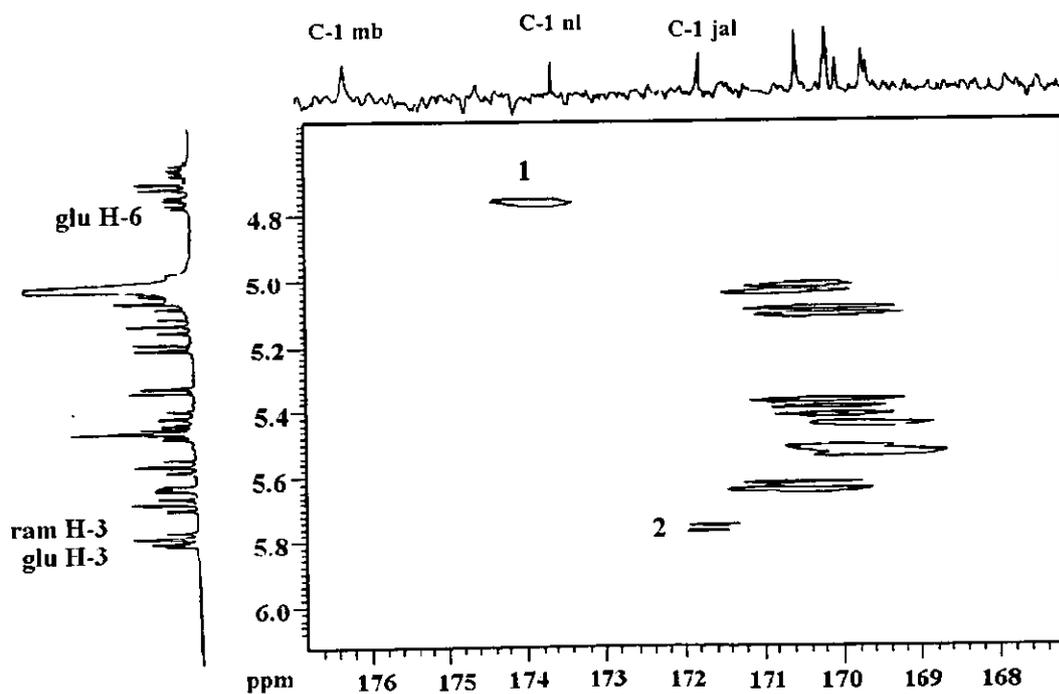


Figura 30. Sección de campo bajo del espectro HMBC del derivado peracetilado de la orizabina VIII (21). Conectividades: 1; H₆glu-C₁nl y 2; H₃glu-C₁jal. Abreviaciones: glu = glucosa, ram = ramnosa, mb = 2-metilbutanoilo, nl = niloilo y jal = jalapinoilo.

En consecuencia, las estructuras de los constituyentes de mayor polaridad aislados de la jalapina de *Ipomoea orizabensis* se establecieron como:

Orizabina V (3); éster intramolecular 1, 3''' {[*O*-6-desoxi-4-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-*O*-β-*D*-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-*L*-manopiranosil-(1→2)-*O*-β-*D*-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil] oxi} del ácido (1*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico;

Orizabina VI (4); éster intramolecular 1, 3''' {[*O*-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-α-*L*-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil] oxi} del ácido (1*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico;

Orizabina VII (5); éster intramolecular 1, 3''' {[*O*-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-*L*-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil] oxi} del ácido (1*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico;

Orizabina VIII (6); éster intramolecular 1, 3'' {[*O*-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-*L*-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil] oxi} del ácido (1*S*) 11-hidroxi-hexadecanoico.

5.1.4. Elucidación estructural de las orizabinas IX–XXI (7–19).

La purificación de las orizabinas IX–XXI (7–19) no se logró con el empleo de la metodología desarrollada para el aislamiento de los glicolípidos de mayor polaridad (1–6) y por lo tanto, se decidió proceder con la peracetilación de las subfracciones E y F para conocer su complejidad y facilitar la separación de sus constituyentes. Las mezclas de reacción se analizaron mediante CLAP en fase normal (SiO_2) y en el cromatograma de la mezcla proveniente de la subfracción E se observó un componente mayoritario y en el generado por F cuatro (fig. 31). Luego de separar estos compuestos en CLAP al nivel preparativo fueron obtenidos los derivados 20 y 22–25 en estado puro de las subfracciones E y F, respectivamente (fig. 32).

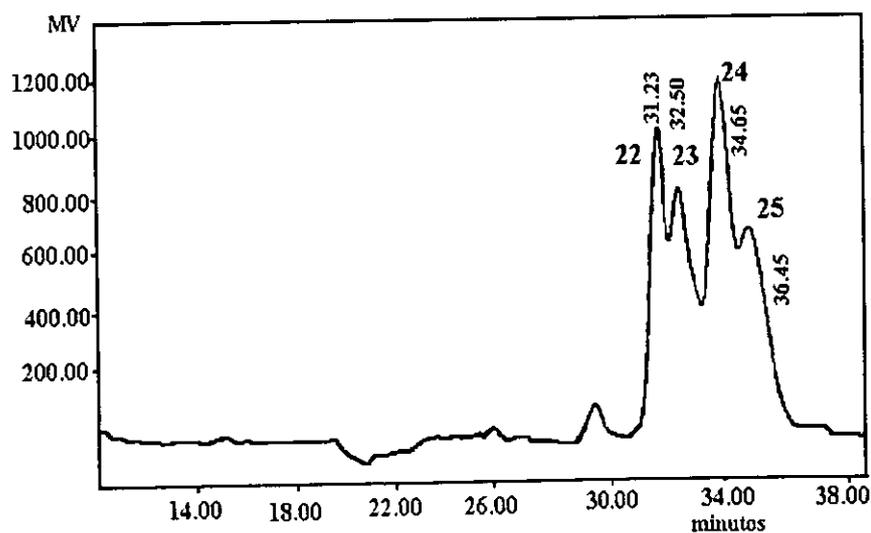
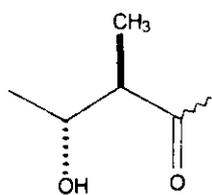
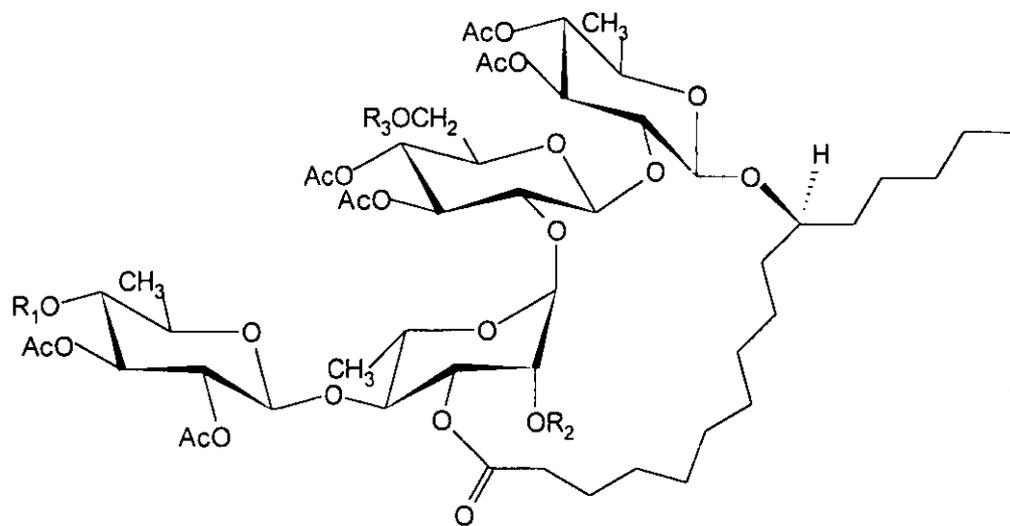
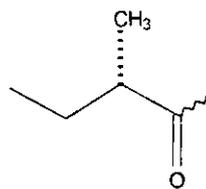


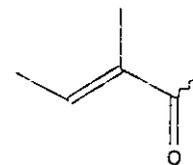
Figura 31. Cromatograma de los derivados peracetilados de la subfracción F. Condiciones; columna SiO_2 (21.2×250 mm, $10 \mu\text{m}$); fase móvil: *n*-hexano–AcOEt (1:1), flujo: 5 mL/min, inyección: $500 \mu\text{L}$ ($18 \text{ mg}/500 \mu\text{L}$) y detector: índice de refracción.



nl



mb



tg

nl = niloilo, mb = 2-metilbutanoilo y tg = tigloilo

| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|
| 20 | tg | mb | H |
| 22 | mb | mb | nl |
| 23 | mb | mb | nl |
| 24 | tg | mb | nl |
| 25 | tg | mb | nl |

Figura 32. Derivados obtenidos a partir de la acetilación de las subfracciones E (20) y F (22–25).

La asignación de las señales de RMN de ^1H y ^{13}C mediante el análisis de los experimentos COSY, TOCSY, HMQC y HMBC de cada uno de estos derivados (cuadros 4 y 5) permitió generar las siguientes conclusiones:

- i) Todos los derivados peracetilados **20**, **22–25** poseen el mismo sitio de lactonización con la aglicona (C-3 ramnosa) de acuerdo a sus respectivos espectros HMBC.
- ii) El compuesto **20** correspondió al derivado peracetilado de la escamonina I, ya que se observaron las señales características de los grupos tigliolo (tg) y 2-metilbutanoilo (mb) en δ 6.95 (H-3) y 2.54 (H-2), respectivamente (fig. 33). Su localización en el núcleo oligosacárido se dedujo desde las correlaciones observadas en el espectro HMBC para las resonancias de los C-1 de ambos residuos, δ 166.83 (tg) y δ 175.51 (mb) con H-4 (δ 4.98) de la quinovosa externa y H-2 (δ 5.85) de la ramnosa, respectivamente.
- iii) Los compuestos **22–25** presentaron un residuo adicional en comparación con las orizabinas V–VIII (**3–6**). La identificación de éstos se hizo en los espectros de RMN ^1H ilustrados en la figura 33 donde los derivados **22** y **23** presentaron dos señales centradas en δ 2.47 y δ 2.38, respectivamente, para el H-2 característica del 2-metilbutanoilo (mb) y en δ 2.96 para el H-2 del grupo niloilo (nl) de la serie *treo* ($J_{\text{H}2-\text{H}3} = 7.0$ Hz). En el caso de los derivados **24** y **25**, las señales diagnósticas aparecieron centradas en δ 2.53 (H-2, mb), 2.98 (H-2, nl) y 6.95 (H-3, tg).

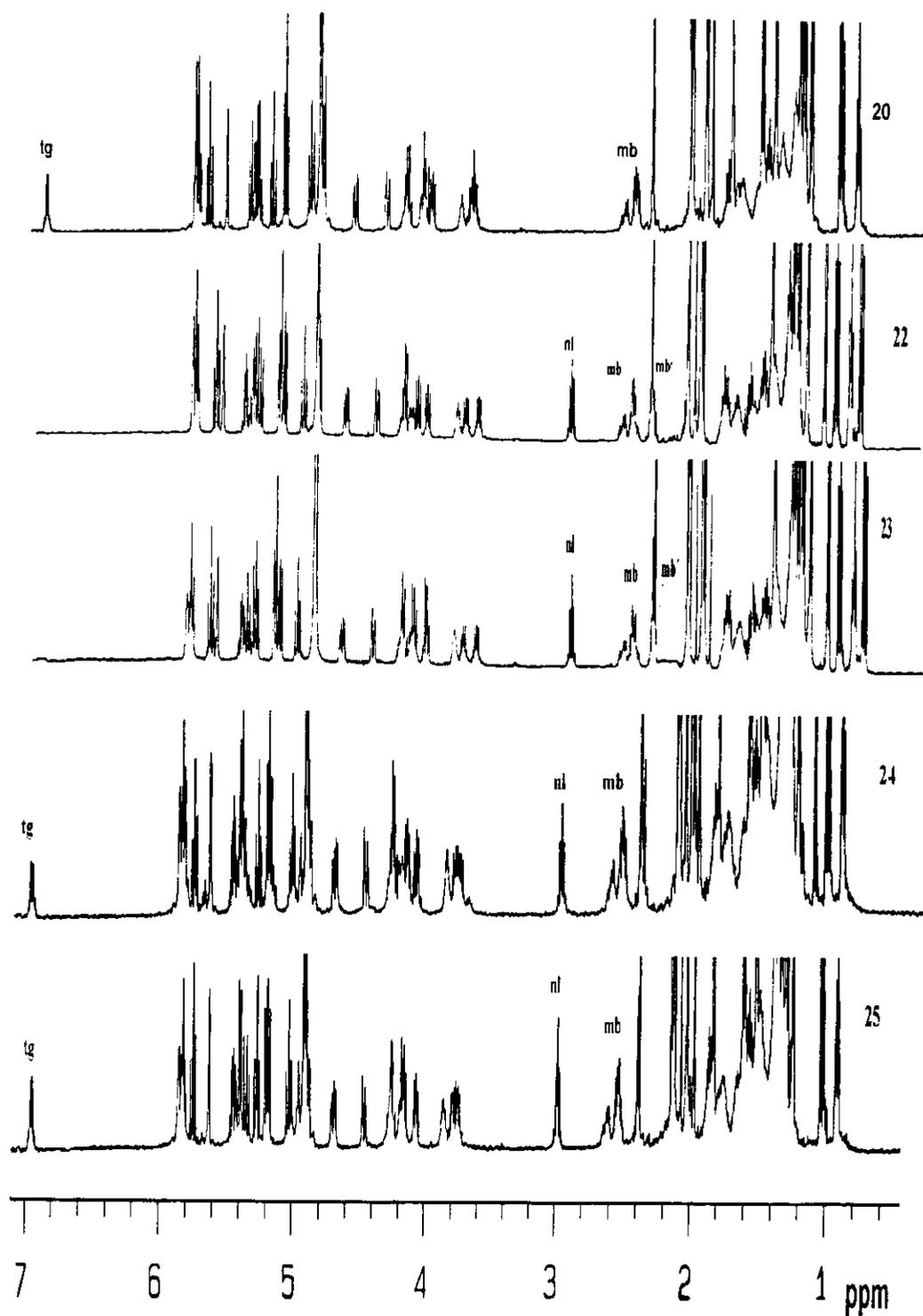


Figura 33. Espectros de RMN ^1H de los derivados peracetilados **20** y **22–25**. Se indican las señales que identifican los residuos tigloilo (tg, H-3), 2-metilbutanoilo (mb, mb', H-2) y niloilo (nl, H-2). 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

iv) Las constantes espectroscópicas de los derivados **22** y **23** resultaron ser idénticas al igual que las registradas para **24** y **25** (ver cuadros 4, 5 y 6). El análisis de sus espectros HMBC permitió establecer la misma ubicación de los sustituyentes en el núcleo oligosacárido, tal como se ilustra en los espectros de **22** y **23** (fig. 34) donde los dos residuos 2-metilbutanoilo (mb y mb') se localizaron en las posiciones C-2 y C-4 de la ramnosa y quinovosa externa, respectivamente y el niloilo (nl) en el C-6 de la glucosa.

De esta forma, se comprobó que la subfracción **F** estaba constituida por dos pares diastereoisoméricos que resultarían de la diferencia en la configuración absoluta de los centros quirales de los residuos ácidos que esterifican al núcleo oligosacárido de cada par (mb o nl).

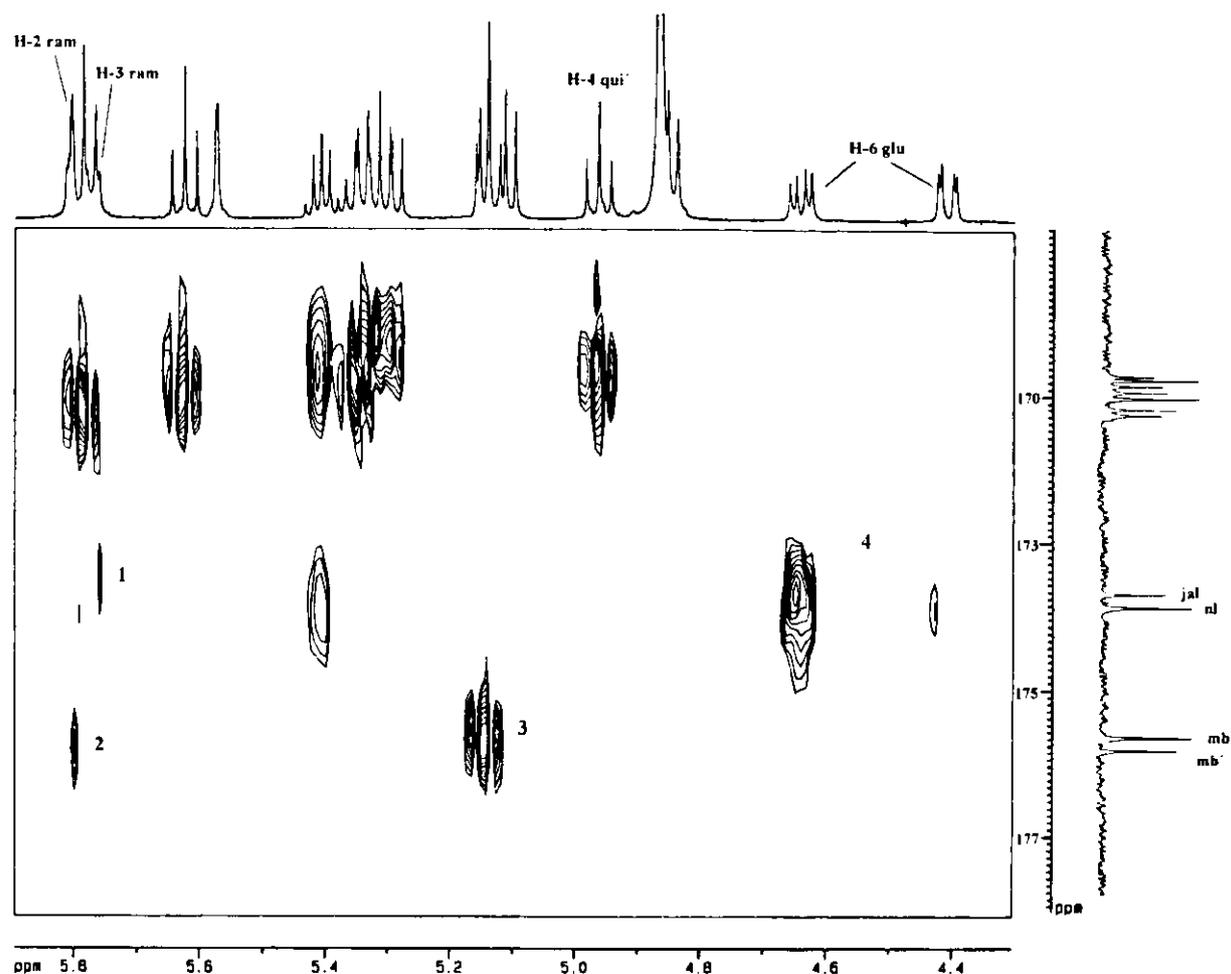


Figura 34. Regiones de campo bajo en el espectro de correlación bidimensional heteronuclear $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ (HMBC) del derivado **23**. Principales conectividades ($^3J_{\text{C-H}}$): **1**; $\text{C}_1\text{jal}-\text{H}_3\text{Ram}$; **2**, $\text{C}_1\text{mb}'-\text{H}_2\text{Ram}$; **3**, $\text{C}_1\text{mb}-\text{H}_4\text{Qui}'$; **4**, $\text{C}_1\text{nl}-\text{H}_6\text{Glu}$. Abreviaciones: ram = ramnosa, qui' = quinovosa externa, glu = glucosa, jal = jalapinoilo, nl = niloilo, mb = 2-metilbutanoilo¹ y mb' = 2-metilbutanoilo².

Cuadro 4. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H para la región oligosacárida de los derivados peracetilados de la orizabina VIII (20), escamonina I (21) y 22–25^a.

| Proton ^b | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|----------------------|
| Qui-1 | 5.18 d (8.0) | 4.69 d (8.0) | 4.85 d (7.7) | 4.87 d (7.6) | 4.89 d (8.0) | 4.90 d (7.5) |
| 2 | 5.39 dd (9.5, 8.0) | 4.32 dd (9.5, 8.0) | 4.01 dd (9.5, 7.7) | 4.13 dd (7.6, 9.5) | 4.15 dd (9.0, 8.0) | 4.16 dd (9.5, 7.5) |
| 3 | 5.75 dd (9.5, 9.5) | 5.55 dd (9.5, 9.5) | 5.35 dd (9.5, 9.4) | 5.38 dd (9.5, 9.5) | 5.40 dd (9.0, 9.0) | 5.40 dd (9.5, 9.5) |
| 4 | 5.27 dd (9.5, 9.5) | 5.05 dd (9.5, 9.5) | 4.96 dd (9.5, 9.4) | 5.00 dd (9.5, 9.5) | 5.01 dd (9.5, 9.0) | 5.03 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 3.75 dq (9.5, 6.5) | 3.65 dq (9.5, 6.0) | 3.74 dq (9.5, 7.0) | 3.77 dq (9.5, 6.0) | 3.79 dq (9.5, 6.5) | 3.79 dq (9.5, 6.5) |
| 6 | 1.25 d (6.5) | 1.29 d (6.0) | 1.26 d (7.0) | 1.27 d (7.0) | 1.30 d (6.5) | 1.29 d (6.5) |
| Glu-1 | 5.16 d (7.5) | 5.18 d (7.5) | 5.15 d (7.5) | 5.17 d (7.5) | 5.19 d (8.0) | 5.19 d (7.5) |
| 2 | 4.10 dd (9.5, 7.5) | 4.15 dd (8.5, 7.5) | 4.03 dd (9.3, 7.5) | 4.04 dd (9.2, 7.5) | 4.08 dd (9.5, 8.0) | 4.07 dd (9.5, 7.5) |
| 3 | 5.83 dd (9.5, 9.5) | 5.77 dd (8.5, 9.0) | 5.78 dd (9.7, 9.3) | 5.79 dd (9.6, 9.2) | 5.83 dd (9.5, 9.0) | 5.82 dd (9.5, 9.5) |
| 4 | 5.43 dd (9.5, 9.5) | 5.40 dd (10.0, 9.0) | 5.34 dd (9.8, 9.7) | 5.31 dd (9.8, 9.6) | 5.38 dd (9.5, 9.0) | 5.34 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 4.14 ddd (9.5, 4.5, 2.5) | 4.23 ddd (10.0, 4.5, 2.0) | 4.15 ddd (9.8, 5.0, 2.5) | 4.15 ddd (9.8, 5.0, 2.6) | 4.19 ddd (9.5, 5.5, 2.5) | 4.17 m |
| 6 | 4.65 dd (12.0, 5.0) | 4.74 dd (12.0, 4.5) | 4.64 dd (12.0, 5.0) | 4.67 dd (12.0, 5.0) | 4.68 dd (11.5, 5.5) | 4.69 dd (12.0, 5.5) |
| 6 | 4.41 dd (12.0, 2.5) | 4.41 dd (12.5, 2.5) | 4.41 dd (12.0, 2.5) | 4.43 dd (12.0, 2.6) | 4.45 dd (11.5, 2.5) | 4.46 dd (12.0, 2.5) |
| Ram-1 | 5.61 * | 5.44 d (1.5) | 5.58 d (1.0) | 5.60 d (1.2) | 5.62* | 5.63 d (1.5) |
| 2 | 5.85 * | 5.61 dd (3.0, 1.5) | 5.80 * | 5.82 dd (3.8, 1.2) | 5.85 dd (3.5, 1.0) | 5.85 dd (1.5, 3.5) |
| 3 | 5.86-5.80 * | 5.78 dd (10.0, 3.0) | 5.78 dd (9.3, 3.0) | 5.78 dd (9.0, 3.8) | 5.83 dd (9.0, 3.5) | 5.82 dd (9.5, 3.5) |
| 4 | 4.25 dd (9.5, 9.5) | 4.29 dd (10.0, 10.0) | 4.19 dd (9.5, 9.5) | 4.21 dd (9.0, 9.0) | 4.24 dd (9.5, 9.0) | 4.24 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 4.30-4.25 * | 4.65 dq (10.0, 6.5) | 4.24-4.19 * | 4.2-4.3 * | 4.3-4.2 * | 4.3-4.22 * |
| 6 | 1.51 d (5.5) | 1.82 d (6.5) | 1.46 d (6.0) | 1.48 d (5.7) | 1.52 d (5.5) | 1.51 d (5.5) |
| Qui'-1 | 4.89 d (8.0) | 5.32 d (8.0) | 4.84 d (8.0) | 5.12 d (8.0) | 5.18 d (8.0) | 5.18 d (8.0) |
| 2 | 4.12 dd (9.5, 8.0) | 5.45 dd (10.0, 8.0) | 5.29 dd (9.6, 8.0)) | 5.32 dd (9.5, 8.0) | 5.38 dd (9.0, 8.0) | 5.38 dd (10.0, 8.0)) |
| 3 | 5.34 dd (9.5, 9.0) | 5.66 dd (10.0, 10.0) | 5.63 dd (9.6, 9.6) | 5.65 dd (9.5, 9.5) | 5.74 dd (9.5, 9.0) | 5.74 dd (10.0, 9.5) |
| 4 | 4.98 dd (9.5, 9.0) | 5.12 dd (10.0, 9.5) | 5.14 dd (9.6, 9.5) | 5.16 dd (9.7, 9.5) | 5.27 dd (9.5, 9.5) | 5.26 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 3.78 dq (9.5, 6.0) | 3.74 dq (9.5, 6.5) | 3.65 dq (9.5, 6.1) | 3.67 dq (9.7, 6.0) | 3.75 dq (9.5, 6.5) | 3.75 dq (9.5, 6.5) |
| 6 | 1.30 d (6.0) | 1.25 d (6.5) | 1.19 d (6.1) | 1.22 d (6.0) | 1.24 d (6.5) | 1.24 d (5.5) |

^{a, b} Ver cuadro 2.

Cuadro 5. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H para la aglicona y los residuos ácidos de los derivados peracetilados de la orizabina VIII (20), escamonina I (21) y 22–25^a.

| Proton ^b | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
|---------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Jal-2a | 2.6 ddd (14.5, 8.0, 3.0) | 2.84 ddd (15.0, 8.0, 2.0) | 2.56 ddd (15.0, 8.2, 3.5) | 2.59 ddd (3.1, 8.0, 15.0) | 2.62 ddd (14.5, 8.0, 3.0) | 2.62 ddd (15.0, 8.0, 3.0) |
| 2b | 2.58-2.50 * | 2.44-2.50 * | 2.50-2.43 * | 2.45-2.55 * | 2.58-2.50 * | 2.50-2.50 * |
| 11 | 3.85 m | 3.77 m | 3.80 m | 3.83 sa | 3.85 m | 3.857 m |
| 16 | 0.902 d (7.0) | 0.88 t (7.0) | 0.87 t (7.2) | 0.897 t (7.0) | 0.918 t (7.0) | 0.919 t (6.5) |
| mb-2 | 2.54 m | 2.48 dq (7.0, 7.0) | 2.50-2.43 so | 2.50 dq | 2.53 m | 2.53 dq (14.0, 7.0) |
| 2-Me | 1.33 d (7.0) | 1.17 d (7.0) | 1.27 d (7.0) | 1.28d (7.3) | 1.32 d (7.0) | 1.32 d (7.5) |
| 3-Me | 1.03 t (7.0) | 0.92 t (7.5) | 0.98 t (7.4) | 1.00 t (7.4) | 1.028 t (7.0) | 1.03 t (7.0) |
| mb'-2 | | | 2.40-2.30 * | 2.34-2.39 * | | |
| 2-Me | | | 1.06 d (7.0) | 1.08 d (7.0) | | |
| 3-Me | | | 0.79 t (7.4) | 0.82 t (7.4) | | |
| nl-2 | | 2.98 dq (7.0, 7.0) | 2.94 dq (7.0, 6.5) | 2.97 dq (7.0, 6.5) | 2.98 dq (7.0, 7.0) | 2.98 dq (7.0, 6.5) |
| 3 | | 5.48-5.42 sa | 5.40 dq (6.5, 6.5) | 5.42 dq (6.5, 6.5) | 5.45 dq (7.0, 6.0) | 5.44 dq (7.0, 6.0) |
| 2-Me | | 1.37 d (7.0) | 1.29 d (7.0) | 1.29 d (7.0) | 1.34 d (7.0) | 1.31 d (6.5) |
| 3-Me | | 1.33 d (6.0) | 1.28 d (6.5) | 1.33 d (6.5) | 1.32 d (6.0) | 1.35 d (6.0) |
| tg 3 | 6.95 qq (7.0, 1.0) | | | | 6.95 qq (7.0, 1.5) | 6.95 qq (7.0, 1.5) |
| 2 Me | 1.83 s | | | | 1.83 d (1.0) | 1.83 d (1.0) |
| 3Me | 1.61 dq (7.0, 1.0) | | | | 1.61 dq (7.0, 1.5) | 1.61 dq (7.0, 1.5) |

^{a, b} Ver cuadro 2.

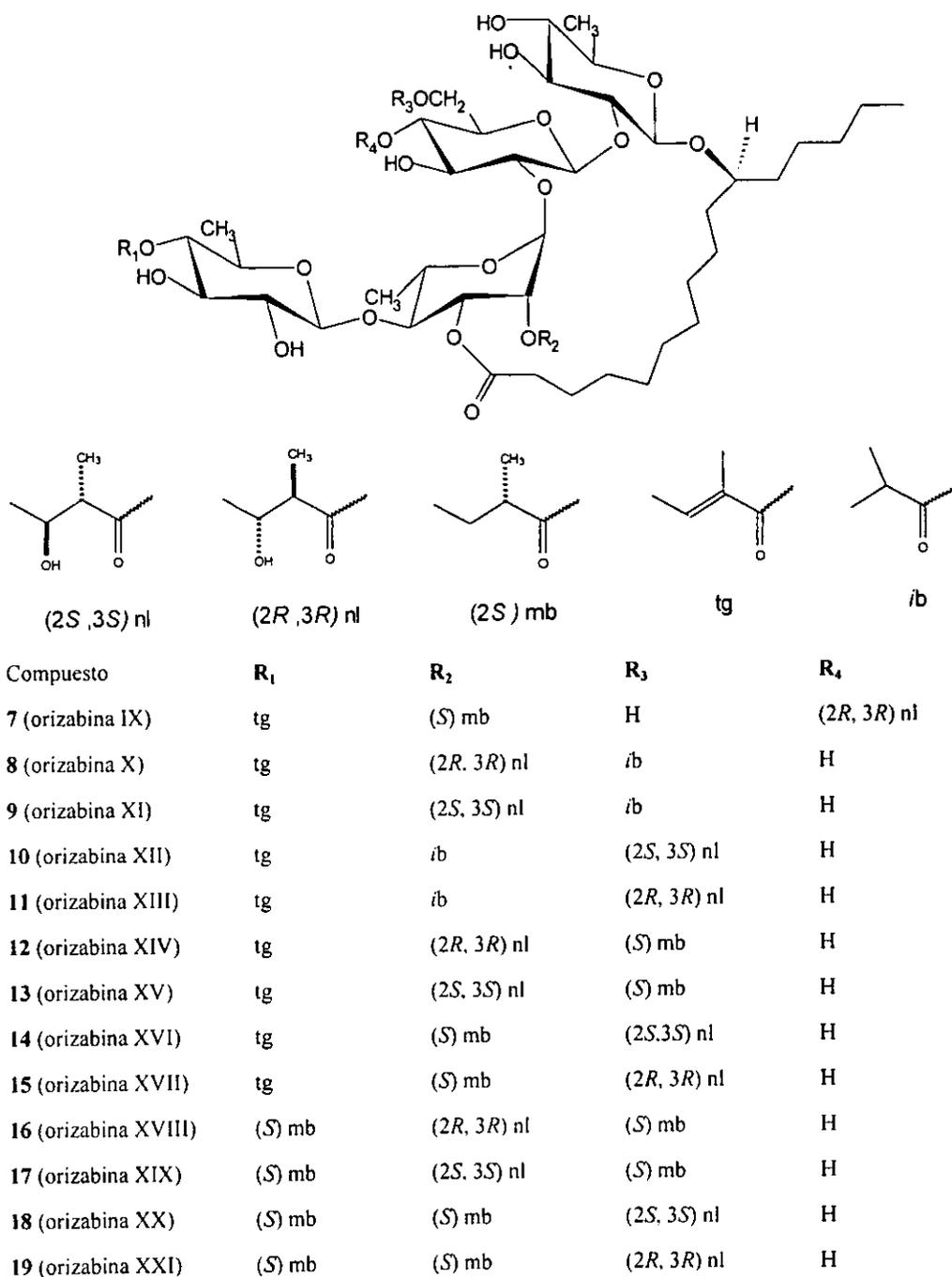
Cuadro 6. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³C de los derivados peracetilados de la orizabina VIII (20), escamonina I (21) y 22-25^a

| Carbono ^b | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Qui-1 | 101.21 | 101.51 | 100.53 | 100.47 | 100.43 | 100.43 |
| 2 | 77.52 | 74.54 | 77.52 | 77.49 | 77.49 | 77.45 |
| 3 | 73.59 | 75.75 | 75.63 | 75.65 | 75.63 | 75.62 |
| 4 | 73.88 | 74.25 | 74.81 | 74.82 | 74.78 | 74.78 |
| 5 | 70.01 | 69.66 | 69.74 | 69.74 | 69.72 | 69.72 |
| 6 | 17.69 | 17.66 | 17.74 | 17.77 | 17.45 | 17.71 |
| Glu-1 | 102.66 | 99.70 | 102.65 | 102.49 | 102.61 | 102.48 |
| 2 | 75.85 | 77.39 | 75.83 | 75.80 | 75.80 | 75.78 |
| 3 | 73.71 | 76.53 | 73.77 | 73.84 | 73.75 | 73.86 |
| 4 | 69.68 | 69.77 | 69.75 | 69.84 | 69.71 | 69.81 |
| 5 | 71.77 | 71.32 | 71.96 | 71.95 | 71.93 | 71.93 |
| 6 | 62.58 | 62.61 | 63.19 | 63.22 | 63.17 | 63.19 |
| Ram-1 | 95.55 | 98.24 | 95.58 | 95.55 | 96.55 | 95.55 |
| 2 | 67.37 | 70.92 | 67.44 | 67.47 | 67.44 | 67.44 |
| 3 | 70.24 | 71.78 | 70.08 | 70.05 | 70.14 | 70.23 |
| 4 | 77.83 | 77.08 | 77.83 | 77.83 | 77.82 | 77.82 |
| 5 | 68.55 | 67.76 | 68.54 | 68.54 | 68.53 | 68.54 |
| 6 | 18.34 | 18.31 | 18.38 | 18.38 | 18.35 | 18.34 |
| Qui'-1 | 100.41 | 100.95 | 101.14 | 101.15 | 101.21 | 101.22 |
| 2 | 77.67 | 71.42 | 72.42 | 72.42 | 72.32 | 72.31 |
| 3 | 75.60 | 73.72 | 73.50 | 73.50 | 73.57 | 73.56 |
| 4 | 74.78 | 73.85 | 73.34 | 73.34 | 73.88 | 73.87 |
| 5 | 69.57 | 70.05 | 70.10 | 70.14 | 70.24 | 70.14 |
| 6 | 17.45 | 17.45 | 17.46 | 17.46 | 17.45 | 17.45 |
| Jal-1 | 173.32 | 171.63 | 173.26 | 173.27 | 173.30 | 173.26 |
| 2 | 34.41 | 34.61 | 34.37 | 34.37 | 34.36 | 34.35 |
| 11 | 79.26 | 80.78 | 79.52 | 79.46 | 79.51 | 79.43 |
| 16 | 14.25 | 14.21 | 14.26 | 14.32 | 14.27 | 14.27 |
| mb-1 | 175.51 | 176.12 | 175.48 | 175.51 | 175.52 | 175.52 |
| 2 | 41.16 | 41.05 | 41.20 | 41.20 | 41.16 | 41.16 |
| 2-Me | 16.93 | 16.94 | 16.94 | 16.99 | 16.94 | 16.94 |
| 3-Me | 11.84 | 11.58 | 11.87 | 11.89 | 11.86 | 11.85 |
| mb'-1 | | | 175.26 | 175.29 | | |
| 2 | | | 41.48 | 41.45 | | |
| 2-Me | | | 16.94 | 16.87 | | |
| 3-Me | | | 11.77 | 11.77 | | |
| nl-1 | | 173.51 | 173.48 | 173.48 | 173.45 | 173.39 |
| 2 | | 44.65 | 44.65 | 44.77 | 44.61 | 44.73 |
| 3 | | 72.20 | 71.43 | 71.59 | 71.40 | 71.56 |
| 2-Me | | 12.76 | 12.75 | 12.75 | 12.71 | 12.72 |
| 3-Me | | 16.94 | 16.94 | 16.99 | 16.94 | 16.94 |
| tg-1 | 166.83 | | | | 166.81 | 166.81 |
| 2 | 128.30 | | | | 128.30 | 128.28 |
| 3 | 138.85 | | | | 138.85 | 138.85 |
| 2-Me | 12.09 | | | | 12.07 | 12.10 |
| 3-Me | 14.25 | | | | 14.27 | 14.27 |

^{a,b} Ver cuadro 3

Como se describe en la parte experimental, la fracción primaria de la jalapina (FPJ) se fraccionó en una columna de alta presión (Spherisorb^R, Waters) en cuatro componentes (I–IV) que permitió la obtención de mezclas de menor complejidad que pudieron ser resueltas y purificadas en un sistema cromatográfico de fase normal a través de la recirculación de muestra (ver inciso 4.5.2.). De esta forma, se obtuvieron las orizabinas IX–XXI (7–19) (fig. 35) y su análisis estructural se inició con los espectros de RMN ¹H. Las orizabinas X–XXI (8–19) presentaron patrones muy semejantes a los producidos por las orizabinas V–VII (3–5) (figs. 36, 38 y 39) a excepción de la señal debida a la presencia de un residuo adicional que esterifica el núcleo oligosacárido y que se observó en los derivados 22–25, razón por la que estos compuestos se encontraron en una fracción de menor polaridad. Debido a que los derivados peracetilados 22–25 fueron preparados a partir de la misma mezcla que dio origen a las orizabinas IX–XXI (7–19), el sitio de lactonización del núcleo oligosacárido con la aglicona en todas ellas estaba previamente localizado en el carbono C-3 de la ramnosa, hecho que después fue comprobado en el análisis de los espectros HMBC de cada una de ellas.

En los espectros de RMN ¹H (fig. 36) de un primer grupo de compuestos, las orizabinas IX–XIII (7–11), se observaron las señales centradas en δ 6.95–6.97 (H-3, tg) y δ 2.81–2.86 (H-2, nl) que indicaron la presencia de los residuos tigloilo y niloilo. Un tercero se identificó a partir de la multiplicidad observada para el H-2 de estos sustituyentes y que en la orizabina IX (7) correspondió a la señal séxtuple del 2-metilbutanoilo (δ 2.34, tq) y en las orizabinas X–XIII (8–11) a la señal séxtuple del 2-metilpropanoilo (iba, δ 2.44–2.54) (Kitagawa *et al.*, 1996b).



nl = 2-metil-3-hidroxibutanoilo (niloilo); mb = 2-metilbutanoilo; tg = 2(*E*)-metilbutenoilo; ib = 2-metilpropanoilo (isobutiroilo).

Figura 35. Glicolípidos obtenidos a partir de la fracción de menor polaridad (F) de la jalapina de *Ipomoea orizabensis*.

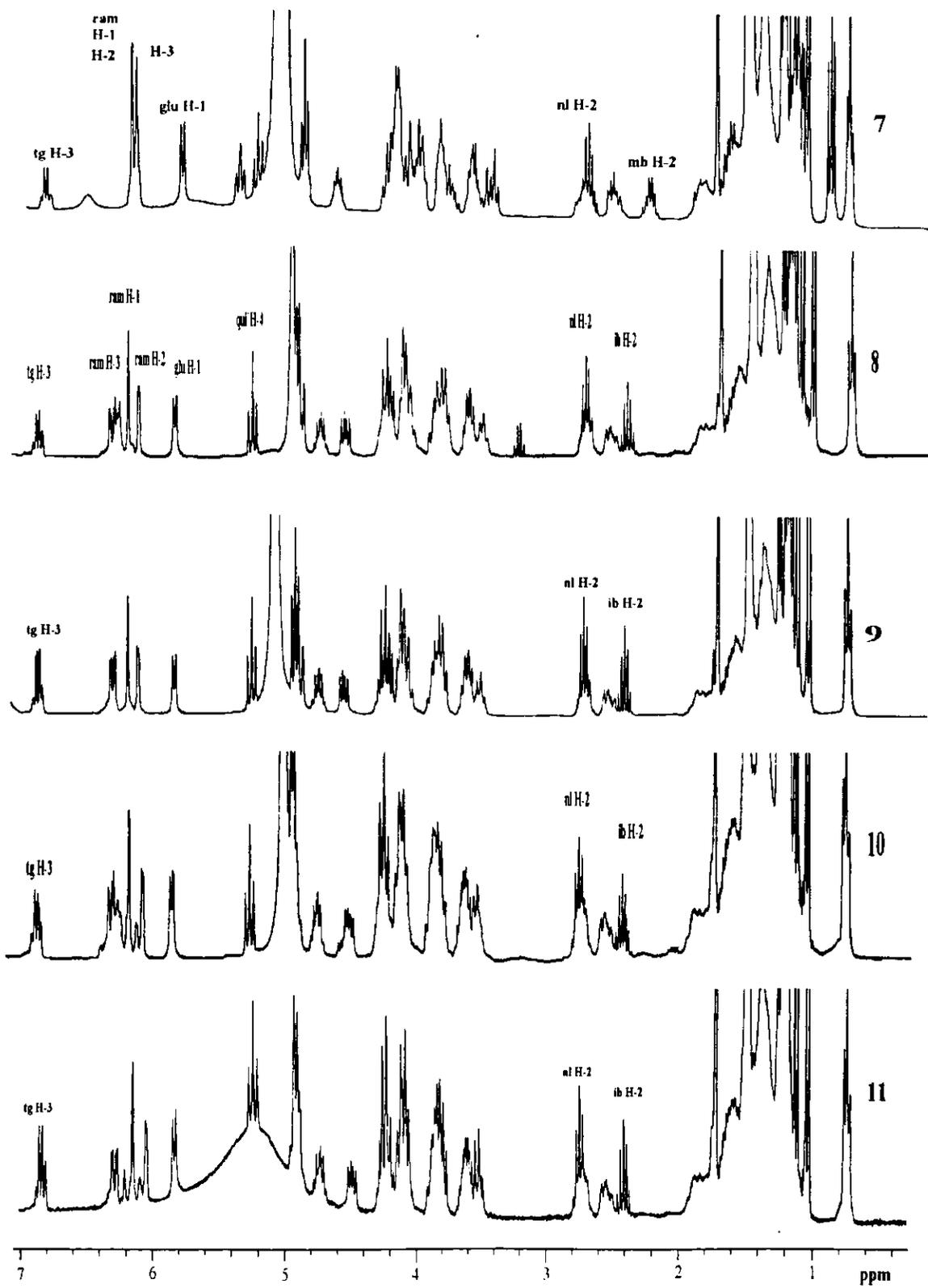


Figura 36. Espectros de RMN ^1H de las orizabinas IX-XIII (7-11). Abreviaciones: *ib* = 2-metilpropanoilo, *tg* = tigoilo, *nl* = niloilo, *mb* = 2-metilbutanoilo. 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

La presencia de los residuos 2-metilpropanoilo (*ib*) y 2-metilbutanoilo (*mb*) también se comprobó mediante las resonancias de los protones correspondientes a los grupos Me-3 en δ 0.98 para el *mb* (7) y Me-2 para el *ib* entre δ 1.16 –1.13 (8–11). De manera adicional, estas observaciones se comprobaron mediante los registros espectrométricos utilizando la técnica de FAB con detección de aniones. El ion pseudomolecular $[M-H]^-$ (m/z 1119) de la orizabina IX (7) presentó una diferencia de 100 Daltons con el producido por la escamonina I (1) (m/z 1019) confirmando la presencia del grupo niloilo. En los compuestos 8–11 el ion pseudomolecular $[M-H]^-$ de m/z 1105 resultó ser el mismo en todos los casos y presentó una diferencia de 14 Daltons (CH_2) con el glicolípido 7, lo cual constituyó otra evidencia para sugerir la presencia del residuo 2-metilpropanoilo (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

Una vez que se efectuó la asignación de las señales de 1H y de ^{13}C de las orizabinas IX–XIII (7–11) (ver cuadros 7, 8 y 9) mediante del análisis de los espectros de RMN bidimensional homonuclear $^1H-^1H$ (COSY y TOCSY) y heteronuclear $^{13}C-^1H$ (HMQC) se procedió a determinar los sitios de esterificación de los grupos 2-metilbutanoilo, 2-metilpropanoilo, tigloilo y niloilo desde las correlaciones $^1H-^{13}C$ observadas en sus correspondientes espectros HMBC.

Cuadro 7. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H para la región oligosacárida de las orizabinas IX–XIII (7–11)^a.

| Protón ^b | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|--------------------------|--------------------------|
| Qui-1 | 4.99 d (8.0) | 5.01 d (8.0) | 4.97 d (7.0) | 5.03 d (7.5) | 4.99 d (7.5) |
| 2 | 4.25 dd (9.0, 8.0) | 4.30 dd (9.0, 8.0) | 4.25 dd (9.0, 7.0) | 4.33 dd (9.5, 7.5) | 4.30 dd (9.0, 7.5) |
| 3 | 4.09 dd (9.0, 9.0) | 4.16 dd (9.0, 9.0) | 4.12 dd (9.0, 9.0) | 4.21 dd (9.5, 9.5) | 4.16 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 3.54 dd (9.0, 9.0) | 3.61 dd (9.0, 9.0) | 3.57 dd (9.0, 9.0) | 3.63 dd (9.5, 9.0) | 3.59 dd (9.0, 9.0) |
| 5 | 3.75-3.68 * | 3.76-7.69 * | 3.75-3.66 * | 3.75 dq (9.0, 6.0) | 3.72 dq (9.0, 6.0) |
| 6 | 1.58 d (6.0) | 1.62-1.57 * | 1.55 d (6.0) | 1.60 d (6.0) | 1.57 d (6.0) |
| Glu-1 | 5.89 d (7.5) | 5.91 d (7.0) | 5.83 d (7.5) | 5.93 d (8.0) | 5.90 d (7.5) |
| 2 | 4.28 dd (9.5, 7.5) | 4.20 dd (8.0, 7.0) | 4.14 dd (9.0, 7.5) | 4.19 dd (8.5, 8.0) | 4.18 dd (9.0, 7.5) |
| 3 | 4.37 dd (9.5, 9.5) | 4.23 dd (9.0, 8.0) | 4.19 dd (9.0, 9.0) | 4.25 dd (8.5, 8.5) | 4.21 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 5.51 dd (9.5, 9.5) | 3.89 dd (9.0, 8.0) | 3.88 dd (9.0, 8.5) | 3.96 dd (8.5, 8.5) | 4.89 dd (9.0, 9.0) |
| 5 | 4.0-3.93 * | 4.20-3.94 * | 3.95-3.91 * | 3.99 ddd (8.5, 6.5, 2.0) | 3.96 ddd (9.0, 6.5, 2.0) |
| 6 | 5.03-4.95 * | 4.97 dd (12.0, 2.5) | 4.94 dd (11.5, 2.5) | 5.01 dd (11.5, 2.0) | 4.98 dd (11.5, 2.0) |
| 6 | 4.15-4.10 * | 4.65 dd (12.0, 6.5) | 4.62 dd (11.5, 6.5) | 4.61 dd (11.5, 6.5) | 4.58 dd (11.5, 6.5) |
| Ram-1 | 6.29 s* | 6.28 d (1.5) | 6.22 d (1.5) | 6.22 s* | 6.23 d (1.5) |
| 2 | 6.33 s* | 6.21 dd (3.0, 1.0) | 6.17 dd (3.0, 1.5) | 6.18 dd (3.0, 1.5) | 6.14 dd (3.5, 1.5) |
| 3 | 6.29 dd (10.0, 2.0) | 6.39 dd (10.5, 3.0) | 6.34 (10.0, 3.0) | 6.40 dd (10.0, 3.0) | 6.37 dd (9.5, 3.5) |
| 4 | 4.29 dd (10.0, 10.0) | 4.33 dd (10.5, 9.5) | 4.30 dd (10.0, 9.5) | 4.34 dd (10.0, 9.5) | 4.31 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 4.74 dq (10.0, 6.0) | 4.83 dq (9.5, 5.5) | 4.78 dq (9.5, 6.0) | 4.84 dq (9.5, 6.0) | 4.80 dd (9.5, 6.5) |
| 6 | 1.64-1.59 * | 1.62-1.57 * | 1.58 d (6.0) | 1.60 d (6.0) | 1.57 d (6.5) |
| Qui'-1 | 5.08 d (8.0) | 5.03 d (8.0) | 4.98 d (8.0) | 5.03 d (7.5) | 5.00 d (7.5) |
| 2 | 3.89 dd (9.0, 8.0) | 3.91 dd (9.5, 8.0) | 3.85 dd (9.0, 8.0) | 3.90 dd (9.5, 7.5) | 3.87 dd (9.0, 7.5) |
| 3 | 4.19 dd (9.0, 9.0) | 4.19 dd (9.5, 9.0) | 4.14 dd (9.0, 9.0) | 4.21 dd (9.5, 9.5) | 4.16 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 5.35 dd (9.0, 9.0) | 5.34 dd (10.0, 9.0) | 5.29 dd (9.0, 9.0) | 5.35 dd (9.5, 9.5) | 5.31 dd (9.5, 9.0) |
| 5 | 3.75-3.68 * | 3.76-3.69 * | 3.75-3.66 * | 3.72 dq (9.5, 6.0) | 3.69 dq (9.5, 6.5) |
| 6 | 1.34 d (7.0) | 1.32 d (6.0) | 1.31 d (6.0) | 1.33 d (6.0) | 1.29 d (6.5) |

^ay^b. Ver cuadro 2

Cuadro 8. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H para la aglicona y los residuos ácidos de las orizabinas IX-XIII (7-11)^a.

| Protón ^b | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|---------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Jal-2a | 2.86 ddd (15.0, 8.0, 3.0) | 2.81 ddd (15.0, 8.5, 3.0) | 2.76 ddd (15.5, 8.0, 3.5) | 2.81 ddd (15.0, 8.5, 3.0) | 2.78 ddd (15.0, 8.5, 3.0) |
| 2b | 2.61 ddd (15.0, 10.0, 3.0) | 2.64 ddd (15.0, 10.0, 3.0) | 2.60 ddd (15.5, 9.5, 3.0) | 2.64 ddd (15.0, 10.0, 3.0) | 2.61 ddd (15.0, 10.0, 3.0) |
| 11 | 4.0-3.93 * | 4.0-3.94 * | 3.95-3.91 * | 4.0-3.94 * | 3.95-3.91 * |
| 16 | 0.85 t (7.0) | 0.87 t (6.5) | 0.87 t (7.0) | 0.87 t (7.0) | 0.84 d (7.0) |
| ib-2 | | 2.54 qq (7.0, 6.5) | 2.55 dq (7.0, 7.0) | 2.54 qq (7.0, 7.0) | 2.51 qq (7.0, 7.0) |
| Me | | 1.24 d (7.0) | 1.23 d (7.0) | 1.23 d (7.0) | 1.21 d (7.0) |
| Me | | 1.16 d (6.5) | 1.16 d (7.0) | 1.16 d (7.0) | 1.13 d (7.0) |
| mb-2 | 2.34 tq (7.0, 7.0) | | | | |
| 2-Me | 1.16 d (7.0) | | | | |
| 3-Me | 0.98 t (7.0) | | | | |
| nl-2 | 2.81 dq (7.0, 7.0) | | | | |
| 3 | 4.31 m | | | | |
| 2-Me | 1.25 d (7.0) | 2.84 dq (7.0, 7.0) | 2.82 dq (7.0, 7.0) | 2.86 dq (7.0, 7.0) | 2.82 dq (7.0, 7.0) |
| 3-Me | 1.35 d (6.5) | 4.38 dq (7.0, 6.5) | 4.34 dq (7.0, 6.5) | 4.37 dq (7.0, 6.0) | 4.34 dq (7.0, 6.5) |
| tg-3 | 6.99 qq (7.5, 1.5) | 1.28 d (7.0) | 1.28 d (7.0) | 1.31 d (7.0) | 1.28 d (7.0) |
| 2 Me | 1.85 m | 1.36 d (6.5) | 1.35 d (6.5) | 1.36 d (6.0) | 1.33 d (6.5) |
| 3Me | 1.65-1.60 * | 6.97 qq (7.0, 1.5) | 6.97 qq (7.0, 1.5) | 6.98 qq (7.0, 1.5) | 6.95 qq (7.0, 1.5) |
| | | 1.84 m | 1.83 m | 1.84 m | 1.81 m |
| | | 1.62-1.57 * | 1.60 dd (7.0, 1.5) | 1.60 dd (7.0, 1.5) | 1.57 dd (7.0, 1.5) |

^{a y b}. Ver cuadro 2.

ib = 2-metilpropanoilo

Cuadro 9. Desplazamientos químicos en RMN ¹³C de las orizabinas IX–XIII (7–11)^a.

| Carbono ^b | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Qui-1 | 100.81 | 100.79 | 100.95 | 100.89 | 100.91 |
| 2 | 79.58 | 79.03 | 79.12 | 78.82 | 78.81 |
| 3 | 78.21 | 78.43 | 18.53 | 78.46 | 78.44 |
| 4 | 77.16 | 77.23 | 77.32 | 77.32 | 77.35 |
| 5 | 72.50 | 72.43 | 72.44 | 72.47 | 72.45 |
| 6 | 18.47 | 18.47 | 18.48 | 18.47 | 18.51 |
| Glc-1 | 101.86 | 101.13 | 101.23 | 100.89 | 100.91 |
| 2 | 79.08 | 79.20 | 79.27 | 79.27 | 79.27 |
| 3 | 74.54 | 77.23 | 77.32 | 77.32 | 77.35 |
| 4 | 73.40 | 72.29 | 72.44 | 72.35 | 72.35 |
| 5 | 75.70 | 74.93 | 74.99 | 74.88 | 74.88 |
| 6 | 62.91 | 64.77 | 68.86 | 64.63 | 64.63 |
| Ram-1 | 96.19 | 96.26 | 96.38 | 96.25 | 96.23 |
| 2 | 68.04 | 69.82 | 69.95 | 70.00 | 70.00 |
| 3 | 71.32 | 71.30 | 71.47 | 71.32 | 71.30 |
| 4 | 78.94 | 79.03 | 79.04 | 79.04 | 79.04 |
| 5 | 68.67 | 68.55 | 68.67 | 68.58 | 68.58 |
| 6 | 18.47 | 18.47 | 18.48 | 18.53 | 18.51 |
| Qui'-1 | 105.44 | 105.22 | 105.19 | 105.27 | 105.27 |
| 2 | 75.15 | 75.14 | 75.28 | 75.15 | 75.15 |
| 3 | 75.35 | 75.37 | 75.47 | 75.38 | 75.37 |
| 4 | 76.88 | 76.88 | 77.03 | 76.91 | 76.89 |
| 5 | 70.44 | 70.40 | 70.55 | 70.41 | 70.41 |
| 6 | 17.99 | 17.96 | 17.99 | 17.97 | 17.98 |
| Jal-1 | 173.22 | 173.27 | 173.34 | 173.28 | 173.28 |
| 2 | 34.41 | 34.48 | 34.51 | 34.50 | 34.50 |
| 11 | 78.94 | 79.03 | 79.27 | 79.17 | 79.17 |
| 16 | 14.26 | 14.26 | 14.26 | 14.28 | 14.27 |
| ib-1 | | 175.86 | 175.86 | 175.90 | 175.90 |
| 2 | | 34.11 | 34.21 | 34.12 | 34.10 |
| Me | | 19.45 | 19.44 | 19.46 | 19.46 |
| Me | | 19.07 | 19.09 | 19.06 | 19.05 |
| mb-1 | 175.32 | | | | |
| 2 | 41.11 | | | | |
| 2-Me | 17.03 | | | | |
| 3-Me | 11.77 | | | | |
| nl-1 | 174.81 | 175.53 | 175.49 | 175.40 | 175.39 |
| 2 | 48.71 | 48.46 | 48.47 | 48.72 | 48.72 |
| 3 | 69.32 | 69.03 | 69.10 | 69.05 | 69.05 |
| 2-Me | 13.23 | 13.36 | 13.36 | 13.29 | 13.29 |
| 3-Me | 20.99 | 20.85 | 20.87 | 20.89 | 20.89 |
| tg-1 | 167.52 | 167.49 | 167.55 | 167.51 | 167.49 |
| 2 | 129.10 | 129.05 | 129.23 | 129.09 | 129.09 |
| 3 | 137.54 | 137.49 | 137.44 | 137.52 | 137.52 |
| 2-Me | 12.22 | 12.19 | 12.21 | 12.21 | 12.20 |
| 3-Me | 14.26 | 14.10 | 14.10 | 14.12 | 14.12 |

^ay^b Ver cuadro 3.

ib = 2-metilpropanoilo

A continuación se presentan los resultados del análisis de los espectros HMBC de los compuestos 7-11:

Las orizabinas IX-XII (7-11) presentan el residuo tigloilo en C-4 de la quinovosa externa. La orizabina IX (7) se encuentra sustituida con el 2-metilbutanoilo en la posición C-2 de la ramnosa y el niloilo en C-4 de la glucosa.

- Las orizabinas X (8) y XI (9) poseen el grupo niloilo en C-2 de la ramnosa y el *isobutiroilo* en el carbono C-6 de la glucosa.
- Las orizabinas XII (10) y XIII (11) tienen el residuo niloilo en la posición 6 de la glucosa y el *isobutiroilo* en la 2 de la ramnosa.

En la figura 37 se presenta una ampliación de los espectros HMBC para las orizabinas X (8) y XI (9) demostrando que prácticamente se sobreponen y, por lo tanto, los residuos se localizan en las mismas posiciones para ambos compuestos, es decir, las posiciones C-6 de la glucosa, C-2 de la ramnosa y C-4 de la quinovosa externa soportan los residuos *isobutiroilo*, niloilo y tigloilo, respectivamente. De esta manera, se evidenció la presencia del primer par diastereoisomérico que surgiría como una consecuencia de la configuración absoluta enantiomérica del residuo niloilo *treo* que está presente en cada una de las orizabinas que constituyen este par, es decir la estereoquímica *2R,3R* o *2S,3S* para este grupo. Esta situación se presentó también en el par constituido por las orizabinas XII (10) y XIII (11).

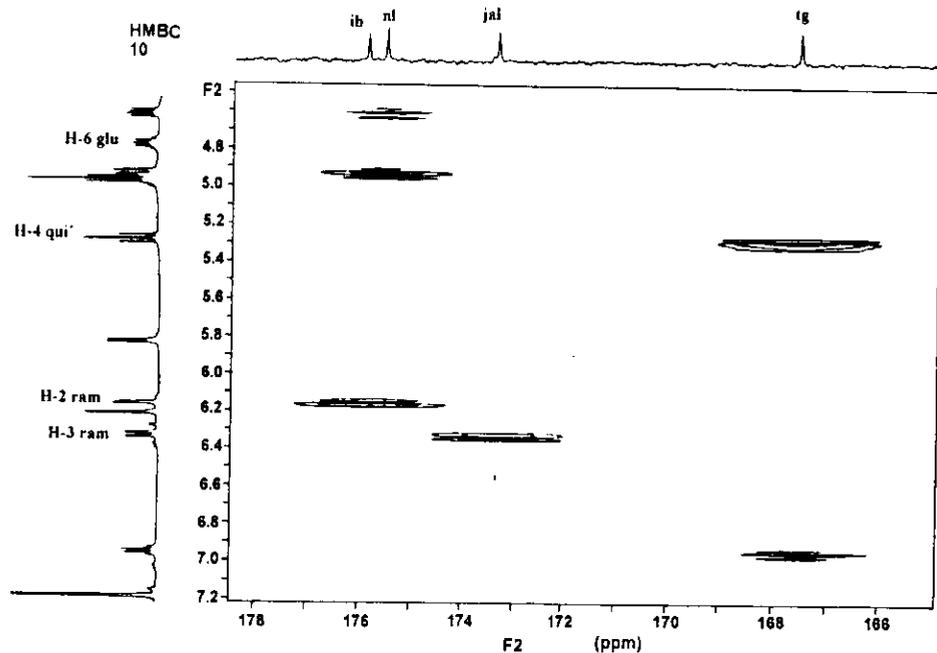
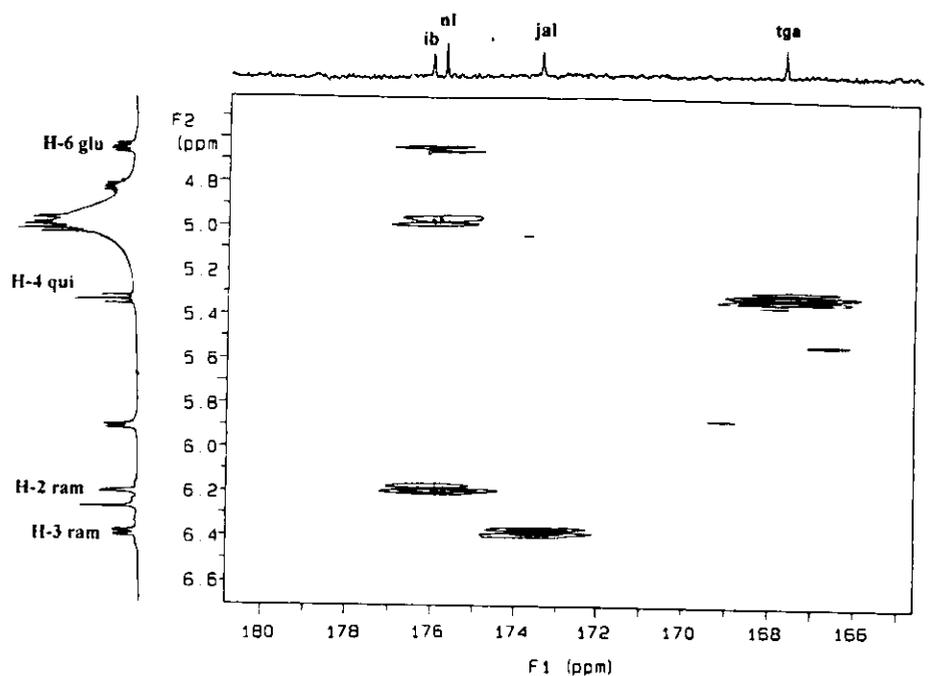


Figura 37. Regiones a campo bajo en el espectro de correlación bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H (HMBC) de las orizabinas X (**8**) (superior) y XI (**9**) (inferior). Abreviaciones: glu = glucosa, qui', quinovosa externa, ram = ramnosa, ib = isobutiroleo, nl = niloilo, jal = jalapinoilo y tg = tigloilo. 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

La diferencia entre cada par de diastereoisómeros se resolvió mediante el establecimiento de la configuración absoluta de los ácidos nilico y 2-metilbutanoico liberados durante la hidrólisis ácida de cada compuesto y que se discutirá posteriormente.

En las figuras 38 y 39 se muestran los espectros de RMN ^1H de las orizabinas XIV–XVII (12–15) y XVIII–XXI (16–19), respectivamente. El análisis de la primera de estas series permite proponer la presencia de los residuos tigloilo (δ 6.96–6.98, H-3), 2-metilbutanoilo (δ 2.38–2.39, H-2) y niloilo (δ 2.82–2.85, H-2) para los compuestos 12–15. La obtención del mismo ion pseudomolecular ($[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 1119) en 12–15 correspondiente a la fórmula molecular de la orizabina IX (7) ($\text{C}_{55}\text{H}_{92}\text{O}_{23}$) demostró la presencia de los tres residuos antes mencionados.

Los compuestos 16–19 a diferencia de 12–15 tienen un grupo 2-metilbutanoilo adicional (δ 2.36–2.49) en lugar del tigloilo que se observó a través del ion pseudomolecular ($[\text{M} - \text{H}]^-$; m/z 1121). Este ion fue el mismo en 16–19 y correspondió a la fórmula $\text{C}_{55}\text{H}_{93}\text{O}_{23}$. La situación de que los dos grupos de compuestos anteriores presentaron patrones casi idénticos en sus espectros de ^1H y ^{13}C derivó después de asignar las señales (cuadros 10, 11 y 12) y de examinar los espectros HMBC en la propuesta de los siguientes pares diastereoisoméricos (fig. 40):

1. Las orizabinas XIV(12) y XV (13) presentaron el grupo tigloilo en la posición C-4 de la quinovosa externa (qui'), el 2-metilbutanoilo y niloilo en los centros C-6 de la glucosa y C-2 de la ramnosa, respectivamente.

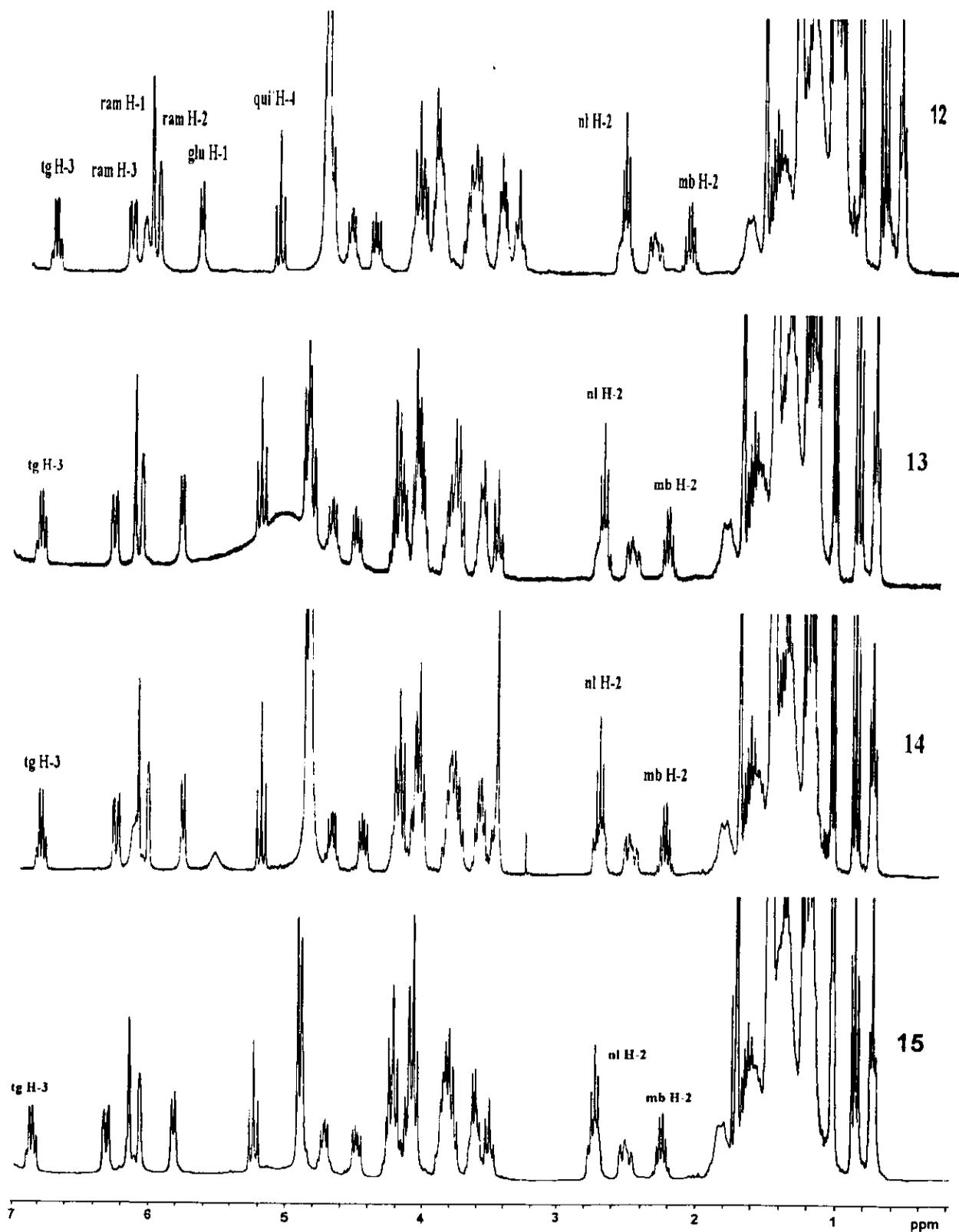


Figura 38. Espectros de RMN ^1H de las orizabinas XIV-XVII (12-15). Abreviaciones: ram = ramnosa, glu = glucosa, qui = quinovosa externa, tg = tigoilo, nl = niloilo, mb = 2-metilbutanoilo. 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

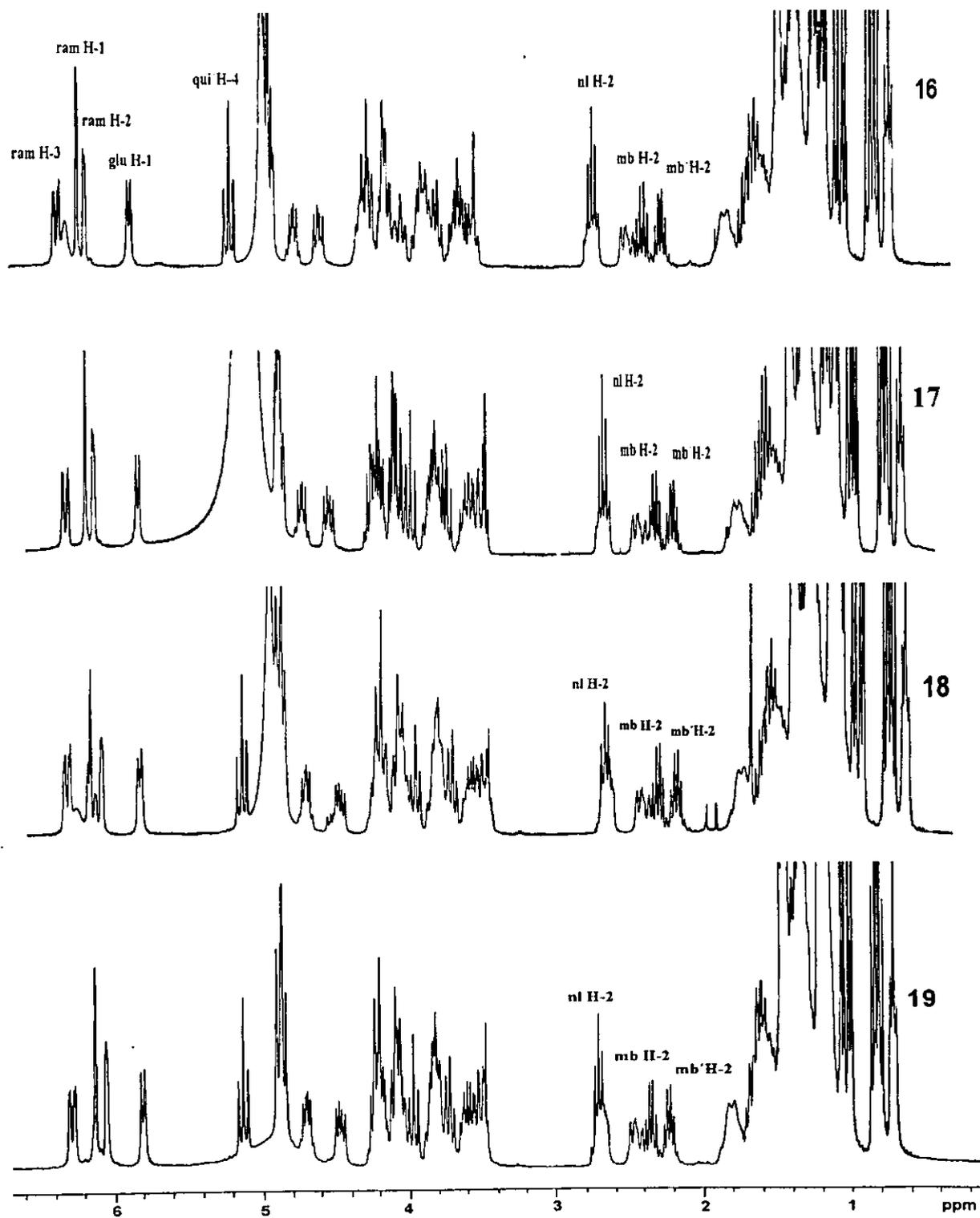
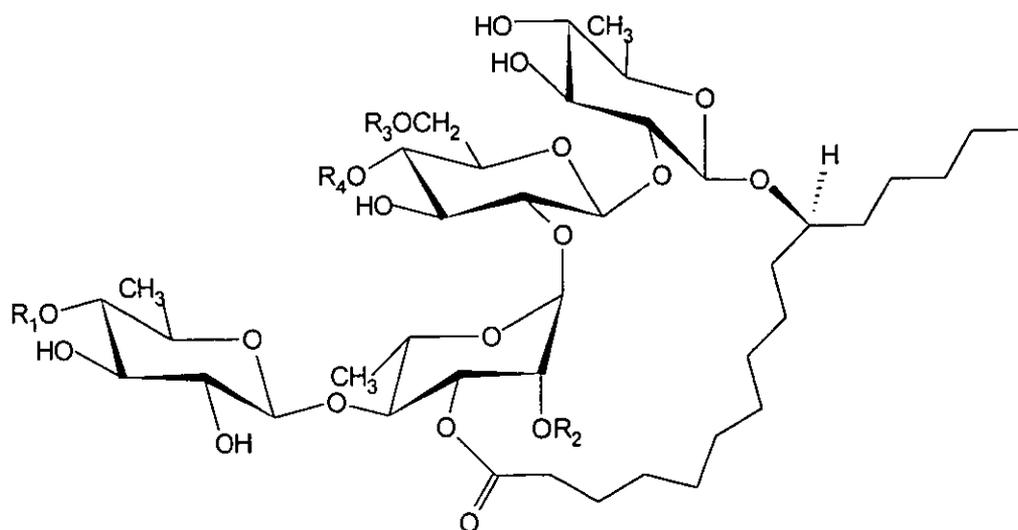


Figura 39. Espectros de RMN ^1H de las orizabinas XVIII-XXI (16–19). Abreviaciones: ram = ramnosa, glu = glucosa, qui = quinovosa externa, tg = tigloilo, nl = niloilo, mb = 2-metilbutanoilo. 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

2. Las orizabinas XVI (**14**) y XVII (**15**) tienen el residuo tigloilo en la misma posición que los compuestos **12** y **13** (H-4 quinovosa externa). La localización de los grupos 2-metilbutanoilo (mb) y niloilo (nl) no fue posible deducirla directamente de sus espectros HMBC debido a la sobreposición de las señales correspondientes a los carbonos C-1 de ambos grupos. Es decir, en el compuesto **14** sólo se observa una señal para los centros C-1 del mb y del nl (δ 175.59), lo cual también sucede en **15** para las mismas señales (δ 175.39). Así, se supuso que la diferencia con el par de compuestos **12** -**13** debía ser la localización de los grupos mb y nl en el núcleo oligosacárido. Por lo tanto, en las orizabinas XVI (**14**) y XVII (**15**) estos residuos se localizarían en los carbonos C-2 de la ramnosa y C-6 de la glucosa, respectivamente.
3. Las orizabinas XVIII (**16**) y XIX (**17**) presentaron el primero de los grupos mb en el carbono C-4 de la quinovosa externa, el segundo (mb') en el C-6 de la glucosa y el niloilo en el C-2 de la ramnosa.
4. Las orizabinas XX (**18**) y XXI (**19**) presentaron uno de los residuos mb localizado en el carbono C-4 de la quinovosa externa. Las posiciones del segundo residuo mb' y del nl no se lograron establecer mediante las correlaciones obtenidas en los espectros HMBC, ya que se observa la misma situación en los desplazamientos químicos para los carboxilos de estos grupos (δ 175.60 y 175.40) que la previamente descrita para el par diastereoisomérico de los compuestos **14** y **15**. De nueva cuenta, el patrón de sustitución del núcleo oligosacárido en los compuestos **18** y **19** sería el contrario al establecido para el par de diastereoisómeros **16** y **17**. Es decir, que el 2-metilbutanoilo se encuentra en el carbono C-2 de la ramnosa y el niloilo en el C-6 de la glucosa.



| Compuesto | R ₁ | R ₂ | R ₃ | R ₄ |
|-----------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| 7 | tg | mb | H | nl |
| 8 | tg | nl | ib | H |
| 9 | tg | nl | ib | H |
| 10 | tg | ib | nl | H |
| 11 | tg | ib | nl | H |
| 12 y 13 | tg | nl | mb | H |
| 14 y 15 | tg | mb | nl | H |
| 16 y 17 | mb | nl | mb | H |
| 18 y 19 | mb | mb | nl | H |

nl = niloilo, mb = 2-metilbutanoilo, tg = tigloilo y ib = 2-metilpropanoilo.

Figura 40. Estructuras propuestas para las orizabinas IX–XXI (7–19). 500 MHz, C₅D₅N.

Cuadro 10. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H de las orizabinas XIV–XVII (12–15)^a

| Protón ^b | 12 | 13 | 14 | 15 |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Qui-1 | 4.98 d (9.0) | 5.00 d (8.5) | 4.91 d (7.5) | 5.02 d (8.0) |
| 2 | 4.29 dd (9.0, 9.0) | 4.31 dd (9.5, 8.5) | 4.30 dd (8.0, 7.5) | 4.32 dd (9.0, 8.0) |
| 3 | 4.18 dd (9.0, 9.0) | 4.17 dd (9.5, 9.5) | 4.20-4.16 * | 4.19 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 3.59 dd (9.5, 9.0) | 3.61 dd (9.5, 8.0) | 3.60 dd (9.0, 8.5) | 3.62 dd (9.0, 9.0) |
| 5 | 3.73 dq (9.5, 6.5) | 3.78-3.70 * | 3.74 dq (9.0, 6.0) | 3.78-3.70 * |
| 6 | 1.57 d (6.5) | 1.62-1.56 * | 1.59 d (6.0) | 1.62-1.58 * |
| Glu-1 | 5.88 d (7.0) | 5.91 d (7.5) | 5.89 d (7.5) | 5.92 d (7.5) |
| 2 | 4.18 dd (9.0, 7.0) | 4.20 dd (8.5, 7.5) | 4.16 dd (9.0, 7.5) | 4.19 dd (9.0, 7.5) |
| 3 | 4.22 dd (9.0, 9.0) | 4.24 dd (8.5, 8.0) | 4.22 dd (9.0, 8.5) | 4.19 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 3.89 dd (9.5, 9.0) | 3.91 dd (8.0, 8.0) | 3.91 dd (8.5, 8.5) | 3.94 dd (9.0, 8.5) |
| 5 | 3.98 ddd (9.5, 7.0, 2.0) | 3.99 ddd (8.0, 6.5, 2.5) | 3.97 ddd (8.5, 6.5, 2.0) | 3.98 dd d (8.5, 7.0, 2.0) |
| 6 | 4.96 dd (11.5, 2.0) | 4.97 dd (11.5, 2.5) | 5.10-4.97 * | 5.01 dd (11.5, 2.0) |
| 6 | 4.64 dd (11.5, 7.0) | 4.65 dd (11.5, 6.5) | 4.58 dd (11.5, 6.5) | 4.6 dd (11.5, 7.0) |
| Ram-1 | 6.25 (1.5) | 6.27 d (1.5) | 6.23 d (1.5) | 6.25 d (1.0) |
| 2 | 6.20 dd (3.0, 1.5) | 6.22 dd (3.0, 1.5) | 6.17 dd (3.0, 1.5) | 6.19 dd (3.0, 1.0) |
| 3 | 6.39 dd (10.0, 3.0) | 6.41 dd (10.0, 3.0) | 6.39 dd (10.0, 3.0) | 6.41 dd (10.0, 3.0) |
| 4 | 4.32 dd (10.0, 9.5) | 4.34 dd (10.0, 10.0) | 4.32 dd (10.0, 10.0) | 4.34 dd (10.0, 9.5) |
| 5 | 4.81 dq (9.5, 6.5) | 4.82 dd (10.0, 6.5) | 4.81 dq (10.0, 6.0) | 4.60 dq (9.5, 6.0) |
| 6 | 1.58 d (6.5) | 1.62-1.56 * | 1.58 d (6.0) | 1.62-1.58 * |
| Qui'-1 | 5.0 d (8.0) | 5.02 d (8.0) | 4.91 d (7.5) | 5.02 d (8.0) |
| 2 | 3.88 dd (8.5, 8.0) | 3.89 dd (8.0, 8.0) | 3.88 dd (8.5, 7.5) | 3.90 dd (9.0, 8.0) |
| 3 | 4.15 dd (8.5, 8.5) | 4.18 dd (9.5, 8.0) | 4.20-4.16 * | 4.19 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 5.33 dd (9.5, 8.5) | 5.35 dd (9.5, 9.5) | 5.33 dd (10.0, 9.5) | 5.35 dd (9.5, 9.0) |
| 5 | 3.73 dq (9.5, 6.5) | 3.78-3.70 * | 3.72 dq (10.0, 6.5) | 3.78-3.70 * |
| 6 | 1.34 d (6.5) | 1.33 d (6.5) | 1.32 d (6.5) | 1.33 d (6.0) |
| Jal-2a | 2.82 ddd (15.0, 8.0, 2.0) | 2.84 ddd (15.5, 8.5, 1.5) | 2.82 ddd (15.5, 8.0, 3.5) | 2.86-2.80 * |
| 2b | 2.61 ddd (15.0, 9.5, 2.5) | 2.62 ddd (15.5, 10.0, 3.0) | 2.62 ddd (15.0, 10.0, 3.0) | 2.62 ddd (15.0, 10.0, 3.0) |
| 11 | 3.90-4.00 * | 3.95 sa | 3.85-3.95 * | 3.97-3.94 * |
| 16 | 0.87 t (7.0) | 0.87 t (7.0) | 0.87 t (7.0) | 0.87 t (7.0) |
| mb-2 | 2.38 tq (7.0, 7.0) | 2.39 tq (7.5, 7.5) | 2.38 tq (7.0, 7.0) | 2.39 tq (7.0, 7.0) |
| 2-Me | 1.16 d (7.0) | 1.16 d (7.5) | 1.15 d (7.0) | 1.16 d (7.0) |
| 3-Me | 0.99 t (7.5) | 0.99 t (7.5) | 0.99 t (7.0) | 0.99 t (7.5) |
| nl-2 | 2.82 dq (7.0, 7.0) | 2.84 dq (7.5, 7.5) | 2.84 dq (7.0, 7.0) | 2.85 dq (7.5, 6.5) |
| 3 | 4.36 dq (7.0, 6.0) | 4.37 dq (7.5, 6.5) | 4.35 m | 4.37 dq (7.5, 6.5) |
| 2-Me | 1.28 d (7.0) | 1.29 d (7.5) | 1.30 d (7.0) | 1.31 d (6.5) |
| 3-Me | 1.36 d (6.0) | 1.37 d (6.5) | 1.35 d (6.5) | 1.36 d (6.5) |
| tg-3 | 6.96 qq (7.0, 1.0) | 6.98 qq (6.5, 1.5) | 6.96 qq (7.0, 1.5) | 6.98 qq (7.0, 1.0) |
| 2 Me | 1.83 d (1.0) | 1.84 m | 1.83 m | 1.84 m |
| 3Me | 1.60 dq (7.0, 1.0) | 1.62-1.56 * | 1.60 dq (6.5, 1.5) | 1.62-1.58 * |

^ay ^bVer cuadro 2.

Cuadro 11. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H de las orizabinas XVIII–XXI (16–19)^a.

| Protón ^b | 16 | 17 | 18 | 19 |
|---------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------------|
| Qui-1 | 5.0 d (8.0) | 4.97 d (8.0) | 5.0 d (8.0) | 4.99 d (7.5) |
| 2 | 4.31 dd (8.0, 8.0) | 4.28 dd (8.0, 8.0) | 4.30 dd (9.0, 8.0) | 4.29 dd (9.5, 7.5) |
| 3 | 4.17 dd (9.0, 8.0) | 4.14 dd (9.0, 8.0) | 4.18 dd (9.0, 8.0) | 4.19-4.13 * |
| 4 | 3.61 dd (9.0, 9.0) | 3.58 dd (9.0, 9.0) | 3.61 dd (9.5, 8.0) | 3.59 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 3.74 dq (9.0, 6.5) | 3.71 dq (9.0, 6.0) | 3.74 dq (9.5, 6.5) | 3.72 dq (9.5, 6.5) |
| 6 | 1.59 d (6.5) | 1.56 d (6.0) | 1.59 d (6.5) | 1.54 d (6.5) |
| Glu-1 | 5.91 d (7.0) | 5.87 d (7.5) | 5.90 d (7.5) | 5.88 d (7.5) |
| 2 | 4.19 dd (9.0, 7.0) | 4.16 dd (7.5, 7.5) | 4.17 dd (9.0, 7.5) | 4.19-4.13 * |
| 3 | 4.23 dd (9.0, 9.0) | 4.20 dd (9.0, 7.5) | 4.23 dd (9.0, 8.5) | 4.21 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 3.91 dd (9.0, 9.0) | 3.88 dd (9.0, 8.0) | 3.93 dd (8.5, 8.5) | 3.90 dd (9.0, 8.5) |
| 5 | 3.98 ddd (9.0, 7.0, 2.0) | 3.96 ddd (8.0, 6.5, 2.0) | 3.96 ddd (8.5, 6.5, 2.0) | 3.96 ddd (8.5, 6.5, 2.0) |
| 6a | 4.98 dd (11.5, 2.0) | 4.95 dd (12.0, 2.0) | 4.90-5.0 * | 4.95 dd (11.5, 2.0) |
| 6b | 4.65 dd (11.5, 7.0) | 4.62 dd (12.0, 6.5) | 4.59 dd (11.5, 6.5) | 4.57 dd (11.5, 6.5) |
| Ram-1 | 6.26 d (2.0) | 6.24 d (1.5) | 6.23 d (1.5) | 6.22 d (1.5) |
| 2 | 6.22 dd (3.0, 2.0) | 6.19 (3.0, 1.5) | 6.16 dd (3.0, 1.5) | 6.15 dd (3.0, 1.5) |
| 3 | 6.40 dd (10.0, 3.0) | 6.37 dd (10.0, 3.0) | 6.39 dd (10.0, 3.0) | 6.37 dd (10.0, 3.0) |
| 4 | 4.33 dd (10.0, 9.5) | 4.30 dd (10.0, 9.5) | 4.31 dd (10.0, 9.5) | 4.29 dd (10.0, 9.5) |
| 5 | 4.82 dq (9.5, 6.0) | 4.79 dq (9.5, 6.5) | 4.81 dq (9.5, 6.5) | 4.79 dd (9.5, 6.0) |
| 6 | 1.59 d (6.0) | 1.56 d (6.5) | 1.58 d (6.5) | 1.56 d (6.0) |
| Qui-1 | 4.98 d (8.0) | 4.95 d (7.5) | 4.97 d (8.0) | 4.95 d (8.0) |
| 2 | 3.85 dd (9.5, 8.0) | 3.82 dd (9.5, 7.5) | 3.84 dd (9.0, 8.0) | 3.82 dd (9.0, 8.0) |
| 3 | 4.09 dd (9.5, 9.5) | 4.07 dd (9.5, 9.5) | 4.10 dd (9.5, 9.0) | 4.07 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 5.25 dd (10.0, 9.5) | 5.22 dd (9.5, 9.0) | 5.24 dd (9.5, 9.5) | 5.22 dd (9.0, 9.0) |
| 5 | 3.69 dq (10.0, 6.5) | 3.67 dq (9.0, 6.5) | 3.68 dq (9.5, 6.5) | 3.67 dq (9.0, 6.5) |
| 6 | 1.36 d (6.5) | 1.32 d (6.5) | 1.34 d (6.5) | 1.32 d (6.5) |
| Jal-2 ^a | 2.81 ddd (15.0, 7.5, 3.5) | 2.79 dd (15.5, 8.0, 3.0) | 2.81 ddd (15.0, 8.0, 3.0) | 2.79 ddd (15.0, 8.5, 3.0) |
| 2b | 2.59 ddd (15.0, 9.5, 2.5) | 2.57 ddd (15.5, 10.0, 2.5) | 2.58 ddd (15.0, 10.0, 3.0) | 2.57 ddd (15.0, 9.5, 3.0) |
| 11 | 3.96-3.88 * | 3.-95-3.90 * | 4.00-3.90 * | 3.95-3.90 * |
| 16 | 0.87 t (7.5) | 0.84 t (7.5) | 0.87 t (7.0) | 0.84 t (7.0) |
| mb-2 | 2.38 tq (7.0, 7.0) | 2.36 tq (7.0, 7.0) | 2.38 tq (7.0, 6.5) | 2.47 tq (7.0, 7.0) |
| 2-Me | 1.13 d (7.0) | 1.13 d (7.0) | 1.15 d (7.0) | 1.18 d (7.0) |
| 3-Me | 0.99 t (7.5) | 0.96 d (7.0) | 0.98 t (7.5) | 0.93 t (7.0) |
| mb'-2 | 2.49 tq (7.5, 7.5) | 2.47 tq (7.0, 7.0) | 2.49 tq (7.0, 7.0) | 2.36 tq (7.0, 7.0) |
| 2-Me | 1.17 d (7.5) | 1.17 d (7.0) | 1.20 d (7.0) | 1.13 d (7.0) |
| 3-Me | 0.96 t (7.5) | 0.93 d (7.0) | 0.95 t (7.5) | 0.95 t (7.0) |
| nl-2 | 2.84 dq (7.0, 7.5) | 2.81 dq (7.0, 6.5) | 2.84 dq (7.0, 7.0) | 2.82 dq (7.0, 7.0) |
| 3 | 4.37 m | 4.34 dq (6.5, 6.5) | 74.35 m | 4.34 dq (7.0, 6.5) |
| 2-Me | 1.29 d (7.5) | 1.26 d (7.0) | 1.30 d (7.0) | 1.28 d (7.0) |
| 3-Me | 1.35 d (6.0) | 1.34 d (6.5) | 1.35 d (6.0) | 1.33 d (6.5) |

^a_y^b Ver cuadro 2.

Cuadro 12. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C de las orizabinas XIV–XXI (12–19)^a.

| Carbono ^b | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 |
|----------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| Qui-1 | 101.33 | 100.89 | 101.15 | 100.95 | 100.38 | 100.87 | 101.14 | 100.95 |
| 2 | 79.17 | 79.20 | 79.08 | 78.85 | 78.49 | 78.88 | 79.07 | 79.24 |
| 3 | 78.64 | 78.46 | 78.63 | 78.44 | 77.94 | 78.42 | 78.63 | 78.44 |
| 4 | 77.44 | 77.26 | 77.49 | 77.29 | 76.75 | 77.25 | 77.50 | 77.31 |
| 5 | 72.67 | 72.47 | 72.68 | 72.47 | 71.95 | 72.45 | 72.68 | 72.48 |
| 6 | 18.75 | 18.52 | 18.69 | 18.53 | 17.95 | 18.50 | 18.24 | 18.51 |
| Glu-1 | 101.70 | 101.16 | 101.15 | 100.95 | 100.63 | 101.11 | 101.14 | 100.95 |
| 2 | 79.38 | 79.20 | 79.44 | 79.24 | 78.68 | 79.18 | 79.43 | 78.87 |
| 3 | 77.45 | 77.26 | 77.55 | 77.29 | 76.75 | 77.25 | 77.50 | 77.31 |
| 4 | 72.50 | 72.32 | 72.55 | 72.35 | 71.81 | 72.31 | 72.54 | 72.35 |
| 5 | 75.16 | 74.96 | 75.07 | 74.87 | 74.46 | 74.96 | 75.08 | 74.88 |
| 6 | 65.00 | 64.81 | 64.84 | 64.63 | 64.29 | 64.79 | 64.84 | 64.63 |
| Rha-1 | 95.61 | 96.36 | 96.52 | 96.32 | 95.85 | 96.34 | 96.52 | 96.34 |
| 2 | 70.00 | 69.83 | 70.18 | 69.98 | 69.30 | 69.80 | 70.18 | 69.98 |
| 3 | 71.49 | 71.30 | 71.48 | 71.29 | 70.79 | 71.27 | 71.48 | 71.29 |
| 4 | 79.09 | 78.89 | 79.02 | 78.85 | 78.39 | 78.98 | 79.07 | 78.87 |
| 5 | 68.85 | 68.65 | 68.87 | 68.67 | 68.13 | 68.62 | 68.85 | 68.65 |
| 6 | 18.69 | 18.52 | 18.77 | 18.46 | 18.01 | 18.44 | 18.77 | 18.51 |
| Qui'-1 | 105.40 | 105.21 | 105.42 | 105.21 | 104.66 | 105.16 | 105.39 | 105.19 |
| 2 | 745.34 | 75.16 | 75.33 | 75.14 | 74.72 | 75.25 | 75.40 | 75.25 |
| 3 | 75.58 | 75.38 | 75.57 | 75.37 | 74.72 | 75.21 | 75.45 | 75.25 |
| 4 | 77.09 | 76.91 | 77.09 | 76.89 | 75.84 | 76.30 | 76.50 | 76.30 |
| 5 | 70.67 | 70.47 | 70.67 | 70.46 | 69.83 | 70.31 | 70.53 | 70.32 |
| 6 | 18.21 | 17.97 | 18.21 | 17.96 | 17.51 | 17.99 | 18.68 | 17.99 |
| Jal-1 | 173.51 | 173.32 | 173.51 | 173.32 | 172.82 | 173.31 | 173.51 | 173.32 |
| 2 | 34.69 | 34.48 | 34.69 | 34.47 | 33.95 | 34.44 | 34.67 | 34.46 |
| 11 | 79.38 | 79.20 | 79.54 | 79.32 | 78.68 | 79.18 | 79.51 | 79.25 |
| 16 | 14.53 | 14.29 | 14.52 | 14.26 | 13.77 | 14.27 | 14.52 | 14.27 |
| mb-1 | 175.57 | 175.39 | 175.59 | 175.39 | 174.89 | 175.38 | 175.60 | 175.43 |
| 2 | 41.35 | 41.14 | 41.34 | 41.11 | 40.62 | 41.11 | 41.33 | 41.11 |
| 2-Me | 17.24 | 17.00 | 17.21 | 16.97 | 16.48 | 16.97 | 17.21 | 16.97 |
| 3-Me | 11.98 | 11.74 | 11.97 | 11.73 | 11.22 | 11.80 | 11.96 | 11.80 |
| mb'-1 | | | | | 175.40 | 175.88 | 176.09 | 175.90 |
| 2 | | | | | 41.21 | 41.69 | 41.93 | 41.72 |
| 2-Me | | | | | 16.48 | 16.97 | 17.21 | 16.97 |
| 3Me | | | | | 11.30 | 11.72 | 12.05 | 11.73 |
| nl-1 | 175.75 | 175.55 | 175.59 | 175.39 | 175.06 | 175.55 | 175.60 | 175.39 |
| 2 | 48.71 | 48.50 | 48.95 | 48.71 | 47.98 | 48.49 | 48.95 | 48.73 |
| 3 | 69.26 | 69.06 | 69.26 | 69.05 | 68.55 | 69.05 | 69.26 | 69.05 |
| 2-Me | 13.63 | 13.39 | 13.54 | 13.29 | 12.88 | 13.37 | 13.55 | 13.31 |
| 3-Me | 21.11 | 20.89 | 21.12 | 20.87 | 20.37 | 20.87 | 21.13 | 20.91 |
| tg-1 | 167.70 | 167.51 | 167.68 | 167.49 | | | | |
| 2 | 129.27 | 129.10 | 129.27 | 129.08 | | | | |
| 3 | 137.73 | 137.51 | 137.72 | 137.51 | | | | |
| 2-Me | 12.45 | 12.21 | 12.46 | 12.21 | | | | |
| 3-Me | 14.36 | 14.12 | 14.36 | 14.10 | | | | |

^{a y b} Ver cuadro 3.

Debido a la ausencia de interacciones significativas ^1H - ^1H (ROESY, NOESY) a través del espacio entre los protones de los residuos 2-metilbutanoilo y niloilo con los del núcleo oligosacárido, nuestra atención se enfocó en los desplazamientos químicos (δ) de los núcleos de ^1H y ^{13}C de las orizabinas XIV-XXI (12-19) (cuadros 10-12) con el objetivo de sustentar la localización de los residuos antes mencionados en las orizabinas XVI (14), XVII (15), XIX (18) y XXI (19).

Las señales del H-6 de la glucosa y H-2 de la ramnosa involucradas en la esterificación de los grupos 2-metilbutanoilo (mb) y niloilo (nl) de las orizabinas XIV (12)-XXI (19) no reflejaron ninguna variación significativa en los desplazamientos químicos (δ) como una consecuencia del intercambio en las posiciones de estos residuos. Por ejemplo, las señales de protón en los compuestos 12-15 para H-6 de la glucosa (cuadro 10) son muy semejantes entre sí, sin importar que los compuestos 12-13 presenten en ese centro el mb y los 14-15 al nl. Sin embargo, las señales de los carbonos C-1 de la quinovosa interna y la glucosa se encuentran en la misma posición en los pares 14-15 (δ 101.1 y δ 100.9) y 18-19 (δ 101.1 y 100.9) (ver cuadro 12) a diferencia de las señales de C-1 generadas por los compuestos 12-13 y 16-17 que aparecen separadas entre sí ($\Delta\delta$ 0.3-0.4 ppm). En la figura 41 se ilustra la región para los carbonos anoméricos de los compuestos 17 y 19 donde se observa el cambio en el desplazamiento químico del carbono C-1 de la glucosa ($\Delta\delta$ 0.2 ppm) cuando el grupo nl se encuentra fuera de la macrolactona, es decir en la posición C-6 de la glucosa.

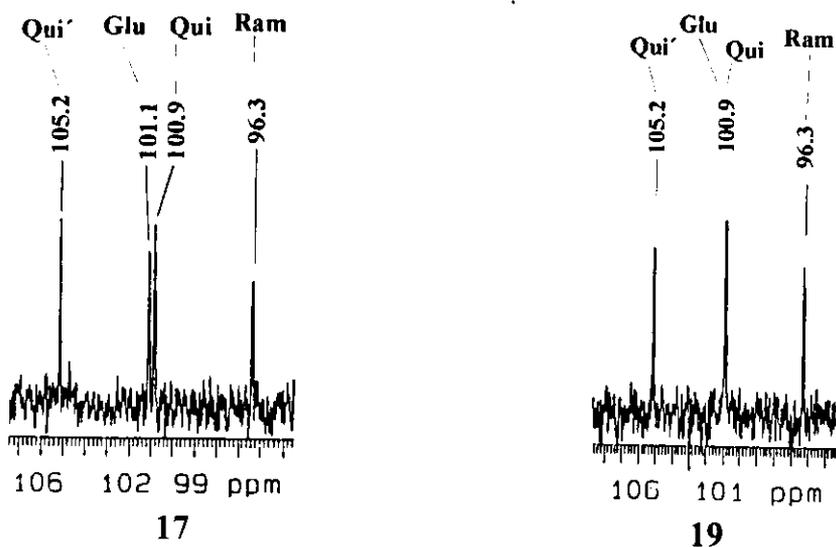


Figura 41. Sección de los espectros de RMN de ^{13}C correspondiente a los carbonos anoméricos (C-1) de las orizabinas XIX (17) y XXI (19).

La propuesta para explicar estas pequeñas variaciones en los desplazamientos químicos de ^{13}C esta relacionada con posibles cambios en la conformación del esqueleto de carbono macrocíclico. Los núcleos de ^{13}C afectados son los que forman parte del sistema cíclico e indican que el glicolípido podría modificar ligeramente su conformación cuando un grupo de mayor volumen (niloilo) se intercambia por uno de menor tamaño (2-metilbutanoilo) entre las posiciones C-2 y C-6 de la ramnosa y glucosa respectivamente. Estas observaciones permiten sustentar la localización contraria del 2-metilbutanoilo (mb) en las orizabinas XVI (14) y XVII (15) que la propuesta para los compuestos 12 y 13. Así, las orizabinas XX (18) y XXI (19) tendrán también el mb situado en el centro C-2 de la ramnosa mientras que los compuestos 16 y 17 presentan este residuo en el carbono C-6 de la glucosa (fig. 34).

5.1.4.1. Análisis de los residuos niloilo y 2-metilbutanoilo.

El tratamiento de los productos naturales 7–19 con una solución de K_2CO_3 (Du *et al.*, 1998) en un sistema bajo reflujo liberó los ácidos orgánicos (nilico, 2-metilbutanoico, tíglico e isobutirico) presentes en cada uno de los glicolípidos. Cada uno de los ácidos liberados se transformó a sus correspondientes ésteres de *p*-bromofenacilo con la finalidad de incrementar su peso molecular, facilitar su extracción y disminuir las pérdidas durante su manipulación. La separación de la mezcla de ésteres en cada caso se hizo mediante CLAP en columna de fase normal (SiO_2), lográndose la obtención de los picos correspondientes a los ésteres de los ácidos 2-metilbutanoico, nilico, 2-metilpropanoico y tíglico. Las constantes espectroscópicas y la rotación óptica $[\alpha]_D + 18$ ($c = 1.0$, MeOH) del 2-metilbutanoato de *p*-bromofenacilo obtenido en cada caso resultaron idénticas a las descritas para el enantiomero *S* (Noda *et al.*, 1987; Ono *et al.*, 1990b).

Las constantes espectroscópicas en la RMN de 1H que presentó el nilato de *p*-bromofenacilo (fig. 42) obtenido de cada uno de los glicolípidos (7–19) reflejó la existencia de un sólo par diastereoisomérico de las dos formas posibles, *i.e.* 2*R*,3*S* o 2*S*,3*R* (serie *eritro*) y 2*R*,3*R* o 2*S*,3*S* (serie *treo*) (Tai e Imaida, 1978). Las constantes de acoplamiento ($^3J_{H-H}$) que presentaron los protones H-2 con H-3 cercanas a 7 Hz establecieron la configuración relativa *treo* (Maskens y Polgar, 1975; Massiot *et al.*, 1992). La distinción entre los dos enantiómeros (2*R*,3*R* o 2*S*,3*S*) se ha efectuado mediante la determinación de su rotación óptica como ésteres de *p*-bromofenacilo (Du *et al.*, 1998; Miyahara, *et al.*, 1996; Ono *et al.*, 1990b) o como derivados esterificados (Dagne *et al.*,

1996). En la presente investigación la determinación de la configuración absoluta en el residuo de niloilo no se hizo mediante el registro de su rotación óptica debido a la cantidad escasa de muestra disponible. Se utilizó como una alternativa la preparación de los ésteres de Mosher (Ohtani *et al.*, 1991; Rieser *et al.*, 1992). Así la determinación de la configuración absoluta del carbono (C-3) que soporta el grupo OH mediante su esterificación con los ácidos de Mosher permitió la identificación inmediata del enantiómero correcto *2R,3R* o *2S,3S* presente en cada uno de los residuos generados por la hidrólisis de las orizabinas IX–XXI (7–19).

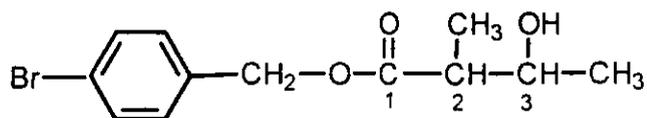


Figura 42. Nilato de *p*-bromofenacilo.

De acuerdo con esta metodología, la determinación de la configuración absoluta de alcoholes y aminas quirales se establece desde la correlación entre la configuración de los ésteres diastereoisoméricos de los ésteres de MTPA formados y los desplazamientos químicos observados en la RMN ^1H . Para esto, se considera que en solución, el grupo MTPA tiene una conformación preferida en donde el protón del carbinol, el carboxilo del éster y el trifluorometilo se encuentran en un mismo plano (fig. 43a) y debido a los efectos diamagnéticos del anillo de benceno, las señales de los protones Ha, Hb y Hc en el éster (*R*)-MTPA se desplazarán hacia campos altos con respecto a aquellas señales correspondientes al derivado (*S*)-MTPA (fig. 43b). El efecto contrario sucederá en el caso de los protones Hx, Hy y Hz. Por lo tanto, si la diferencia en los desplazamientos entre las

señales de ambos derivados ($\Delta\delta = \delta_S - \delta_R$) posee un valor positivo ($\Delta\delta > 0$) éstos protones se encuentran del lado derecho del plano y si es negativa ($\Delta\delta < 0$) se encuentran del lado izquierdo del mismo (fig. 43c) (Ohtani *et al.*, 1991).

Las constantes espectroscópicas (δ ^1H) de los ésteres de Mosher *R* y *S* de los nilatos de *p*-bromofenacilo derivados fueron analizadas y se encontró que cada par de compuestos indistinguibles espectroscópicamente presentaron ambos enantiómeros de la serie *treo* para los nilatos que esterificaban el núcleo oligosacárido. En el cuadro 11 se resumen los desplazamientos químicos (δ) de los derivados (*S*) y (*R*)-MTPA del nilato de *p*-bromofenacilo provenientes de las orizabinas X (8) y XI (9) y su aplicación en el establecimiento de la configuración absoluta para el centro estereogénico C-3.

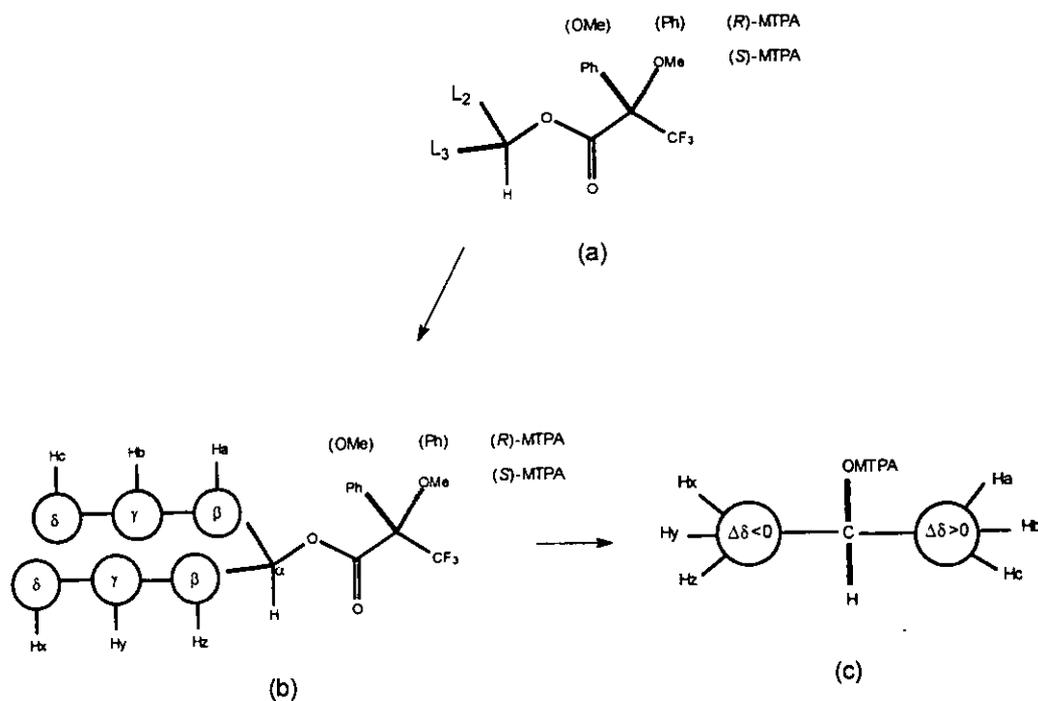


Figura 43. Modelo para el establecimiento de la configuración absoluta del C- α en alcoholes secundarios mediante la generación de los ésteres de Mosher y el empleo de la RMN ^1H .

Cuadro 13. Efectos en el desplazamiento químico (δ) de los núcleos vecinos al centro C-3 de los ésteres de Mosher del nilato de *p*-bromofenacilo derivados a partir de las orizabinas X (**8**) y XI (**9**).

| | MTPA | 3CH ₃ | $\Delta \delta$ H | 2CH ₃ | $\Delta \delta$ H | H-2 | $\Delta \delta$ H | Configuración C-3 |
|----------|----------|------------------|-------------------|------------------|-------------------|------|-------------------|----------------------|
| 8 | <i>R</i> | 1.36 | + 0.07 | 1.30 | - 0.05 | 2.96 | - 0.03 | 2 <i>R</i> |
| | <i>S</i> | 1.43 | | 1.25 | | 2.93 | | |
| 9 | <i>R</i> | 1.43 | - 0.07 | 1.24 | + 0.07 | 2.93 | + 0.03 | 2 <i>S</i> |
| | <i>S</i> | 1.36 | | 1.31 | | 2.96 | | |

En el derivado proveniente del compuesto **8** se determinó la configuración absoluta *R* en el carbono C-3 (fig. 44) y, por lo tanto este residuo corresponde al isómero 2*R*,3*R*.

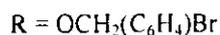
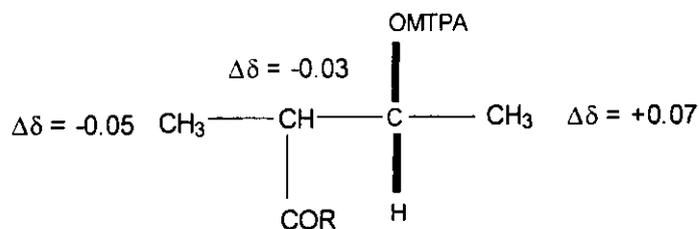


Figura 44. Determinación de la configuración absoluta (*R*) del centro C-3 del éster de Mosher proveniente del nilato presente en la orizabina X (**8**).

El análisis de los glicolípidos restantes utilizando la metodología descrita anteriormente permitió determinar la configuración absoluta del residuo niloilo 2*R*,3*R* en las orizabinas IX (7), XIII (11), XIV (12), XVII (15), XVIII (16) y XXI (19) y la configuración 2*S*,3*S* en las XII (10), XV (13), XVI (14) XIX (17) y XX (18). De esta forma, estos compuestos se caracterizaron como se describe a continuación:

Orizabina IX (7): éster intramolecular 1, 3'''- {[*O*-6-desoxi-4-*O*-(1-oxo-tigilil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-*L*-manopiranosil-(1→2)-*O*-4-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina X (8): éster intramolecular 1, 3'''- {[*O*-6-desoxi-4-*O*-(1-oxo-tigilil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)- α-*L*-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2-metil-1-oxo-propil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XI (9): éster intramolecular 1, 3'''- {[*O*-6-desoxi-4-*O*-(1-oxo-tigilil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*,3*S*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)- α-*L*-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2-metil-1-oxo-propil)-β-*D*-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-*D*-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XII (10): éster intramolecular 1, 3'''-{[O-6-desoxi-4-O-(1-oxo-tigilil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-6-desoxi-2-O-(2-metil-1-oxo-propil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-O-6-O-(2*S*,3*S*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XIII (11): éster intramolecular 1,3'''-{[O-6-desoxi-4-O-(1-oxo-tigilil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-6-desoxi-2-O-(2-metil-1-oxo-propil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-O-6-O-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi}- del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XIV (12): éster intramolecular 1,3'''-{[O-6-desoxi-4-O-(1-oxo-tigilil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-6-desoxi-2-O-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-O-6-O-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XV (13): éster intramolecular 1,3'''-{[O-6-desoxi-4-O-(1-oxo-tigilil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-6-desoxi-2-O-(2*S*,3*S*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-O-6-O-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XVI (14): éster intramolecular 1,3'''-{[O-6-desoxi-4-O-(1-oxo-tigilil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-6-desoxi-2-O-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-

(1→2)-*O*-6-*O*-(2*S*,3*S*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XVII (15): éster intramolecular 1,3'''- {[*O*-6-desoxi-4-*O*-(1-oxo-tigilil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XVIII (16): éster intramolecular 1,3'''- {[*O*-6-desoxi-4-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XIX (17): éster intramolecular 1,3'''- {[*O*-6-deoxi-4-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*,3*S*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XX (18): éster intramolecular 1,3'''- {[*O*-6-desoxi-4-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-*O*-6-desoxi-2-*O*-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-*O*-6-*O*-(2*S*,3*S*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

Orizabina XXI (19): éster intramolecular 1,3'''-{[O-6-desoxi-4-O-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-6-desoxi-2-O-(2*S*)(2-metil-1-oxo-butil)-α-L-manopiranosil-(1→2)-O-6-O-(2*R*,3*R*)(3-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido (11*S*)-11-hidroxi-hexadecanoico.

5.1.5. Actividad citotóxica de las escamoninas I (1) y II(2) y las orizabinas V–XXI (3–19).

La evaluación citotóxica de las escamoninas I (1) y II(2) y las orizabinas V–VIII (3–6) se efectuó tomando como referencia la elipticina mediante el método de microplacas (22 μ L) y como método de cuantificación de proteínas la tinción con sulforodamina (Likhitwitayawuid *et al.*, 1993). Las orizabinas XIX–XXI (7–19) fueron evaluadas según el método en tubo de ensayo y utilizando la técnica de Bradford para determinar el contenido proteico.

Los resultados obtenidos en las pruebas preliminares de la evaluación citotóxica en la jalapina de esta raíz (Sosa-Vasquez, 1993) mostraron una actividad significativa en dos líneas celulares cancerosas: carcinoma nasofaríngeo humano (KB) y el linfoma de móridos (P-388) para las fracciones primarias III–VII (<20 μ g/mL) de la jalapina. La confirmación de una actividad citotóxica no específica del extracto clorofórmico (jalapina) de esta raíz motivó el estudio fitoquímico de las fracciones primarias más activas, entre las cuales se encuentra la fracción primaria de la jalapina (FPJ) con el propósito de lograr el aislamiento de glicolípidos bioactivos. Los compuestos de esta naturaleza con propiedades citotóxicas no se reportan con frecuencia siendo ejemplos la tricolorina A (Pereda-Miranda, 1993) y el glicolípido mayoritario de *I. stans* (Reynolds *et al.*, 1995).

La actividad citotóxica de los constituyentes mayoritarios (compuestos 1-19) de la FPJ se presenta en el cuadro 14. En general, la actividad citotóxica que mostraron los glicolípidos evaluados fue significativa en la línea celular de cáncer nasofaríngeo (KB) y

en menor grado en la de cáncer de ovario (OVCAR). Resulta interesante resaltar que los glicolípidos provenientes de la fracción F (7–19) de menor polaridad son los que poseen las actividades citotóxicas más importantes ($CE_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$). La orizabina VII (5) mostró un valor de $8 \mu\text{g/mL}$ para la línea KB mientras que los compuestos análogos con un residuo metilbutiroilo adicional en la posición C-4 de la quinovosa externa, las orizabinas XX (18) y XXI (19), presentaron valores de $CE_{50} = 1.74$ y $1.82 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Por lo tanto, es posible suponer que las orizabinas de menor polaridad (7–9) presentaron una mayor actividad citotóxica gracias a la mayor liposolubilidad atribuida al grupo éster adicional que presentaron los núcleos oligosacáridos. Además, no se ha reportado a la fecha un mecanismo de acción específico, sólo se ha propuesto que este tipo de compuestos actúan como ionóforos modificando la permeabilidad de las membranas celulares (Kitakawa *et al.*, 1989).

Cuadro 14. Actividad citotóxica de las escamoninas I (1) y II (2) y las orizabinas V (1)–XXI (19).

| Compuesto | Línea celular ^a , CE ₅₀ (µg/ml) ^a | | | |
|----------------------|--|-----------|-------|-------|
| | HCT-15 | SQC-1UISO | OVCAR | KB |
| 1 (escamonina I) | >20 | 19.54 | >20 | 7.51 |
| 2 (escamonina II) | >20 | 18.22 | 19.49 | 10.43 |
| 3 (orizabina V) | >20 | 19.96 | >20 | 13.00 |
| 4 (orizabina VI) | >20 | >20 | >20 | 8.0 |
| 5 (orizabina VII) | >20 | 17.13 | >20 | 8.0 |
| 6 (orizabina VIII) | >20 | >20 | >20 | 19.70 |
| 7 (orizabina IX) | 9.1 | 12.0 | 15.8 | 5.5 |
| 8 (orizabina X) | 10 | 19.1 | 8.3 | 3.31 |
| 9 (orizabina XI) | 6.3 | 10 | 7.9 | 1.74 |
| 10 (orizabina XII) | 15.8 | >20 | 8.7 | 12 |
| 11 (orizabina XIII) | >20 | >20 | >20 | 1.82 |
| 12 (orizabina XIV) | 10 | 16.6 | 14.5 | 2.29 |
| 13 (orizabina XV) | >20 | >20 | >20 | 1.09 |
| 14 (orizabina XVI) | 13.2 | 15.8 | 15.8 | 1.9 |
| 15 (orizabina XVII) | 25.1 | 12 | 15.8 | 1.66 |
| 16 (orizabina XVIII) | 20 | 19.9 | 11.5 | 2.10 |
| 17 (orizabina XIX) | 8.31 | 18.2 | 12.6 | 2.29 |
| 18 (orizabina XX) | 17.4 | 15.8 | 6.3 | 1.74 |
| 19 (orizabina XXI) | >20 | 11 | 3.9 | 1.82 |
| Elipticina | 0.24 | 0.096 | 0.13 | 0.04 |

^a Abreviaciones: HCT-15, cáncer de colon; SQC-1 UISO, cáncer de cervix celular escamoso; KB, cáncer nasofaríngeo; OVCAR, cáncer de ovario.

5.2. Análisis fitoquímico de la raíz de *Ipomoea purga*.

5.2.1 Obtención de los ácidos glicosídicos metilados de la convolvulina.

La extracción clorofórmica del material vegetal de *I. purga* produjo 4.41 g de jalapina y la metanólica 169.55 g de convolvulina. El total de la convolvulina se fraccionó mediante cromatografía en columna (SiO_2), utilizando como eluyente mezclas de metanol-cloroformo-acetona con un incremento gradual de la polaridad. Cada una de las fracciones obtenidas (I-VII) se sometió a evaluación de su potencial citotóxico en tres líneas celulares cancerosas humanas: cáncer de colon (HCT-15), carcinoma de cervix celular escamoso (SQC-1 UISO) y carcinoma nasofaríngeo (KB) (cuadro 15). Se encontró que la fracción II presentó actividad citóxica significativa ($\text{CE}_{50} < 5 \mu\text{g/ml}$) contra las tres líneas ensayadas.

Cuadro 15. Actividad citotóxica de las fracciones del extracto metanólico de *Ipomoea purga*.

| Fracción | Línea celular ^a CE_{50} ($\mu\text{g/ml}$) | | |
|----------|--|------------|-------|
| | HCT-15 | SQC-1 UISO | KB |
| I | 16.59 | 2.18 | 3.23 |
| II | 3.01 | 3.38 | 4.46 |
| III | 3.01 | 14.79 | 34.61 |
| IV | 50.12 | 28.18 | 24.54 |
| V | 30.90 | 14.45 | 41.68 |
| VI | 2.81 | 3.63 | 2.88 |
| VII | 72.44 | 16.59 | 25.11 |

^aAbreviaciones: HCT-15, cáncer de colon; SQC-1 UISO, carcinoma de cervix celular escamoso; KB, carcinoma nasofaríngeo.

Cada una de las fracciones se hidrolizó por separado en medio básico y las mezclas de reacción mostraron una gran homogeneidad por cromatografía en capa fina. Este análisis permitió la detección de dos componentes mayoritarios ($R_f = 0.1$ y 0.15 , $\text{CHCl}_3\text{-MeOH-H}_2\text{O}$, 6:4:1). La fracción II (500 mg) se hidrolizó y sometió a esterificación con diazometano para su posterior separación y purificación mediante cromatografía líquida de alta presión (CLAP). El sistema cromatográfico al nivel preparativo utilizado fue el siguiente: columna NH_2 ($\mu\text{Bondapak}^{\text{TM}}$, 19×150 mm), fase móvil: acetonitrilo-agua (78:22), flujo: 4 mL/min y detector: índice de refracción (64 UIR) (fig. 44). De esta forma, se aislaron los ésteres púrgicos A (**26**) (119 mg, $t_R = 26.73$ min) y B (**27**) (28.3 mg, $t_R = 23.38$ min) y el artefacto de reacción **28** (12 mg, $t_R = 18.8$ min) (fig. 45). La purificación de los mismos se efectuó mediante el reciclaje de muestra en el mismo sistema cromatográfico (Kubo y Nakatsu, 1990; Bah y Pereda-Miranda, 1996).

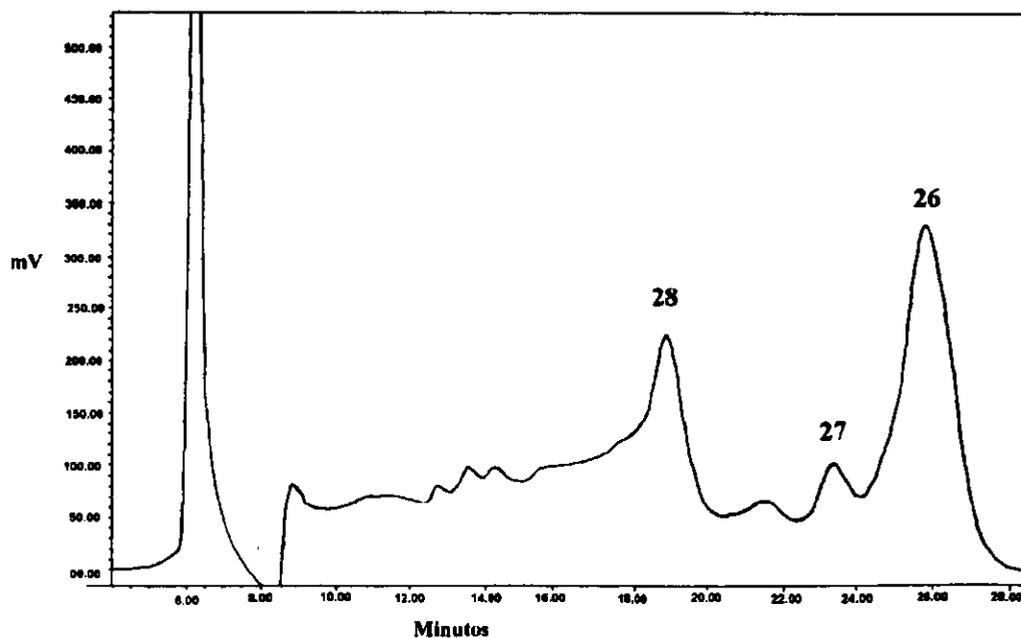


Figura 45. Cromatograma de los ácidos glicosídicos metilados obtenidos a partir de la fracción II de la convolvulina de *Ipomoea purga*. Condiciones: columna C_{NH_2} (19×150 mm, $10 \mu\text{m}$); fase: $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (8:2), flujo: 4 mL/min, inyección: $500 \mu\text{L}$ (80mg/mL) y detector: índice de refracción.

5.2.2. Análisis de los carbohidratos presentes en los ésteres púrgicos A (26) y B (27).

La hidrólisis de los ésteres glicosídicos **26** y **27** en medio ácido se efectuó con el objetivo de conocer la naturaleza de sus unidades monosacáridas constitutivas mediante la coelución de los componentes de la mezcla problema con estándares de referencia por cromatografía de líquidos de alta presión (CLAP). Las mezclas generadas de la hidrólisis de los ésteres púrgicos A (**26**) y B (**27**) resultaron ser idénticas y presentaron cinco constituyentes (fig. 46). Cuatro de estos picos mostraron los mismos tiempos de retención que los estándares de L-ramnosa ($t_R = 6.9$ min), D-quinovosa ($t_R = 7.3$ min), D-fucosa ($t_R = 8.3$ min) y D-glucosa ($t_R = 13.6$ min) y la coelución de éstos cuando se inyectaron con la muestra problema (fig. 47) comprobó la presencia de los mismos en los ésteres púrgicos A (**26**) y B (**27**). El quinto constituyente de la mezcla de hidrólisis con un $t_R = 9.9$ min se identificó como materia prima parcialmente hidrolizada debido a las variaciones observadas en su abundancia relativa cuando se repitió la hidrólisis ácida de las mezclas.

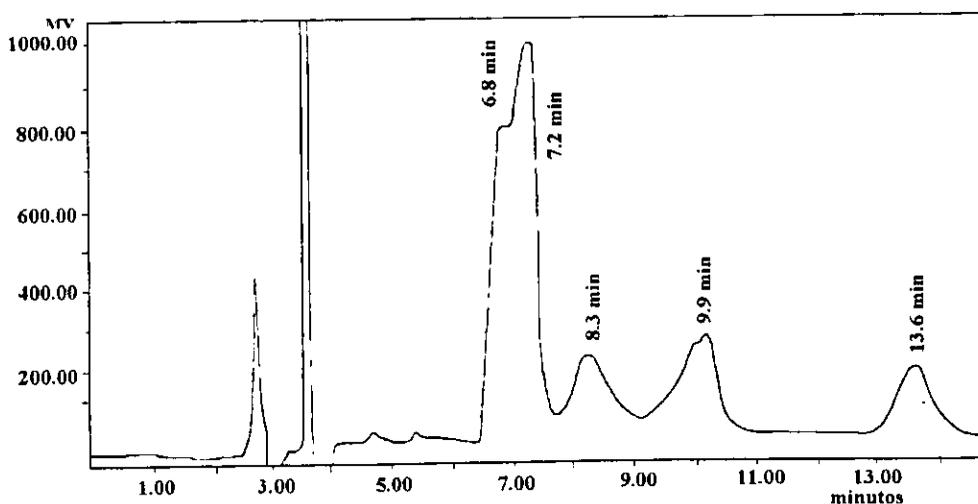


Figura 46. Análisis mediante CLAP de los carbohidratos presentes en la mezcla de hidrólisis ácida de los ésteres A (**26**) y B (**27**). Condiciones: columna para carbohidratos (Waters, 3.9 x 300 mm); fase móvil: CH₃CN-H₂O (85:15); flujo: 1 mL/mL; inyección: 20 µL (15 mg/mL).

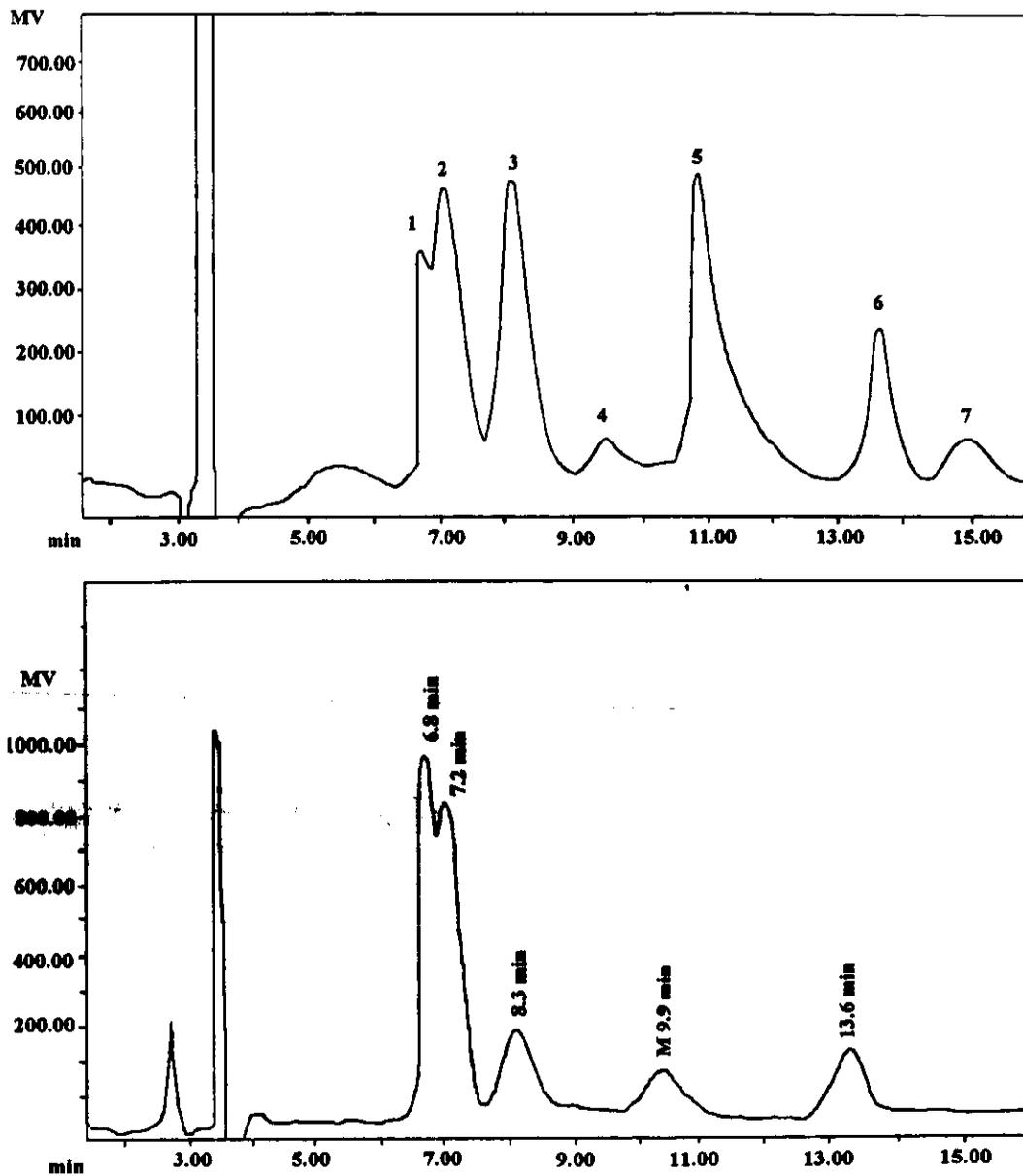


Figura 47. Cromatogramas de los monosacáridos de referencia (superior) y coelución con la mezcla problema (inferior): 1; L-ramnosa ($t_R = 6.9$ min), 2; D-quinovosa ($t_R = 7.3$ min), 3; D-fucosa ($t_R = 8.3$ min), 4; D-arabinosa ($t_R = 9.6$ min), 5; D-fructosa ($t_R = 11.1$ min), 6; D-glucosa ($t_R = 13.6$ min), 7; D-galactosa ($t_R = 6.9$ min) y M; muestra no hidrolizada ($t_R = 9.9$ min). Condiciones: columna para carbohidratos (Waters, 3.9 x 300 mm); fase móvil: $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (85:15); flujo: 1 mL/mL e inyección: 20 μL (15 mg/mL).

5.2.3. Análisis de las agliconas de los ésteres púrgicos A (31) y B (32).

Los ésteres metílicos **31** y **32** derivados de los ácidos convolvulínico y jalapinólico respectivamente, se sometieron a una reacción de sililación para su análisis en espectrometría de masas (EI-MS). El ion molecular en ambos derivados no se detectó, sin embargo, se puso de manifiesto en **31** un pico base de m/z 145 y el ion de m/z 287 (33.41 %) que fueron generados por las rupturas alfa al grupo OTMS (fig. 48), de manera que el primer ion $[C_4H_8OTMS]^+$ se generó por la ruptura homolítica del enlace $C_{10}-C_{11}$ y el fragmento de m/z 287 ($C_{12}H_{22}O_3$) correspondió al producto de la ruptura del enlace $C_{11}-C_{12}$. Por lo tanto, estos fragmentos demostraron que el tamaño de la aglicona correspondía a un C_{14} , es decir al ácido convolvulínico (Ono *et al.*, 1992b). El mismo fragmento de m/z 287 se observó en la muestra derivada de **32** (fig. 49) y el ion de m/z 173 (pico base) ($C_6H_{12}OTMS$) identificó al éster metílico del ácido jalapinólico debido a la diferencia de 28 Daltons observada para este derivado en comparación con el pico base generado por el derivado del ácido convolvulínico.

La determinación de la configuración absoluta del convolvulinato (**31**) y jalapinolato (**32**) de metilo se hizo mediante la formación de los ésteres de Mosher correspondientes. Así, la comparación de los desplazamientos químicos en la RMN 1H de los derivados (*R*)-MTPA y (*S*)-MTPA de **32** y (*R*)-MTPA de **31** con los descritos (Ono *et al.*, 1993a) demostró que ambos compuestos poseen la configuración absoluta *S* en su centro quiral C-11.

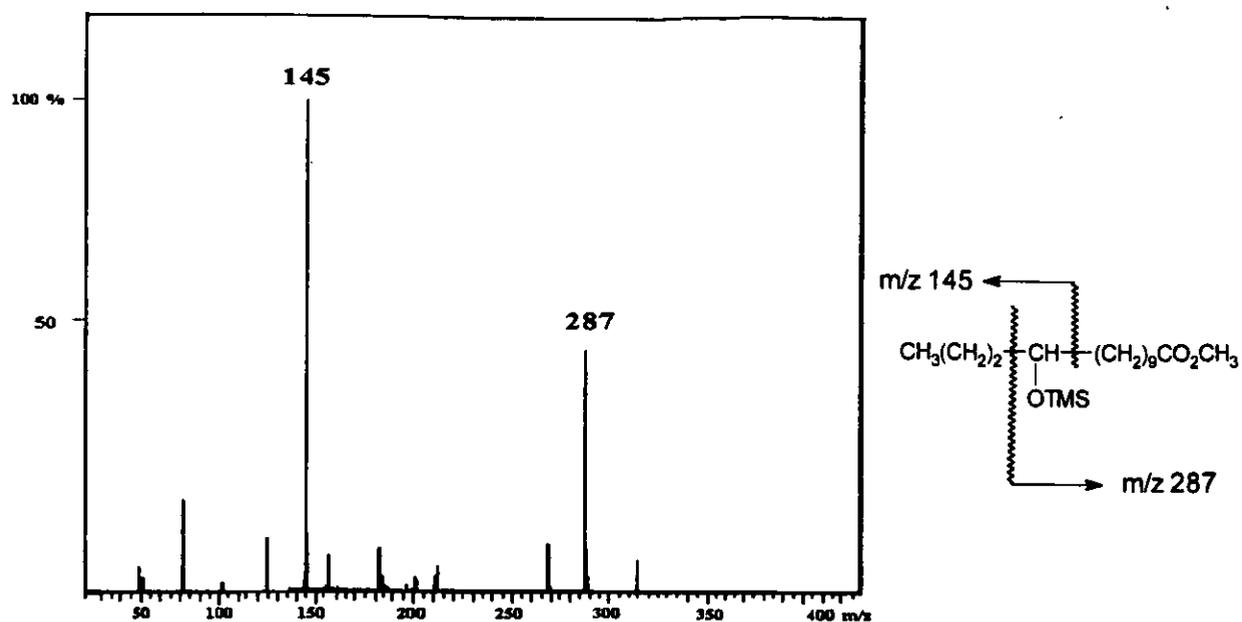


Figura 48. Espectro de masas por impacto electrónico (EI, 70 eV) y patrón de fragmentación generado por el derivado sililado del éster metílico del ácido convolvulínico (31).

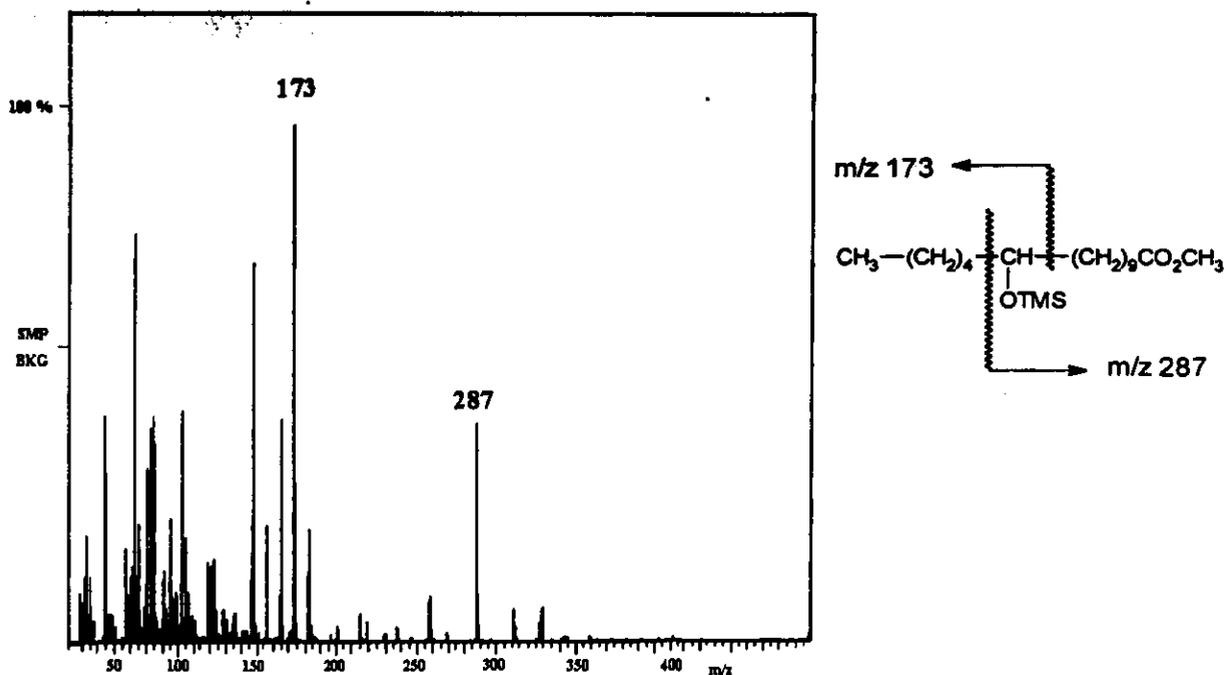


Figura 49. Espectro de masas por impacto electrónico (EI, 70 eV) y patrón de fragmentación generado por el derivado sililado del éster metílico del ácido jalapinólico (32).

5.2.4. Elucidación estructural de los ácidos glicosídicos constitutivos de la convolvulina de *Ipomoea purga*.

Los ésteres púrgicos A (26) y B (27) presentaron espectros de RMN ^1H prácticamente idénticos. Sin embargo, el espectro de RMN ^1H del compuesto 28 presentó una apariencia diferente a la obtenida para los compuestos 26 y 27 (fig. 50). A partir de éstos, se dedujo la siguiente información como resultado del análisis de la zona con menor sobreposición de señales: 1) la existencia de cuatro unidades de metilpentosas en todos los compuestos debido a las señales dobles en la zona comprendida entre δ 1.0 y 2.0 y que corresponden a grupos metilos; 2) la presencia del grupo metileno en posición α al carboxilo de la aglicona que se observa como una señal triple centrada en aproximadamente δ 2.2; 3) las señales simples centradas en δ 3.4 y 3.6 que fueron asignadas fácilmente a los grupos metoxilo (CH_3O) en todos los compuestos. El compuesto 28 presentó una señal adicional centrada en δ 3.8 (^{13}C δ 60.8).

En los espectros de RMN ^{13}C (fig. 51) todos los compuestos mostraron en la región comprendida entre δ 100–105 las señales originadas por los carbonos anoméricos y que de acuerdo a su número confirmaron la presencia de 6 unidades monosacáridas. De las cuales, dos correspondieron a unidades de hexosas debido a las señales centradas en δ 62 y 63.5 que indicaron la presencia de los hidroximetilenos de estas unidades sacáridas (Agrawal, 1992; Bah y Pereda-Miranda, 1996). En la región de campo alto (debajo de 35 ppm), el compuesto 27 mostró dos señales adicionales a las registradas para los compuestos 26 y 28 centradas en δ 32.2 y 35.2. Esta observación es congruente con la presencia del ácido convolvulínico como la aglicona del éster púrgico A (26) y, por lo

tanto, el ácido jalapínico representa la aglicona para el hexasacárido minoritario, el éster púrgico B (27).

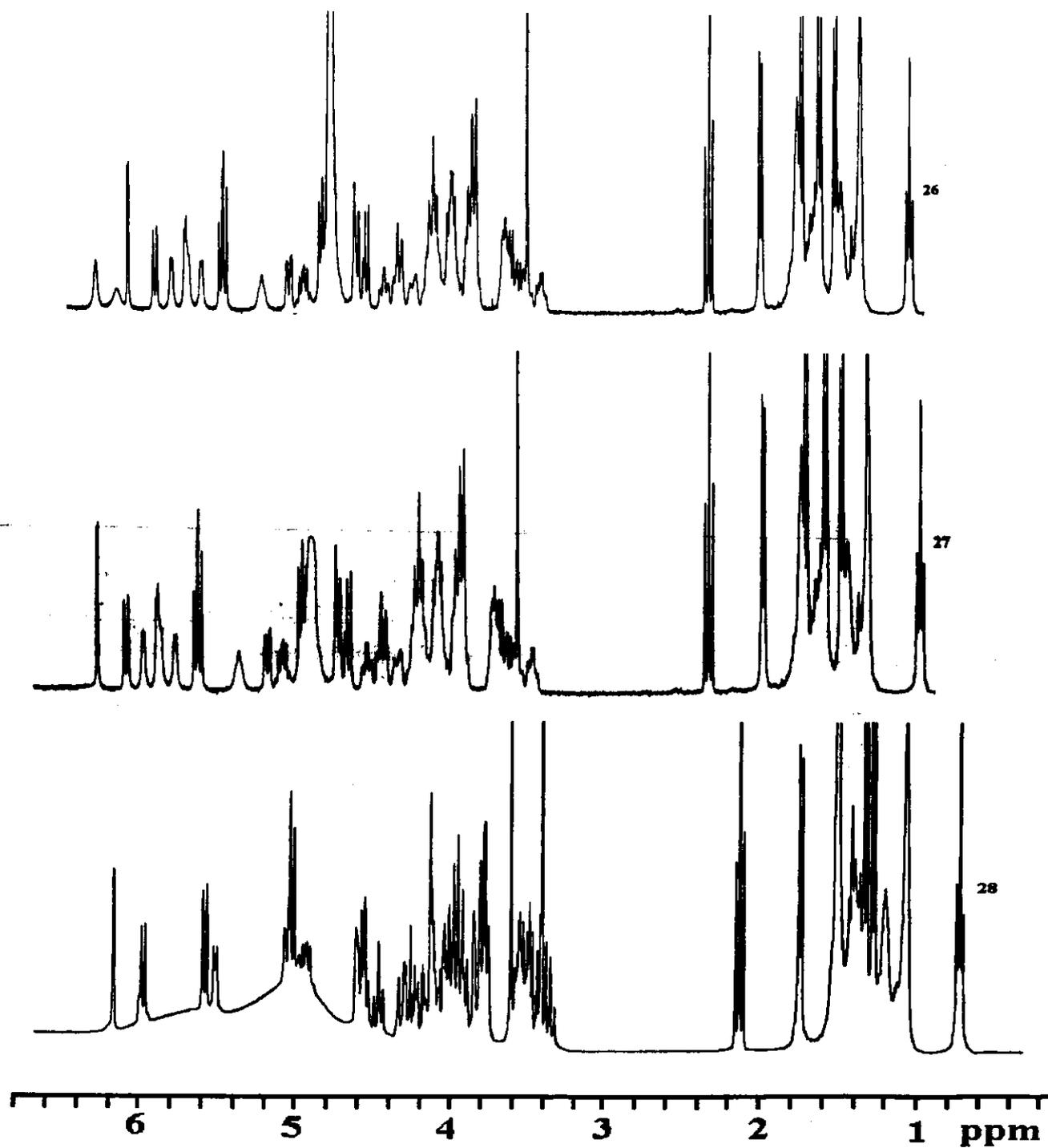


Figura 50. Espectro de RMN ¹H de los ésteres púrgicos A (26) y B (27) y del artefacto del éster púrgico A (28). 500 MHz, C₅D₅N.

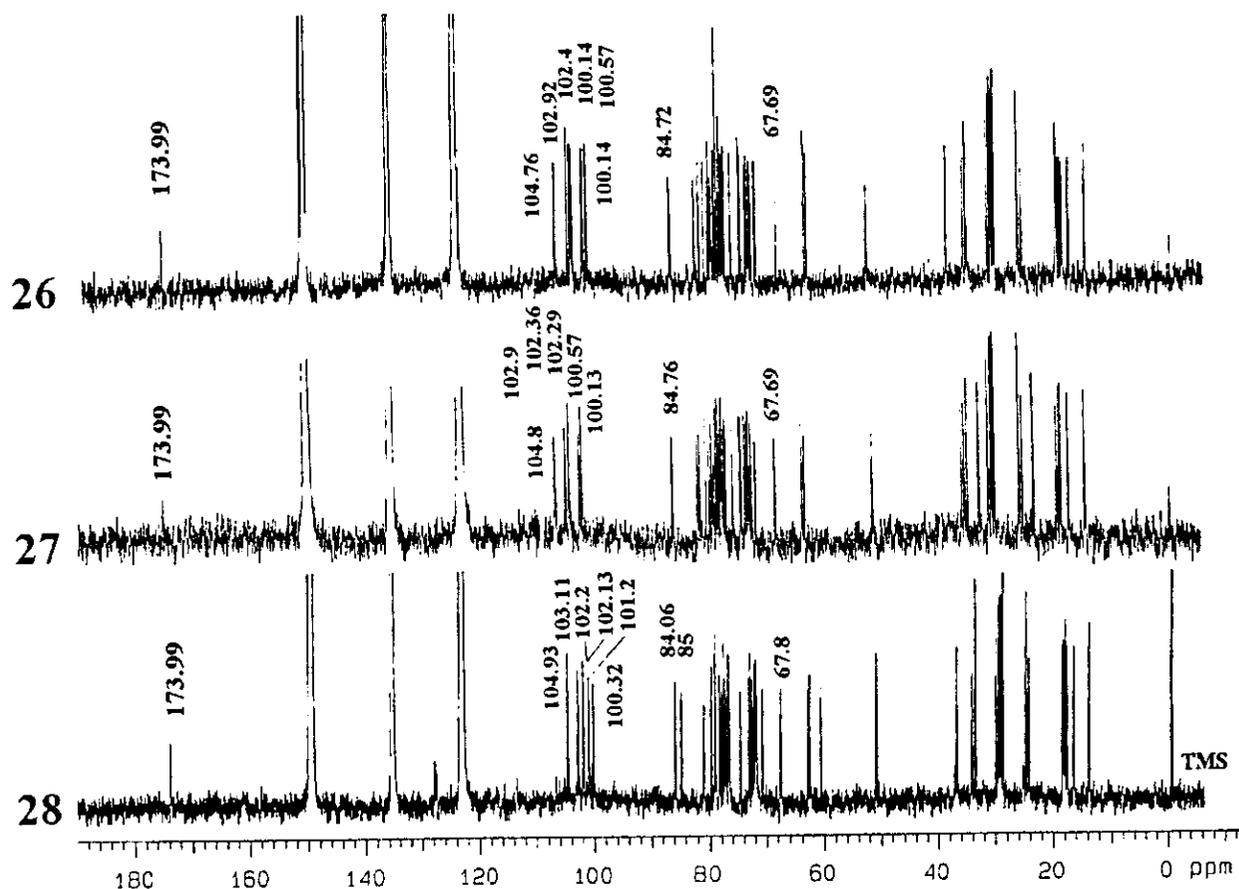


Figura 51. Espectros de RMN de ^{13}C de los ésteres púrgicos A (26) y B (27) y para el artefacto 28. 125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Debido a la gran similitud espectroscópica en la porción oligosacárida de los ésteres púrgicos A (26) y B (27), el análisis estructural se iniciará con estos dos compuestos de manera comparativa y se discute a continuación.

Partiendo del conocimiento de que existen dos unidades de hexosas (glucosa) y cuatro de metilpentosas entre las que se incluyen la ramnosa, la quinovosa y la fucosa, se procedió a hacer la asignación de los espectros de RMN ^1H de 26 y 27 junto con los experimentos COSY y TOCSY. En la figura 52 se ilustra el espectro COSY del compuesto 27, en donde se aprecia que la asignación de las resonancias sólo fue posible para los protones anoméricos y algunas señales resueltas; e.g. H_2 , H_3 y H_5 de la ramnosa. Sin embargo, partiendo de estas asignaciones se localizaron en el espectro TOCSY los

desplazamientos químicos de algunas señales adicionales (fig. 53), *e.g.*, H₂-H₆ de glucosa, H₄ de una unidad de quinovosa, H₂-H₄ de la segunda unidad de quinovosa y las correspondientes a las unidades de fucosa y la segunda de glucosa; H₁-H₃ de una de ellas (fuc/glu'), así como H₁ y H₂ de la segunda (fuc/glu').

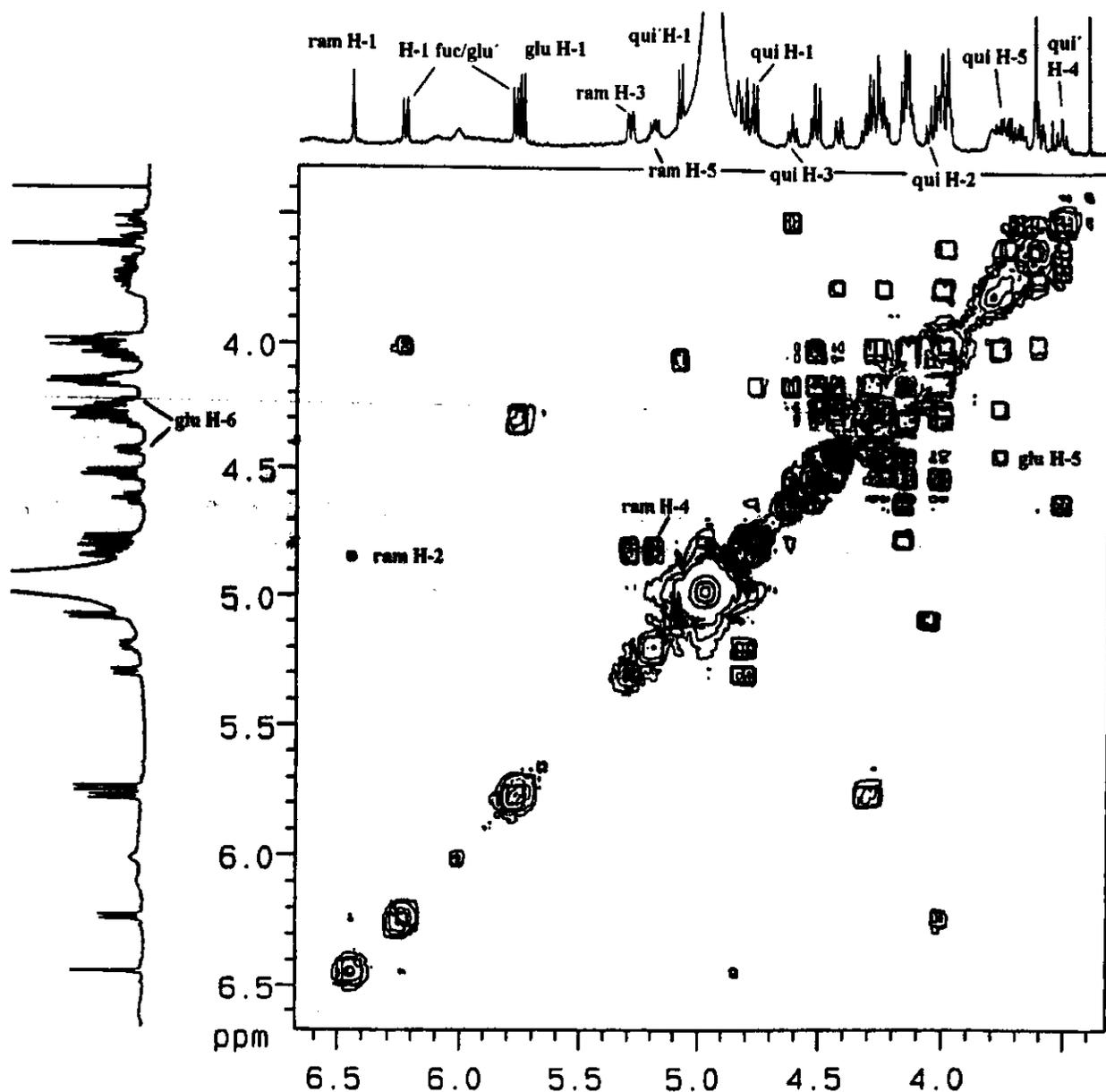


Figura 52. Sección del espectro COSY para el núcleo oligosacárido del éster púrgico B (27). Abreviaciones: glu= glucosa, glu'= glucosa externa, fuc = fucosa, ram = ramnosa, qui = quinovosa y qui' = quinovosa externa. 500 MHz, C₅D₅N.

Como se aprecia en el espectro TOCSY (fig. 53), las señales diagnósticas tanto para la fucosa (δ 4.04–3.97 H₄) como para la glucosa (δ 4.18–4.12 y 4.56–4.40, H₆) (Agrawal, 1992; Bah y Pereda-Miranda, 1996) se encontraron sobrepuestas y por lo tanto no se lograron asignar completamente, denotándose en los espectros como fuc/glu'.

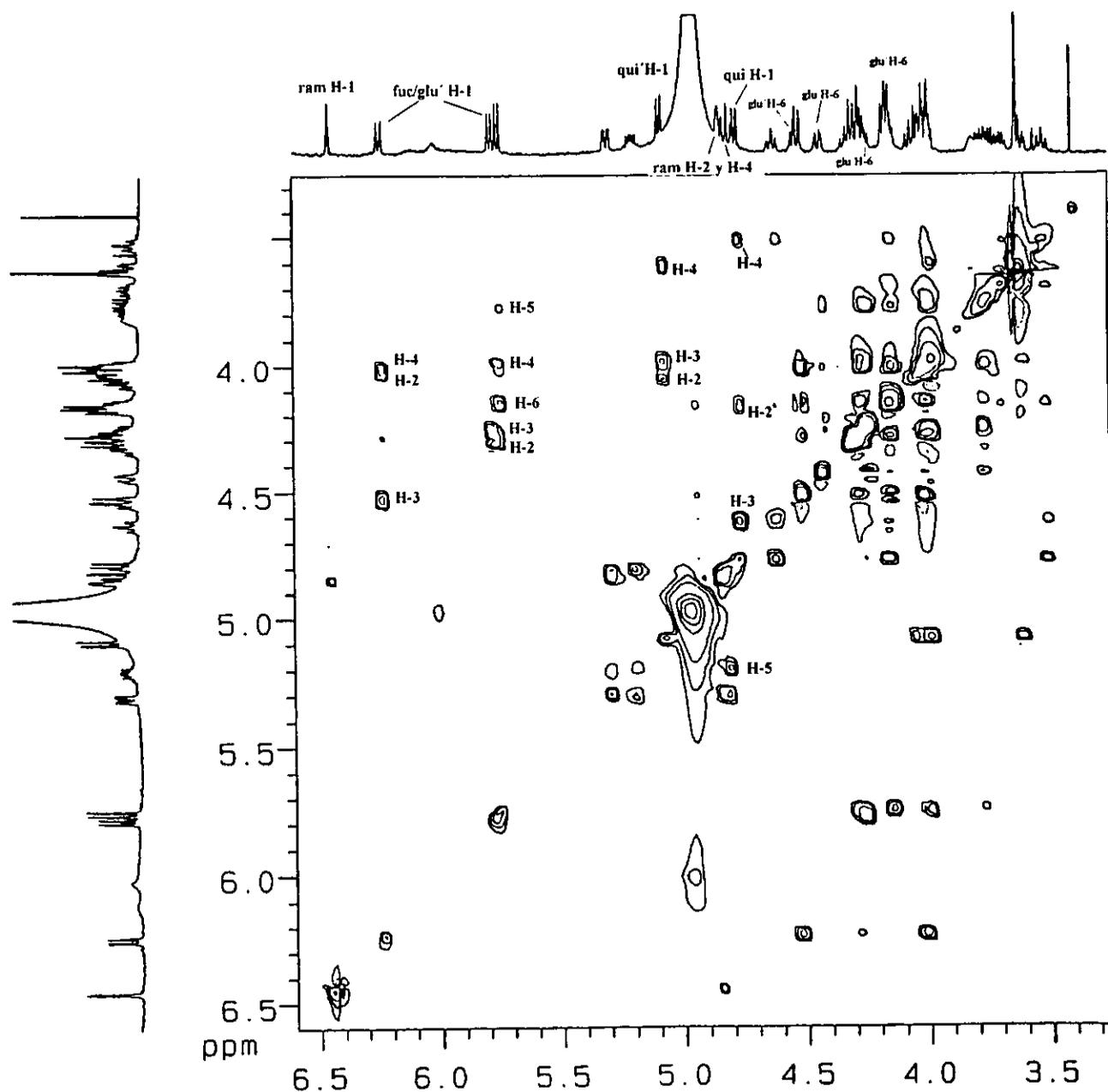


Figura 53. Sección del espectro TOCSY para el núcleo oligosacárido del éster púrgico B (27). Abreviaciones: glu = glucosa, glu' = glucosa externa, qui = quinovosa, qui' = quinovosa externa, fuc = fucosa y ram = ramnosa. 500 MHz, C₅D₅N.

El análisis de los espectros HMQC y HMBC se hizo para lograr la asignación de la mayor parte de las señales de ^{13}C del núcleo oligosacárido e iniciar la determinación de la secuencia de glicosidación desde de las conectividades a larga distancia ($^3J_{\text{C-H}}$) presentes en el espectro HMBC de la figura 54. La conectividad entre la resonancia de H-1 (δ 4.78) de una unidad de quinovosa (qui) con la correspondiente al C-11 (δ 80.10) de la aglicona demostró que esta unidad es el primer azúcar en la secuencia del núcleo oligosacárido.

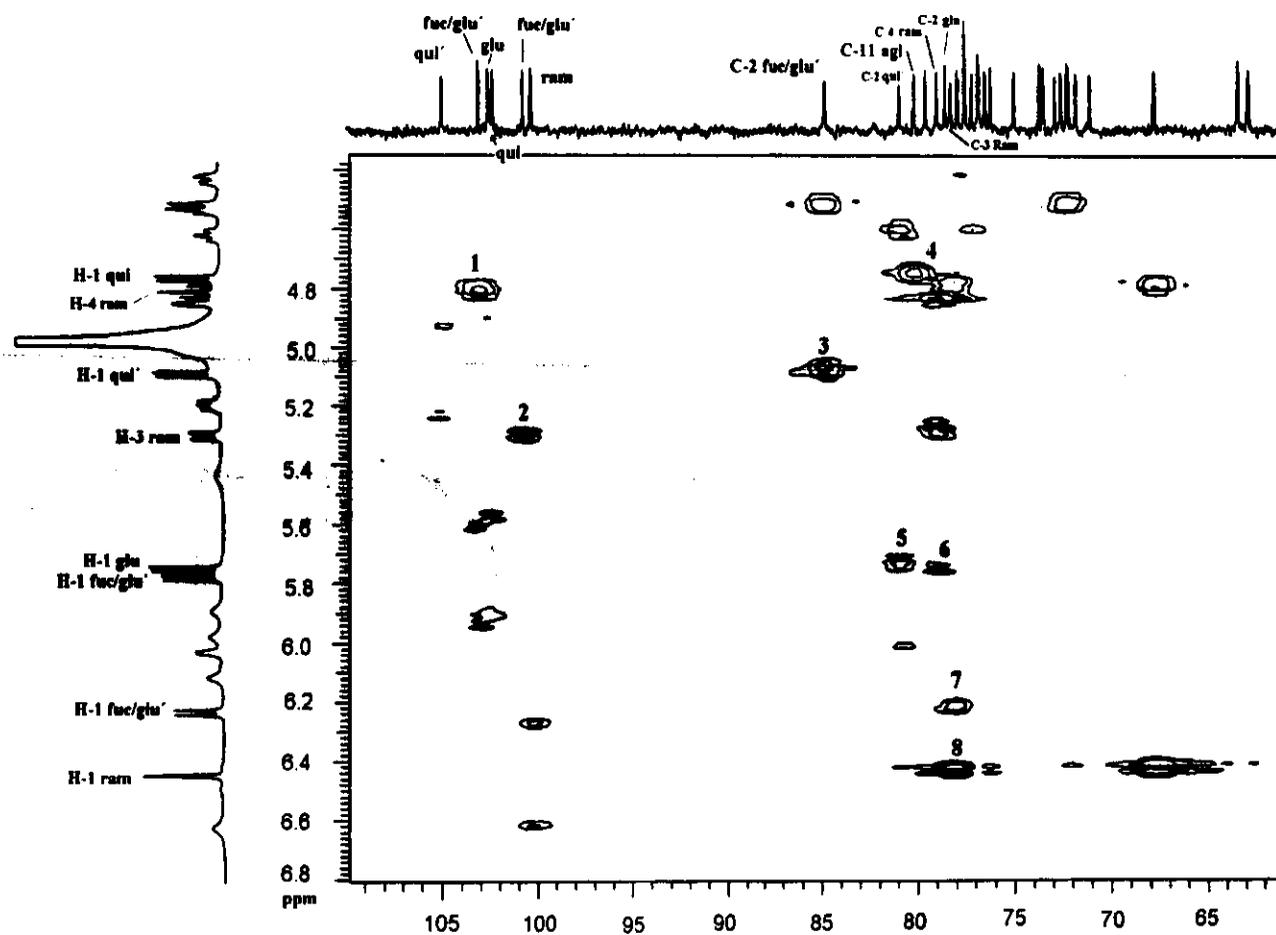


Figura 54. Sección del espectro de HMBC del éster púrgico A (26). Asignaciones: 1, $\text{H}_4\text{ram}-\text{C}_1\text{fuc/glu}'$; 2, $\text{H}_3\text{ram}-\text{C}_1\text{fuc/glu}'$; 3, $\text{H}_1\text{qui}'-\text{C}_2\text{fuc/glu}'$; 4, $\text{H}_1\text{qui}-\text{C}_{11}\text{agl}$; 5, $\text{H}_1\text{glu}-\text{C}_2\text{qui}$; 6, $\text{H}_1\text{fuc/glu}'-\text{C}_4\text{ram}$; 7, $\text{H}_1\text{fuc/glu}''-\text{C}_3\text{ram}$; 8, $\text{H}_1\text{ram}-\text{C}_2\text{glu}$. Abreviaciones: ram = ramnosa, fuc = fucosa, glu = glucosa, glu' = glucosa externa, qui = quinovosa, qui' = quinovosa externa y agl = aglicona.

La correlación observada para el carbono C-2 (δ 80.85) de la quinovosa interna con H-1 (δ 5.75) de una unidad de glucosa (glu) definió a esta como la segunda unidad monosacárida. La secuencia de azúcares se continuó con la ramnosa (ram) debido a la correlación entre la señal de su hidrógeno H-1 (δ 6.45) con el C-2 (δ 77.83) de la glucosa interna (glu). Las correlaciones restantes no permitieron emitir ninguna conclusión adicional relacionada con la estructura del núcleo oligosacárido debido a las asignaciones incompletas para las señales de la unidad de glucosa externa (glu') y la fucosa (fuc). Las conectividades para el resto del oligosacárido se establecieron como sigue: los protones H-3 (δ 5.30) y H-4 (δ 4.81) de la ramnosa con los carbonos C-1 (δ 100.57 y 102.92) de las unidades no identificadas, fucosa o glucosa (fuc/glu). Es decir, la posición en donde se encuentra unida la fucosa podría ser el centro C-3 o C-4 de la ramnosa, conectividad también observada entre la resonancia de H-1 de fuc/glu' (δ 6.23) con las generadas por C-3 (δ 78.18) y C-4 (δ 78.91) de la ramnosa. Estas correlaciones indicaron la naturaleza ramificada de la cadena oligosacárida. Finalmente, la última correlación fue la observada para las señales H-1 (δ 5.09) de la unidad de quinovosa externa (qui') y C-2 (δ 84.72) de una de las unidades no identificadas fuc/glu'. Por lo tanto, la secuencia de glicosidación podría corresponder a cualquiera de las dos posibilidades estructurales ilustradas en la figura 55. Los superíndices indican los carbonos que forman los enlaces glicosídicos en los seis monosacáridos y la aglicona. Por ejemplo, en la estructura 1, el C-1 de la fucosa (fuc₁) está unido con C-4 de la ramnosa (ram₄), además, C-3 (ram₃) y C-1 (ram₁) de este mismo azúcar están formando enlaces glicosídicos con el C-1 de la glucosa externa (glu'₁) y C-2 de la glucosa interna (glu₂) respectivamente.

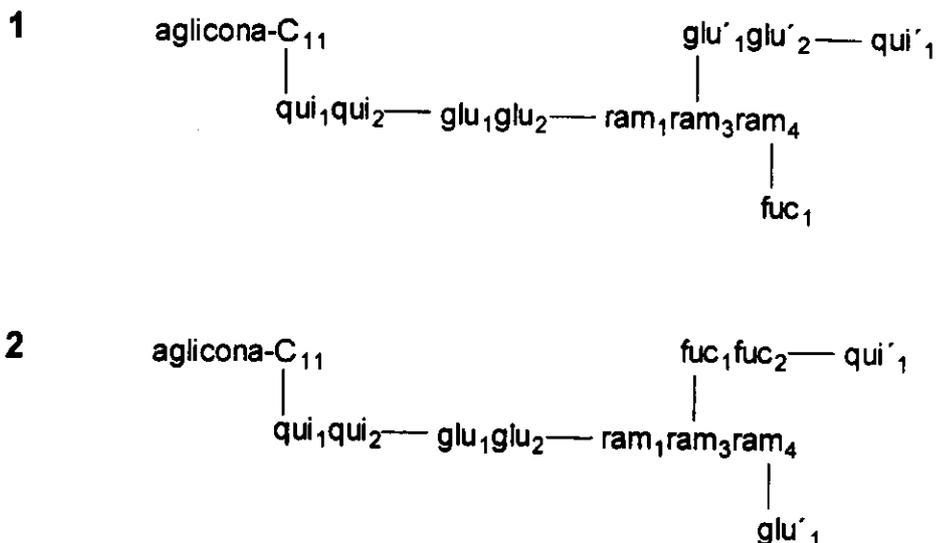


Figura 55. Secuencias probables de glicosidación para el núcleo oligosacárido constitutivo de la convolvulina de *Ipomoea purga*. Abreviaciones: qui = quinovosa, glu = glucosa interna, ram = ramnosa, fuc = fucosa, qui' = quinovosa externa y glu' = glucosa externa.

Una evidencia fundamental para lograr el establecimiento de la estructura de los ésteres púrgicos A (26) y B (27) se obtuvo del análisis de sus datos espectrométricos (FAB). En la figura 56 se presentan los espectros de masas de los compuestos 26 y 27, de los cuales se deduce que los fragmentos de m/z 1193 y 1165 corresponden a los iones pseudomoleculares $[M - H]^-$ debido a las pérdidas lógicas de 146 Daltons ($C_6H_{10}O_4$, metilpentosa) a partir de cada uno de ellos. La diferencia de 28 unidades de masa entre estos iones corroboró la asignación previamente establecida para las agliconas de los ésteres 26 y 27. En el patrón de fragmentación del espectro de masas del éster púrgico B (27) se observaron las pérdidas sucesivas de las unidades monosacáridas provocadas por la ruptura de los enlaces glicosídicos (Dell, 1987): m/z 1047 $[M - H - 146$ (metilpentosa)] $^-$, 885 $[1047 - 162$ (hexosa)] $^-$, 739 $[885 - 147$ (metilpentosa)] $^-$, 593 $[739 - 146$ (metilpentosa)] $^-$, 431 $[593 - 162$ (hexosa)] $^-$ y el ion de m/z 285 que correspondió a la fórmula condensada de la aglicona menos un protón ($C_{17}H_{33}O_3$).

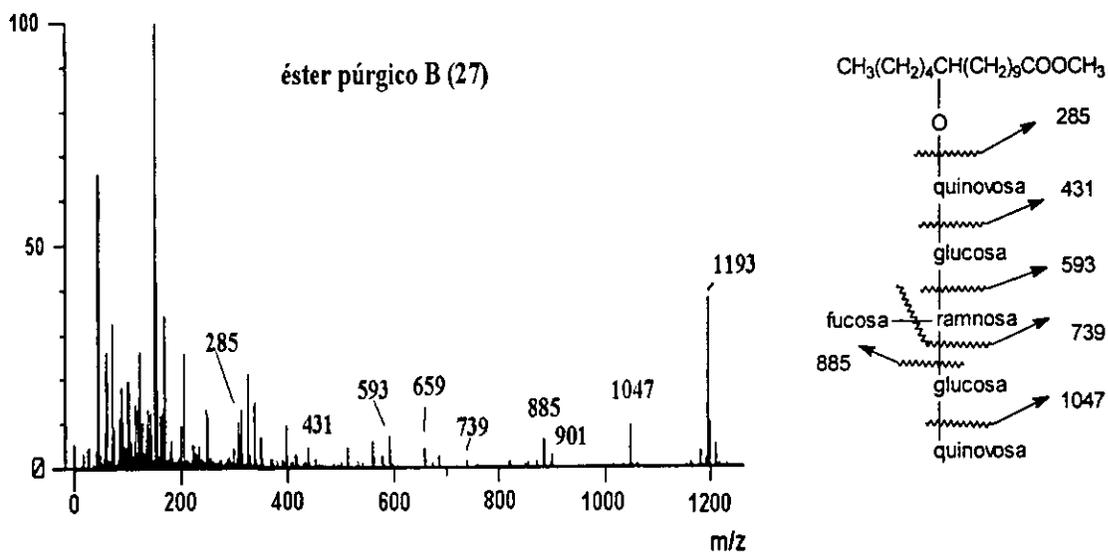
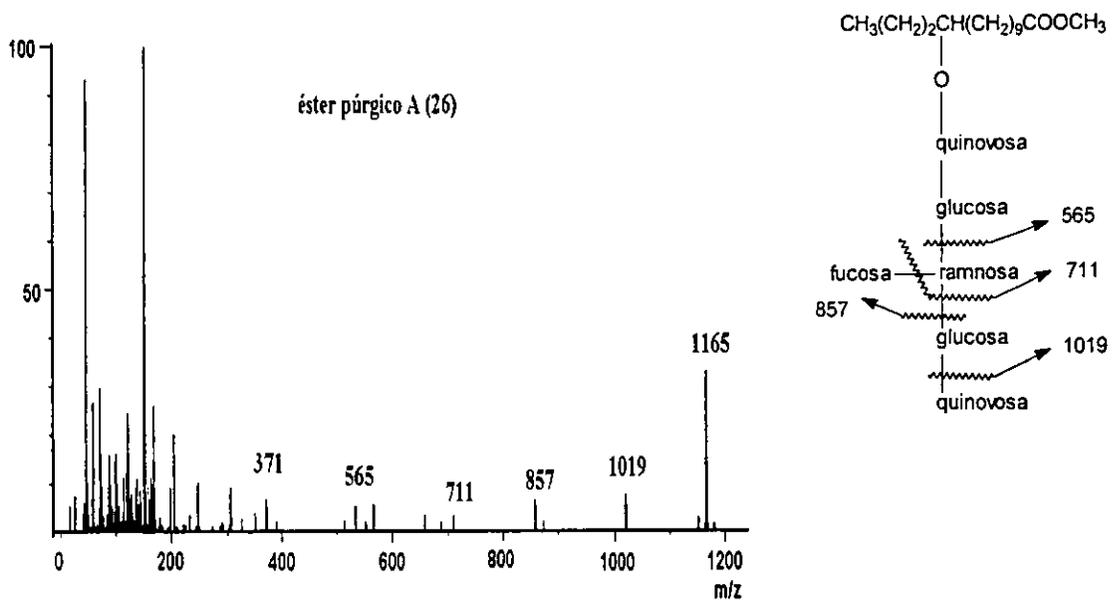


Figura 56. FAB-MS modo negativo y patrón de fragmentación de los ésteres púrgicos A (26) y B(27).

Cuando un oligosacárido es lineal, la secuencia de los azúcares se establece a partir de los incrementos de masa que separan dos iones consecutivos de una serie y por la distribución de las abundancias relativas de los iones; e.g. en el ácido escamónico A (fig. 24), la distribución en forma regular de los fragmentos m/z 725, 579, 417 y 271 refleja las pérdidas consecutivas de cada unidad para una secuencia lineal (Bah y Pereda-Miranda, 1996). Sin embargo, si el oligosacárido está ramificado el espectro de masas muestra una apariencia discontinua en la serie de fragmentos que representan las pérdidas de cada unidad monosacárida (Domon *et al.*, 1994; MacLeod y Ward, 1997; Ono *et al.*, 1992b; Wolfender *et al.*, 1992). En la figura 56 se observa la serie de fragmentos originados por la pérdida de cuatro unidades monosacáridas en el ácido púrgico A (26) y de seis en el compuesto 27 y la abundancia de los iones m/z de 711 para 26 y de 739 para 27 establecieron que la posición de ramificación en las cadenas oligosacáridas de estos dos compuestos esta en la ramnosa (fig. 56). Esta suposición se corroboró en el compuesto 27 por la presencia de los fragmentos de m/z 901 y 885 que se originarían a partir del ion pseudomolecular m/z de 1193 por la pérdida de dos unidades de metilpentosas [$1193 - H - 146 - 146$]⁻ y una metilpentosa junto con una hexosa [$1193 - H - 146 - 162$]⁻ respectivamente y, por lo tanto, la posición de la ramificación corresponde a la tercera unidad (ramnosa) del núcleo oligosacárido. Esta situación también ocurre en el éster púrgico A (26) (fig. 56) donde existen dos posibles alternativas para la fragmentación del ion pseudomolecular [$M - H$]⁻ (m/z 1165) con la formación de los iones de m/z 873 [$M - H - 146 - 146$]⁻ y 857 [$M - H - 146 - 162$]⁻. De lo anterior, quedó establecido que la

unidad de glucosa externa (glu') no ocupaba una posición terminal y la secuencia de glicosidación debería corresponder a la indicada con el número uno en la figura 55.

En el compuesto **27** existe un ion de m/z 659 en mayor proporción que el de m/z 739 $[M-146-162-146]^-$ que refleja pérdidas diferentes a las de una unidad monosacárida (146 o 162) y debe corresponder a las generadas por rupturas en los anillos piranósidos. Este tipo de fragmentaciones en algunos disacáridos determina el tipo de uniones glicosídicas (Garozzo *et al.*, 1990; Reinhold *et al.*, 1995), pero en carbohidratos con un mayor número de unidades, las rupturas en los anillos piranósidos no se consideran como señales diagnósticas para la elucidación estructural debido a la complejidad en el número de posibilidades que existen en las rupturas α a los enlaces glicosídicos dentro del anillo (Dell, 1987).

El establecimiento de la secuencia de glicosidación de los ésteres púrgicos A (**26**) y B (**27**) discutida en párrafos anteriores facilitó la asignación completa de las señales de ^1H y ^{13}C (ver cuadros 16, 17 y 18) como se discute posteriormente. Así, partiendo del hecho de que la secuencia de los monosacáridos es la mostrada en la figura 55 (secuencia 1) en donde la ramnosa tiene en sus posiciones C-3 y C-4 a los monosacáridos glucosa externa y fucosa, respectivamente, las conectividades en el espectro HMBC de la fig. 54 que restaban por asignarse para determinar los sitios de unión de la ramnosa con las unidades de fucosa y glucosa externa fueron: la correlación entre las señales de protón H-4 (δ 4.81) y H-3 (δ 78.18) de la ramnosa con las de los centros C-1 (δ 102.92) de la fucosa y C-1 (δ 100.57) de la glucosa externa, respectivamente, las señales de los carbonos C-3 (δ 78.18) y C-4 (δ 78.91) de la ramnosa con las señales de los protones H-1 de la glucosa

externa (δ 6.23) y H-1 de la fucosa (δ 5.78), respectivamente, y por último la correlación que determinó la secuencia glucosa externa-quinovosa externa entre el protón H-1 (δ 5.09) de esta última con el carbono C-2 (δ 84.72) de la primera. De esta forma, se completó la asignación de las correlaciones $^3J_{C-H}$ en el espectro HMBC que sustentan la secuencia de glicosidación mostrada en la siguiente figura:

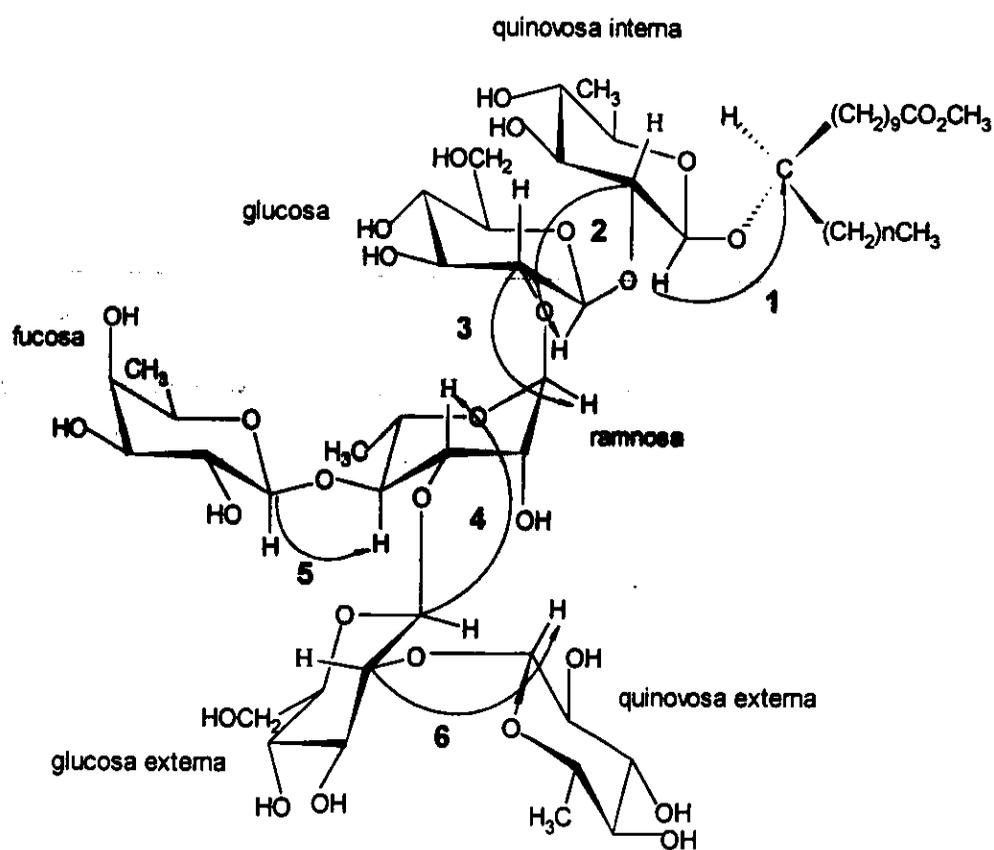


Figura 57. Correlaciones $^3J_{C-H}$ observadas en el espectro HMBC del éster púrgico B (27, $n = 4$). 1; H₁qui-C₁₁agl; 2, H₂qui-H₁glu; 3, H₁ram-C₂glu; 4, H₃ram-C₁glu'; 5, H₄ram-C₁fuc y 6, H₁qui'-C₂glu'.

La identificación de las señales centradas en δ 6.33 y 5.78 como las correspondientes a los H-1 de la glucosa externa (glu') y fucosa (fuc) respectivamente, permitió la asignación completa de las señales restantes para estas dos unidades sacáridas. Como se aprecia en el cuadro 16, para las unidades de glucosa interna (glu), glucosa externa (glu') y fucosa (fuc) no se determinó un desplazamiento exacto para sus señales de hidrógeno debido a la sobreposición de las mismas y, por lo tanto, la asignación de las resonancias de carbono se hizo a partir de los espectros HMQC y HMBC tal como se describe a continuación.

En el espectro HMQC (fig. 58) del compuesto **26**, no fue posible asignar las señales de los carbonos C-2 y C-4 de la glucosa externa a partir de las señales de hidrógeno correspondientes (H-2 y H-4) debido a que se localizaron sobrepuestas en el intervalo de desplazamientos de δ 4.05–3.97. Por lo tanto, existen por lo menos cuatro posibilidades (δ 84.72, 77.45, 72.84 y 72.20) para asignar las resonancia de los carbonos C-2 y C-4. En el caso del centro que está formando un enlace glicosídico (C-2) su señal se debe encontrar desplazada paramagnéticamente (Agrawal y Pathak 1996) y podría corresponder al valor de δ 84.72. Para sustentar esta deducción, se analizaron las conectividades existentes entre los núcleos de carbono e hidrógeno ($^2J_{C-H}$) en los espectros HMBC de la misma unidad monosacárida.

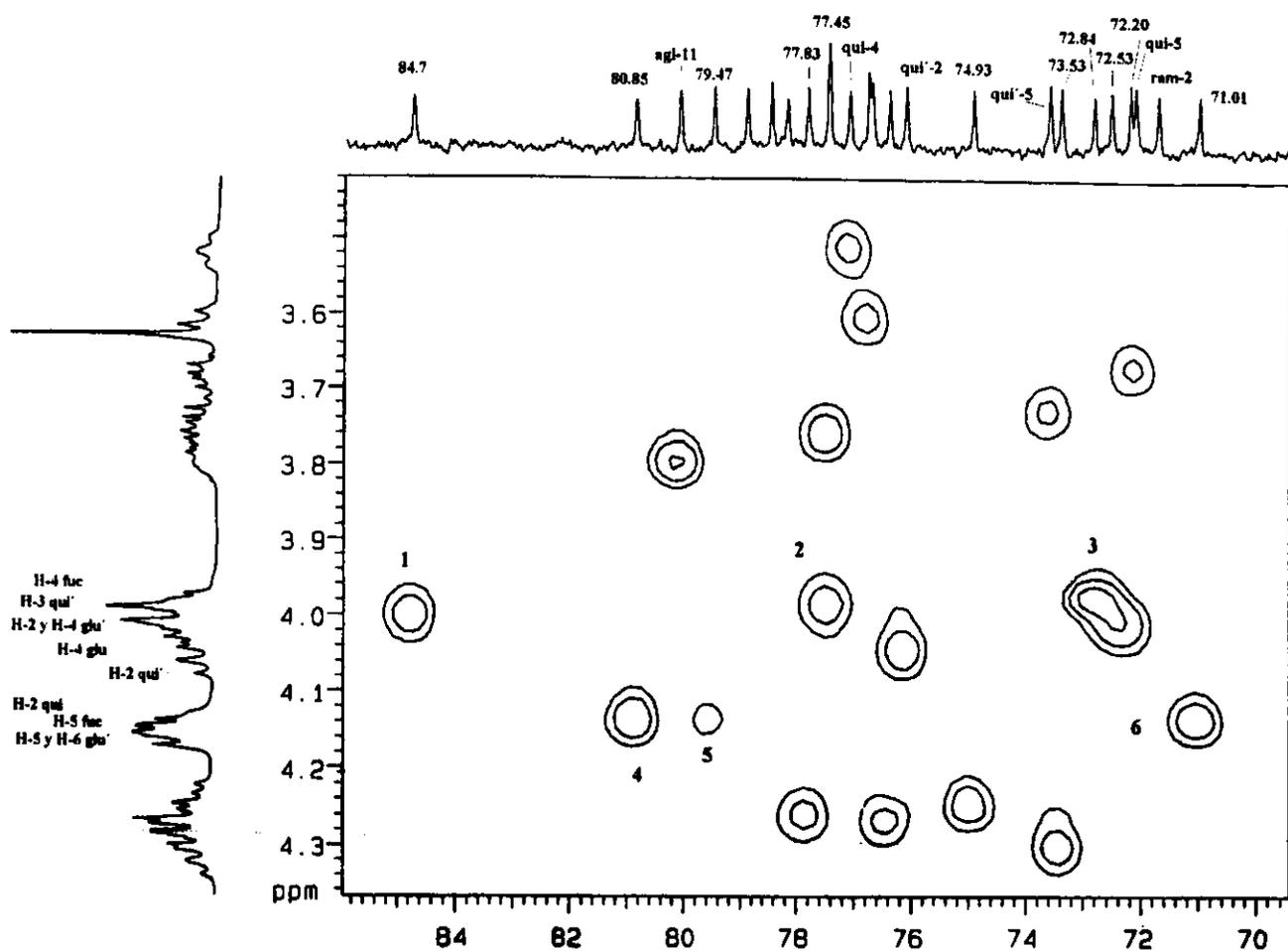


Figura 58. Sección del espectro HMQC del éster purgativo A (26). Asignación de las resonancias de ^{13}C . Asignaciones: 1, 2 y 3; $\text{C}_2\text{glu}'/\text{C}_4\text{glu}'/\text{C}_3\text{glu}'/\text{C}_4\text{fuc}/\text{C}_3\text{qui}'$, 4, 5 y 6; $\text{C}_2\text{qui}/\text{C}_5\text{fuc}/\text{C}_5\text{glu}'$. Abreviaciones: glu' = glucosa externa, fuc = fucosa, qui' = quinovosa externa y qui = quinovosa interna. 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

El espectro HMBC (fig. 59) presentó una correlación entre la resonancia en δ 84.72 con la del H-3 (δ 4.52) de la glucosa externa y esta última con otra señal de carbono en δ 72.20 que debe ser la debida al C-4 de la misma unidad. De lo anterior, se puede concluir que la resonancia en δ 84.72 corresponde al centro C-2 y la de δ 72.20 al C-4 de la glucosa externa (glu').

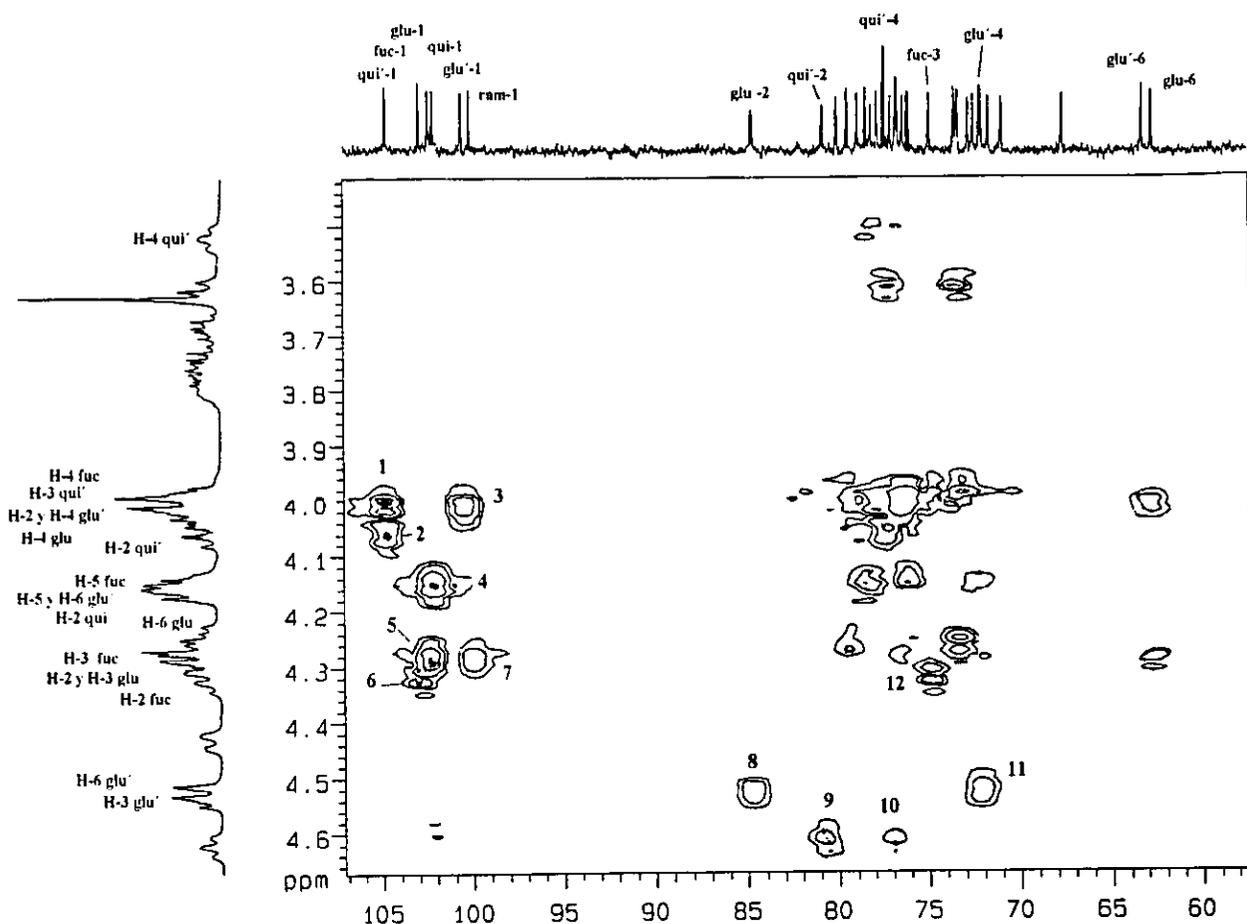


Figura 59. Sección del espectro HMBC del éster purgativo A (**26**) y asignación de centros de ^{13}C . Conectividades: 1; $\text{H}_2\text{glu}'\text{-C}_1\text{qui}'$, 2; $\text{H}_2\text{qui}'\text{-C}_1\text{qui}'$, 3; $\text{H}_1\text{glu}'\text{-C}_1\text{glu}'$, 4; $\text{H}_2\text{qui}\text{-C}_1\text{glu}$, 5; $\text{H}_2\text{glu}\text{-C}_1\text{glu}$, 6; $\text{H}_2\text{fuc}\text{-C}_1\text{fuc}$, 7; $\text{H}_2\text{glu}\text{-C}_1\text{ram}$, 8; $\text{H}_3\text{glu}'\text{-C}_2\text{glu}'$, 9; $\text{H}_3\text{qui}\text{-C}_2\text{qui}$, 10; $\text{H}_3\text{qui}\text{-C}_4\text{qui}$, 11; $\text{H}_3\text{glu}'\text{-C}_4\text{glu}'$, 12; $\text{H}_2\text{fuc}\text{-C}_3\text{fuc}$. 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

Un ejemplo adicional del procedimiento antes descrito para la asignación de las señales de ^{13}C con ayuda del espectro HMBC es la asignación de los núcleos de la unidad de fucosa. La señal C-3 se asignó a partir de la correlación observada en el espectro HMBC de la figura 59, donde la señal del carbono anomérico C-1 (δ 102.92) de la fucosa permitió determinar el desplazamiento químico del H-2 (δ 4.35–4.23) de esta unidad y esta señal presentó una conectividad con la de δ 74.93 que correspondió al C-3 (δ 74.93)

de la fucosa. Las resonancias de los núcleos restantes se asignaron utilizando el espectro HMBC de la figura 60, la señal del H-6 (δ 1.54) de la fucosa presentó conectividades ($^{2,3}J_{C-H}$) con las resonancias centradas en δ 72.82 y 71.01 y que corresponden a los carbonos C-4 y C-5 respectivamente.

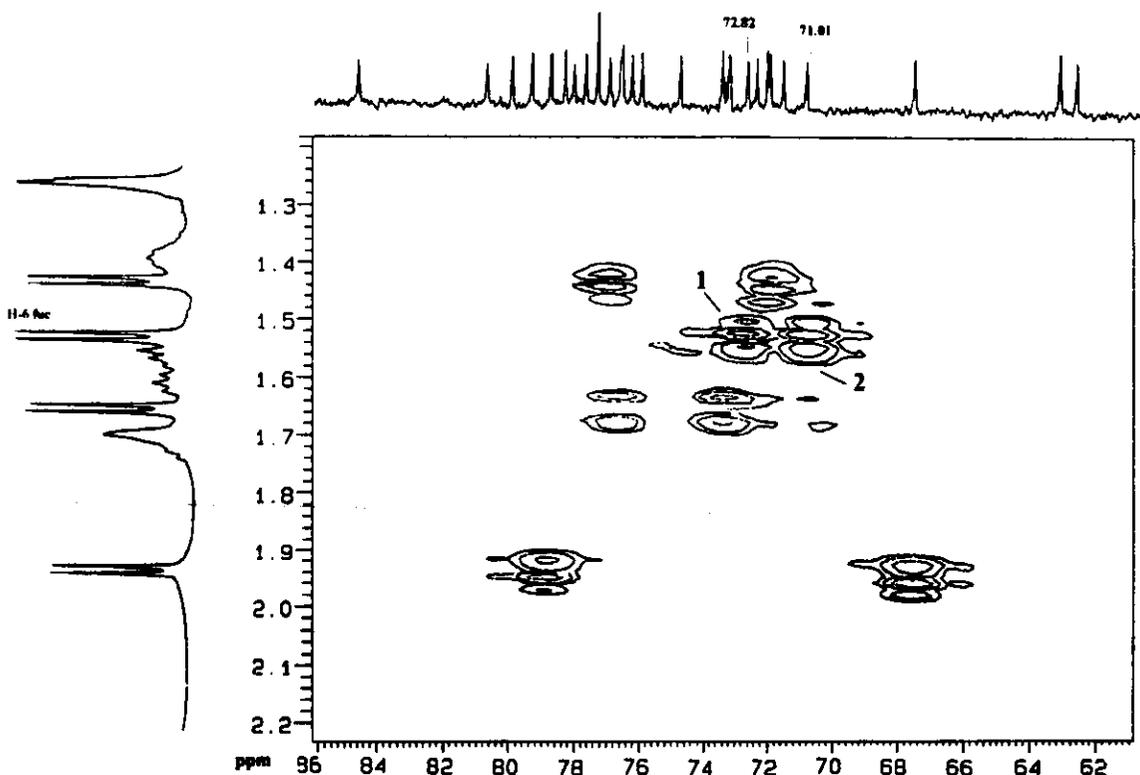


Figura 60. Sección del espectro HMBC para la asignación de los carbonos C-4 y C-5 de la fucosa. Conectividades: 1; H₆fuc-C₄fuc y 2; H₆fuc-C₅fuc. 500 MHz, C₅D₅N.

Como parte complementaria al análisis espectroscópico efectuado para la determinación de la estructura de los ésteres púrgicos A (26) y B (27) en la figura 61 se presentan los efectos nucleares Overhauser con el objetivo de confirmar la secuencia de glicosidación descrita en la figura 57 (Agrawal y Pathak, 1996; Bah y Pereda-Miranda, 1996).

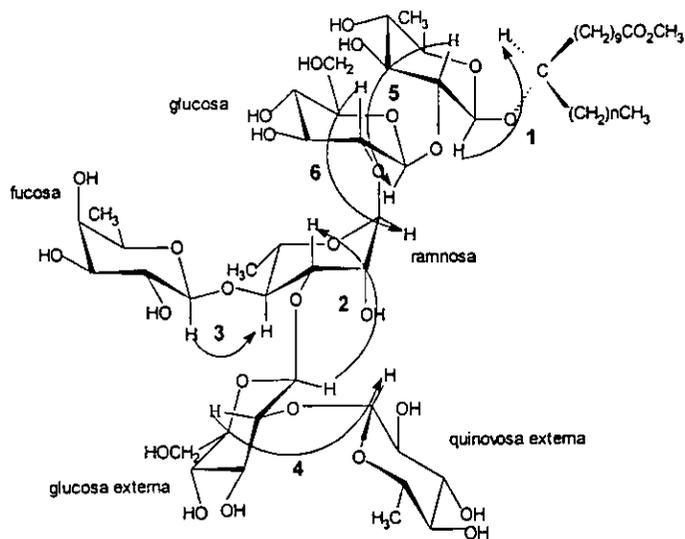
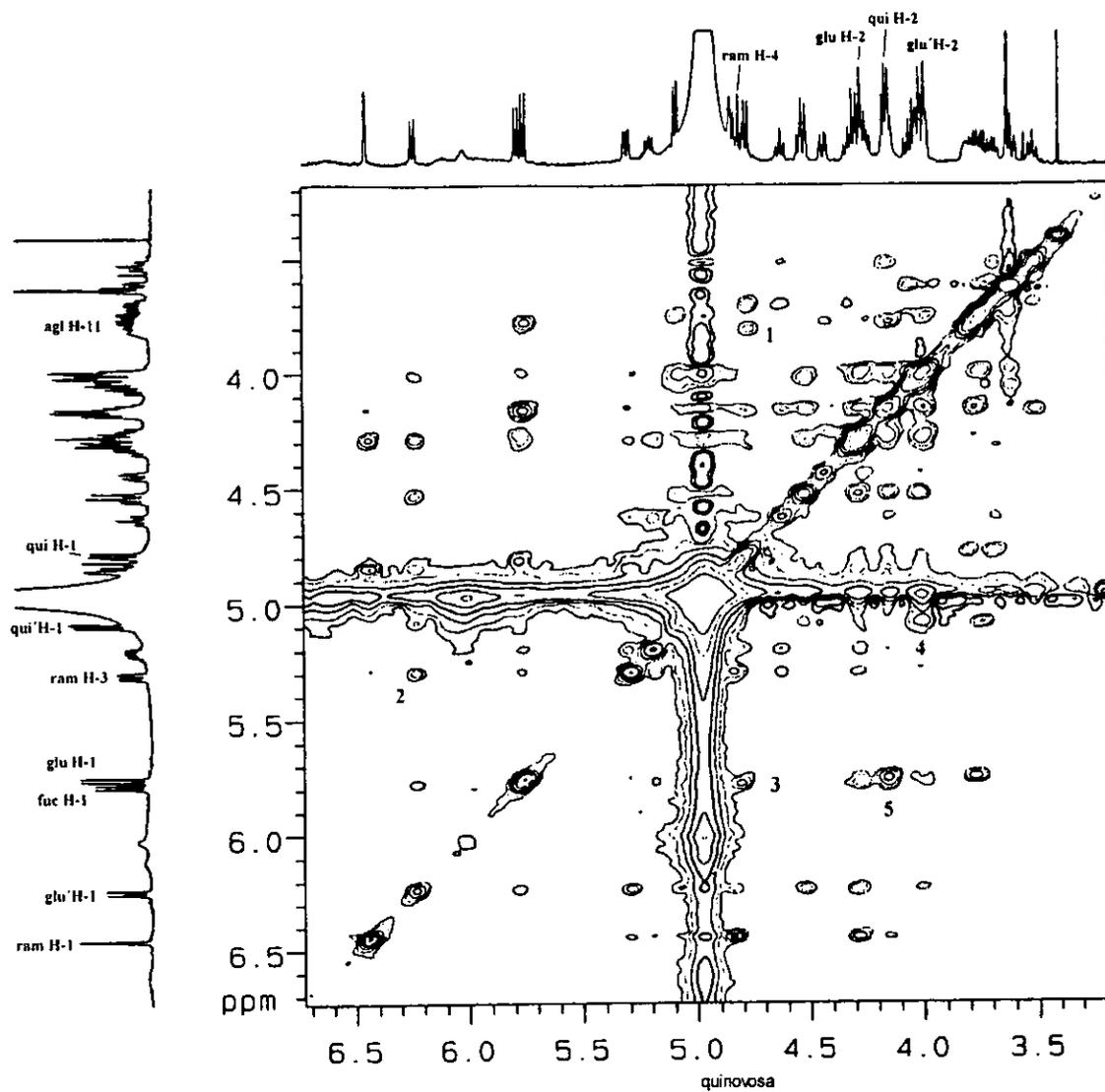


Figura 61. NOESY y correlaciones observadas del éster purgico B (27) ($n = 4$). Correlaciones: 1; $H_{11}agl-H_1qui$, 2; H_3ram-H_1glu' , 3; H_1fuc-H_4ram , 4; $H_2glu'-H_1qui'$, 5; H_1glu-H_2qui y 6; H_1ram-H_2glu . 500 MHz, C_5D_5N .

Cuadro 16. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H para los ésters púrgicos A (26), B (27) y sus correspondientes derivados peracetilados (29 y 30)^a.

| Protón ^b | 26 | 27 | 29 | 30 |
|---------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|---------------------------|
| Qui-1 | 4.78 d (7.5) | 4.76 d (7.5) | 4.71 d (7.5) | 4.65 d (7.5) |
| 2 | 4.18 - 4.12* | 4.18 - 4.12 * | 4.22 dd (9.5, 7.5) | 4.14 dd (8.0, 8.0) |
| 3 | 4.63 dd (9.0, 9.0) | 4.62 dd (8.0, 8.0) | 5.78 dd (9.5, 9.5) | 5.54 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 3.52 dd (9.0, 9.0) | 3.52 dd (8.5, 8.5) | 5.07 dd (9.5, 9.5) | 5.02 dd (9.5) |
| 5 | 3.70 dq (9.0, 6.5) | 3.68 dq (9.0, 6.0) | 4.13 dq (9.5, 6.0) | 4.01 dq (6.0, 9.4) |
| 6 | 1.45 d (6.5) | 1.44 d (6.0) | 1.34 d (6.0) | 1.27 d (6.15) |
| Glu-1 | 5.75 d (8.0) | 5.74 d (7.5) | 5.12 d (8.0) | 5.06 d (8.0) |
| 2 | 4.35 - 4.23* | 4.32 - 4.24 * | 4.22 dd (9.5, 8.0) | 4.14 dd (8.0, 8.0) |
| 3 | 4.35 - 4.23 * | 4.32 - 4.24 * | 5.67 dd (10.0, 9.5) | 5.62 dd (9.0, 9.0) |
| 4 | 4.05 - 3.97* | 4.04 - 3.97 * | 5.33 dd (10.0, 10.0) | 5.28 dd (9.8, 9.8) |
| 5 | 3.80 - 3.74 * | 3.80 - 3.74 * | 4.09 ddd (10.0, 5.0, 3.0) | 4.00 ddd (10.0, 6.0, 3.0) |
| 6a | 4.44 dd (11.0, 3.0) | 4.43 dd (12.0, 2.5) | 4.64 - 4.58* | 4.60 - 4.55* |
| 6b | 4.25 dd (11.0, 6.0) | 4.24 dd (12.0, 5.5) | 4.35 - 4.26* | 4.25 - 4.21* |
| Ram-1 | 6.45 d (1.5) | 6.44 d (2.0) | 5.45 d (1.5) | 5.40 ** |
| 2 | 4.85 dd (1.5, 3.0) | 4.85 ** | 5.66 * | 5.61 * |
| 3 | 5.30 dd (3.0, 9.5) | 5.30 dd (9.5, 3.0) | 4.60 dd (3.4, 9.0) | 4.60 - 4.55* |
| 4 | 4.81 dd (10.0, 9.5) | 4.88 (9.5, 9.5) | 4.35 - 4.26 * | 4.30 - 4.21* |
| 5 | 5.20 dq (10.0, 6.0) | 5.19 dq (9.5, 6.0) | 4.55 - 4.50* | 4.50 - 4.45* |
| 6 | 1.95 d (6.0) | 1.94 d (6.0) | 1.85 d (6.5) | 1.78 d (6.0) |
| Glc'-1 | 6.23 d (7.5) | 6.23 d (7.5) | 5.45 * | 5.41 - 5.40* |
| 2 | 4.09 - 3.97 * | 4.04 - 3.97* | 4.24 dd (8.5, 7.5) | 4.17 dd (8.3, 8.3) |
| 3 | 4.52 dd (9.0, 9.0) | 4.53 dd (8.5, 8.5) | 5.57 dd (9.0, 8.5) | 5.52 dd (8.6, 8.6) |
| 4 | 4.05 - 3.97* | 4.04 - 3.97* | 5.29 dd (9.0, 9.0) | 5.24 dd (9.5, 9.5) |
| 5 | 4.18 - 4.12 * | 4.18 - 4.12* | 4.35 - 4.26 * | 4.30 - 4.21* |
| 6a | 4.56 - 4.50 * | 4.55 - 4.50* | 4.55 - 4.50 * | 4.50 - 4.45* |
| 6b | 4.18 - 4.12 * | 4.18 - 4.12* | 4.39 dd (11.7, 2.0) | 4.34 dd (12.0, 2.0) |
| Qui'-1 | 5.09 d (8.0) | 5.09 d (8.0) | 5.24 d (8.25) | 5.18 d (8.3) |
| 2 | 4.06 dd (9.0, 8.0) | 4.06 dd (9.0, 8.0) | 5.50 dd (9.0, 8.25) | 5.48 dd (9.0, 9.0) |
| 3 | 4.04 - 3.97 * | 4.04 - 4.00* | 5.66 dd (10.0, 9.0) | 5.61 (9.5, 9.5) |
| 4 | 3.61 dd (9.5, 9.5) | 3.62 dd (9.5, 9.0) | 5.46 dd (10.0, 9.5) | 5.42 dd (9.4, 9.4) |
| 5 | 3.74 dq (9.5, 6.5) | 3.74 dq (9.5, 6.0) | 3.96 dq (9.5, 6.0) | 3.91 dq (9.5, 6.0) |
| 6 | 1.66 d (6.5) | 1.66 d (6.0) | 1.44 d (6.0) | 1.38 d (6.0) |
| Fuc-1 | 5.78 d (7.5) | 5.77 d (7.5) | 5.59 d (8.0) | 5.53 d (8.0) |
| 2 | 4.35 - 4.23 * | 4.32 dd (9.0, 7.5) | 5.80 dd (10.0, 8.0) | 5.73 dd (10.0, 8.0) |
| 3 | 4.35 - 4.23 * | 4.32 - 4.24* | 5.59 dd (10.0, 3.0) | 5.54 dd (10.0, 3.3) |
| 4 | 4.04 - 3.97 * | 4.04 - 3.97* | 5.90 d (3.0) | 5.83 d (3.3) |
| 5 | 4.18 - 4.12 * | 4.18 - 4.12* | 4.35 - 4.26 * | 4.30 - 4.21* |
| 6 | 1.54 d (6.0) | 1.53 d (6.5) | 1.33 d (7.0) | 1.33 d (6.0) |
| Jal-2 | | 2.32 t (8.0) | | 2.24 t (7.5) |
| 11 | | 3.80 m | | 3.62 m |
| 14 | | 0.91 t (7.0) | | 0.90 t (7.0) |
| Con-2 | 2.32 t (7.0) | | 2.34 t (7.4) | |
| 11 | 3.81 m | | 3.65 m | |
| 16 | 0.86 t (7.0) | | 0.89 t (7.2) | |
| MeO | 3.40 s | 3.63 s | 3.56 s | 3.56 s |

^a ^b Ver cuadro 2.

Fuc = fucosa, Con = 11-hidroxi-tetradecanoilo.

** Se observa como señal simple

Cuadro 17. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C para la porción oligosacárida de los ésteres púrgicos A (26), B (27) y sus correspondientes derivados peracetilados (29 y 30)^a.

| Carbon ^b | 26 | 27 | 29 | 30 |
|---------------------|--------|--------|--------|--------|
| Qui-1 | 102.15 | 102.36 | 100.93 | 100.89 |
| 2 | 80.85 | 80.80 | 77.09 | 76.91 |
| 3 | 78.47 | 78.43 | 75.78 | 76.02 |
| 4 | 77.08 | 77.08 | 74.46 | 74.24 |
| 5 | 72.12 | 72.18 | 69.38 | 69.17 |
| 6 | 18.25 | 18.25 | 17.96 | 17.73 |
| Glu-1 | 102.40 | 102.29 | 101.33 | 101.14 |
| 2 | 77.83 | 77.81 | 72.70 | 72.57 |
| 3 | 76.40 | 76.39 | 76.24 | 76.02 |
| 4 | 72.53 | 72.53 | 70.00 | 69.83 |
| 5 | 77.45 | 77.50 | 72.40 | 72.22 |
| 6 | 62.81 | 62.81 | 63.39 | 63.17 |
| Ram-1 | 100.14 | 100.14 | 97.41 | 97.28 |
| 2 | 71.73 | 71.77 | 73.85* | 73.79* |
| 3 | 78.18 | 78.18 | 78.63 | 78.40 |
| 4 | 78.91 | 78.93 | 77.10 | 76.91 |
| 5 | 67.69 | 67.69 | 67.81 | 67.63 |
| 6 | 18.97 | 18.98 | 19.20 | 18.96 |
| Glu'-1 | 100.57 | 100.57 | 102.50 | 102.31 |
| 2 | 84.72 | 84.76 | 78.41 | 78.22 |
| 3 | 76.77 | 76.70 | 75.78 | 75.57 |
| 4 | 72.20 | 72.28 | 70.02 | 69.83 |
| 5 | 79.48 | 79.49 | 69.58 | 69.67 |
| 6 | 63.32 | 63.32 | 62.77 | 62.55 |
| Qui'-1 | 104.76 | 104.80 | 101.73 | 101.52 |
| 2 | 76.11 | 76.12 | 72.24 | 72.08 |
| 3 | 77.45 | 77.44 | 73.97* | 73.65* |
| 4 | 76.77 | 76.77 | 74.21 | 74.01 |
| 5 | 73.60 | 73.66 | 71.21 | 70.99 |
| 6 | 18.56 | 18.56 | 18.18 | 17.94 |
| Fuc-1 | 102.92 | 102.91 | 101.11 | 100.94 |
| 2 | 73.40 | 73.47 | 69.64 | 69.44 |
| 3 | 74.93 | 75.00 | 72.70 | 72.49 |
| 4 | 72.82 | 72.88 | 71.21 | 70.99 |
| 5 | 71.01 | 71.08 | 71.67 | 69.38 |
| 6 | 16.94 | 16.95 | 16.31 | 16.09 |

^ay ^b Ver cuadro 3, *señales que pueden estar intercambiadas.

Fuc = fucosa.

Cuadro 18. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C para la aglicona de los ésteres púrgicos A (**26**), B (**27**) y sus correspondientes derivados peracetilados (**29** y **30**)^a.

| Carbon ^b | 26 | 27 | 29 | 30 |
|---------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Con-1 | 173.99 | | 174 | |
| 2 | 34.14 | | 34.34 | |
| 11 | 80.10 | | 80.75 | |
| 14 | 14.35 | | 14.65 | |
| Jal-1 | | 173.99 | | 173.38 |
| 2 | | 34.12 | | 34.13 |
| 11 | | 80.49 | | 81.00 |
| 16 | | 14.20 | | 14.24 |
| CH ₃ O | 51.17 | 51.16 | 51.38 | 51.19 |

^a y ^b Ver cuadro 3, *señales que pueden estar intercambiadas.

Fuc = fucosa, Con = 11-hidroxitetradecanoilo.

El análisis de los espectros de RMN de los derivados peracetilados **29** y **30** que fueron preparados a partir de los ésteres **26** y **27**, así como la del artefacto del éster púrgico A (**28**), cuya elucidación estructural se discutirá posteriormente, proporcionó evidencias adicionales que confirmaron la secuencia de glicosidación propuesta. A continuación se presentan dichos argumentos.

En las figuras 62 y 63 se ilustran los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los derivados **29** y **30**, observándose la gran similitud entre los mismos en la región sacárida (δ_{H} 3–6.0 y δ_{H} 60–82). Los espectros bidimensionales COSY, TOCSY, HMQC y HMBC mostraron las mismas correlaciones y, por lo tanto, sólo se presentan los correspondientes a uno de los derivados (**29** ó **30**).

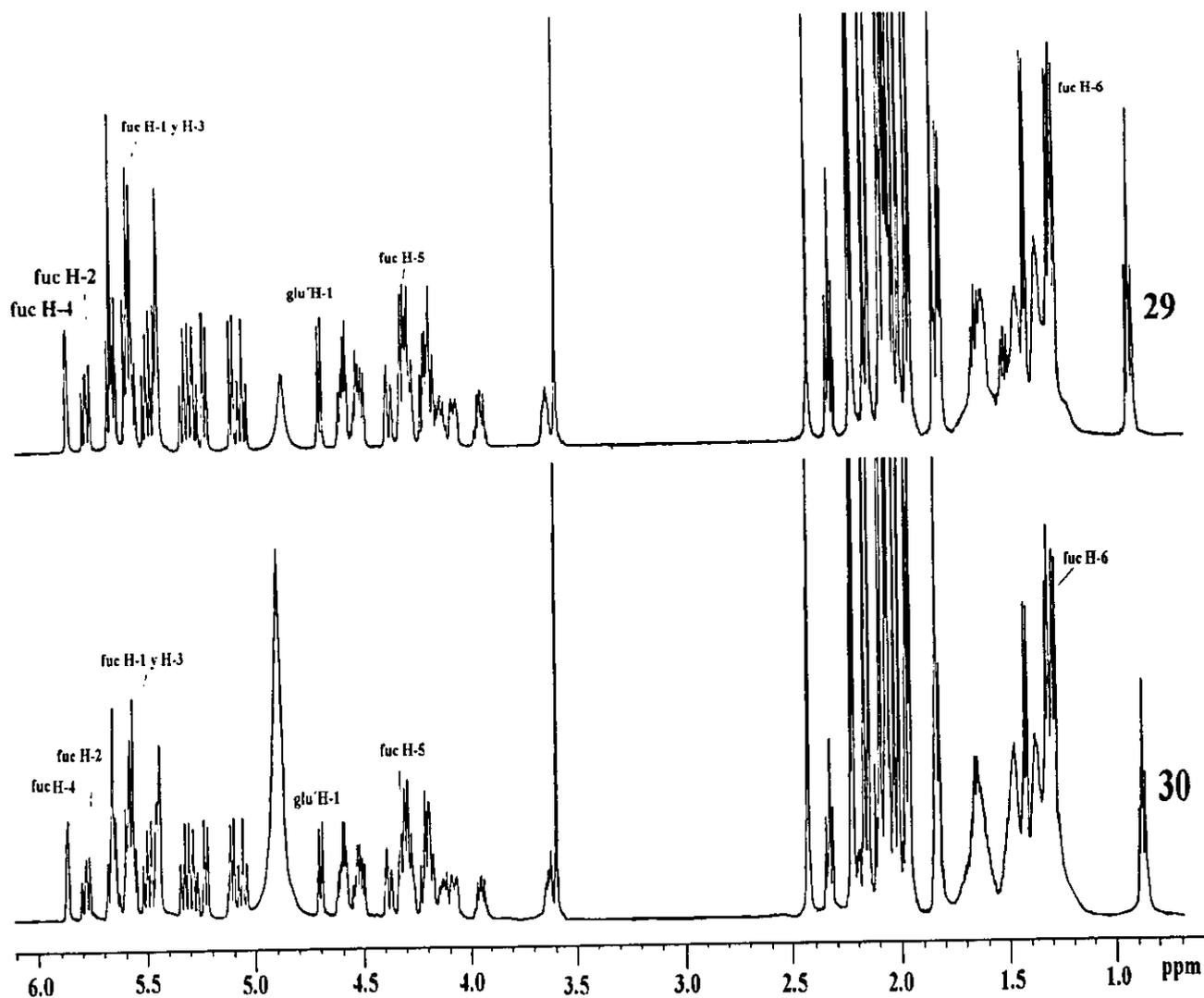


Figura 62. Espectros de RMN ^1H de los derivados peracetilados de los ésteres púrgicos A (29) (superior) y B (30) (inferior). 500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$.

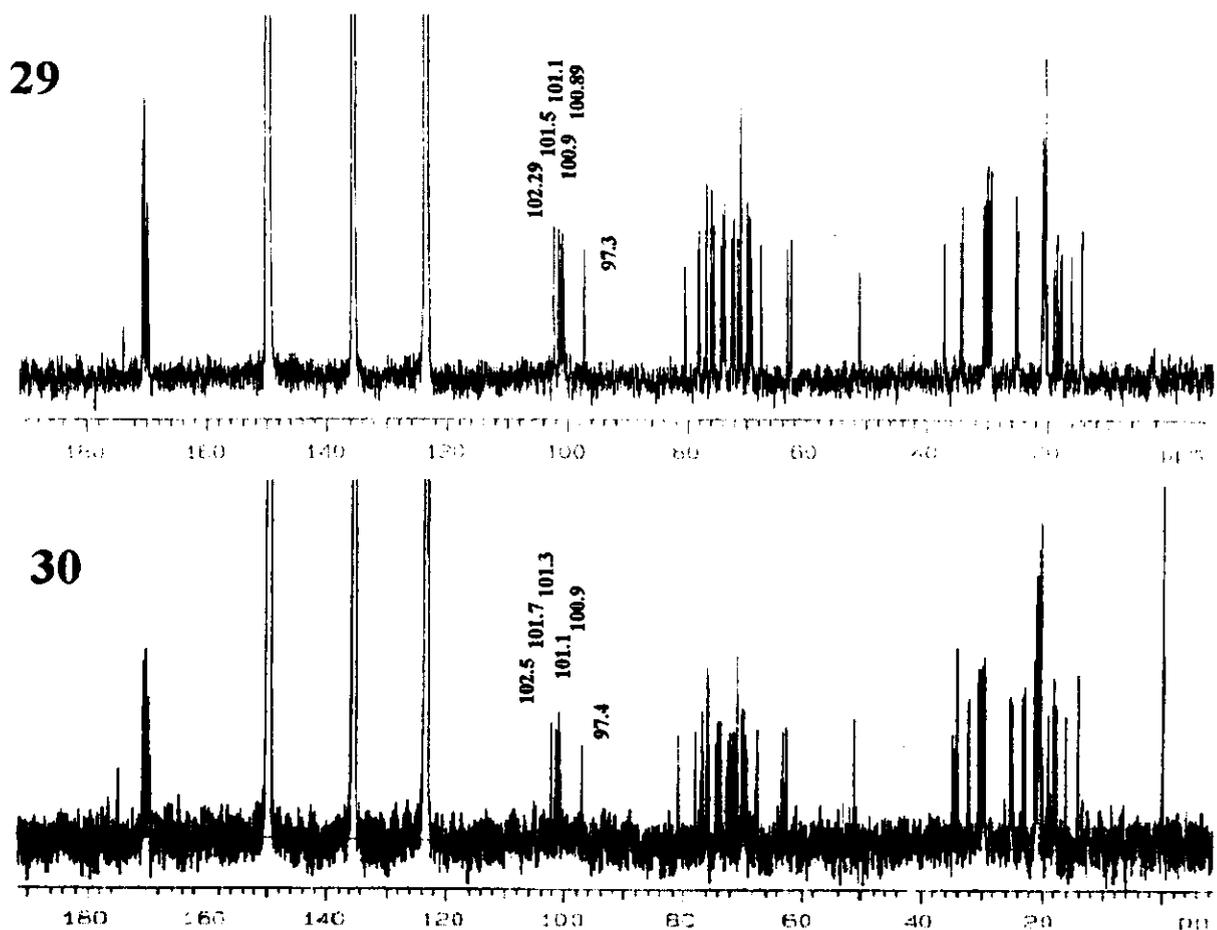


Figura 63. Espectros de RMN ^{13}C de los derivados peracetilados de los ésteres púrgicos A (29) y B (30).

El análisis de los espectros COSY de ambos derivados permitió la asignación completa de las resonancias protónicas. Así en el correspondiente al compuesto 29 (fig. 64) se identificó la fucosa de la siguiente observación: la señal doble de una unidad de metilpentosa desplazada hacia campo bajo (δ 5.90) correspondiente a H-4 mostró un acoplamiento con H-3 (δ 5.54) de $^3J_{\text{H-H}} = 3.0$ Hz (Bah y Pereda-Miranda, 1996). Varias de las resonancias que en los espectros de RMN ^1H de los ésteres púrgicos A (26) y B (27) se encuentran sobrepuestas se resolvieron en los espectros de los respectivos derivados peracetilados y permitieron la asignación de las señales de ^1H y ^{13}C (ver cuadros 16, 17 y 18).

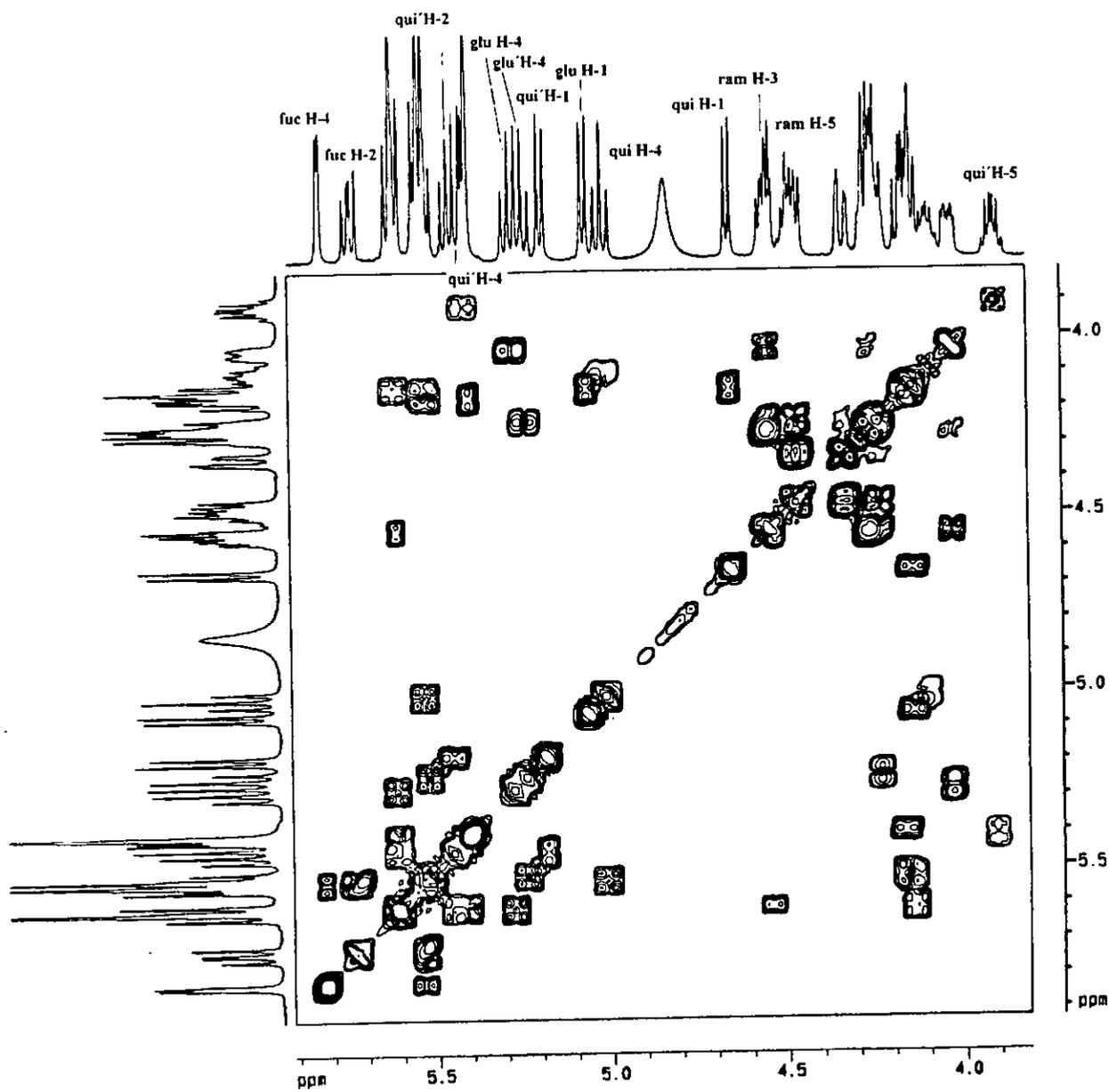


Figura 64. Sección del espectro COSY del derivado peracetilado del éster púrgico A (29).

La asignación de las señales de ^{13}C en los espectros HMQC de los compuestos **29** y **30** se hizo sin las dificultades que se presentaron en los compuestos **26** y **27**. En la región oligosacárida (δ 3.5-6.0) las resonancias de ^1H se encontraron lo suficientemente resueltas y definidas para asignar las correspondientes de ^{13}C de cada una de las unidades individuales del núcleo oligosacárido (fig. 65).

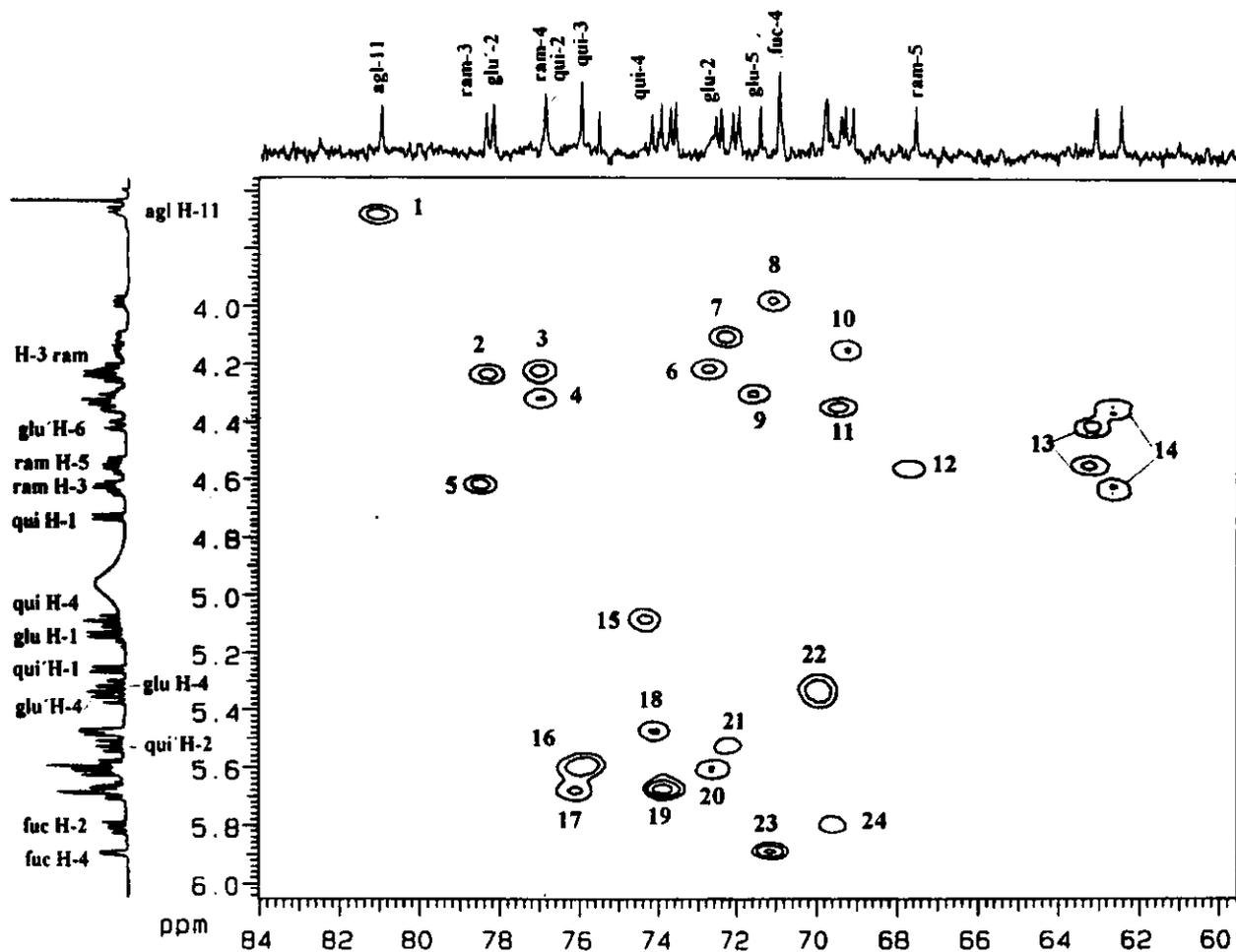


Figura 65. Sección del espectro HMQC para la región oligosacárida del compuesto **30**. Asignación de las resonancias de ^{13}C ; 1; C_{11}agl , 2; $\text{C}_2\text{glu}'$, 3; C_2qui , 4; C_4ram , 5; C_3ram , 6; C_2glu , 7; C_5glu , 8; C_5qui , 9; $\text{C}_5\text{glu}'$, 10; $\text{C}_5\text{qui}'$, 11; C_5fuc , 12; C_5ram , 13; $\text{C}_6\text{glu}'$, 14; C_6glu , 15; $\text{C}_4\text{qui}'$, 16; C_3glu y $\text{C}_3\text{glu}'$, 17; C_3qui , 18; C_4qui , 19; C_2ram , 20; C_3fuc , 21; $\text{C}_2\text{qui}'$, 22; C_4glu y $\text{C}_4\text{glu}'$; 23; C_4fuc , 24; C_2fuc .

En el análisis de los espectros HMBC de los derivados **29** y **30** se observaron algunas de las correlaciones ($^3J_{C-H}$) (fig. 66) que también se registraron para los compuestos **26** y **27**, así como aquellas que no fueron fácilmente observadas para discernir la posición de la fucosa y la glucosa terminal. Las correlaciones que permitieron sustentar inequívocamente la estructura propuesta para los ésteres púrgicos A (**26**) y B (**27**) (fig. 67) fueron las que presentaron los hidrógenos H-3 (δ 4.60) y H-4 (δ 4.30) de la unidad de ramnosa con las señales de los carbonos anoméricos de la glucosa externa (δ 102.50) y de la fucosa (δ 101.11), respectivamente.

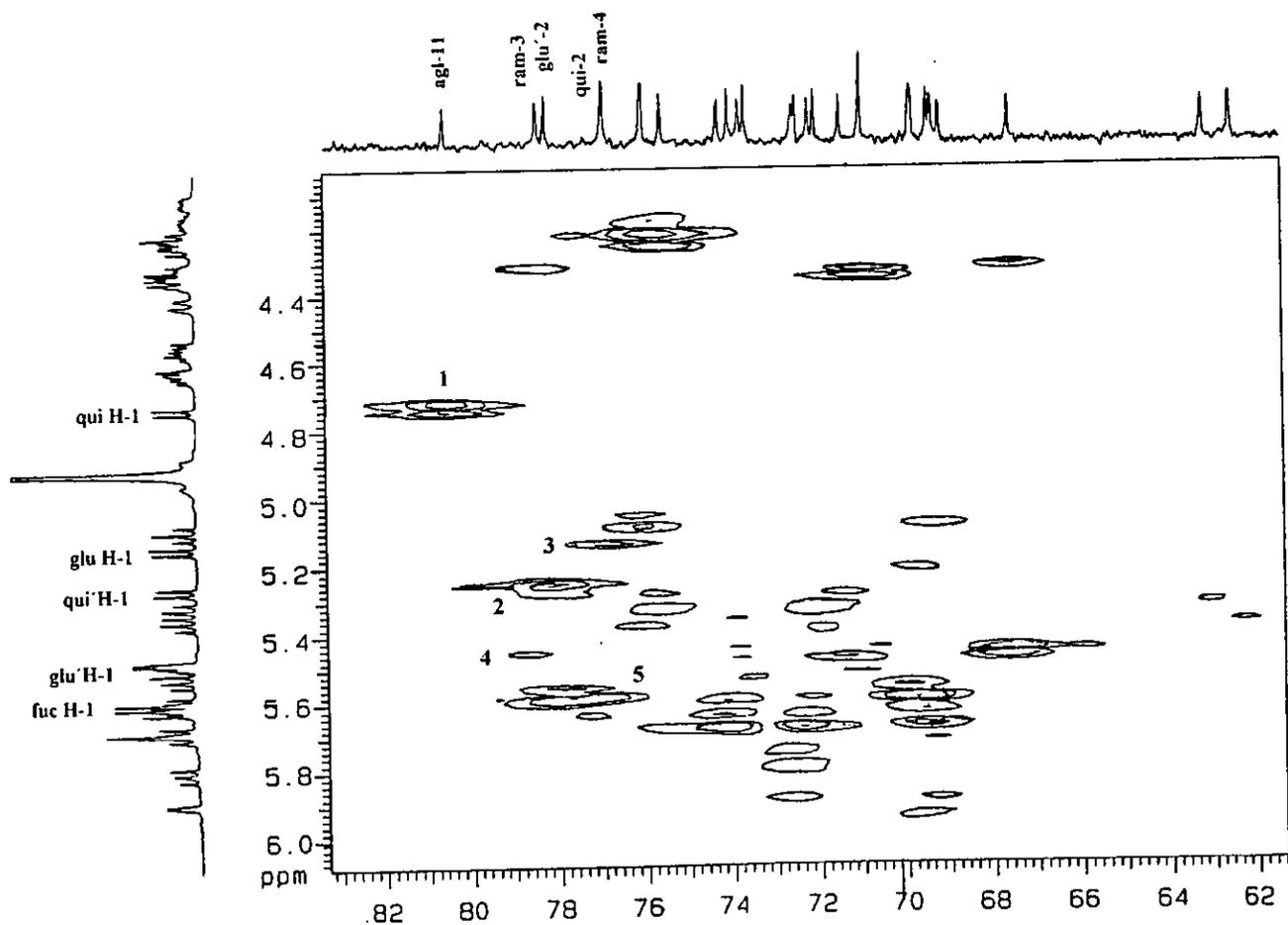


Figura 66. Sección del espectro HMBC del compuesto **29**. Correlaciones: 1; $C_{11}agl-H_1qui$, 2; $C_2glu'-H_1qui'$, 3; C_2qui-H_1glu , 4; C_3ram-H_1glu' , 5; C_4ram-H_1fuc .

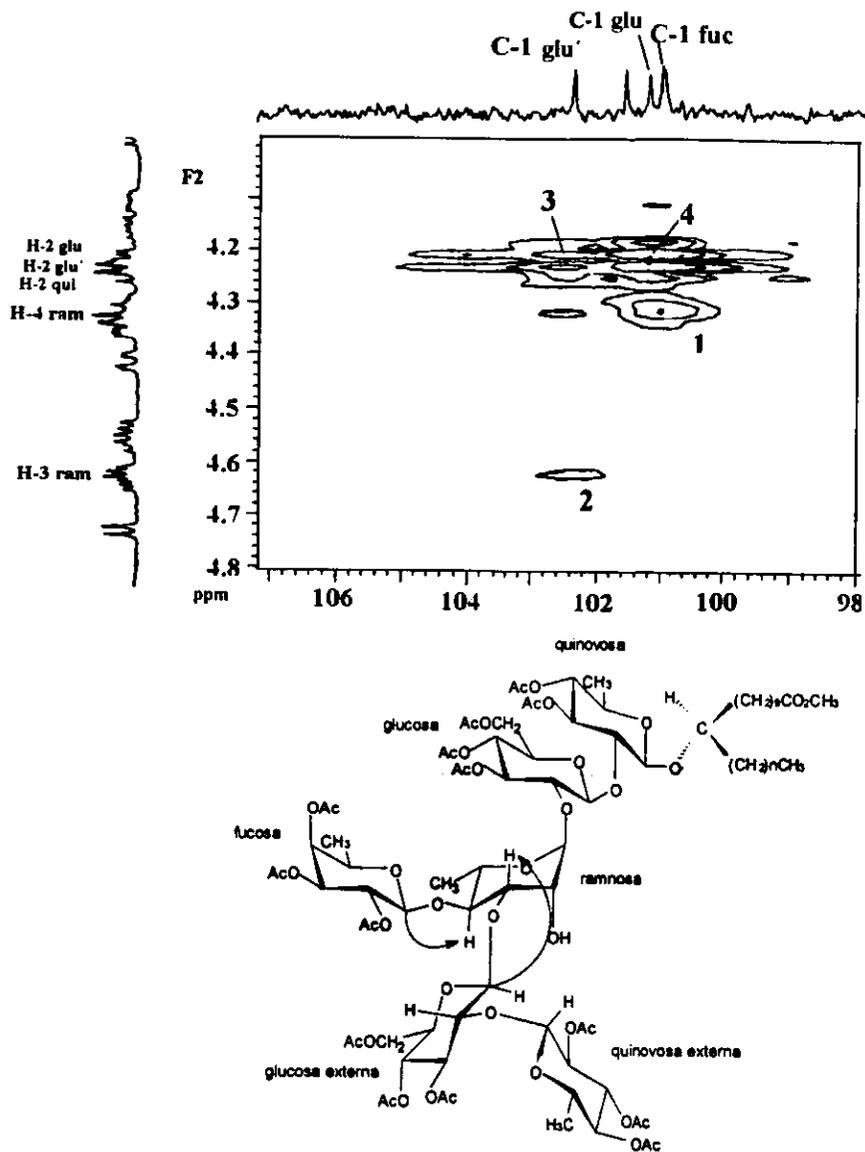


Figura 67. Sección del espectro HMBC del éster púrgico A (29) peracetilado en donde se muestra la correlación entre el C-1 de la fucosa con el H-4 de la ramnosa (1) y C-1 de la glucosa externa con el H-3 de la ramnosa (2). 3; C₁glu'-H₂glu' y 4; C₁glu-H₂glu.

En la figura 68 se muestra el espectro ROESY del mismo derivado peracetilado (29) y algunas de las conectividades que justifican también la misma secuencia de glicosidación de 26 y 27.

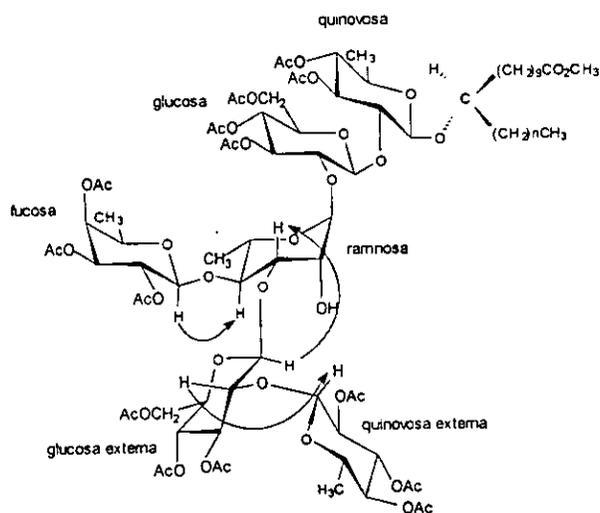
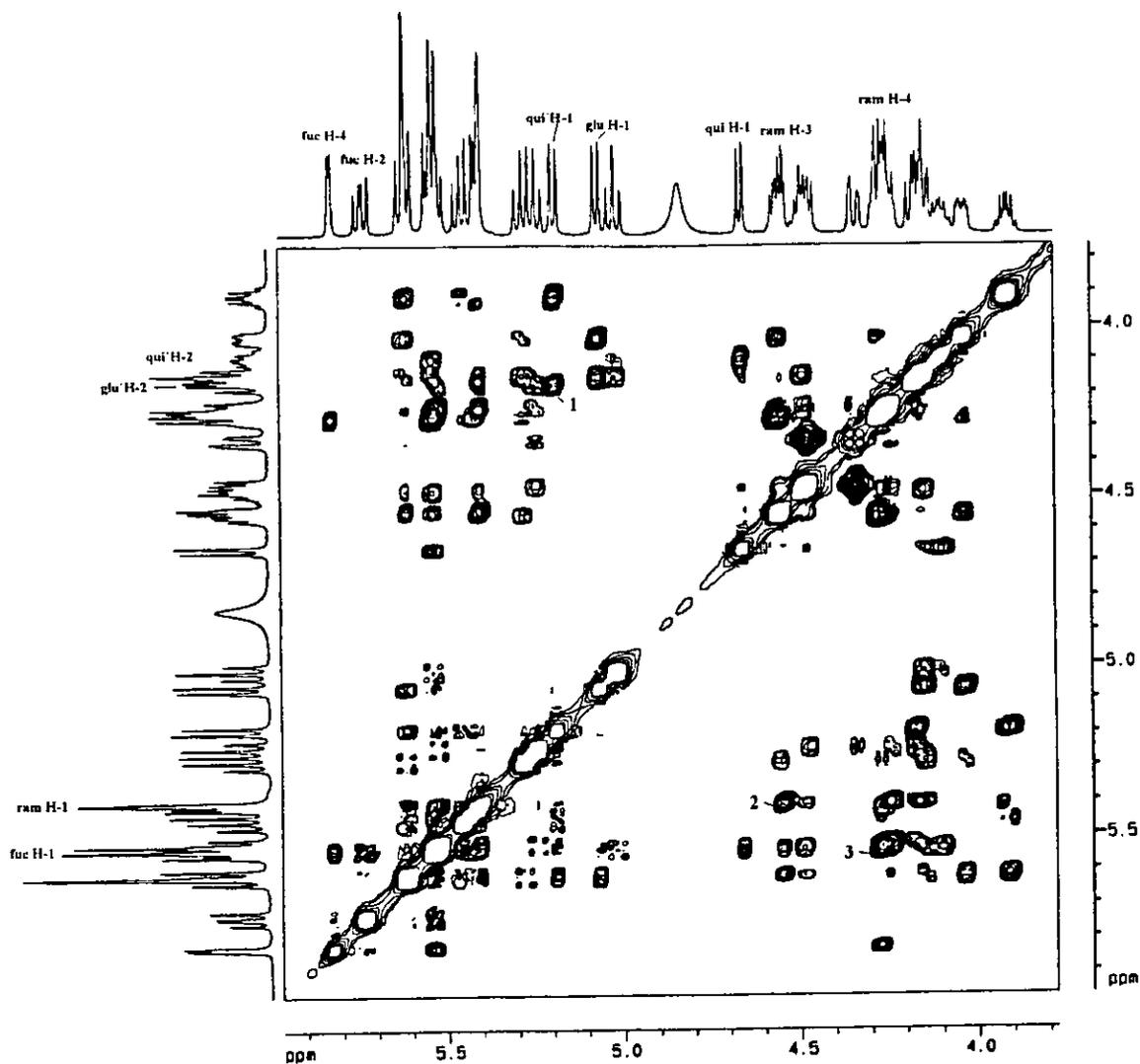


Figura 68. Espectro ROESY y correlaciones observadas en el derivado peracetilado del éster púrgico A (29) donde $n = 2$. Conectividades: 1; $H_1\text{qui}-H_2\text{glu}'$, 2; $H_3\text{ram}-H_1\text{glu}'$ y 3; $H_4\text{ram}-H_1\text{fuc}$.

La naturaleza del derivado **28** correspondiente a un artefacto del éster púrgico A (**26**) se determinó inicialmente a partir del espectro de masas (FAB-MS) (fig. 69) que mostró el ion pseudomolecular $[M - H]^-$ m/z de 1179 junto con los fragmentos m/z de 565 y 857; el primero de éstos dos últimos también está presente en el compuesto **26** [aglicona - 146 - 146] $^-$ y el segundo parece representar el producto de la pérdida de dos unidades monosacáridas además de un grupo metilo. La diferencia de este último con el ion de m/z 1179 ($1179 - 857 = 322$) no corresponde a la pérdida de una metilpentosa y una hexosa ($146 + 162 = 308$), ni a la pérdida de dos metilpentosas ($146 \times 2 = 292$). Si la pérdida fuese de 292 Daltons, la diferencia con 322 sólo sería posible a partir de la pérdida de formaldehído (CH_2O) de los grupos metoxilo (Seibl, 1973). Esta observación, sugiere la presencia de un metoxilo sustituyendo alguna de las unidades sacáridas terminales.

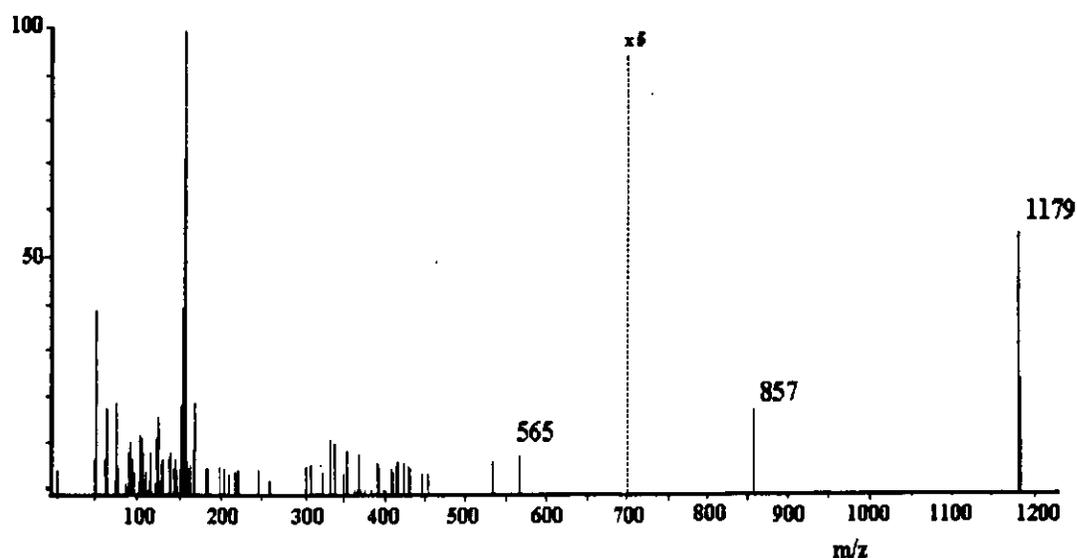


Figura 69. Espectro de masas FAB-MS (modo negativo) de **28**, artefacto del éster púrgico A.

La observación anterior se corroboró mediante el análisis de los espectros de RMN bidimensionales (COSY, TOCSY, HMQC y HMBC) que se efectuó con menores dificultades que en el caso de los ésteres púrgicos A (26) y B (27), ya que las señales diagnósticas de ^1H para la identificación de cada unidad monosacárida fueron fácilmente distinguibles. Así, fue posible asignar las señales de la fucosa a partir de la resonancia en δ 4.06 (H-4) y para las unidades de glucosa que presentaron al menos una de sus señales correspondientes al protón H-6 sin superposición (δ 4.40 y 4.52), como se puede apreciar en el espectro COSY de la figura 70.

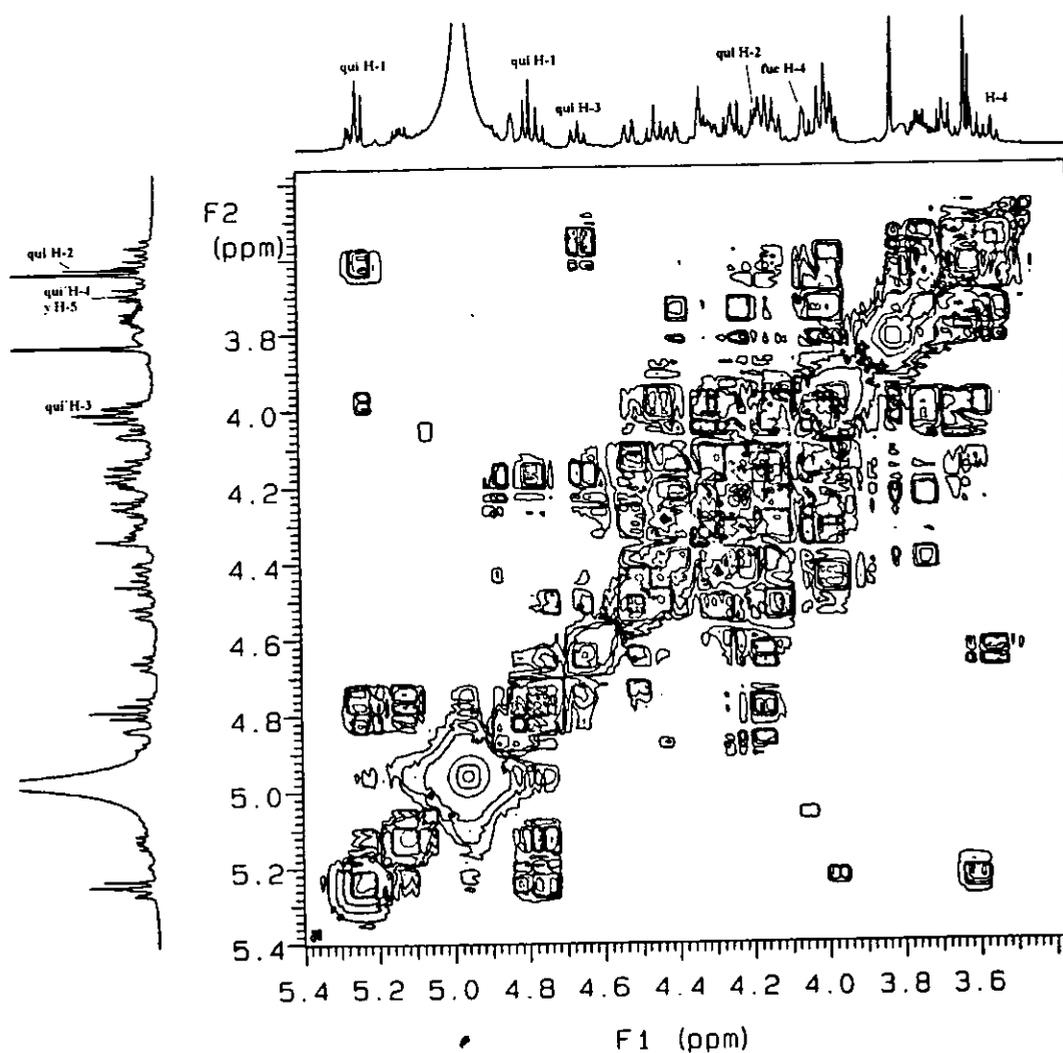


Figura 70. Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida del derivado 28.

En el espectro COSY de la figura 70 se ilustra la asignación de las resonancias para los hidrógenos H₁–H₅ de las dos unidades de quinovosa. Los desplazamientos descritos para las señales con sobreposición fueron confirmados con el espectro TOCSY y se concluyó la asignación de todas las resonancias de ¹H en el compuesto **28** (ver cuadro 19). La asignación de las resonancias de ¹³C se hizo a partir de los espectros HMQC y HMBC tal como se describió para los ésteres púrgicos A (**26**) y B (**27**) (ver cuadro 20).

La secuencia de glicosidación para el compuesto **28** se estableció desde las conectividades observadas en el espectro HMBC (fig. 71), así la interacción entre el C-11 de la aglicona con el H-1 de una unidad de quinovosa determinó la primera unidad monosacárida.

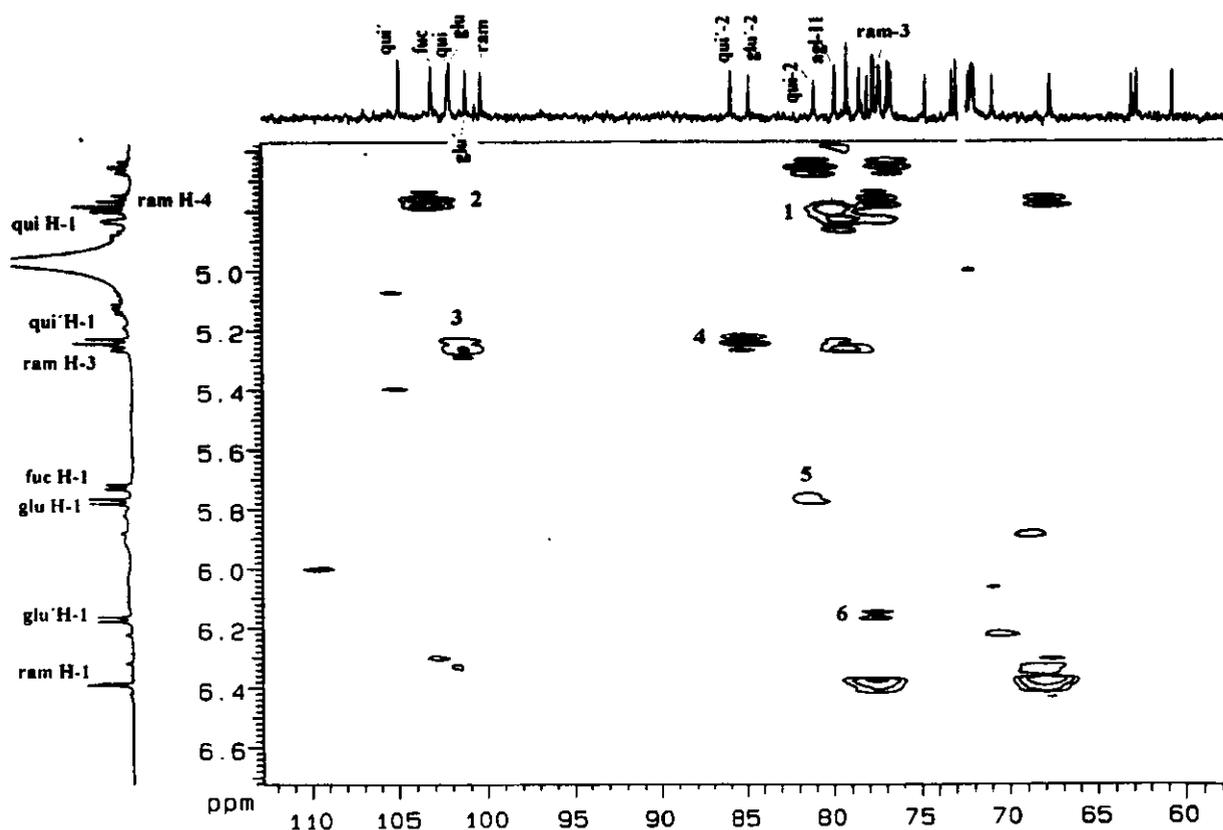


Figura 71. Sección del espectro HMBC del compuesto **28**. Conectividades (³J_{C-H}): 1; H₁qui–C₁₁agl, 2; H₄ram–C₁fuc, 3; H₃ram–C₁glu', 4; H₁qui'–C₂glu', 5; H₁glu–C₂qui, 6; H₁glu'–C₃ram.

El resto de las correlaciones $^3J_{C-H}$ fueron las que se describieron previamente para los compuestos **26** y **27** y que se indican en las figuras 71 y 72. La única diferencia que se encontró entre los ésteres **26-27** con **28** fue la conectividad entre la señal de un grupo metoxilo (δ 3.82) con el carbono C-2 de la quinovosa externa (qui') (δ 86.05) (fig. 72), de tal manera que, el compuesto **28** resultó ser un artefacto de **26** con una diferencia de masa de 14 Daltons que se observó con el ion de m/z 857 y que representó la pérdida de una unidad de glucosa y de quinovosa con un metoxilo $[1179 - 146 - 162 - 14]^-$.

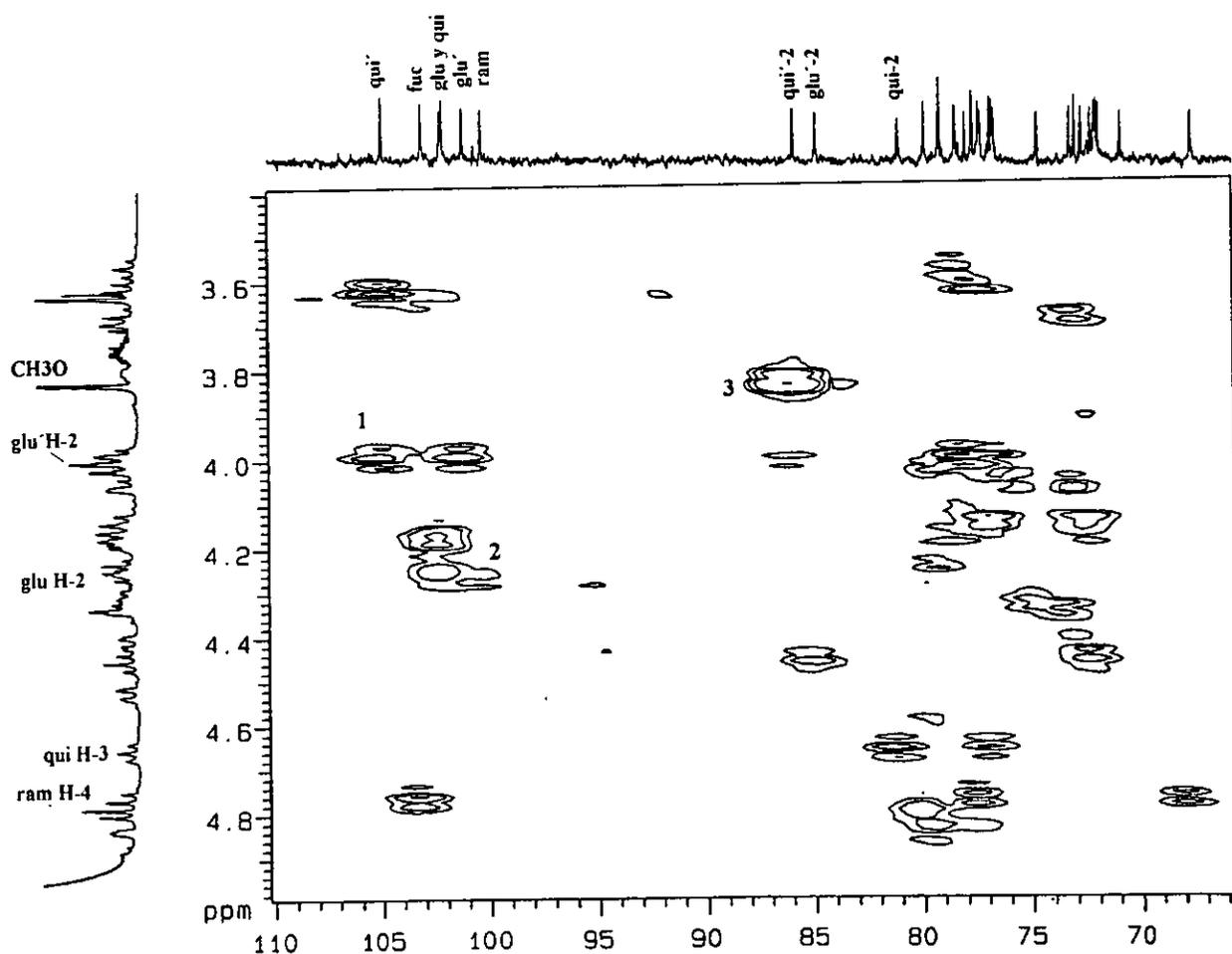


Figura 72. Sección del espectro HMBC del compuesto **28**. Conectividades ($^3J_{C-H}$): 1; $H_2glu'-C_1qui'$, 2; H_2glu-C_1ram , 3; CH_3O-C_2qui' .

Cuadro 19. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H del éster púrgico A (26) y del compuesto 28^a.

| Protón ^b | 26 | 28 |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| Qui-1 | 4.78 d (7.5) | 4.88 d(7.5) |
| 2 | 4.18 - 4.12* | 4.20-4.15* |
| 3 | 4.63 dd (9.0, 9.0) | 4.65 dd(8.5, 8.5) |
| 4 | 3.52 dd (9.0, 9.0) | 3.56 dd(9.0, 9.0) |
| 5 | 3.70 dq (9.0, 6.5) | 3.70-3.77* |
| 6 | 1.45 d (6.5) | 1.46 d(6.0) |
| Glu-1 | 5.75 d (8.0) | 5.77 d(7.5) |
| 2 | 4.35 - 4.23* | 4.23 dd(8.0, 8.0) |
| 3 | 4.35 - 4.23 * | 4.20-4.11* |
| 4 | 4.05 - 3.97* | 4.02 dd(9.5, 9.5) |
| 5 | 3.80 - 3.74 * | 3.77-3.70* |
| 6a | 4.44 dd (11.0, 3.0) | 4.40 dd(3.0, 11.0) |
| 6b | 4.25 dd (11.0, 6.0) | 4.26-4.28* |
| Ram-1 | 6.45 d (1.5) | 6.38 d(1.5) |
| 2 | 4.85 dd (1.5, 3.0) | 4.83 dd(3.0, 1.5) |
| 3 | 5.30 dd (3.0, 9.5) | 5.25 dd(3.0, 9.0) |
| 4 | 4.81 dd (10.0, 9.5) | 4.76 dd(10.0, 10.0) |
| 5 | 5.20 dq (10.0, 6.0) | 5.12 dq(9.5, 6.0) |
| 6 | 1.95 d (6.0) | 1.91 d (6.0) |
| Glc'-1 | 6.23 d (7.5) | 6.17 d(7.5) |
| 2 | 4.09 - 3.97 * | 4.02-3.95* |
| 3 | 4.52 dd (9.0, 9.0) | 4.45 dd(8.5, 8.5) |
| 4 | 4.05 - 3.97* | 4.02-3.95* |
| 5 | 4.18 - 4.12 * | 4.35-4.28* |
| 6a | 4.56 - 4.50 * | 4.52 dd(2.5, 11.5) |
| 6b | 4.18 - 4.12 * | 4.20-4.11* |
| Qui'-1 | 5.09 d (8.0) | 5.23 d(8.0) |
| 2 | 4.06 dd (9.0, 8.0) | 3.61 dd(8.0, 9.0) |
| 3 | 4.04 - 3.97 * | 4.02-3.95* |
| 4 | 3.61 dd (9.5, 9.5) | 3.67-3.71* |
| 5 | 3.74 dq (9.5, 6.5) | 3.67-3.71* |
| 6 | 1.66 d (6.5) | 1.68(6.0) |
| Fuc-1 | 5.78 d (7.5) | 5.72 d(7.0) |
| 2 | 4.35 - 4.23 * | 4.35-4.28* |
| 3 | 4.35 - 4.23 * | 4.35-4.28* |
| 4 | 4.04 - 3.97 * | 4.06 d(3.0) |
| 5 | 4.18 - 4.12 * | 4.20-4.11* |
| 6 | 1.54 d (6.0) | 1.51 d(6.0) |
| Con-2 | 2.32 t (7.0) | 2.32 t(7.0) |
| 11 | 3.81 m | 3.78 m |
| 16 | 0.86 t (7.0) | 0.90 t(7.5) |
| MeO | 3.40 s | 3.40 |

^ay ^b Ver cuadro 16.

Cuadro 20. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C del éster púrgico A (**26**) y del compuesto **28**^a.

| Carbono ^b | 26 | 28 | Carbono ^b | 26 | 28 |
|----------------------|--------|--------|------------------------|--------|--------|
| Qui-1 | 102.15 | 102.13 | Qui'-1 | 104.76 | 104.93 |
| 2 | 80.85 | 81.19 | 2 | 76.11 | 86.05 |
| 3 | 78.47 | 78.59 | 3 | 77.45 | 77.78 |
| 4 | 77.08 | 76.89 | 4 | 76.77* | 77.02 |
| 5 | 72.12 | 72.26 | 5 | 73.60 | 73.15 |
| 6 | 18.25 | 18.22 | 6 | 18.56 | 18.54 |
| Glu-1 | 102.40 | 102.21 | Fuc-1 | 102.92 | 103.11 |
| 2 | 77.83 | 76.82 | 2 | 73.40 | 74.86 |
| 3 | 76.40 | 79.31 | 3 | 74.93* | 73.37 |
| 4 | 72.53 | 72.19 | 4 | 72.82 | 72.86 |
| 5 | 77.45 | 77.51 | 5 | 71.01 | 71.07 |
| 6 | 62.81 | 63.19 | 6 | 16.94 | 16.96 |
| Ram-1 | 100.14 | 100.32 | Con-1 | 173.99 | 173.99 |
| 2 | 71.73 | 72.10 | 2 | 34.14 | 34.14 |
| 3 | 78.18 | 77.42 | 11 | 80.10 | 80.00 |
| 4 | 78.91 | 79.31 | 14 | 14.35 | 14.35 |
| 5 | 67.69 | 67.81 | CH ₃ O | 51.17 | 51.16 |
| 6 | 18.97 | 18.99 | CH ₃ O Q'-2 | 60.85 | |
| Glu'-1 | 100.57 | 101.20 | | | |
| 2 | 84.72 | 85.00 | | | |
| 3 | 76.77 | 78.14 | | | |
| 4 | 72.20 | 72.42 | | | |
| 5 | 79.48 | 77.81 | | | |
| 6 | 63.32 | 62.89 | | | |

^a^b. Ver cuadro 18.

La generación de artefactos como **28** se ha descrito durante la metilación exhaustiva de los ácidos glicosídicos con diazometano (Ono *et al.*, 1990c). La posición de metilación también ocurre en una unidad terminal probablemente porque existe una mayor exposición del monosacárido al diazometano. También, es posible proponer que los hidroxilos poseen diferentes reactividades hacia la sustitución nucleofílica, aún cuando existen en las referencias sólo algunos estudios de las diferentes reactividades de

los grupos OH en una unidad monosacárida como el reportado para la glucosa (Mulroney *et al.*, 1999).

Como se ha mencionado anteriormente, la elucidación estructural del artefacto **28** se efectuó con una menor dificultad y, por lo tanto, no se necesitó de la formación de su derivado peracetilado para confirmar su estructura como en el caso de **26** y **27**. Además, el compuesto **28** representa un derivado de **26** y es una prueba adicional a la estructura propuesta para el núcleo oligosacárido de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas de *Ipomoea purga*.

La metilación de **26** en la posición 2 de la quinovosa externa provocó algunos cambios en los desplazamientos químicos de las resonancias protónica y de carbono-13, tal como se observa en los cuadros 19 y 20. Las señales de ^{13}C afectadas de forma significativa son el centro de sustitución C-2 de la quinovosa externa que se desplazo paramagnéticamente ($\Delta\delta +10$), los centros C-3 ($\Delta\delta -1.37$) y C-5 ($\Delta\delta +1.67$) de la glucosa externa y el correspondiente al C-3 ($\Delta\delta -1.56$) de la fucosa. Estas observaciones reflejan cambios conformacionales en las tres unidades monosacáridas terminales y que también son observados mediante los cambios producidos en los desplazamientos de algunas señales de hidrógeno: la señal del H-2 ($\delta 3.61$) de la unidad metoxilada se desplazó hacia campo alto ($\Delta\delta -0.4$) y los desplazamientos diamagnético y paramagnético de las resonancias de los protones H-3 ($\Delta\delta -0.07$) y H-5 ($\Delta\delta +1.0$), respectivamente, de la glucosa externa. Estos cambios en los desplazamientos de ^{13}C y ^1H son explicados a partir de las siguientes conectividades observadas en el espectro NOESY (fig. 73): a) los protones H-1 de la quinovosa interna (qui) ($\delta 4.88$) y H-3 ($\delta 5.25$), H-5 ($\delta 5.12$) de la

ramnosa y b) los protones H-1 (δ 5.23) de la quinovosa externa (qui') y H-1 (5.72) de la fucosa. Estas conectividades justifican la estructura que se presenta en la figura 73. Así la metilación del éster púrgico A (26) parece haber provocado un cambio conformacional en las unidades sacáridas terminales que puede ser sustentado por el hecho de que la sustitución de un protón por un grupo metilo ha modificado la polaridad de esa porción terminal del oligosacárido generando ajustes conformacionales para disminuir su energía interna. Se ha descrito que este tipo de estructuras poseen una distribución espacial parecida a la de un detergente, es decir su porción hidrofílica esta dispuesta de manera contraria a la cadena del ácido graso (Jiang *et al.*, 1995).

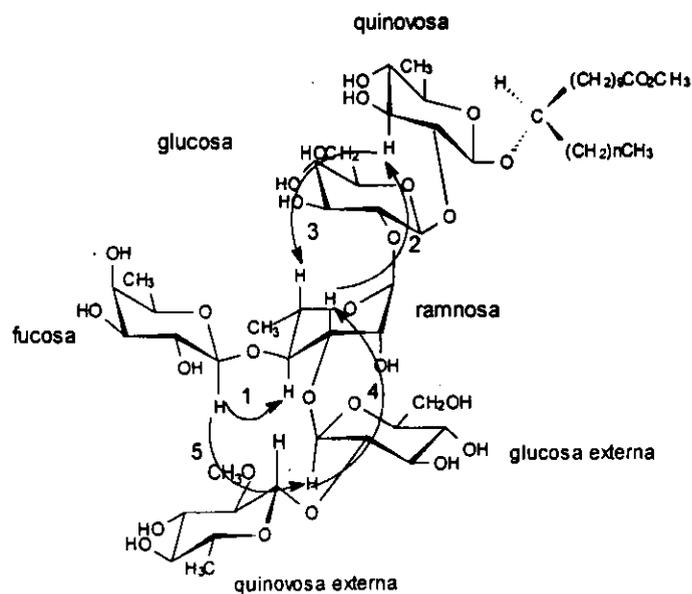
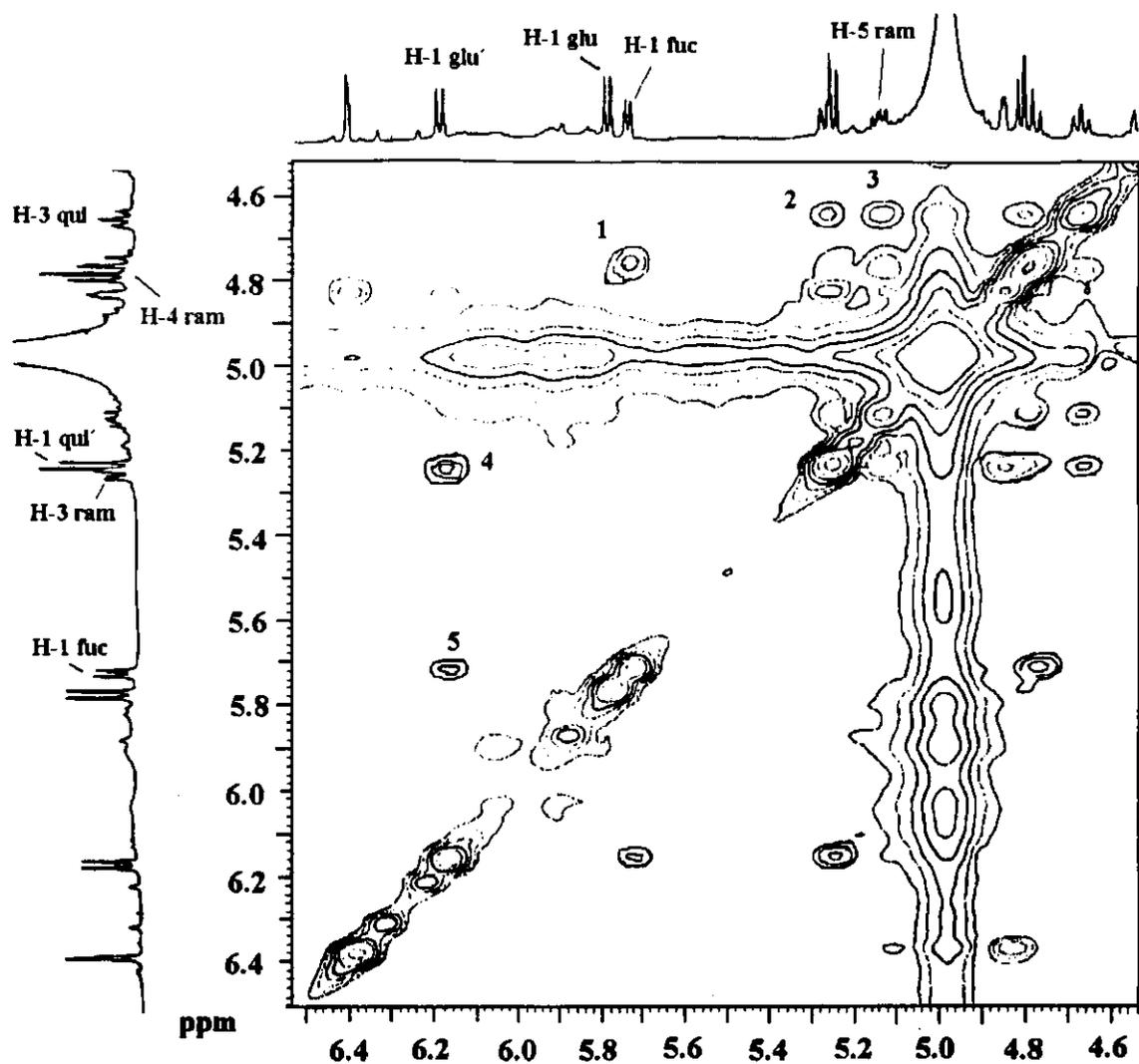


Figura 73. Sección del espectro NOESY y conectividades observadas en el compuesto **28**. Correlaciones: 1; H₁fuc–H₄ram, 2; H₃qui–H₃ram, 3; H₃qui–H₅ram, 4; H₁glu'–H₁qui' y 5; H₁fuc–H₁glu'. 500 MHz, C₅D₅N.

Las configuraciones absolutas D o L de los componentes monosacáridos en los ésteres púrgicos A (26), B (27) y en el artefacto de 26 (28) no se determinaron de acuerdo a la técnica descrita por Hara *et al.*, (1987). En la mayoría de los trabajos de elucidación estructural de los glicolípidos de las convolvuláceas sólo se ha descrito quinovosa, glucosa y fucosa con configuraciones absolutas D a excepción de la ramnosa lo cual está de acuerdo a la consideración de que la gran parte de los monosacáridos de origen vegetal poseen la configuración absoluta D a excepción de la ramnosa (Weymouth-Wilson, 1998) y por esa razón se consideró esta configuración absoluta en los azúcares de los ésteres púrgicos A (26) y B (28). La configuración de los carbonos anoméricos de estos monosacáridos se estableció gracias al registro de sus constantes de acoplamiento ^{13}C - ^1H geminales ($^1J_{\text{C-H}}$) (ver cuadro 21). Según Perlin y Casu (1969), los valores de acoplamiento geminales son característicos para cada anómero y difieren aproximadamente en 10 Hz; el anómero α presenta un valor de 170 Hz, mientras el β tiene uno cercano a 160 Hz. Entonces, de acuerdo a los datos mostrados en el cuadro 21 todas las unidades monosacáridas poseen las configuraciones β excepto la ramnosa (Agrawal y Pathak, 1996; Bah y Pereda-Miranda, 1996; Perlin y Casu, 1969).

Cuadro 21. Acoplamientos C-H ($^1J_{\text{C-H}}$) presentados por los carbonos anoméricos de los monosacáridos presentes en los compuestos 26–28.

| Monosacárido | Compuestos 26 y 27 $^1J_{\text{C-H}}$ (Hz) | Compuesto 28 $^1J_{\text{C-H}}$ (Hz) |
|-------------------|---|---|
| Quinovosa interna | 156.7 | 156.9 |
| Glucosa interna | 156.0 | 161.4 |
| Ramnosa | 169.2 | 170.7 |
| Glucosa externa | 162.0 | 156.9 |
| Fucosa | 159.0 | 156.0 |
| Quinovosa externa | 166.0 | 161.5 |

De acuerdo a lo anterior, los núcleos oligosacáridos de la convolvulina de *Ipomoea purga* se caracterizaron como:

Ester púrgico A (26); éster metílico del ácido (11*S*)-11{-*O*-6-desoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi - β -D-glucopiranosido}-hidroxitradecanoico.

Ester púrgico B (27); éster metílico del ácido (11*S*)-11{-*O*-6-desoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi - β -D-glucopiranosido}-hidroxihexadecanoico.

Éter metílico del éster púrgico A (28); éster metílico del ácido (11*S*)-11{-*O*-6-desoxi-2-*O*-metil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi β -D-glucopiranosido}-hidroxitradecanoico.

La existencia de dos núcleos oligosacáridos con diferente aglicona en la convolvulina de la raíz de *Ipomoea purga* es una situación análoga a la descrita para los ácidos glicosídicos de las resinas foliares de *Pharbitis nil* donde se aislaron los ácidos farbíticos B y D (Ono *et al.*, 1990b). Estos son hexasacáridos con la misma secuencia de

glicosidación y diferente aglicona. Mientras que en el ácido farbítico B se encuentra como la aglicona el ácido 3,2-dihidroxihexadecanoico (diOHC₁₆), el otro presenta el 3,11-dihidroxitetradecanoico (diOHC₁₄). Este mismo hecho sucede en la jalapina de *Quamoclit pennata*, cuyos ácidos glicosídicos, los ácidos quamoclínico A y operculínico A se diferencian en las agliconas que son los ácidos convolvulinivo (OHC₁₄) y jalapínico (OHC₁₆), respectivamente (Ono *et al.*, 1992b). Otros ejemplos son los ácidos cuscúticos A (OHC₁₄) y D (OHC₁₆) y los ácidos multifidínicos A (OHC₁₄) y B (OHC₁₆) obtenidos de la convolvulina de las hojas de *Cuscuta chinensis* (Du *et al.*, 1998) y de *Quamoclit multifida* (Ono *et al.*, 1997), respectivamente.

El éster púrgico A (26) resultó ser el núcleo oligosacárido principal que caracteriza la convolvulina de *I. purga*, resultado que está de acuerdo con la presencia del β-quinovósido del ácido convolvulínico aislado de esta misma raíz por Shing y Stacey (1973) mediante métodos degradativos de las resinas glicosídicas totales. Los ésteres púrgicos A (26) y B (27) representan ejemplos adicionales de núcleos glicosídicos ramificados con seis unidades monosacáridas junto con los aislados de *Pharbitis nil* (Ono *et al.*, 1990b) y de *I. lonchophyla* (MacLeod y Ward, 1997).

6. Conclusiones.

6.1. Usando técnicas de CLAP, de la jalapina de *Ipomoea orizabensis* se obtuvieron y caracterizaron diecisiete glicolípidos novedosos con el mismo núcleo oligosacárido, las orizabinas V (3)–XXI (19) junto con las descritas escamonina I y II.

6.2. Las orizabinas V (3)–XXI (19) presentaron como núcleo oligosacárido al ácido (11S)-11-[O-6-desoxi-β-D-glucopiranosil-(1→4)-O-6-desoxi-L-manopiranosil-(1→2)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosido]-hidroxihexadecanoico, al igual que las escamoninas I y II. Las orizabinas V (3) –VIII (6) mostraron dos residuos ácidos esterificando al núcleo oligosacárido y las orizabinas IX (7)–XXI (19) tres. Estos residuos ácidos fueron el metilbutanoilo, niloilo, tigloilo e isobutiroilo. El sitio de lactonización del núcleo oligosacárido con la aglicona en las orizabinas fue la posición C-3 de la unidad de ramnosa a excepción de la orizabina VIII (6) que fue en la unidad de glucosa (C-3). Mediante la reacción de Mosher se diferenciaron los pares diastereoisoméricos de los grupos niloilo de la serie *treo* 2*R*,3*R* y 2*S*,3*S* de las orizabinas IX (7)-XXI (19).

6.3. La evaluación del potencial citotóxico complementó el trabajo fitoquímico para la obtención de compuestos bioactivos, *i.e.*, aquellos glicolípidos provenientes de las fracciones de menor polaridad (orizabinas IX–XXI) mostraron una actividad citotóxica significativa en la línea KB ($ED_{50} < 5 \mu\text{g/mL}$).

6.4. Durante el análisis preliminar de la convolvulina de *Ipomoea purga* se caracterizaron dos núcleos oligosacáridos novedosos, los ésteres púrgicos A y B que representan ejemplos escasos de núcleos hexasacáridos ramificados en la familia de las convolvuláceas. La elucidación estructural de los mismos se hizo con los métodos degradativos y de derivatización en conjunto con las técnicas analíticas espectrométricas y espectroscópicas de alta resolución.

6.5. El estudio fitoquímico de *Ipomoea orizabensis* e *Ipomoea purga* ha puesto en evidencia la importancia que tiene el establecimiento de una metodología para distinguir sin equivocación las jalapas falsas de la raíz de *Ipomoea purga*. Se propone que los núcleos oligosacáridos de una jalapa falsa, el ácido orizábico A o el escamónico A, son tetrasacáridos lineales cuya aglicona corresponde al ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínico) y esta aglicona es diferente a la observada en el núcleo oligosacárido principal de la raíz de *Ipomoea purga*, el éster metílico del ácido (11*S*)-11-{-*O*-6-desoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi - β -D-glucopiranosido}-hidroxitetradecanoico (éster púrgico A). Estas diferencias se encontraron en concordancia con la clasificación botánica de la familia Convolvulaceae, ya que *Ipomoea purga* pertenece al subgénero *Quamoclit* (Moench) Clark, sección *Exogonium* (Choisy) Griseb, mientras que *Ipomoea orizabensis* e *Ipomoea stans* están incluidas en el subgénero *Ipomoea*, sección *Tyrianthinae* (House) Austin (McDonald, 1991).

7. Apéndice.

Elucidación estructural de la soldanelita, glicolípido aislado de la jalapina de *Calystegia sodanella* (Convolvulácea).

La elucidación estructural de los glicolípidos de la familia Convolvulaceae en este trabajo no solo se hizo en los compuestos obtenidos de las raíces de *I. orizabensis* y de *I. purga* sino también en un glicolípido obtenido de la jalapina de las raíces de *Calystegia soldanella*, planta Europea de la familia Convolvulácea. El tratamiento de las raíces para obtener la jalapina y el compuesto en cuestión en estado puro no se mencionan en esta sección debido a que sólo hice la elucidación estructural del mismo a partir de los datos espectrométricos y espectroscópicos disponibles. La estructura de este glicolípido (fig. A1) se dedujo de los espectros de RMN homonuclear y heteronuclear, (^1H , ^{13}C , COSY, HMQC, HMBC, ROESY) y de sus datos espectrométricos (FAB) y se propuso como la de un tetrasacárido ramificado que contiene al ácido jalapinólico como aglicona.

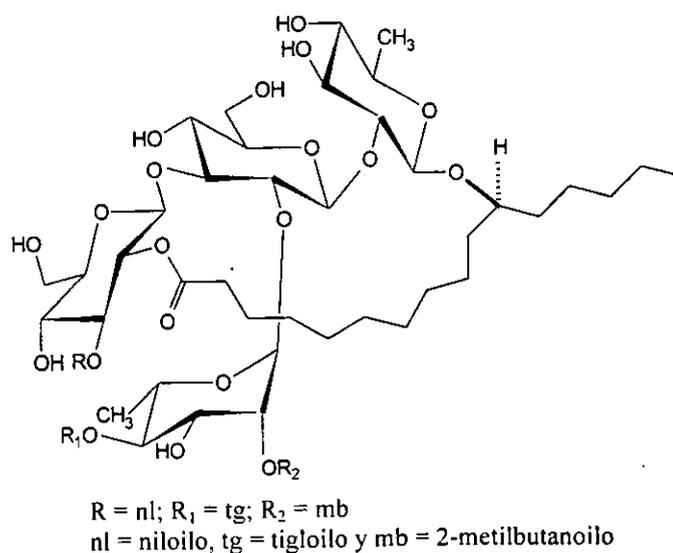


Figura A1. Estructura de la soldanelita.

En el espectro DEPT de la figura A2 se observan cuatro señales en la región de los carbonos anoméricos (δ 104–97.5) e indican la presencia de cuatro unidades monosacáridas, de las cuales dos corresponden a la glucosa debido a las resonancias de los carbonos metilénicos en δ 62.98 y 61.48. También es posible proponer la presencia de los residuos niloilo (nl) y 2-metilbutanoilo (mb) debido a las señales en δ 48.01 y 41.51, desplazamientos que son característicos de los carbonos alfa al grupo carboxilo en cada residuo (Bah, 1997).

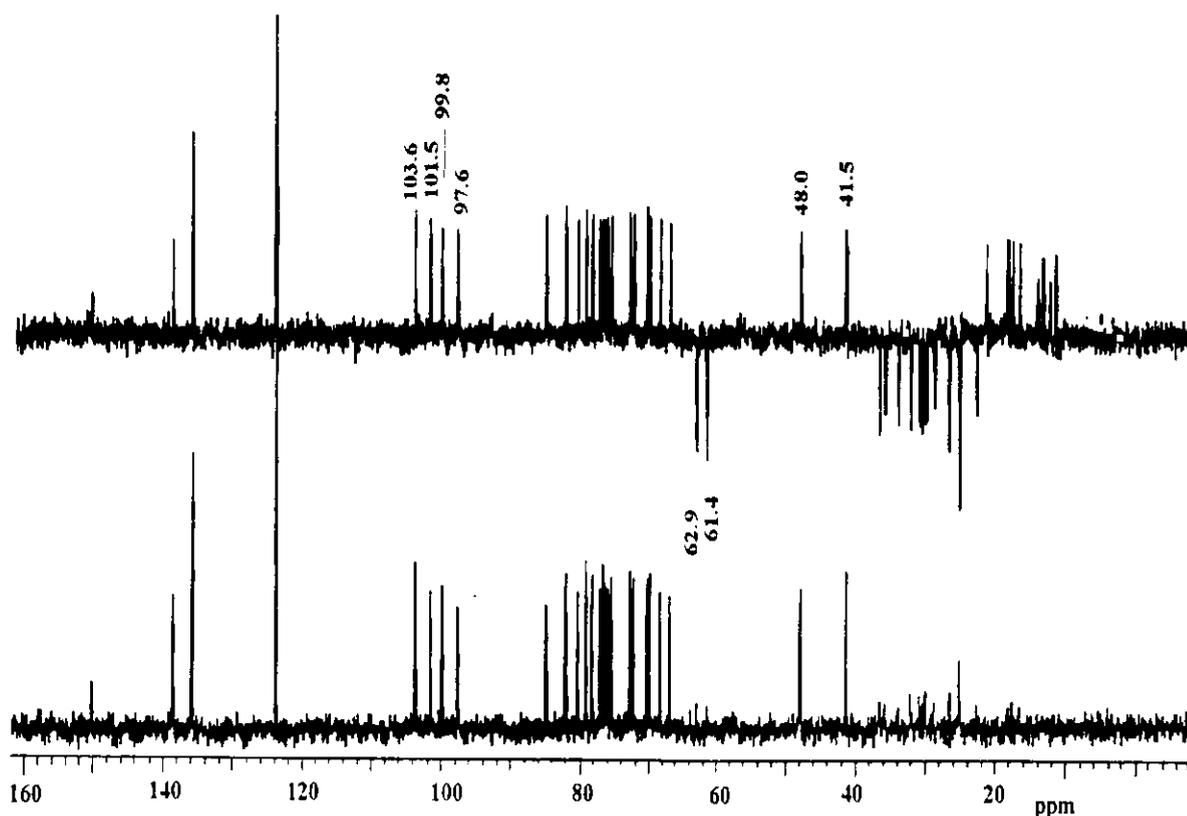


Figura A2. DEPT de la soldanelita.

El análisis del espectro de RMN ^1H (fig. A3) sugiere la presencia de los grupos tigloilo (tg), además de corroborar el niloilo (nl) y 2-metilbutanoilo (mb) mediante las siguientes señales: δ 7.29 (tg, H-3), 2.99 (nl, H-2) y 2.41 (mb, H-2). Las resonancias que demuestran la naturaleza lactónica de este glicolípido aparecen en δ_{ca} 2.72 y son debidas a los protones CH_2 alfa al grupo carboxilo de la aglicona (jalapinoilo) y a diferencia de las orizabinas V(3)-XXI(19) se observan con desplazamientos muy cercanos. La determinación del peso molecular por FAB-MS (modo negativo) mediante la generación del ion $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z de 1135 confirmó la fórmula molecular de $\text{C}_{55}\text{H}_{92}\text{O}_{24}$ que justifica la presencia de los grupos tg, mb y nl, dos unidades de metilpentosas y dos de hexosas, así como la del ácido jalapinólico como la algicona ($1135 = 271 + 146 + 146 + 162 + 162 - 18 + 100$ (nl) + 84 (mb) + 82 (tg)).

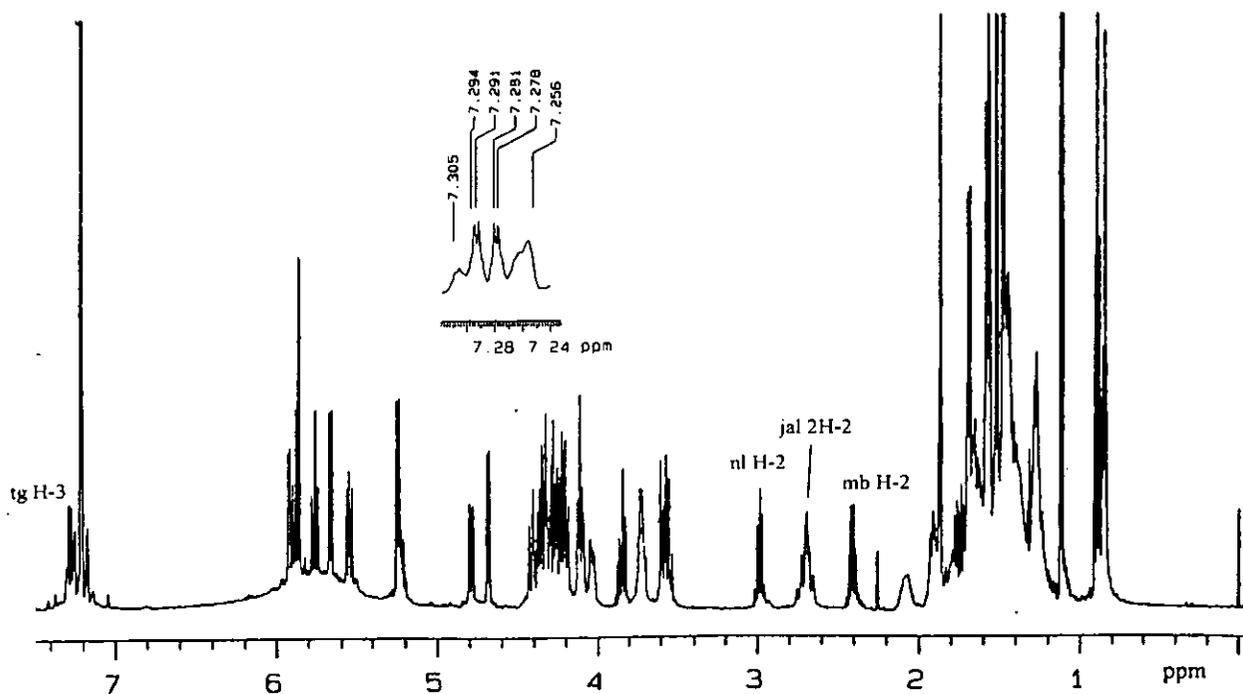


Figura A3. Espectro de RMN ^1H de la soldanelita.

El estudio de los espectros COSY y TOCSY permitió la asignación de las señales de hidrógeno de cada una de las unidades monosacáridas (ver cuadro A1) y partiendo de éstas se asignaron las señales de carbono mediante el análisis del espectro HMQC. Para aquellas señales en las que se dificultó esta asignación se siguió el procedimiento descrito en los ésteres purgicos A (26) y B (27). Las constantes de acoplamiento ($^3J_{C-H}$) que presentaron los hidrógenos H-2 y H-3 de las dos unidades de metilpentosas permitieron establecer su naturaleza. Para la ramnosa, las señales de los protones H-2 y H-3 correspondieron a los dobles centrados en δ_{H2} 5.93 (3.5, 1.5 Hz) y δ_{H3} 4.79 (9.5, 3.5 Hz) y para la quinovosa estas asignaciones fueron para los tripletes en δ_{H2} 4.22 (9.0, 9.0 Hz) y δ_{H3} 4.25 (9.0, 9.0 Hz) (Massiot *et al.*, 1990). La identificación de las señales de los carbonos C-1 de los residuos ácidos (jal, mb, nl y tg) se hizo mediante la observación de las conectividades ($^2J_{C-H}$) en el espectro HMBC de éstos núcleos con sus protones adyacentes en cada residuo; *e.g.* H-2 del mb (δ 2.42) con su señal del centro C-1 (δ 176.38) y en el caso del niloilo y del 2-metilbutanoilo, las señales de los carbonos C-1 de ambos se localizaron en el mismo desplazamiento (δ 176.38). Se estableció la secuencia de glicosidación a partir de las correlaciones $^3J_{C-H}$ observadas en el espectro HMBC, donde se aprecia que, así como las orizabinas V(3)-XXI (19) y los ésteres purgicos A (26) y B (27), el primer monosacárido unido en la posición C-11 de la aglicona es la quinovosa que es deducido desde la correlación del H-1 (δ 4.69) de este azúcar con el C-11 (δ 172.8) de la aglicona (fig. A4).

Cuadro A1. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H y ^{13}C de la soldanelita para la región oligosacárida^a.

| Posición ^b | δ ^1H (500 MHz ^a) | δ ^{13}C (125 MHz ^a) |
|-----------------------|---|--|
| Qui-1 | 4.69 d (7.0) | 103.63 |
| 2 | 4.22 dd (9.0, 9.0) | 80.74 |
| 3 | 4.25 dd (9.0, 9.0) | 79.13 |
| 4 | 3.55 dd (9.0, 9.0) | 76.71 |
| 5 | 3.60-3.55 * | 72.28 |
| 6 | 1.58 d (6.0) | 18.32 |
| Glu-1 | 5.67 d (8.0) | 101.54 |
| 2 | 4.11 dd (8.0, 8.0) | 76.43 |
| 3 | 4.28 dd (9.0, 8.0) | 84.85 |
| 4 | 3.84 dd (9.0, 9.0) | 70.07 |
| 5 | 3.71 ddd (9.0, 6.0, 2.5) | 77.16 |
| 6 | 4.11 dd (11.5, 6.0) | 62.98 |
| | 4.37-4.32 * | |
| Glu'-1 | 5.24 d (8.5) | 99.83 |
| 2 | 5.55 dd (10.0, 8.5) | 72.80 |
| 3 | 5.88 dd (10.0, 10.0) | 76.04 |
| 4 | 4.20 dd (10.0, 9.5) | 70.06 |
| 5 | 4.04 ddd (9.5, 5.0, 2.0) | 78.25 |
| 6 | 4.35-4.30 * | 61.48 |
| | 4.42 dd (11.5, 2.0) | |
| Ram-1 | 5.86 * | 97.62 |
| 2 | 5.93 dd (3.5, 1.5) | 72.88 |
| 3 | 4.79 dd (9.5, 3.5) | 68.40 |
| 4 | 5.76 dd (10.0, 9.5) | 75.48 |
| 5 | 5.22 dq (10.0, 6.0) | 66.92 |
| 6 | 1.56 d (6.0) | 17.64 |

Cuadro A2. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H y ^{13}C de la soldanelita para la aglicona y los residuos ácidos^a.

| Posición ^b | δ ^1H (500 MHz ^a) | δ ^{13}C (125 MHz ^a) |
|-----------------------|---|--|
| jal-1 | | 172.84 |
| 2 | 2.72 | 33.90 |
| 11 | 3.72 m | 82.01 |
| 16 | 0.85 t (7.5) | 14.16 |
| mb-1 | | 176.38 |
| 2 | 2.41 tq (7.0, 7.0) | 41.51 |
| 2Me | 1.12 d(7.0) | 16.65 |
| 3Me | 0.89 t (7.5) | 11.65 |
| nl-1 | | 176.38 |
| 2 | 2.99 dq (7.0, 7.0) | 48.00 |
| 3 | 4.40-4.32 * | 70.36 |
| 2Me | 1.52 d (6.5) | 13.47 |
| 3Me | 1.48 d (6.5) | 21.38 |
| tg-1 | | 167.58 |
| 2 | | 128.20 |
| 3 | 7.29 qq (6.5, 1.5) | 138.30 |
| 2Me | 1.90 d (1.5) | 12.43 |
| 3Me | 1.69 dd(7.0, 1.5) | 14.33 |

^{a, b}. Ver los cuadros 2 y 3.

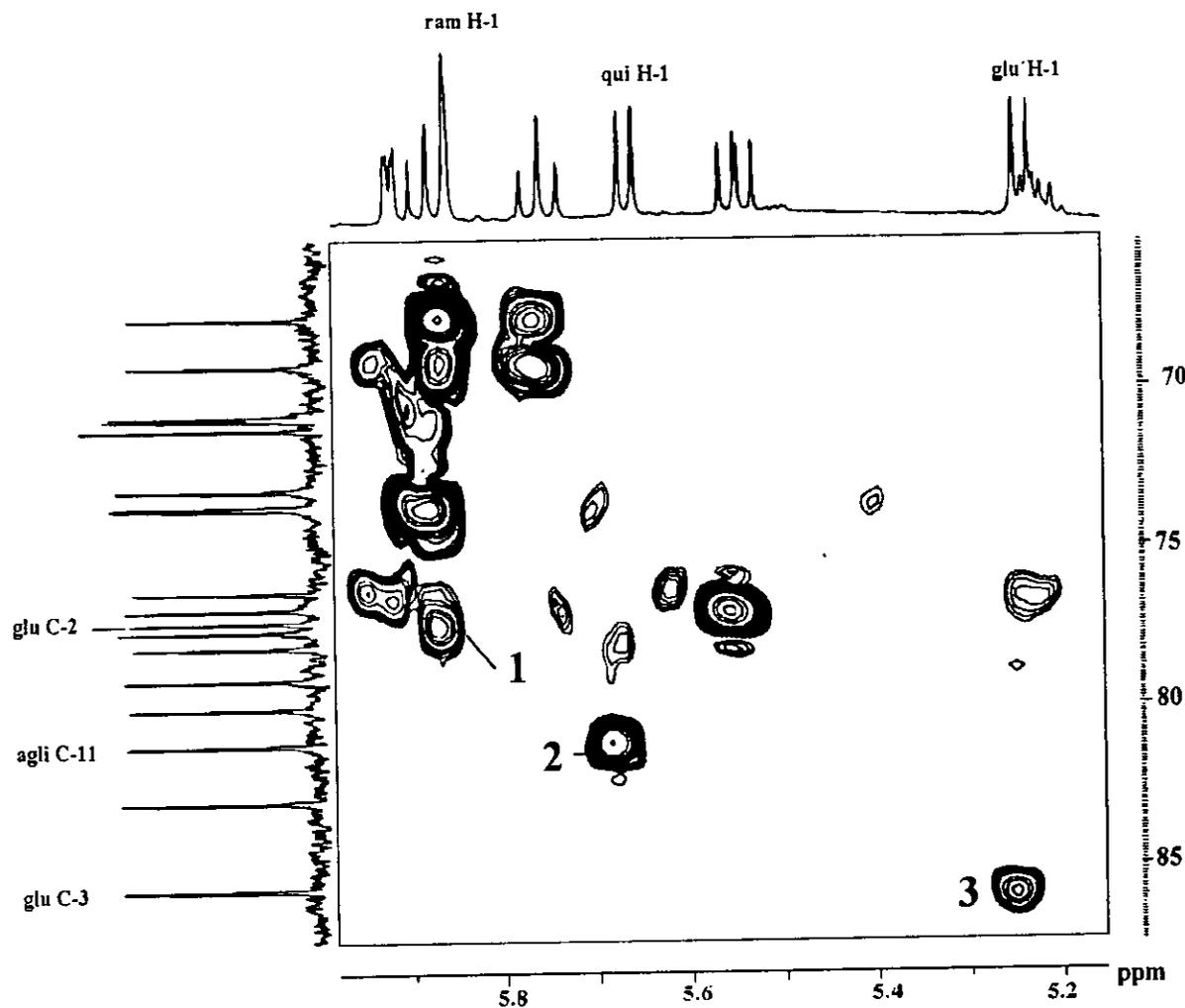


Figura A4. Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la soldanelita. Conectividades ($^3J_{C-H}$): 1; C₂glu–H₁ram, 2; C₁₁agl–H₁qui y 3; C₃glu–H₁glu'.

Las correlaciones restantes presentes en el espectro HMBC fueron las siguientes:

a) la señal del carbono C–1 de una de las unidades de glucosa interna (glu) con el H–2 de la quinovosa (qui), b) la resonancia del núcleo C–1 de la ramnosa (ram) con H–2 de la glucosa interna (glu) y c) la señal C–1 de la unidad de glucosa externa (glu') con la correspondiente al H–3 de la quinovosa (figs. A4 y A5).

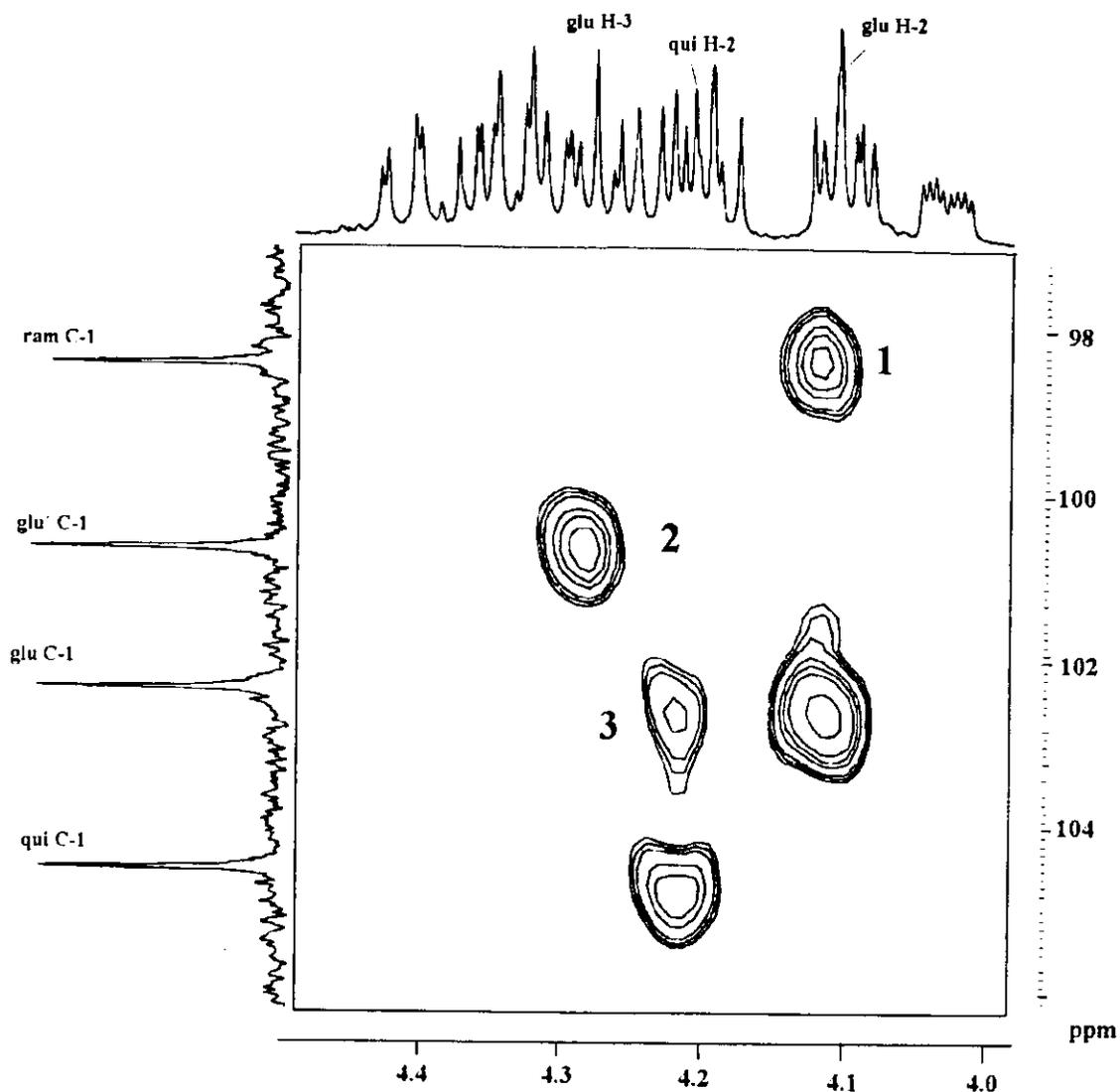


Figura A5. Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la soldanellita. Conectividades ($^3J_{C-H}$): 1; C₁ram–H₂glu, 2; C₁glu'–H₃qui y 3; C₁glu–H₂qui.

En la sección del espectro HMBC de la figura A6 se ilustra la determinación de los sitios de acilación para el tigloilo (tg) y para la aglicona (agl), cuyas señales de los carbonos C–1 (δ 167.58 y 172.84) presentaron conectividades con las resonancias de los hidrógenos H–4 (δ 5.76) de la ramnosa (ram) y H–2 (δ 5.55) de la glucosa externa (glu'), respectivamente. Este no fue el caso de los residuos niloilo y 2-metilbutanoilo y por lo tanto, las correlaciones mostradas en el espectro HMBC no son concluyentes para los protones H–3 de la glucosa externa (δ 5.88) y H–2 de la ramnosa (δ 5.93).

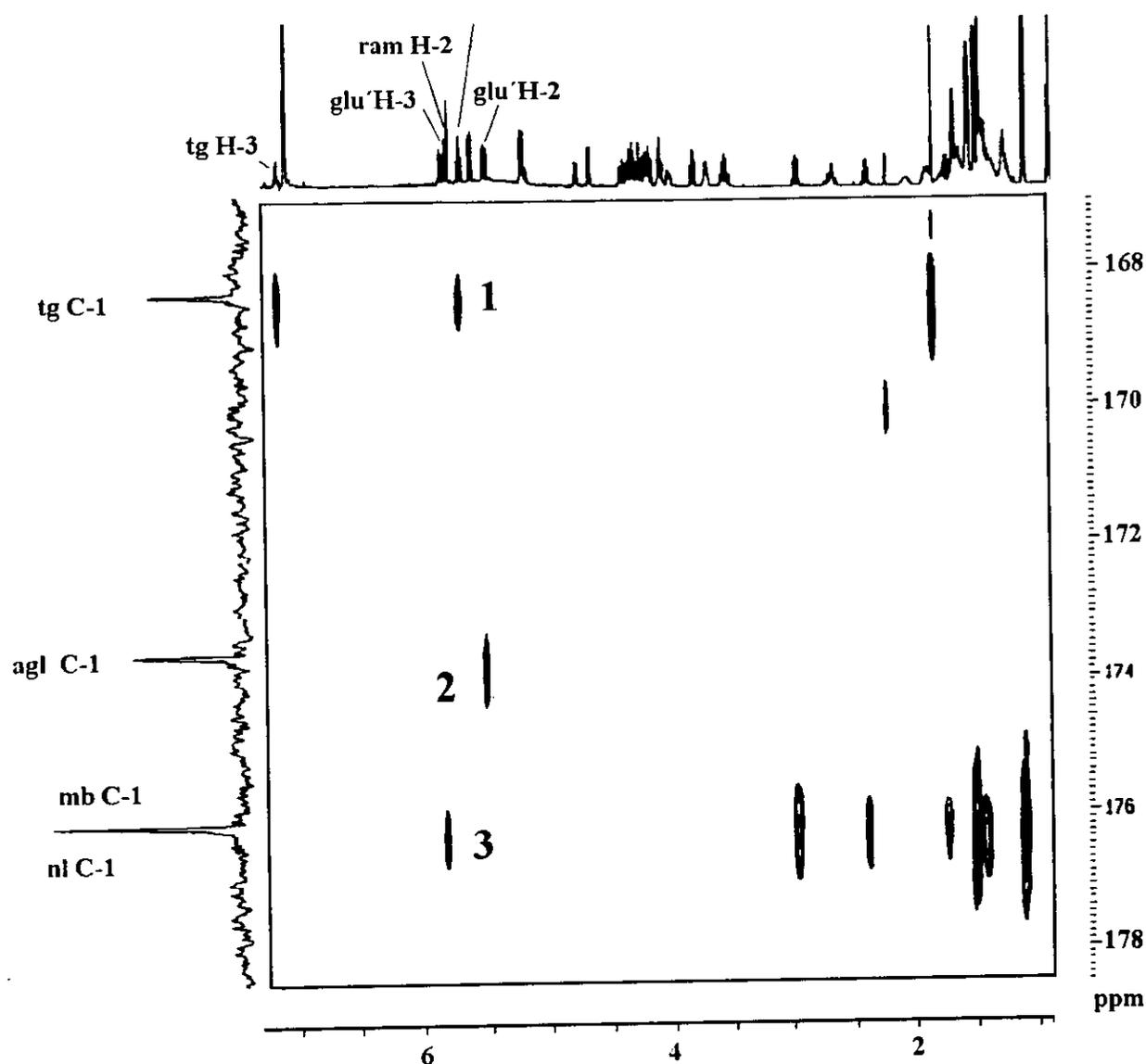


Figura A6. Sección del espectro HMBC de la soldanelita para la determinación de los sitios de acilación. Conectividades: 1; $C_1\text{tg}-H_4\text{ram}$, 2; $C_1\text{agl}-H_2\text{glu}'$ y 3; $C_1\text{mb}/C_1\text{nl}-H_2\text{ram}/H_3\text{glu}'$. Abreviaciones: tg = tigloilo, ram = ramnosa, agl = aglicona, glu' = glucosa externa, mb = 2-metilbutanoilo y nl = niloilo. C_5D_5N .

La determinación de las posiciones de los residuos niloilo y 2-metilbutanoilo (mb) se hizo a partir del análisis del espectro ROESY de la figura A7, donde se observa la correlación que existe entre la señal del grupo 2CH_3 (δ 1.52) del niloilo con el H-3 (δ 5.88) de la glucosa externa (glu'), por lo tanto, el residuo mb se encuentra en la posición C-2 de la ramnosa. Otra correlación observada en esta misma figura es la producida entre

el hidrógeno H-1 (δ 5.86) de la ramnosa y las correspondientes a los del CH₂ de la aglicona (δ 3.72).

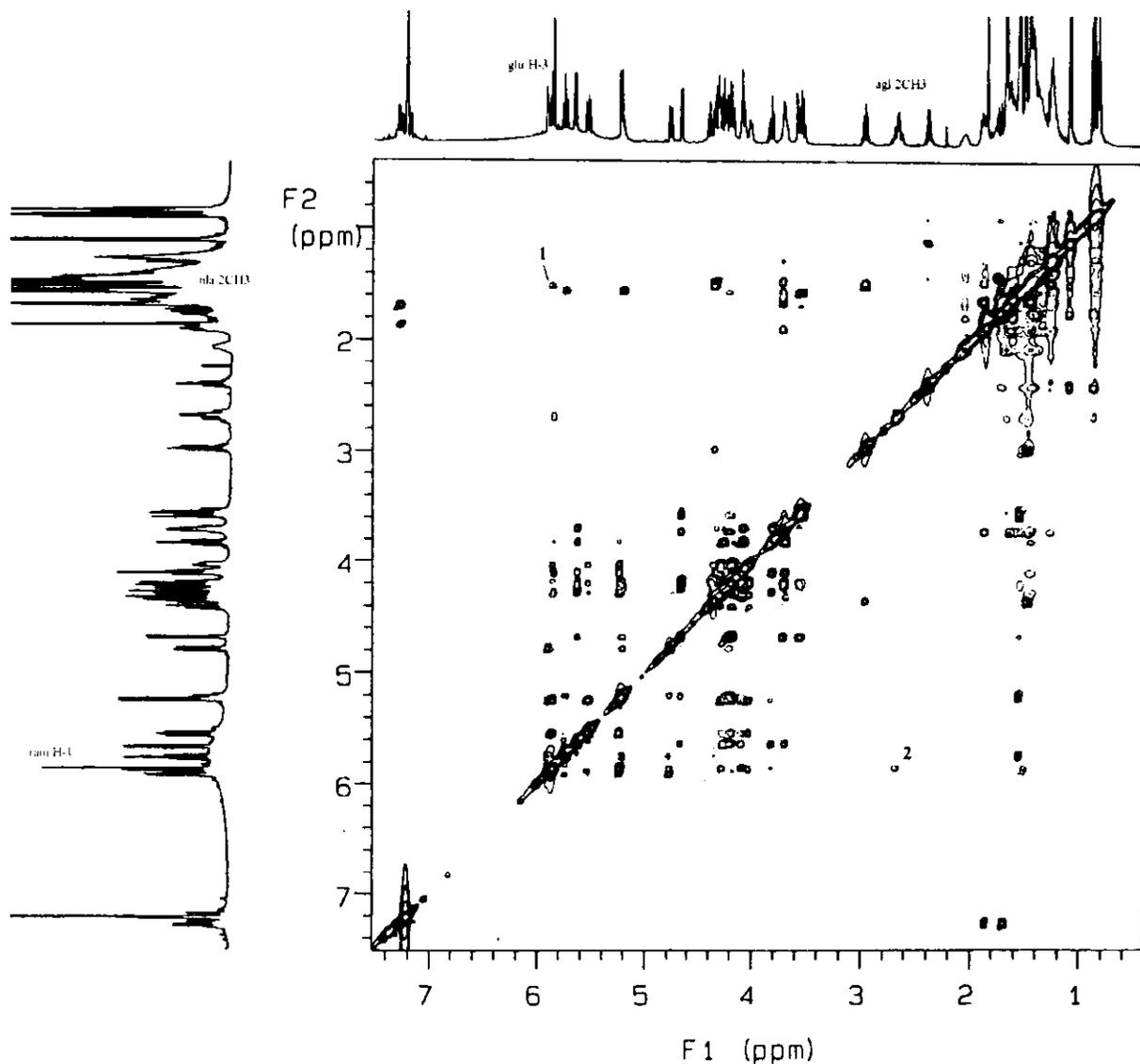


Figura A7. ROESY de la soldanelita. Conectividades: 1; 2CH₃nl-H₃glu' y 2; H₁ram-2CH₃agl. Abreviaciones: nl = niloilo, ram = ramnosa y agl = aglicona. C₅D₅N, 500 MHz.

En la figura A8 se pueden apreciar mas correlaciones que sustentan la secuencia de glicosidación propuesta para este compuesto además de la debida al H-5 (δ 5.22) de la ramnosa (ram) con el H-1 (δ 4.69) de la quinovosa (qui) que junto con la previamente descrita en la figura A7 (2) sugieren que el anillo de la ramnosa esta orientado como se ilustra en la figura A9.

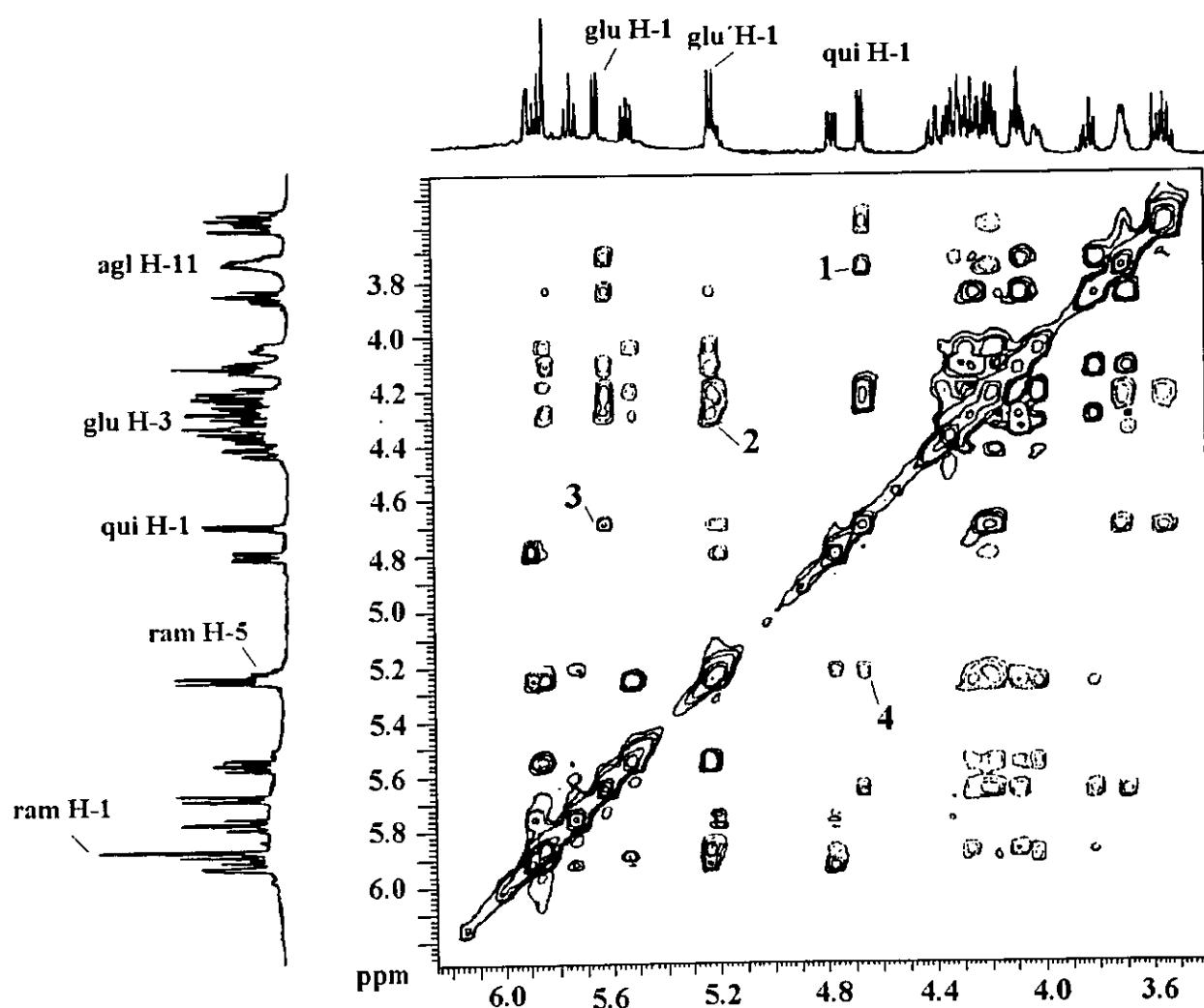


Figura A8. Sección del espectro ROESY para la región oligosacárida de la soldanelita. Conectividades: 1; $H_{11}agl-H_1qui$, 2; H_3glu-H_1glu' , 3; H_1qui-H_1glu y 4; H_5ram-H_1qui . C_5D_5N .

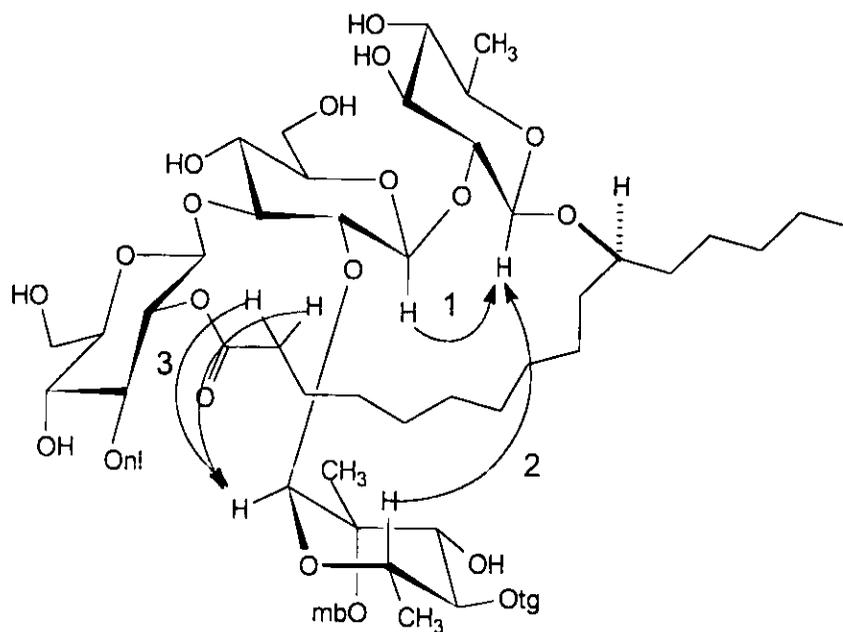


Figura A9. Correlaciones observadas en el espectro ROESY para mostrar la orientación del anillo de la ramnosa en la soldanelita. 1; H₁qui-H₁glu, 2; H₁₁agl-H₅glu' y 3; CH₂agl-H₁glu'. Abreviaciones: qui = quinovosa. glu = glucosa, agl = aglicona, glu' = glucosa externa, mb = 2-metilbutanoilo, nl = niloilo y tg = tigloilo.

Entonces después de analizar los datos espectroscópicos y espectrométricos de propuso la estructura de la soldanelita como la del éster intramolecular 1,3'' {[O-6-desoxi-2-O-(2-metil-1-oxo-butil)-4-O-(1-oxo-tigilil)-α-L-manopiranosil-(1→3)-O-[(3-O-hidroxi-2-metil-1-oxo-butil)-β-D-glucopiranosil-(1→3)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-6-desoxi-β-D-glucopiranosil] oxi} del ácido 11-hidroxihexadecanoico.

8. Bibliografía

Agrawal, P.K. (1992). NMR Spectroscopy in the structural elucidation of Oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*, **31**, 3307-3330.

Agrawal, P.K. y Pathak, K.A. (1996). Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopic Approach for the Determination of Interglycosidic Linkage and Sequence in Oligosaccharides. *Phytochemical Analysis*, **7**, 113-130.

Amor-Prats, D. y Harborne, J.B. (1993). Allelochemical effects on ergoline alkaloids from *Ipomoea parasitica* on *Heliothis virescens*. *Chemoecology*, **4**, 55-61.

Anaya, A. L.; Calera, M.R.; Mata, R. y Pereda-Miranda, R. (1990). Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*, **16**, 2145-2152.

Bah, M. y 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.

Bah, M. y 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.

Bah, M. (1997). Aplicación de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (FAB) de alta resolución en la elucidación estructural de las Tricolorinas A-J, oligosacáridos aislados de las resinas de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM, México, pp 292.

Baldwin, M.A. (1995). Modern Mass Spectrometry in Bioorganic Analysis. *Natural Products Reports*, 35-44.

Bieber, L.W.; Da Silva Filho, A.A.; Correa-Lima, R.M.O.; De Andrade-Chiappeta, A.; Carnero Do Nascimento, S.; De Souza, I. A.; De Mélo, J.F. y Jürgen-Veith, H. (1986). Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry*, **25**, 1077-81.

Bidlingmeyer, B. A. (1992). Practical HPLC Methodology and applications. John Wiley, Nueva York, pp. 269-283.

Boog, A.L.G.M.; Roos, R R. y Peters, A.L.J. (1991). δ Lactone manufacture from Jalap resin hydrolyzates with yeast. *Eur Pat Appl EP*, 409, 321.

- Botz, L., Hahn, E. y Szabo, L. G. (1990-1991). Botanical identification of *Ipomoea tricolor* Cav. Seed samples from Hungary and layer chromatographic examination of their hallucinogen ergot alkaloids. *Acta Bot Hung.* **36**, 229-43
- Chao, J-M. y DerMarderosian, A.H. (1973). Identification of the ergoline alkaloids in the genus *Argyreaia* and related genera and their chemotaxonomic implications in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, **12**, 2435-2440.
- Contreras, C.M.; Chacón, L. y Enríquez, R.G. (1996). Anticonvulsant properties of *Ipomoea stans*. *Phytomedicine*, **3**, 41-44.
- Costello, C.E. (1997). Time, life...and mass spectrometry. New techniques to adress biological questions. *Biophysical Chemistry*, **68**, 173-188
- Cruz-Bailon, H. (1998) Estudio Fitoquímico preliminar de la resina de *Ipomoea purga*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 60.
- Cruz, M. de la (1964) Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis (Codice Badiano). Instituto Mexicano del Seguro Social, México.
- Dagne, E.; VanWyk, B.; Stephenson, D. y Steglich, W. (1996) Three oxantrones from *Aloe littoralis*. *Phytochemistry*, 1683-1687.
- Dale, J.A. y Mosher, H.S. (1973) Nuclear Magnetic Resonance Enantiomer Reagents. Configurational Correlations via Nuclear Magnetic Resonance Chemical Shifts of Diastereomeric Mandelate, *O*-Methyl mandelate and α -Mehtoxy- α -trifluoromethyl phenylacetate (MTPA) Esters. *Journal of Am Chem Soc.* **95**, 512-519.
- Dass, Ch. (1996). The role of a Liquid Matrix in Controlling FAB-Induced Fragmentation. *J. Mass spectrom.* **31**, 77-82.
- Dell, A. (1987). F.A.B.-Mass spectrometry of carbohydrates. En: R.S. Tipson y D. Horton (eds). *Advances Carbohydrates Chemistry*. Academic Press, vol. 45, pp. 19-72.
- Díaz, J.L. (1976). Uso de las plantas medicinales de México. Monografías Científicas II. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A.C., México, pp. 66-67.
- Domon, R.; Mueller, D.R. y Richter, W.J. (1994) Tandem Mass Spectrometric Analysis of Fixed-charge Derivatized Oligosaccharides. *Org. Mass Spectrom.* **29**, 713-719.
- Du, X., Kohinata, K., Kawasaki, T., Guo, Yong-Tian y Miyahara, K. (1998). Components of the ether-insoluble resin glycoside-like fraction from *Cuscuta chinensis*. *Phytochemistry*, **48**, 843-850.

- Du, X., Sun, N., Nishi, M., Kawasaki, T., Guo, Y. y Miyahara, K. (1999). Components of the ether-insoluble Resin Glycoside Fraction from the seed of *Cuscuta australis*. *J. Nat. Prod.* **62**, 722-725.
- Enriquez, R. G.; León, I.; Pérez, F.; Walls, F.; Carpenter, K. A.; Puzzuoli, F. V. y Reynolds, W.L. (1992). Characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of a complex tetrasaccharide glycoside isolated from *Ipomoea stans*. *Canadian Journal of Chemistry*, **70**, 1000-1008.
- Fürster, A. y Müller, T. (1998) Metathesis Route to Resin Glycosides: Formal Total Synthesis of Tricolorin A. *J. Org. Chem.*, **63**, 424-425.
- Garozzo, D.; Giuffrida, M.; Impallomeni, G.; Ballistreri, A. y Montaudo, G. (1990). Determination of Linkage Position and Identification of the Reducing End in Linear Oligosaccharides by Negative Ion Fast Atom Bombardment Mass Spectrometry. *Anal Chem.* **62**, 279-286.
- Geran, R.I.; Greenberg, M.M.; McDonald, M. M.; Schumacher, A.M. y Abbott, B. (1972). *J. Cancer Chemother. Rep.* Part. 3, 1.
- Ghebregzabher, M.; Rufini, S.; Monaldi, B. y Lato, M. (1976). Thin-layer Chromatography of carbohydrates. *Journal of Chromatography*, **127**, 133-162.
- Hara, S.; Okabe, H. y Mihashi, K. (1987) Gas-Liquid Chromatographic Separation of Aldose Enantiomers as Trimethylsilyl Ethers of Methyl 2-(Polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4(R)-carboxilates. *Chem Pharm Bull.*, **35**, 501-506.
- Henrici, A.; Kaloga, M. y Eich, E. (1994). Jacpaniculines, the first lignanamide alkaloids from the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, **37**, 1637.
- Hostettmann, K; Hostettmann, M. y Marson, A. (1986) Preparative Chromatography techniques. Applications in Natural Products Isolation. Springer-Verlag, Berlin, pp- 37-40.
- Jenett-Siems, K.; Kaloga, M., y Eich, E. (1993). Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, **34**, 437-440
- Jenett-Siems, K., Kaloga, M. y Eich, E. (1994a) Ergobalansine/ergobalansinine, a proline free peptyde-type alkaloid of the fungal genus *balansia* is a constituent of *Ipomoea piurensis*. *Journal of Natural Products*, **57**, 1304-1306.
- Jenett-Siems, K., Kaloga, M. y Eich, E. (1994b). Hygrines and tropanes, alkaloids of considerable importance for the chemotaxonomy of the Convolvulaceae. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **2**, 122.

Jiang, Z-H; Geyer, A. y Schidt, R.R. (1995) The macrolidic Glycolipid Calonyctin A, a plant growth regulator: Synthesis, Structural Assignment and Conformational Analysis in Micellar Solution. *Angew Chem Int Ed Engl.*, **34**, 2520-2523.

Kitagawa, I.; Shibuya, H., Yokokawa, Y., InBaek, N., Ohashi, K., Yoshikawa, M.; Nitta, A. y Wiriadinata, H. (1988). Structures of Merremosides B and D, New antiserotonic Resin-Glycosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an Indonesian folk medicine. *Chem. Pharm Bull.* **36**, 1618-1621.

Kitagawa, I.; InBaek, N., Ohashi, K.; Sakagami, M.; Yoshikawa, M. y Shibuya, H. (1989). Merremosides B and H. New Ionophoric Resin Glicosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an Indonesian folk medicin. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1131-1133.

Kitagawa, I.; In Baek, N.; Kawashima, K., Yokokawa, Y.; Yoshikawa, M.; Ohashi, K. y Shibuya, H. (1996a). Indonesian Medicinal Plants.XV. Chemical Structures of five New Resin-Glycosides, Merremosides a, b, c, d and e, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1680-1692.

Kitagawa, I.; In Baek, N., Yokokawa, Y.; Yoshikawa, M.; Ohashi, K. y Shibuya, H. (1996b). Indonesian Medicinal Plants.XVI. Chemical Structures of four New Resin-Glycosides, Merremosides f, g, h₁ and h₂, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 1693-1699.

Kogetsu, H.; Noda, N.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1991). Scammonin III-VI, resin Glycosides of *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*, **30**, 957-963.

Kubo, I. y Nakatsu, T. (1990). Recent examples of preparative-scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. *LC-GC*, **8**, 933-939.

Larson D.P. y Heathcock C.H. (1996), Synthesis of the Macrolactone Disaccharide Subunit of Tricolorin A. *J. Org. Chem*, **61**, 5208-5209.

Lehmann, C.W.; Fürstner, A. y Müller, Th. (2000) Macrocyclic substructure of tricolorin A- The first crystal structure of a resin glycoside. *Z. Kristallogr.* **215**, 114-117.

Linajes A.; Rico-Gray, V. y Carrión, G. (1993). Traditional production System of the Root of Jalapa, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, México. *Economic Botany*, **48**, 84-89.

Listinsky, J.J., Siegal, G.P. y Listinsky, C.M. (1998). Alpha-L-fucose: a potentially critical molecule in pathologic processes including neoplasia. *Am. J. Clin. Pathol.*, **110**, 425-440.

- Likhiywitayawuid, K., Angerhofer, C.K., Cordell, G.A.; Pezzuto, J.M. y Ruangrunsi, N. (1993). Cytotoxic and Antimalarial Bisbenzylisoquinoline Alkaloids from *Stephania erecta*. *J. Nat. Prod.*, **56**, 30.
- Lowry, O. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, A. L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* **193**, 265-275.
- Lu, S., O'yang, Q.; Guo, Z.; Yu, B. y Hui, Y. (1997). The First Total Synthesis of Tricolorin A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, **36**, 2344-2346
- MacLeod J.K. y Ward A. (1997). Structural Investigation of Resin Glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *J. Nat. Prod.*, **60**, 467-471.
- Madhusudanan, K. P. (1998). Formation of Radical Anion Adducts between Dihydroxybenzenes and the Matrix Under Fast Atom Bombardment. *J. Mass Spectrom.* **33**, 173-182.
- Mannich, C. y Schumann, P. (1938). Jalap resin and its principal constituents. *Archiv der Pharmazie*, **276**, 211-226.
- Martínez, M. (1969). Las plantas medicinales de México. Botas-México, pp. 276-279.
- Martínez, M. (1959). Plantas útiles de la flora mexicana. Botas-México, pp. 539-542.
- Maskens, K. y Polgar, N. (1973) Studies in the Stereochemistry of 2-Alkyl-3-hydroxy and 2-Alkyl-3-methoxy-butiric Acids. *J.C.S. Perkin I*, 109-115.
- Massiot G.; Lavaud, C. y Benson, V.(1990). Couplage RMN á longue distance entre protons dans les pyranoses. Mise en évidence et applications. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 440-445.
- Massiot, G.; Chen, XF.; Lavaud, C.; Le Men-Olivier, L.; Delaude, C.; Viari, A.; Vigny, P y Duval, J. (1992). Saponins from Steam bark of *Petersianthus Macrocarpus*. *Phytochemistry*, **31**, 3571-3576.
- McDonald, A. (1991). Origin and Diversity of Mexican Convolvulacea. *Anales Inst. Biol. Univ. Autón. México, Sec. Bot.* **62**, 65-82.
- Miyahara, K.; Du, X., Watanabe, M.; Sugimura, C.; Yahara, S. y Nohara, T. (1996). Resin glycosides. XXIII. Two novel acylated trisaccharides related to resin glycoside from the seeds of *Cuscuta chinensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **44**, 481-485.
- Monardes, N. (1565). Historia medicinal de las cosas que traen de nuestras Indias Occidentales que sirven en la medicina. Sevilla, España.

- Mulroney, B.; Peel, B. y Traeger, J.C. (1999). Relative Gas-phase Acidities of Glucopyranose from Moleccular Orbital Calculations. *J. Mass spectrom*, **34**, 544-553.
- Navarro-Ruiz, A.; De la Mora, G.; Villanueva-Michel, M.T. y Domínguez-Rodríguez, R.J. (1996). Anticonvulsivant effect of aqueous, hydroalcohol and chloroform extracts from *Ipomoea stans* root in the rat. *Phytotherapy Research*, **40**, 242-244.
- Noda, N.; Ono, M.; Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1987). Resin Glycosides I. Isolation and structure elucidation of Orizabin I, II, III and IV. Genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *Tetrahedron*, **43**, 3889-3902.
- Noda, N.; Kobayashi, H.; Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988a). Resin glycosides II. Identification and Characterization of the Component organic and Glycosidic acids of the crude Resin Glycoside from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 627-633.
- Noda, N.; Kobayashi, H. y Kawasaki, T. (1988b). Resin Glycosides III. Isolation and Structural Study of genuine resin Glycosides, Muricatins I-VI, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 920-929.
- Noda, N.; Nishi, M.; Miyahara, K. (1988c). Resin Glycosides IV. Two new resin Glycosides. Muricatins VII and VIII from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 1707-1713.
- Noda., N.; Kogetsu, H.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990). Scammonins I and II, the resin glycosides of radix scammoniae from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*, **29**, 3565-3569.
- Noda, N.; Yoda, S.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992a). 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.
- Noda, N.; Kogetsu, H.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992b). Scammonins VII and VIII, two resin glycosides from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*, **31**, 2761-2766.
- Noda, N.; Takahashi, T.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. y Yang, CR. (1994a). Stoloniferins I-VII, Resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry*, **36**, 365-371.
- Noda, N.; Tsuji, K.; Miyahara, K. y Yang, C-R. (1994b). 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.
- Noda, N.; Tsuji, K.; Kawasaki, T.; Miyahara, K.; Kanazono, H. y Yang, C-R. (1995). A novel resin glycoside, merremin (tuguajalapin X dimer) from *Merremia hungaiensis*. *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 1061-1063.

Noriega, J. M. (1903). Estudio comparativo entre la verdadera y la falsa jalapa. *anales del Instituto Nacional Mexicano* **6**:111-120.

Ohtani, I.; Kusumi, T.; Kashman, Y. y Kakisawa, H. (1990) High-Field FT NMR Application of Mosher's Method. The Absolute Configuration of Marine Terpenoids. *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 4092-4096.

Okabe, H.; Koshito, N.; Tanaka, K. y Kawasaki, T. (1971). Studies on resin glycosides. II. Unhomogeneity of "pharbitic acid" and isolation partial structures of pharbitic acids C y D, the major constituents of "Pharbitic acid". *Chem. Pharm. Bull.*, **19**, 2394-2403.

Ono, M.; Kubo, K.; Mikiyohara, K. y Kawasaki, T. (1989a). Operculin I and II, new ether soluble resin glycosides ("jalapin") with fatty acid ester groups from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea operculata*) *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 241-244.

Ono, M.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1989b). Resin Glycosides V. Identification and Characterization of the Component Organic and Glycosidic Acids of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides ("Jalapin") from Rhizoma Jalapae Braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 3209-3213.

Ono, M.; Fukunaga, T.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990a). Resin Glycosides VIII. Four new Glycosidic Acids, Operculinic Acids D, E, F y G, of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides ("Jalapin") from Rhizoma *Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea Operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, **36**, 2650-2655.

Ono, M.; Noda, N.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990b). Resin Glycosides.VII. Reinvestigation of the Component Organic and Glycosidic Acids of Pharbitin, the Crude Ether-Insoluble Resin Glycoside ("Convolvulin") of *Pharbitis Semen* (Seeds of *Pharbitis nil*). *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 1892-1897).

Ono, M.; Nishi, M.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990c). Resin Glycosides IX. Operculins I, II, V, VII and VIII. New Ether-Soluble resin Glycosides of the Rhizoma *Jalapae braziliensis* (the roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2986-2991.

Ono, M.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1991). Resin glycosides XI. Operculins II, 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.

Ono, M.; Fujimoto, K.; Kawata, T.; Fukunawa, T.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992a). Resin Glycosides XII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from Rhizoma *Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1400-1403.

Ono, M.; Kuwabata, K.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992b). Resin Glycosides XVI. Quamoclins I-IV, new ether-soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 2674-2680.

Ono, M.; Yamada, F.; Noda, N.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1993a). Resin Glycosides XVIII. Determination by Mosher's Method of the Absolute Configurations of Mono and Dihydroxy fatty Acids originated from Resin Glycosides. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1023-1026.

Ono, M.; Nakagawa, T.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1993b). Woodrosins I and II, Ether-Insoluble resin Glycosides from the stems of *Ipomoea tuberosa*. *Chem. Pharm. Bull.*, **41**, 1925-1932.

Ono, M.; Honda, F.; Karahashi, A.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1997). Resin Glycosides XXV. Multifidins I and II, New Jalapins, from the seed of *Quamoclit x multifida*. *Chem. Pharm. Bull.*, **45**, 1995-1960.

Osuna, L.; Ponce-Monter, H.; Campos, G. M.; Rojas, J. y Meckes, M. (1996). Effect of *Ipomoea intrapilosa* methanol extract on the serotonergic response in rat uterus. *Phytotherapy Research*. **10**, 257-259.

Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; Anaya, A.L.; Winckramaratne, D.B.M.; Pezuto, J. M. y Kinhorn, A.D. (1993). Tricolorin A, major phytochemical inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.*, **56**, 571-582.

Pereda-Miranda, R. (1995). Bioactive Natural Products from traditionally used Mexican Plants. En J.T. Arnason (ed.). *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press. New York, pp. 83-112.

Perlin, A.S. y Casu, B. (1969). Carbon-13 and Proton Magnetic Resonance spectra of D-glucose-¹³C. *Tetrahedron Letters*, **34**, 2921-2924.

Perusquía, M.; Mendoza, S.; Bye, R.; Linares, E. y Mata, R. (1995). Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology*, **46**, 63-69.

Power, F. B. y Rogerson H. (1912). Chemical examination of the root of *Ipomoea orizabensis*. *J. Chem. Soc.*, **101**, 1-26.

Ragunathan, V.; Sulochana, N. (1994). A new flavone glycoside from flowers of *Ipomoea purpurea* Roth. *Indian J. Chem Sect B; Org. Chem. Ind. Med. Chem.*, **33B**, 507-8.

Reinhold, V.N.; Reinhold B.B. y Costello, C.E. (1995). Carbohydrate Molecular Weight profiling, Sequence, Linkage and Branching Data: ES-MS and CID. *Anal. Chem.*, **67**, 1772-1784.

Reynolds, F. W.; Yu, M.; Enríquez, R.G.; González, H.; León, I.; Magos, G. y Villarreal, M.L. (1995). Isolation and Characterization of Cytotoxic and Antibacterial Tetrasaccharide Glycosides from *Ipomoea stans*. *J. Nat. Prod.*, **58**, 1730-1734.

Rieres, M.J.; Hui, Y.; Rupprecht, J.K.; Koalowski, J.L.; Wood, K.V.; McLaughlin, J.L.; Hanson, P.R.; Zhuang, Z. y Hoye, T.R. (1992). Determination of Absolute Configuration of Stereogenic Carbinol Centers in Annonaceous Acetogenins by ^1H and ^{19}F NMR Analysis of Mosher Ester Derivatives. *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 10203-10213.

Roos, R. y Baker J. (1991). Process for the isolation of hydroxy fatty acid derivatives from convolvulaceae plants. *Eur. Pat. Appl. E. P.*, **409**, 320.

Sarin, J.P.S.; Hari, G.S.; Nandu, K.M. y Dhar, M. M. (1973). Ipolearósido: A new glycoside from *Ipomoea leari*, with anti-cancer activity. *Phytochemistry*, **12**, 2461-2468.

Schimming, T.; Tofern, B.; Mann, P.; Richter, A.; Jenett-Siems, K.; Dráger, B.; Asano, N.; Gupta, P.; Correa, D.M. y Eich, E. (1998). Distribution and Taxonomic significance of Calystegines in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, **49**, 1989-1995

Seibl, J. Espectrometría de masas, 1^{ra} ed., Alhambra, 1973.

Shibuya, H.; Kawashima, K.; InBaek, N.; Narita, N.; Yoshikawa, M. y Kitagawa, I. (1989). Synthesis of (11S)-(+)-and (11R)-(-) jalapinic acids. A revision of Chemical Structures of merremosides B and D. *Chem. Pharm. Bull.*, **37**, 260-262.

Shu, Y.Z. (1998). Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J. Nat. Prod.*, **61**, 1053-1071.

Singh, S. y Stacey, B.E. (1973). A new β -D-quinóvoside from Commercial *Ipomoea purga*. *Phytochemistry*, **12**, 1701-1705.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bakesch, H.; Kenney, S. y Boyd, M.R. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, **82**, 1107-1112.

Sosa-Vasquez, F. (1993). Estudio Fitoquímico preeliminar de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*). Tesis de Licenciatura. Universidad "Benito Juárez" de Oaxaca. Nota. Posteriormente a este trabajo se determinó que la planta estudiada correspondía a *Ipomoea orizabensis*.

Srivastava, R. y Kassum, S. (1991). Structure of pescaproside E, a fatty acid glycoside from *Ipomoea pescaprae*. *Carbohydrate Research*, **212**, 169.-176.

Stauffacher, D.; Tschertter H. y Hofmann, (1965). Isolierung von Ergosin and Ergosinin neben Agroclavin aus den Samen von *Ipomoea argyrophylla* VATKE (Convolvulaceae) *Hel. Chim. Acta*, **48**, 1379-1380.

Suffness, M. y Pezzuto, J.M. (1991). Assays related to cancer drug discovery. En: K. Hostemann (ed). *Methods in Plant Biochemistry. Assays for Bioactivity*, Vol. 6, Academic press, Great Yarmouth, Norfolk. pp. 71-133.

Tai, A. e Imada, M. (1978) The stereochemical of 3-Hydroxy-2-methylbutiric Acid. *Bull Chem Soc Jap*, **51**, 1114-1117.

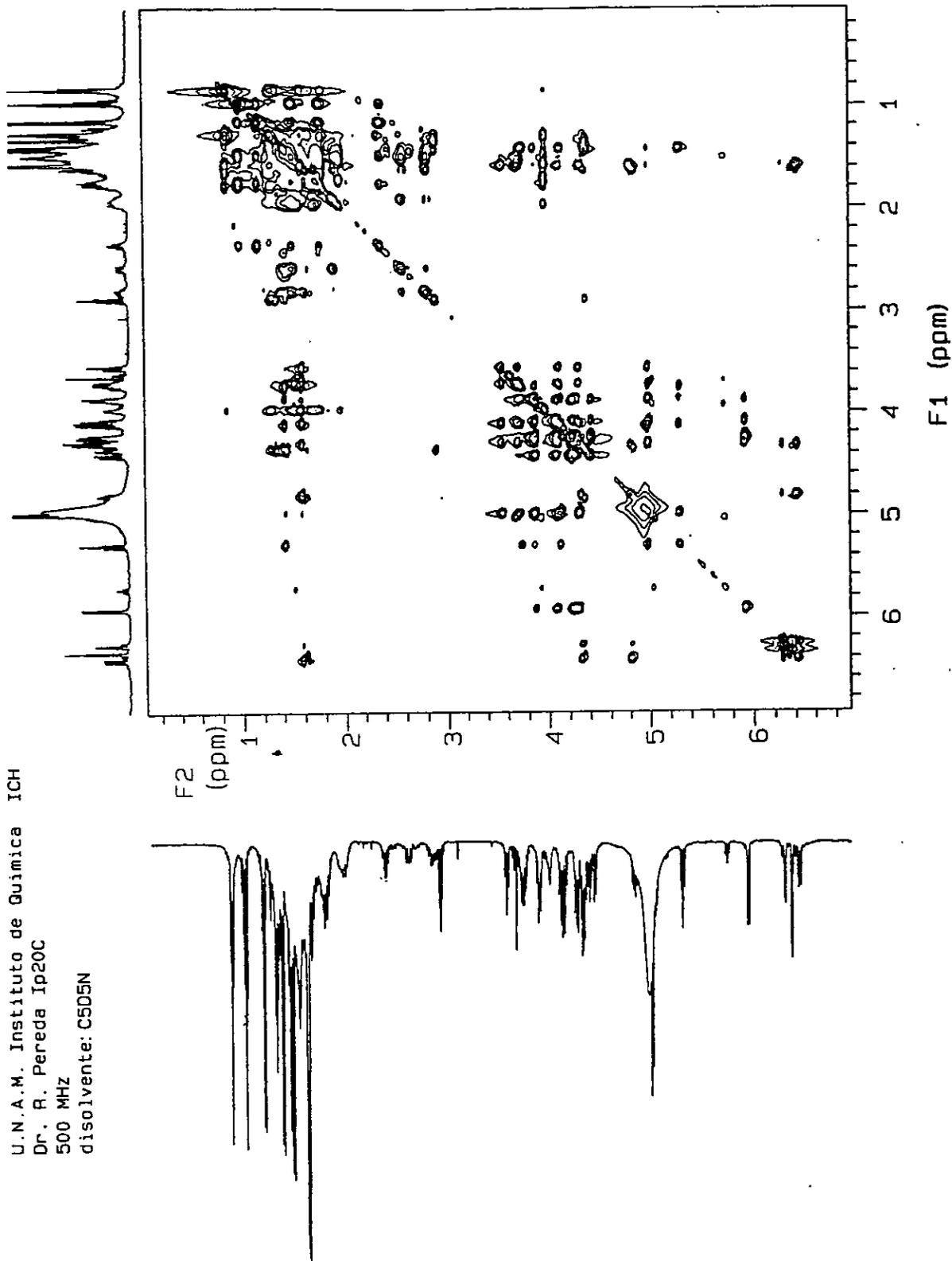
Tyler, E.V.; Brady, R.L. y Robbers, E.J. (1979). *Farmacognosia*, 2da ed., El Ateneo, Pedro García S.A..

Yañez Muñoz, Oscar. S. (1998). Caracterización del ácido púrgico B, componente oligosacárido minoritario de la convolvulina de *Ipomoea purga*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. pp 63.

Wolfender, Jean-Luc; Maillard, M.; Marsto P. y Hostettmann. A. (1992). Mass spectrometry of Underivatized naturally Ocurring Glycosides *Phytochemical Analysis*, **3**, 193-214

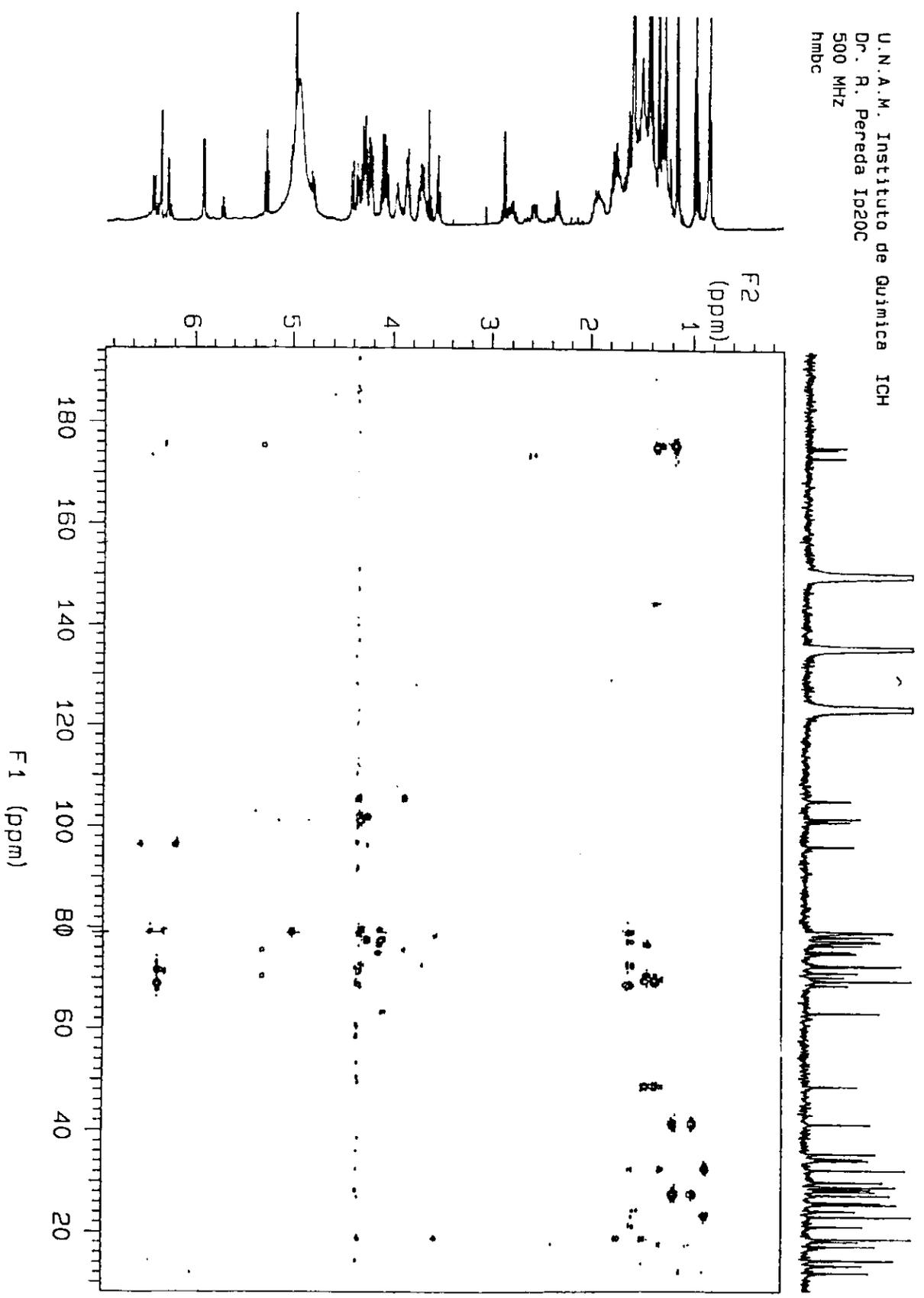
9. Espectros

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda Ip20C
500 MHz
disolvente: C5D5N

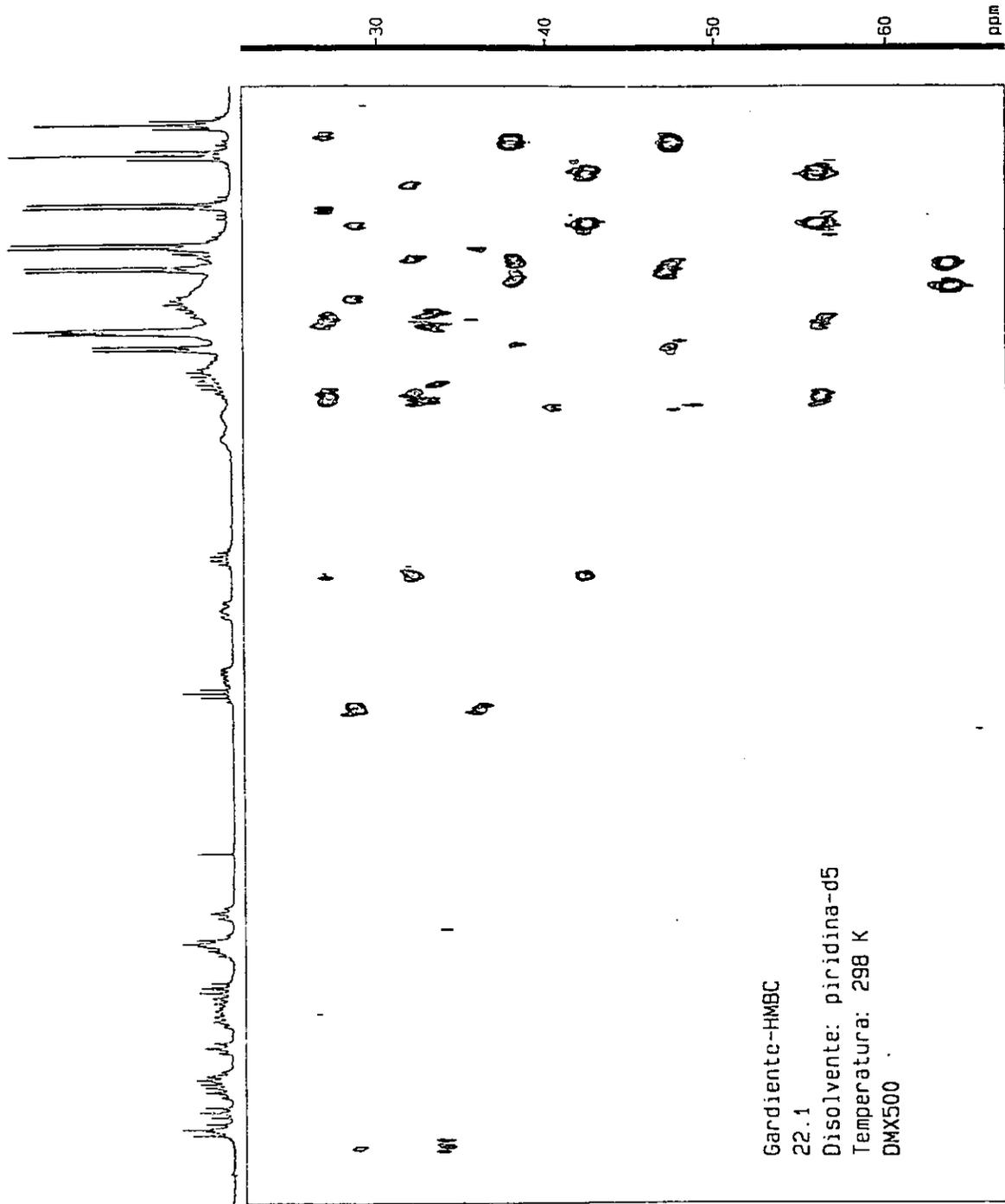


Espectro 1. COSY de la orizabina V (3).

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Pereda I020C
500 MHz
hmbc

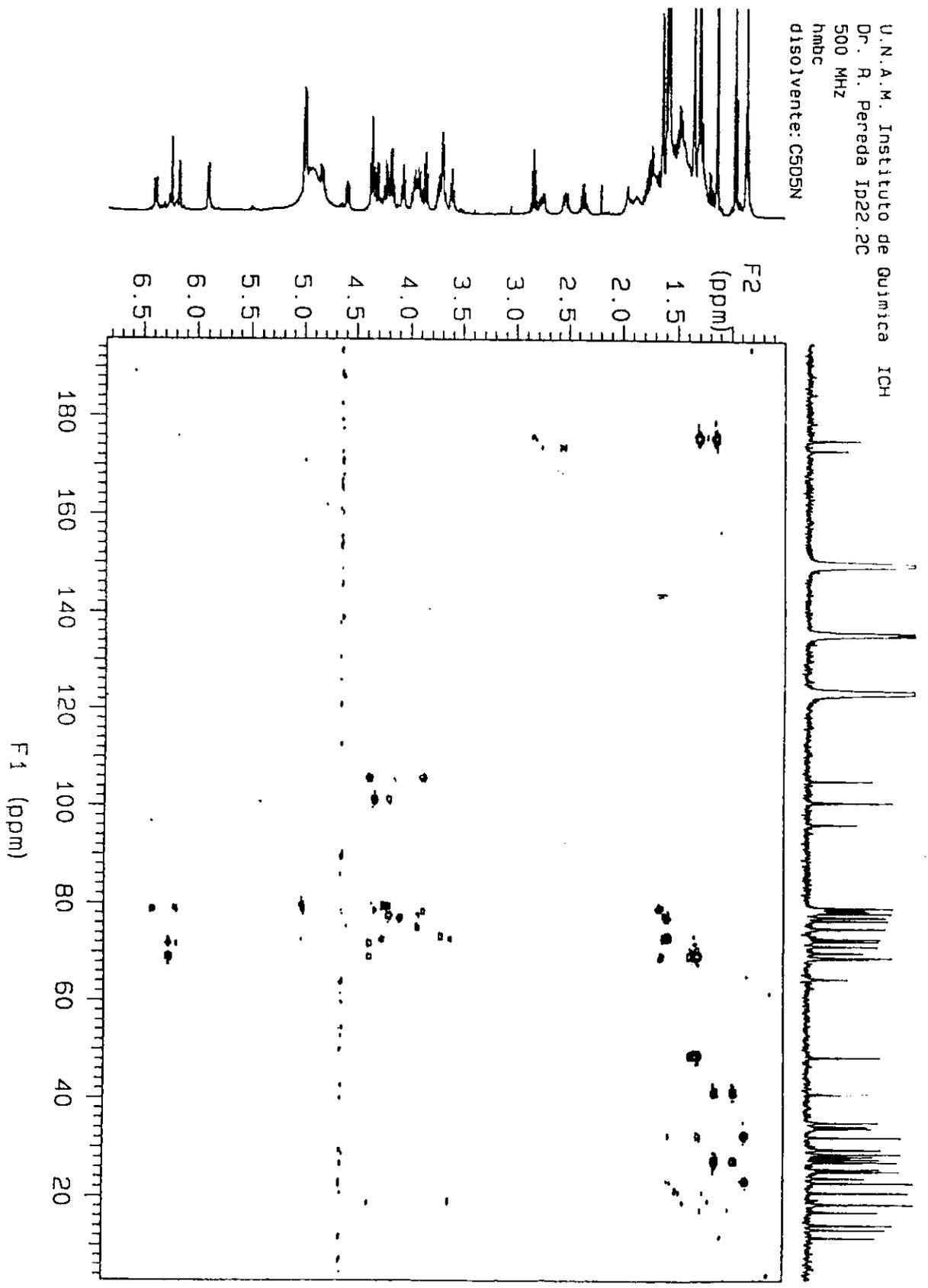


Espectro 2. HMBC de la orizabina V (3).



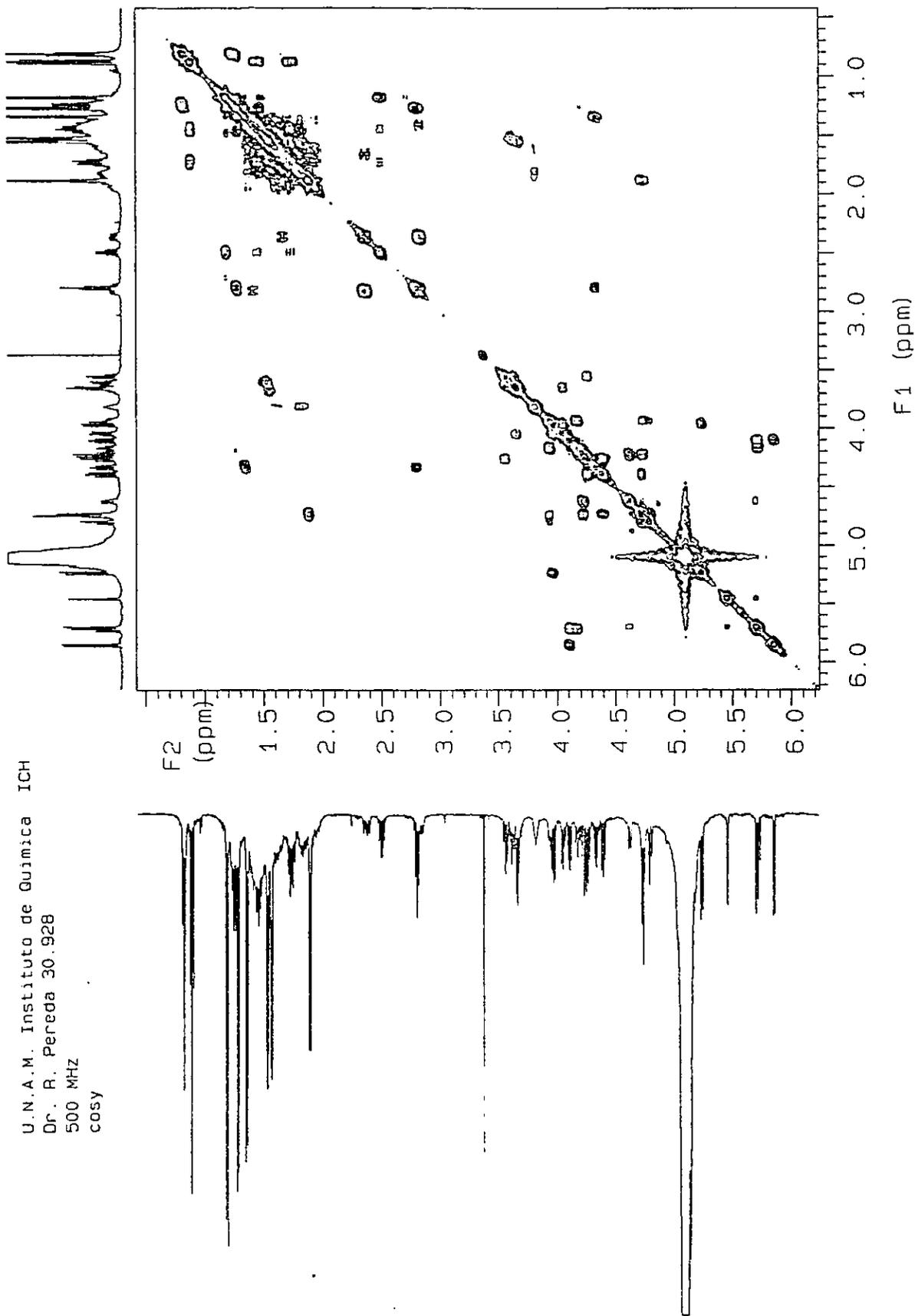
Espectro 3. HMBC de la orizabina VI (4)

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Pereda Ip22.2C
500 MHz
hmbc
disolvente: C5D5N



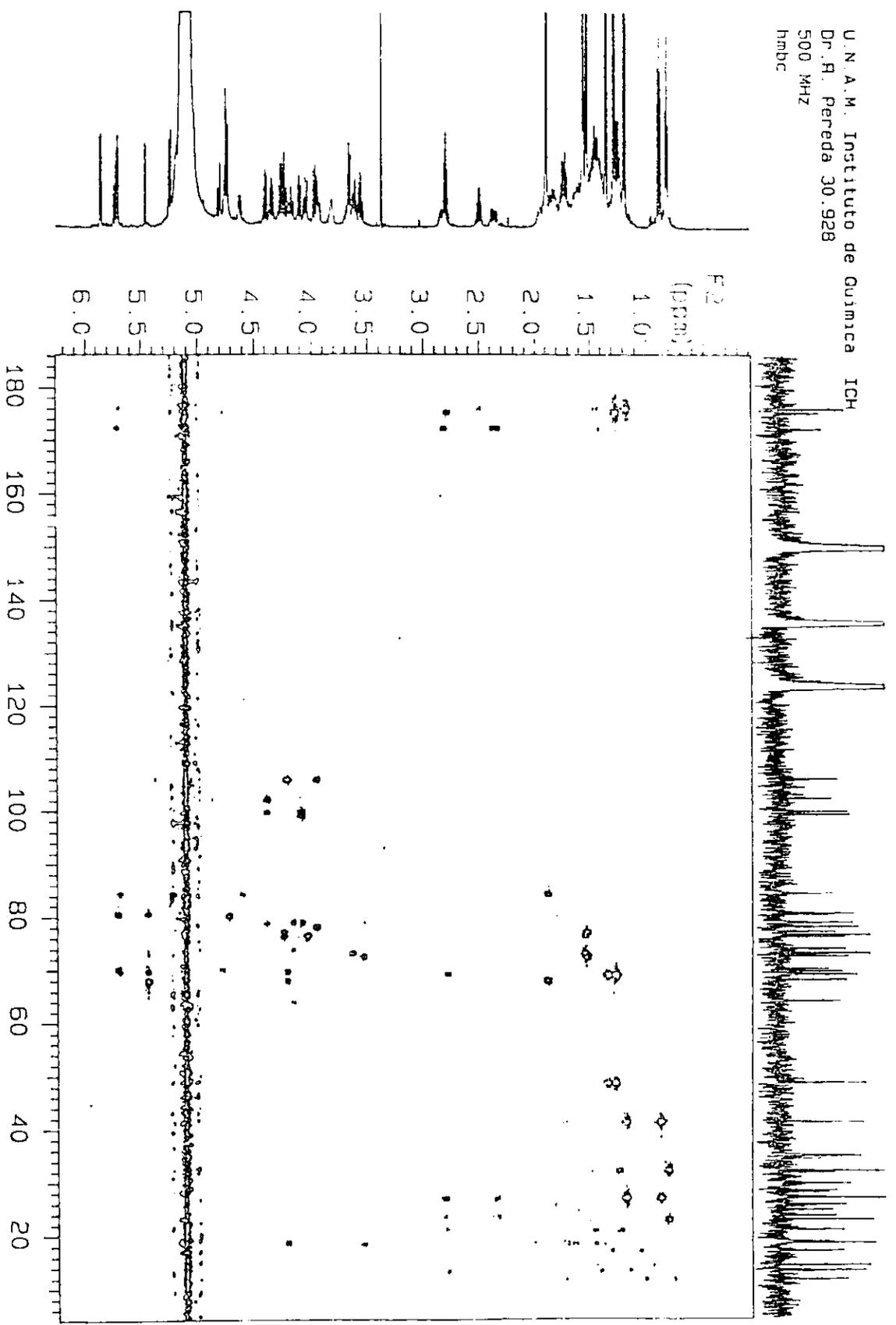
Espectro 4. HMBC de la orizabina VII (5)

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Pereda 30.928
500 MHz
cosy



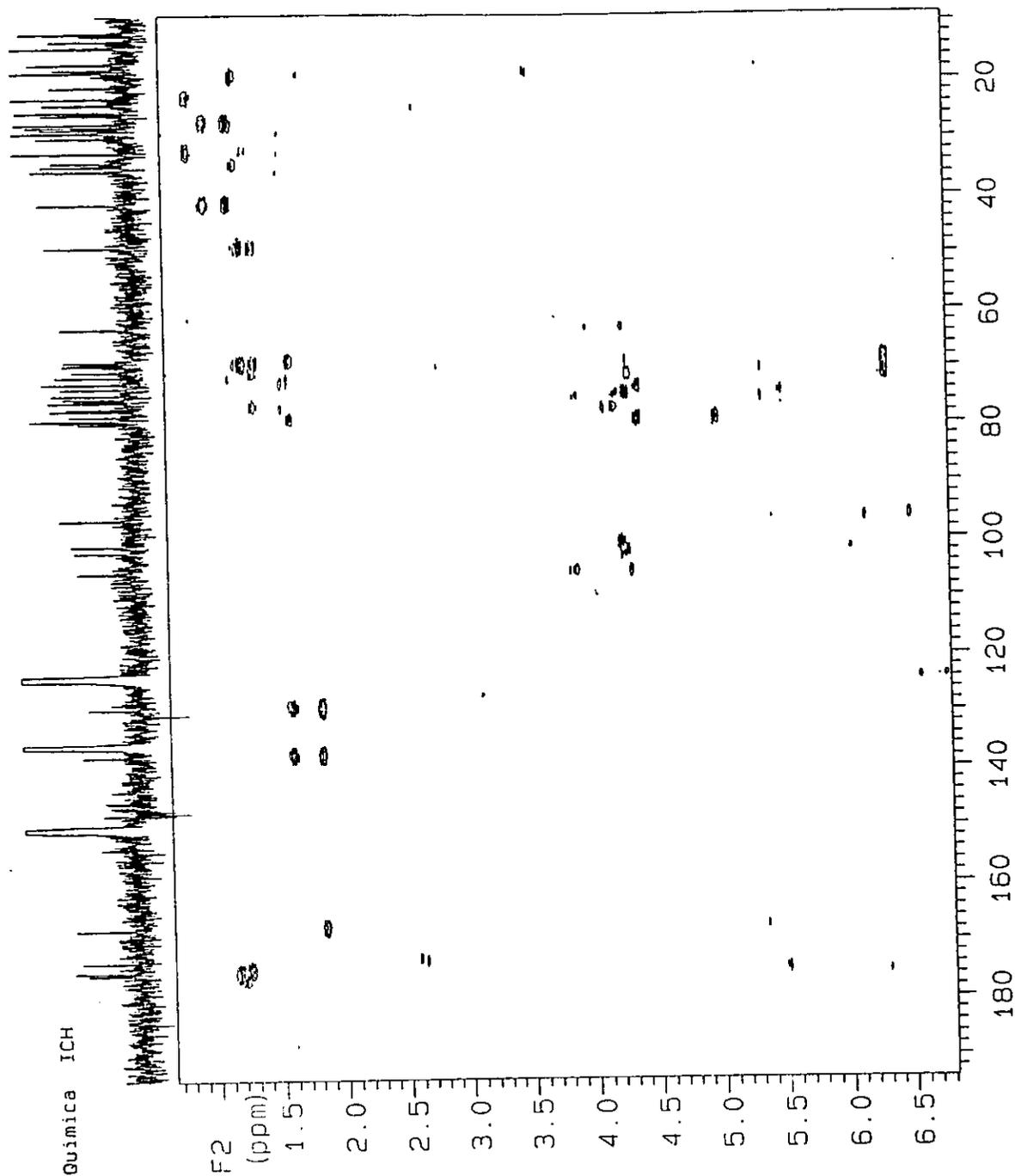
Espectro 5. COSY de la orizabina VIII (6).

U. N. A. M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda 30.928
500 MHz
hmbc



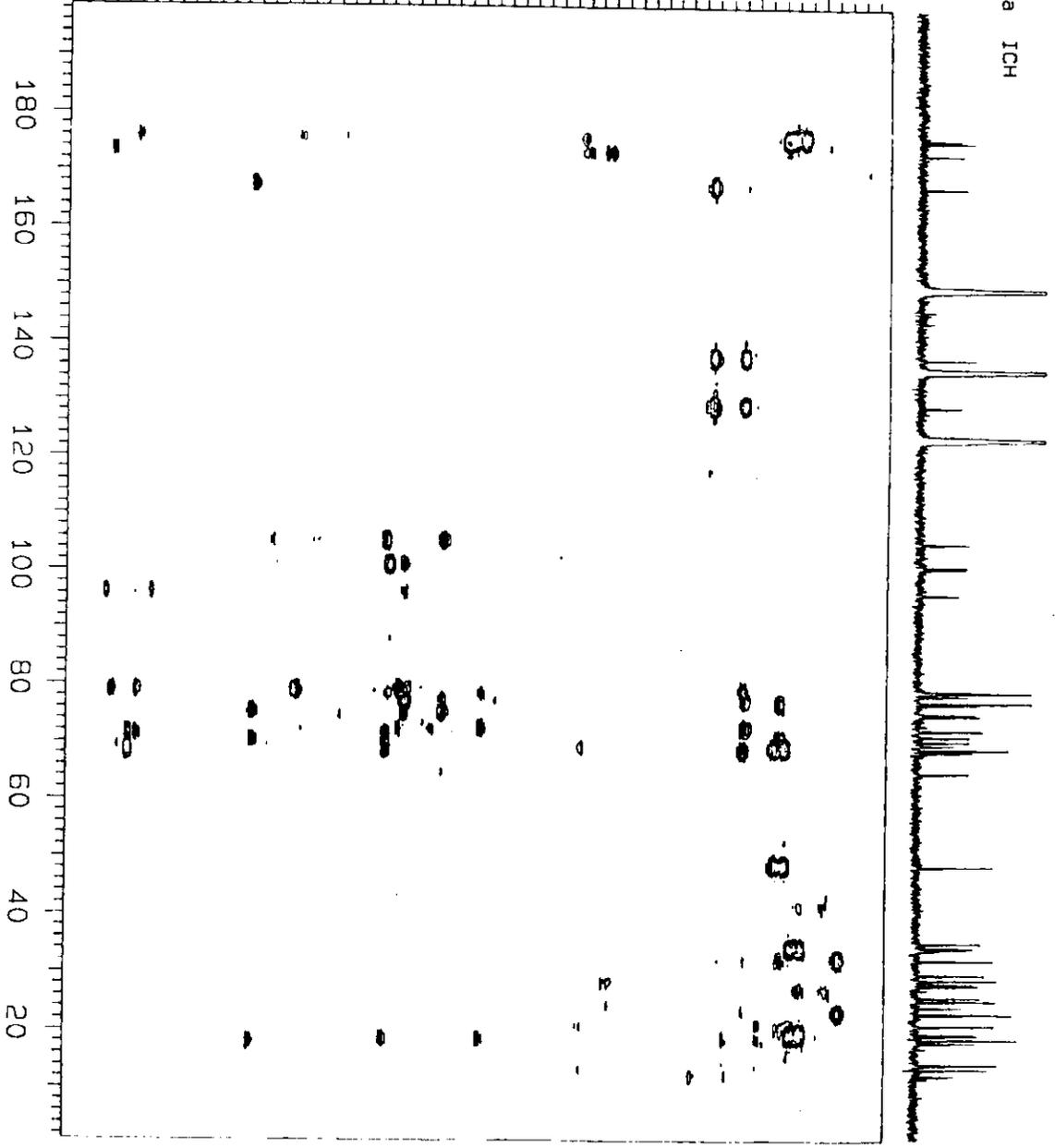
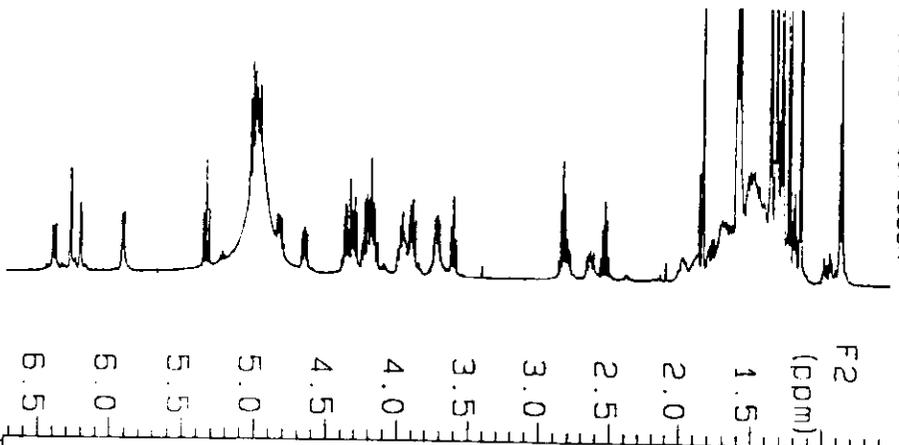
Espectro 6. HMBC de la orizabina VIII (6)

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda 121i
500 MHz
disolvente: C5D5N
hmbc



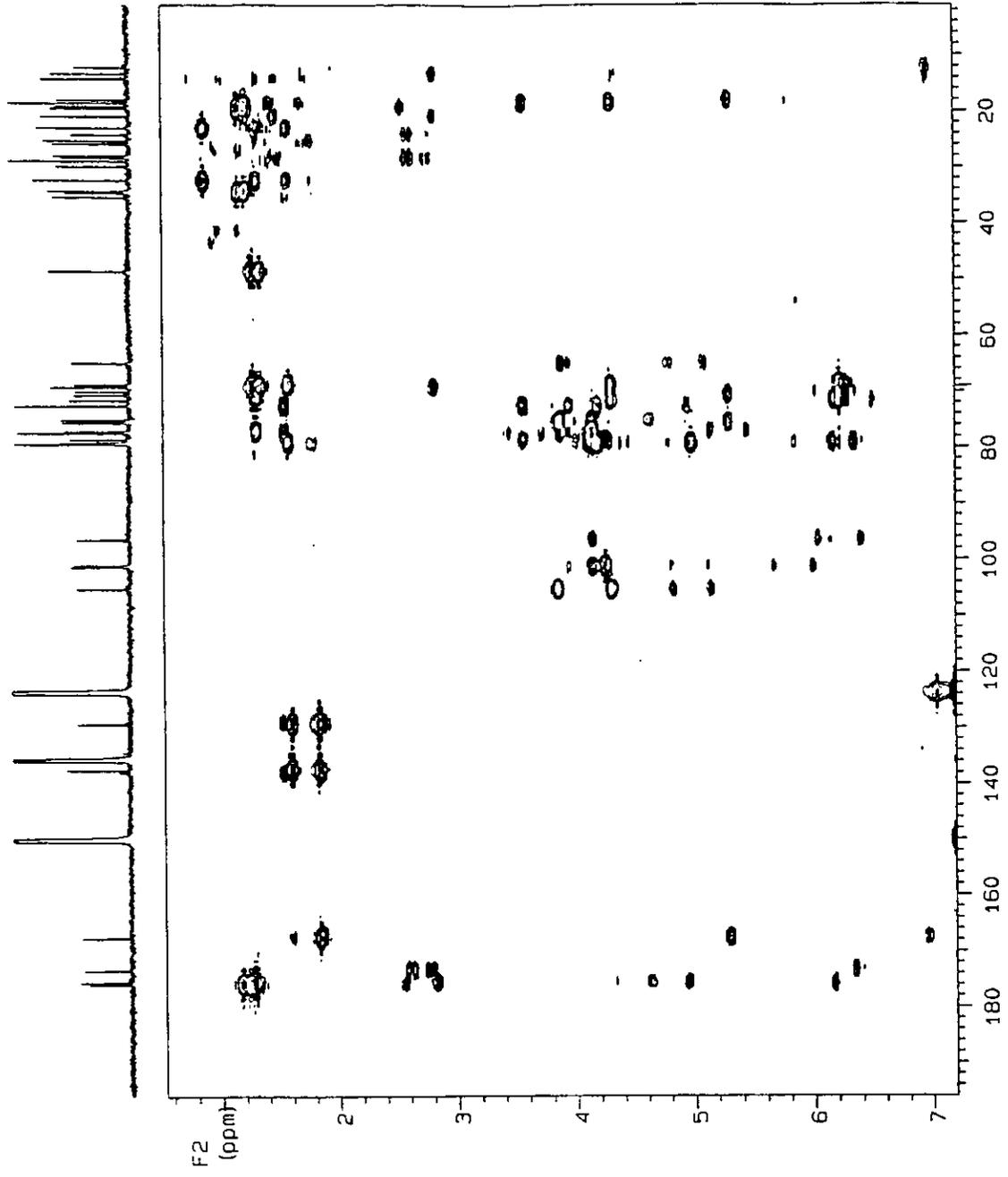
Espectro 7. HMBC de la orizabina IX (7)

U. N. A. M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda 121.11
500 MHz
hmbc
disolvente: C5D5N



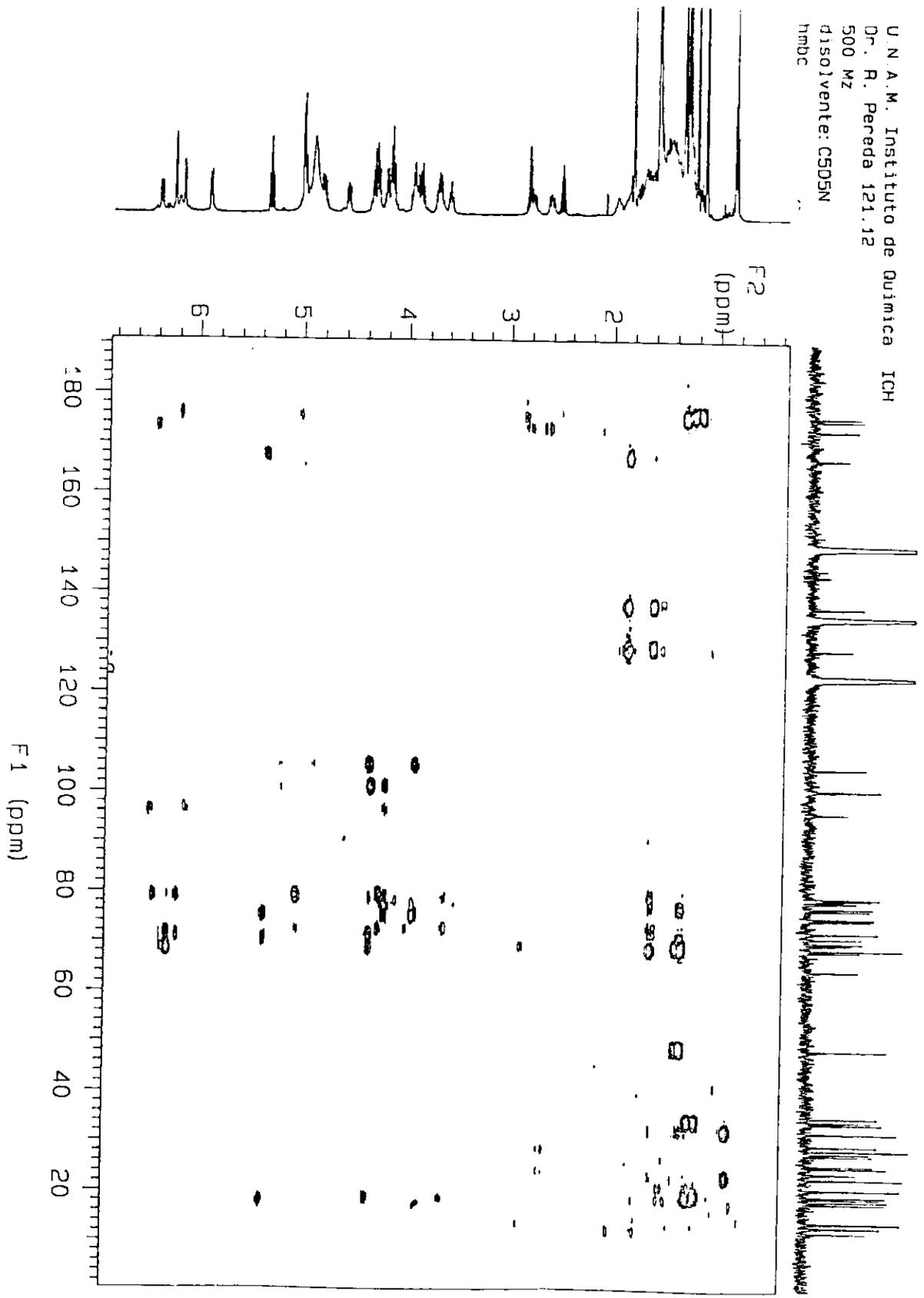
Espectro 8. HMBC de la orizabina X (8)

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Pereda 11d
500 MHz
hmbc
C55N



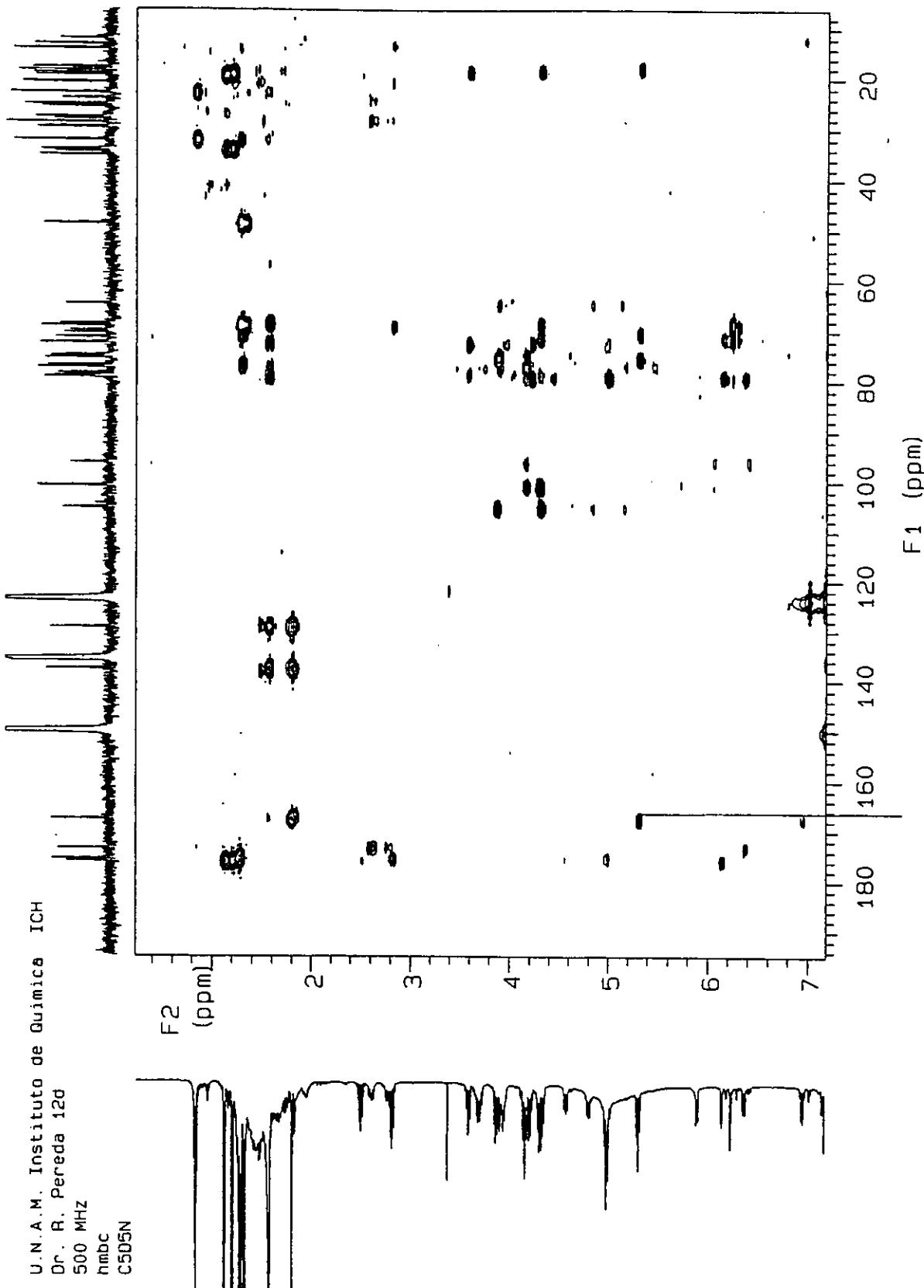
Espectro 9. HMBN de la orizabina XI (9)

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Pereda 121.12
500 Mz
disolvente: CD5N
hmbc



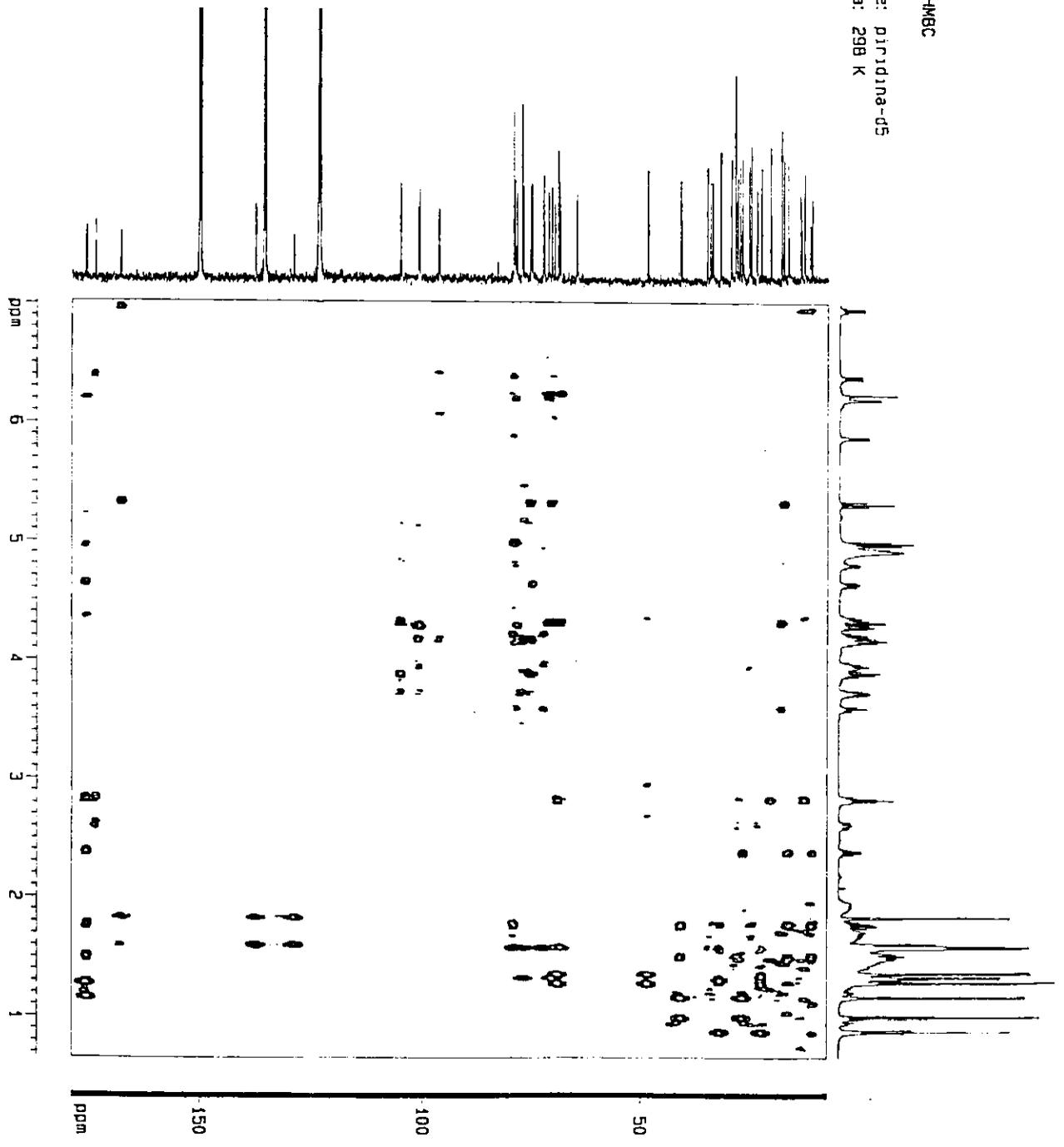
Espectro 10. HMBC de la orizabina XII (10)

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Pereda 12d
500 MHz
hmbc
C5D5N



Espectro 11. HMBN de la orizabina XIII (11)

GRADIENTE-HMBC
 12-3-1
 Disolvente: piridina-d5
 Temperatura: 298 K
 DMX500



Espectro 12. HMBC de la orizabina XIV (12)

Current Data Parameters
 File: 1231
 ExpNo: 1
 F2 - Acquisition Parameters

Date_: 08/05
 Time: 13:05
 Instrument: 5 mm Avance
 Processor: mddsp32
 F2 - Acquisition Parameters

NUC1: 13C
 PULPROG: zgpg30
 SOLVENT: DMSO
 NS: 16
 DS: 4
 SWH: 401.074 MHz
 FIDRES: 0.161724 Hz
 AQ: 0.2327266 sec
 RG: 117.906
 DQ: 1.0000000
 DE: 200.00000
 TE: 300.2 K
 F2 - Acquisition Parameters

SI: 1
 SF: 125.760 MHz
 DSF: 125.760 MHz
 F2 - Acquisition Parameters

SI: 1
 SF: 125.760 MHz
 DSF: 125.760 MHz
 F2 - Acquisition Parameters

SI: 1
 SF: 125.760 MHz
 DSF: 125.760 MHz
 F2 - Acquisition Parameters

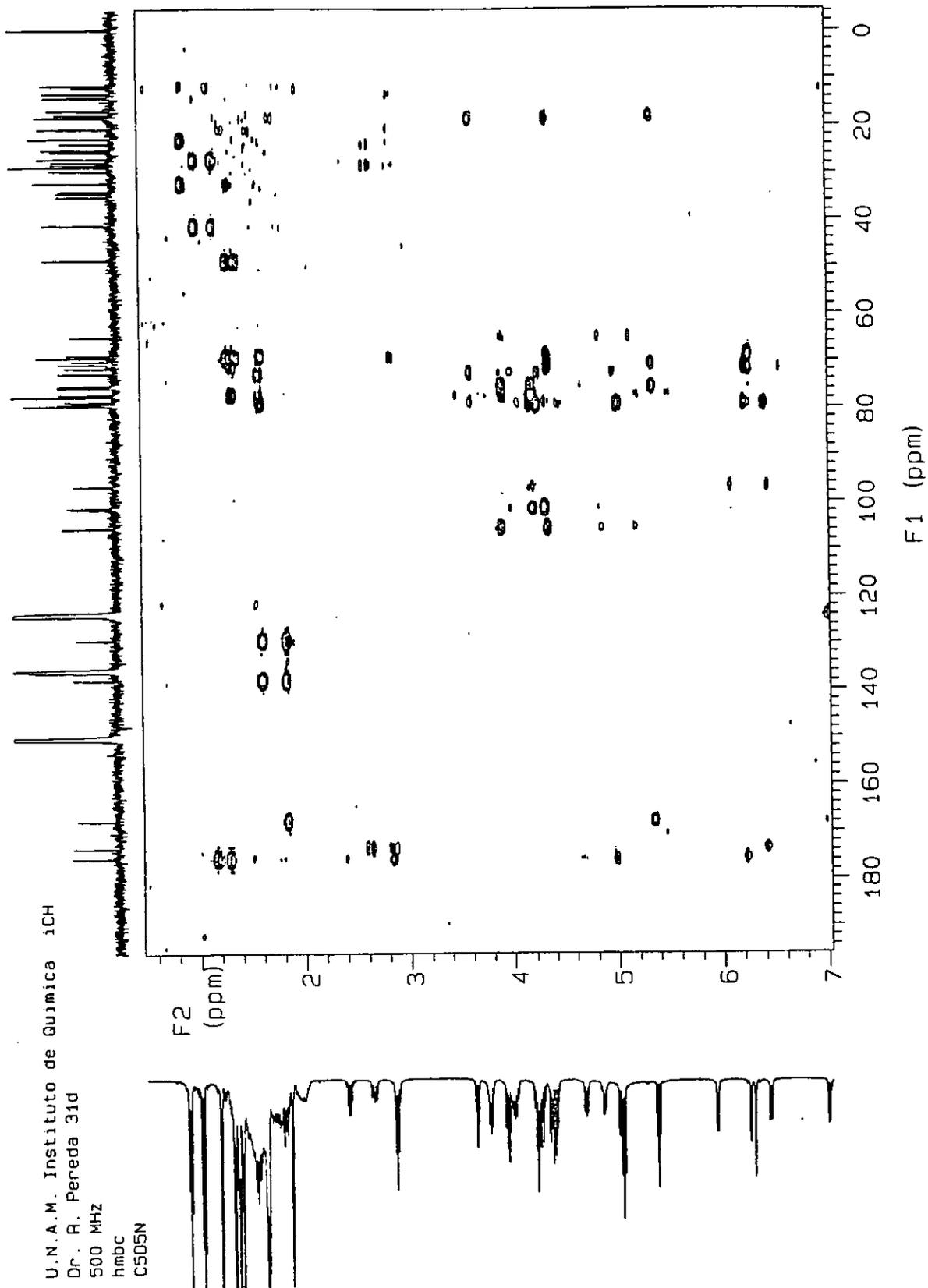
SI: 1
 SF: 125.760 MHz
 DSF: 125.760 MHz
 F2 - Acquisition Parameters

SI: 1
 SF: 125.760 MHz
 DSF: 125.760 MHz
 F2 - Acquisition Parameters

SI: 1
 SF: 125.760 MHz
 DSF: 125.760 MHz
 F2 - Acquisition Parameters

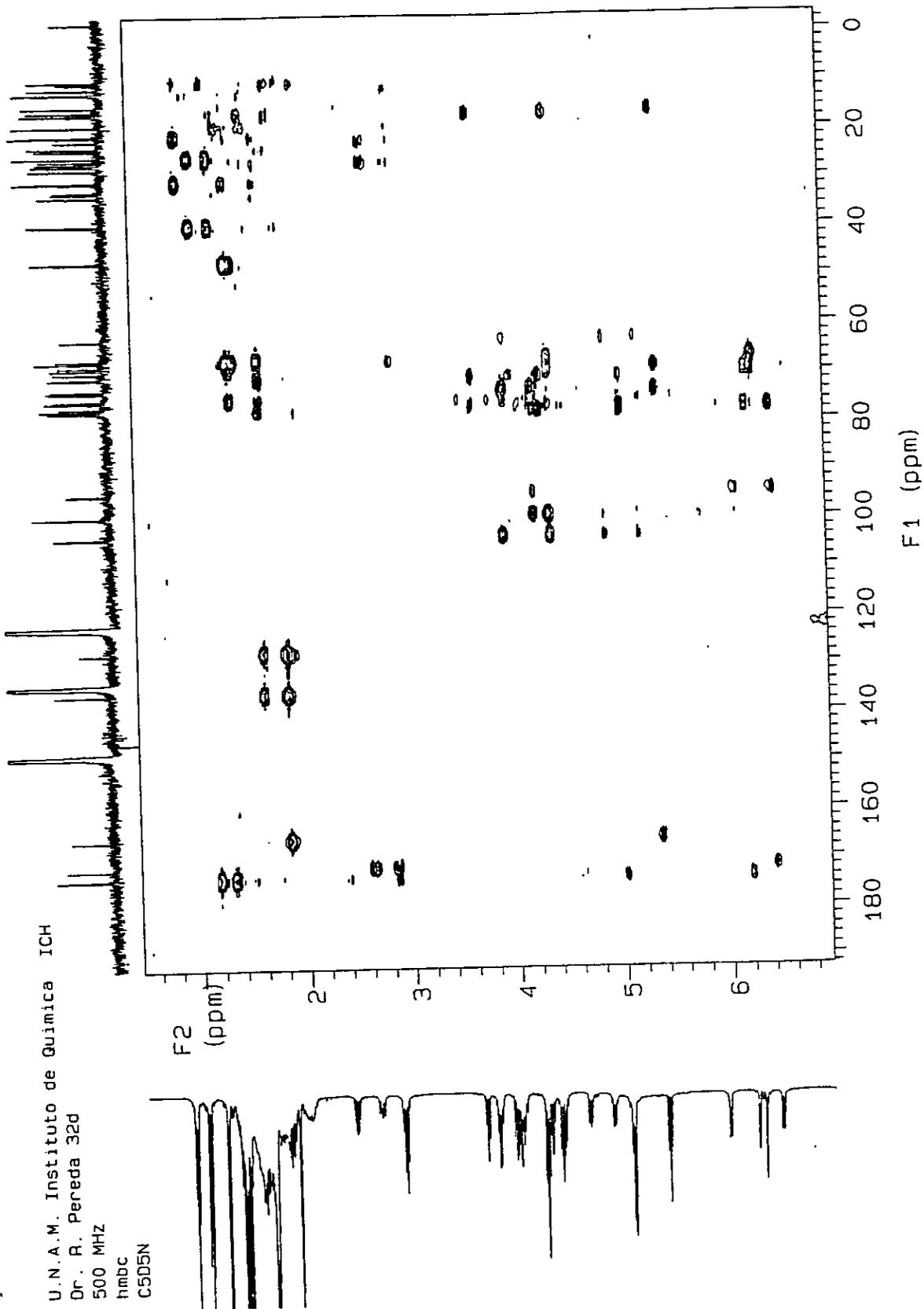
SI: 1
 SF: 125.760 MHz
 DSF: 125.760 MHz
 F2 - Acquisition Parameters

U.N.A.M. Instituto de Quimica iCH
Dr. R. Pereda 31d
500 MHz
hmbc
C505N



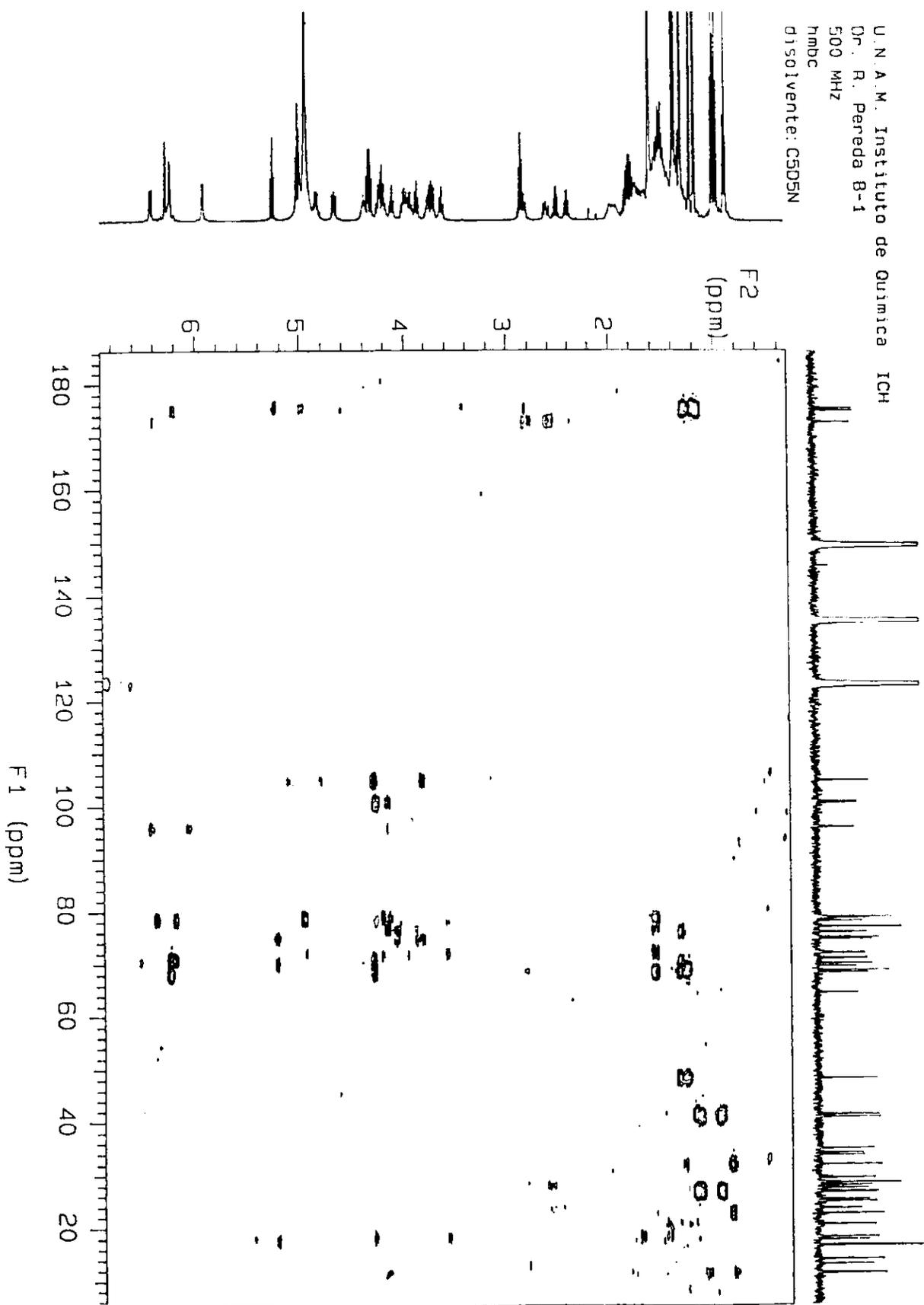
Espectro 13. HMBC de la orizabina XV (13)

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda 32d
500 MHz
hmbc
C5D5N



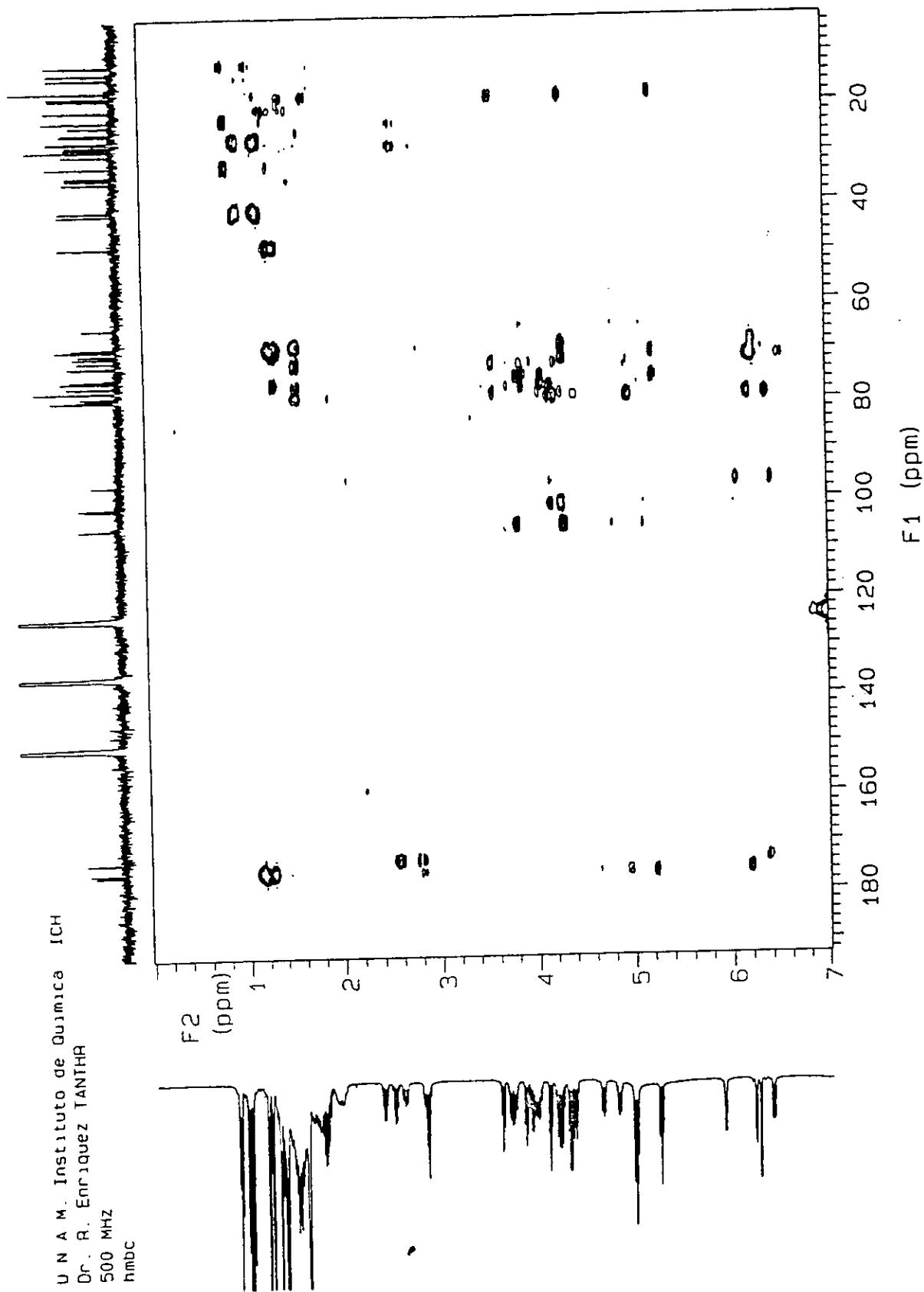
Espectro 15. HMBC de la orizabina XVII (15)

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda B-1
500 MHz
hmbc
disolvente: C5D5N



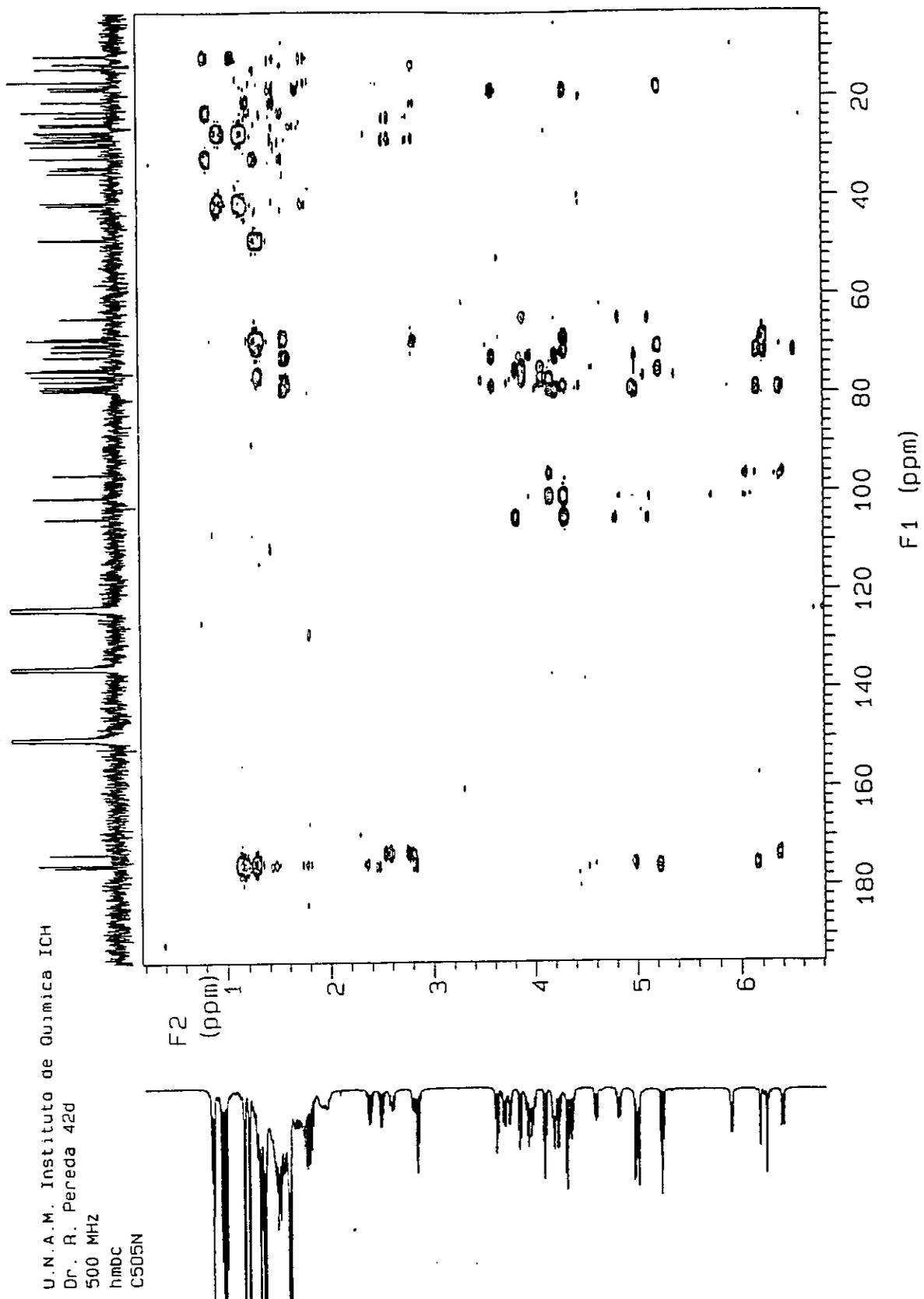
Espectro 16. HMBC de la orizabina XVIII (16)

U N A M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Enriquez TANTHA
500 MHz
hmbc



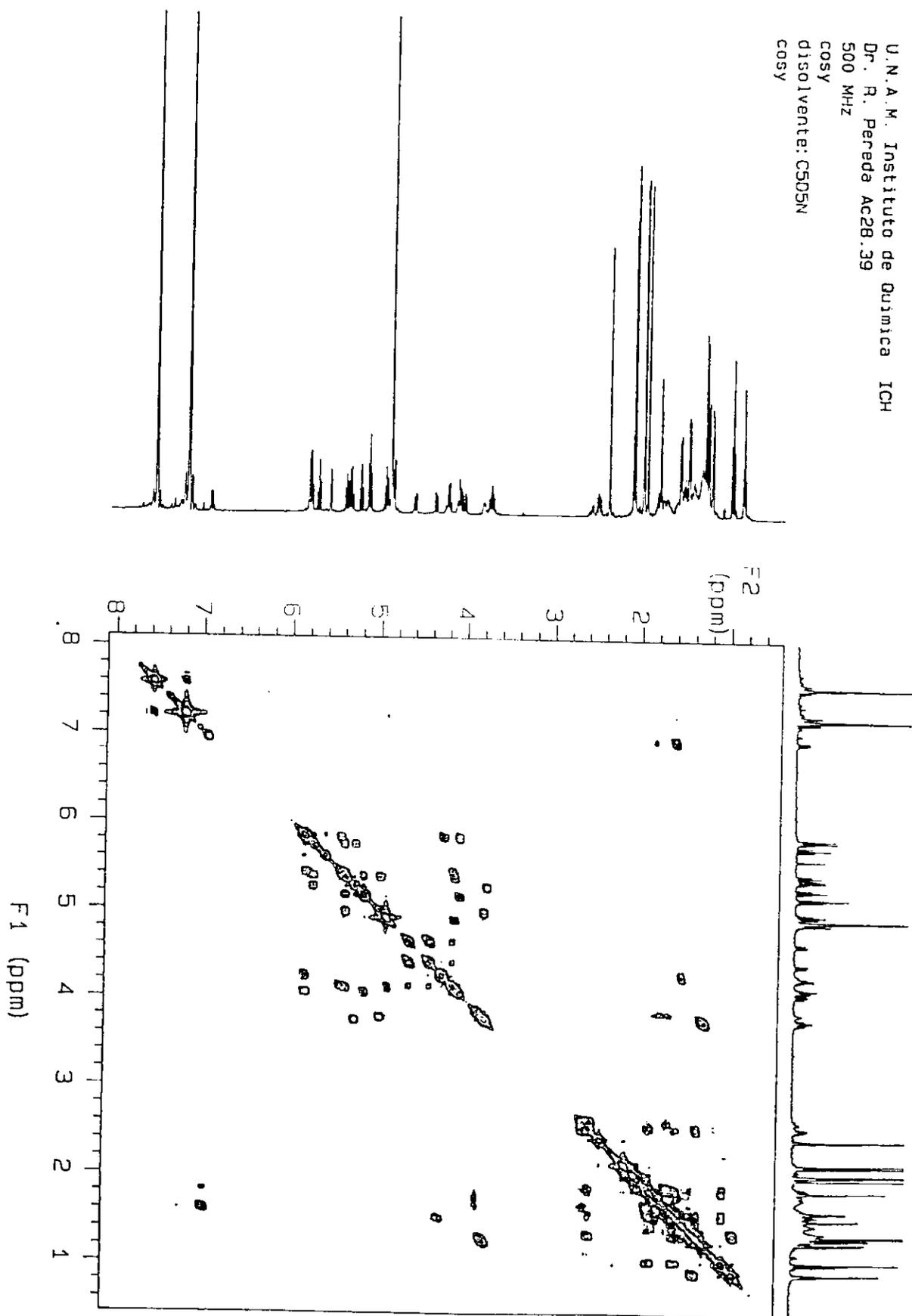
Espectro 17. HMBN de la orizabina XIX (17)

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda 42d
500 MHz
hmbc
C505N



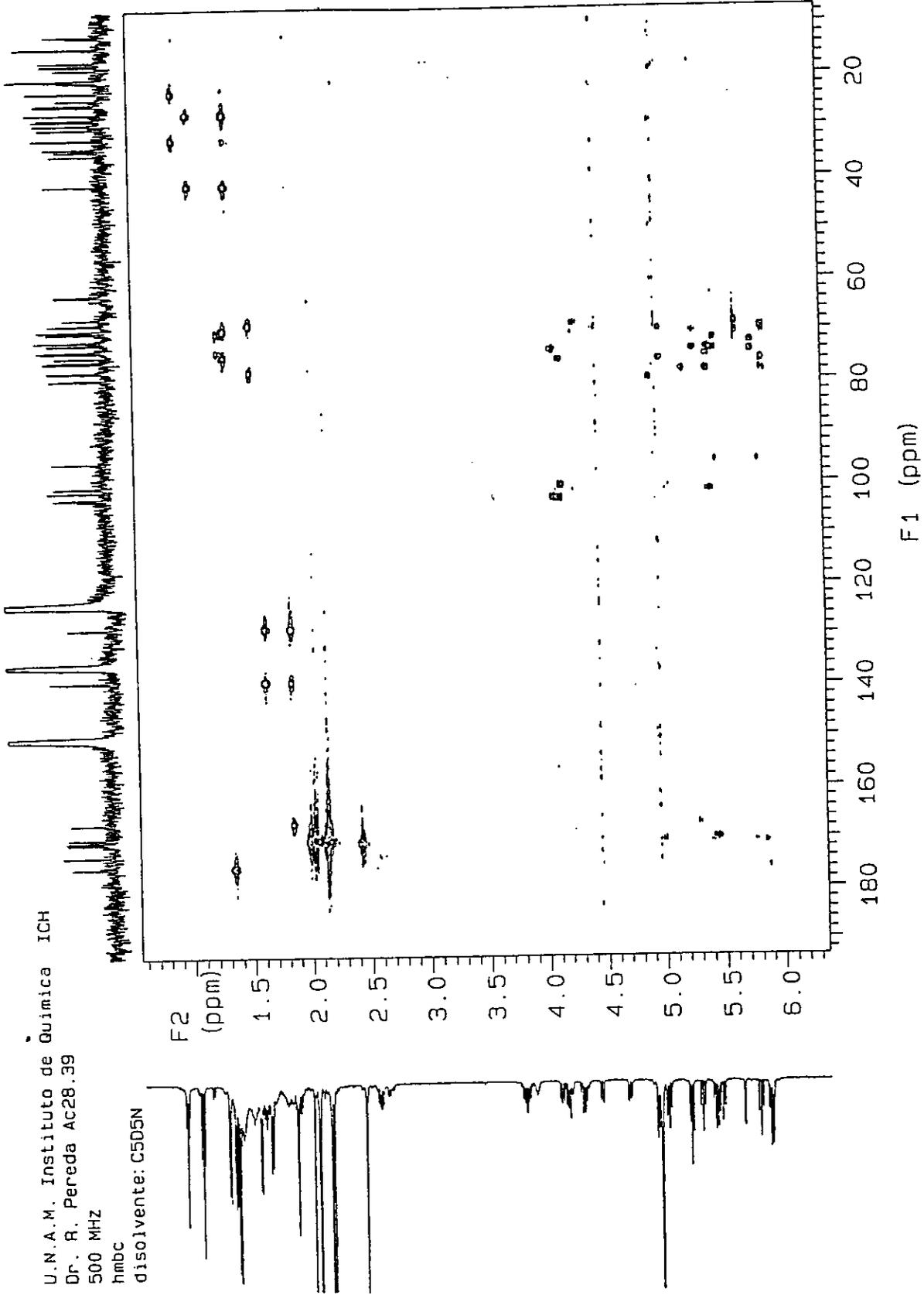
Espectro 19. HMBC de la orizabina XXI (19)

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda Ac28.39
500 MHz
COSY
disolvente: C5D5N
COSY



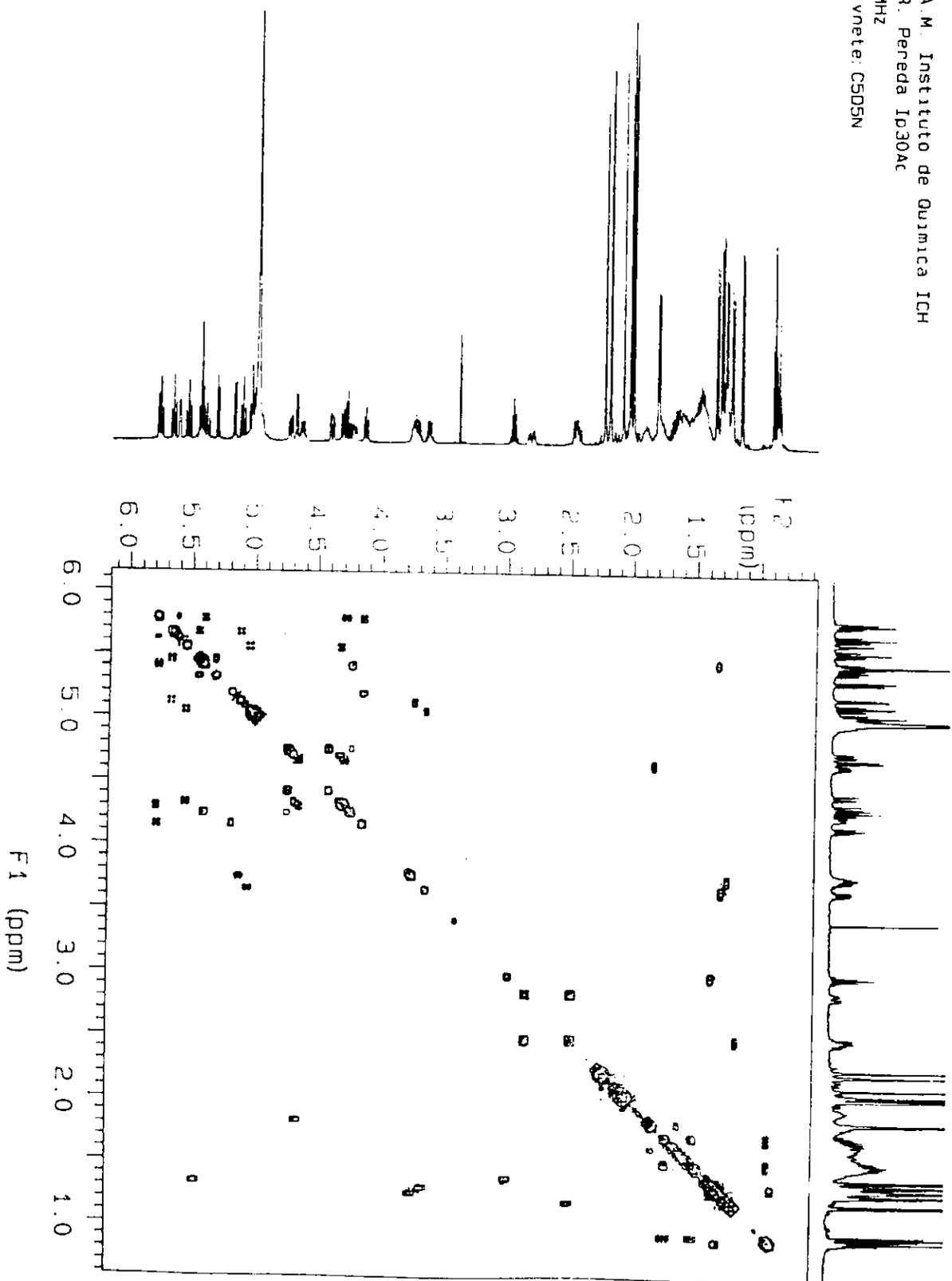
Espectro 20. COSY del derivado peracetilado de la escamominina I (20).

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda Ac28.39
500 MHz
hmbc
disolvente: C5D5N



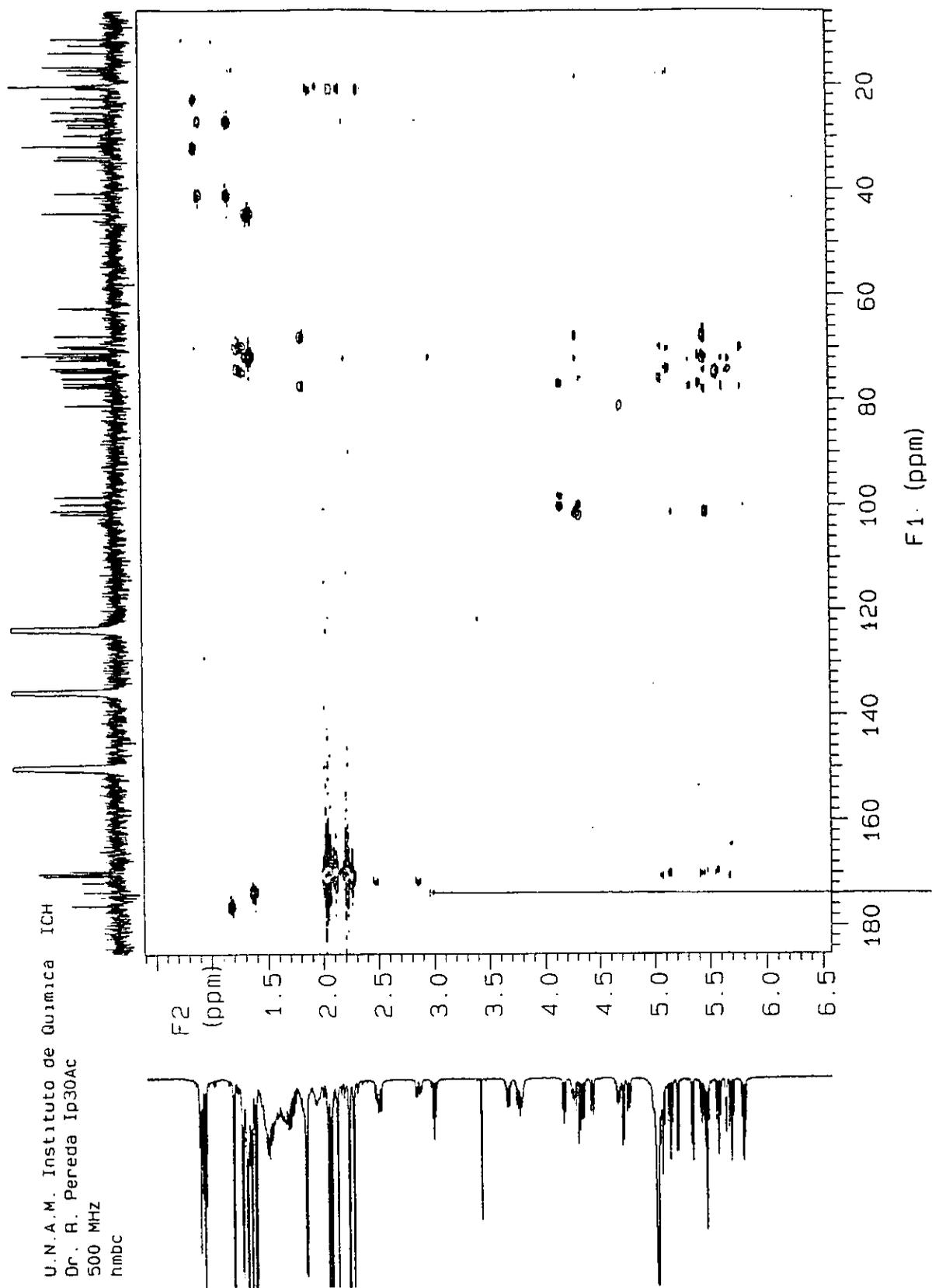
Espectro 21. HMBC del derivado paracetilado de la escamonia I (20).

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda Ip30ac
500 MHz
disolvente: C5D5N
COSY



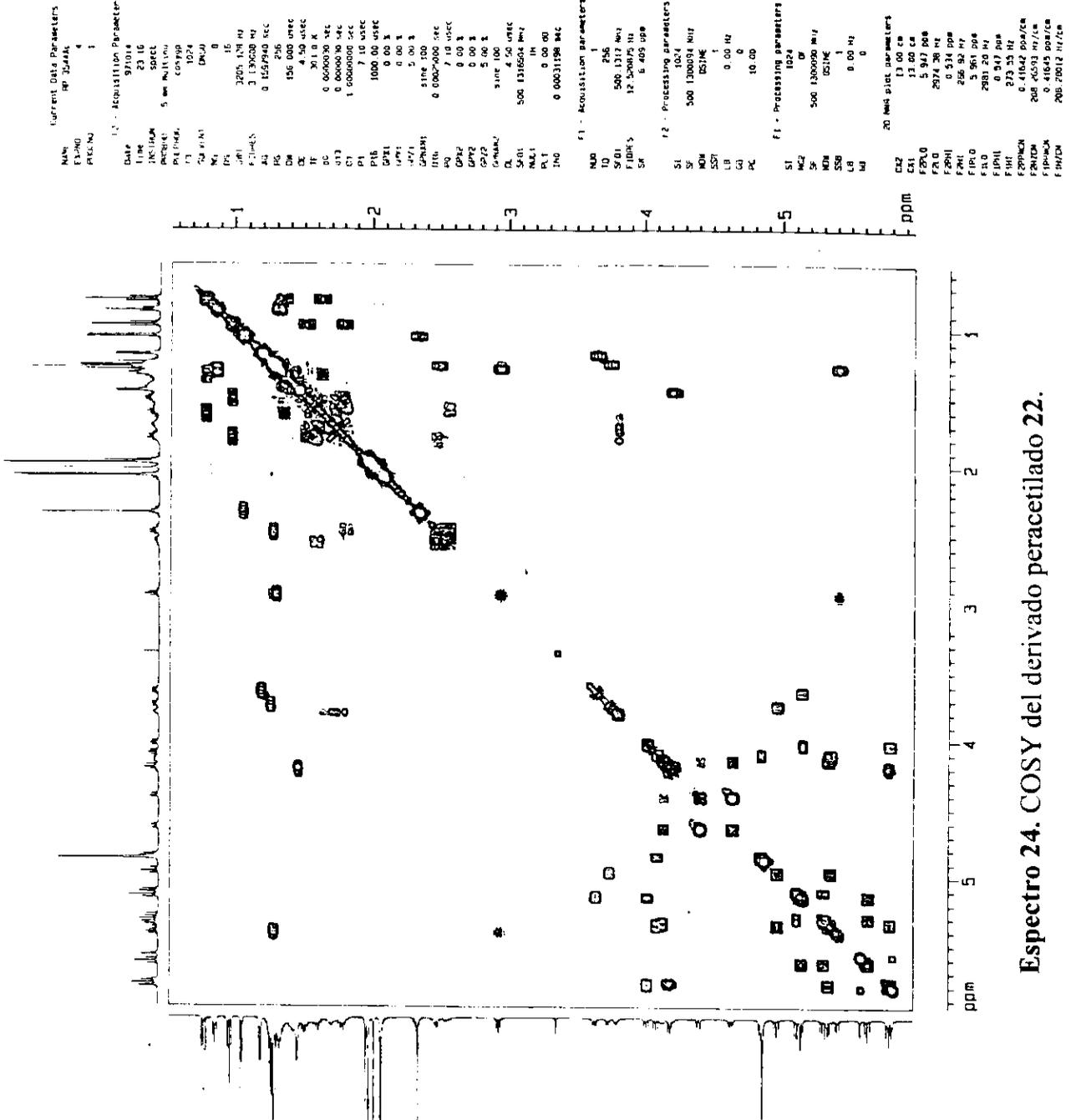
Espectro 22. COSY del derivado peracetilado de la orizabina VIII (21).

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda Ip30Ac
500 MHz
hmbc



Espectro 23. HMBC del derivado peracetilado de la orizabina VIII (21).

Gradiente-COSY
 35.44 AC
 Disolvente: p:ridina-d5
 Temperatura: 298 K
 DMX500



Current Data Parameters
 NAME: RP_20444
 EXPNO: 4
 PROCNO: 1
 Date_ Time: 971014
 23 16
 INSTRUM: spect
 PULPROG: zgpg30
 ACQPRG: cosypp
 CHAN: zgpg30
 CPDPRG: cosypp
 F2: 500.130624 MHz
 F1: 500.130624 MHz
 NUC1: 13C
 NUC2: 1H
 PSY: 16
 PSI: 16
 JMOD: 3
 F2HLEN: 3200.000 Hz
 AQ: 1.330000 Hz
 F1HLEN: 0.1557940 sec
 RG: 256
 DW: 136.000 usec
 DE: 4.50 usec
 TE: 301.0 K
 GC: 0.000000 sec
 GPC: 0.000000 sec
 GPCD: 0.000000 sec
 C1: 1.0000000
 P1: 7.10 usec
 P18: 1000.00 usec
 DPH1: 0.00 sec
 LPH1: 0.00 sec
 LPH2: 5.00 sec
 SFO1: 500.130624 MHz
 NAL1: 1H
 PL1: 0.00 dB
 IN0: 0.0003196 sec
 SFO2: 500.130624 MHz
 NAL2: 13C
 PL2: 0.00 dB
 IN1: 0.0003196 sec

F1 - Acquisition parameters
 MD: 256
 ID: 256
 SF: 500.13117 MHz
 FIDRES: 12.520075 Hz
 SR: 6.405 000

F2 - Processing parameters
 SI: 1024
 SF: 500.1300000 MHz
 DS: 4
 USINE: 0.00 Hz
 U: 0.00 Hz
 G0: 0.00 Hz
 PC: 10.00

F1 - Processing parameters
 SI: 1024
 MC2: 0
 SF: 500.1300000 MHz
 DS: 4
 USINE: 0.00 Hz
 U: 0.00 Hz
 G0: 0.00 Hz
 PC: 10.00

2D NMR plot parameters
 CZ: 13.00 Hz
 CX: 13.00 Hz
 FZ: 5.947 000
 FZ0: 2974.36 Hz
 FZ1: 0.514 ppm
 FZ2: 286.90 Hz
 FZ3: 5.961 000
 FZ4: 2981.20 Hz
 FZ5: 0.517 ppm
 FZ6: 0.514 Hz
 FZ7: 0.41632 Hz
 FZ8: 205.45031 Hz/cm
 FZ9: 0.41643 ppm/cm
 FZ10: 205.29012 Hz/cm

Espectro 24. COSY del derivado peracetilado 22.

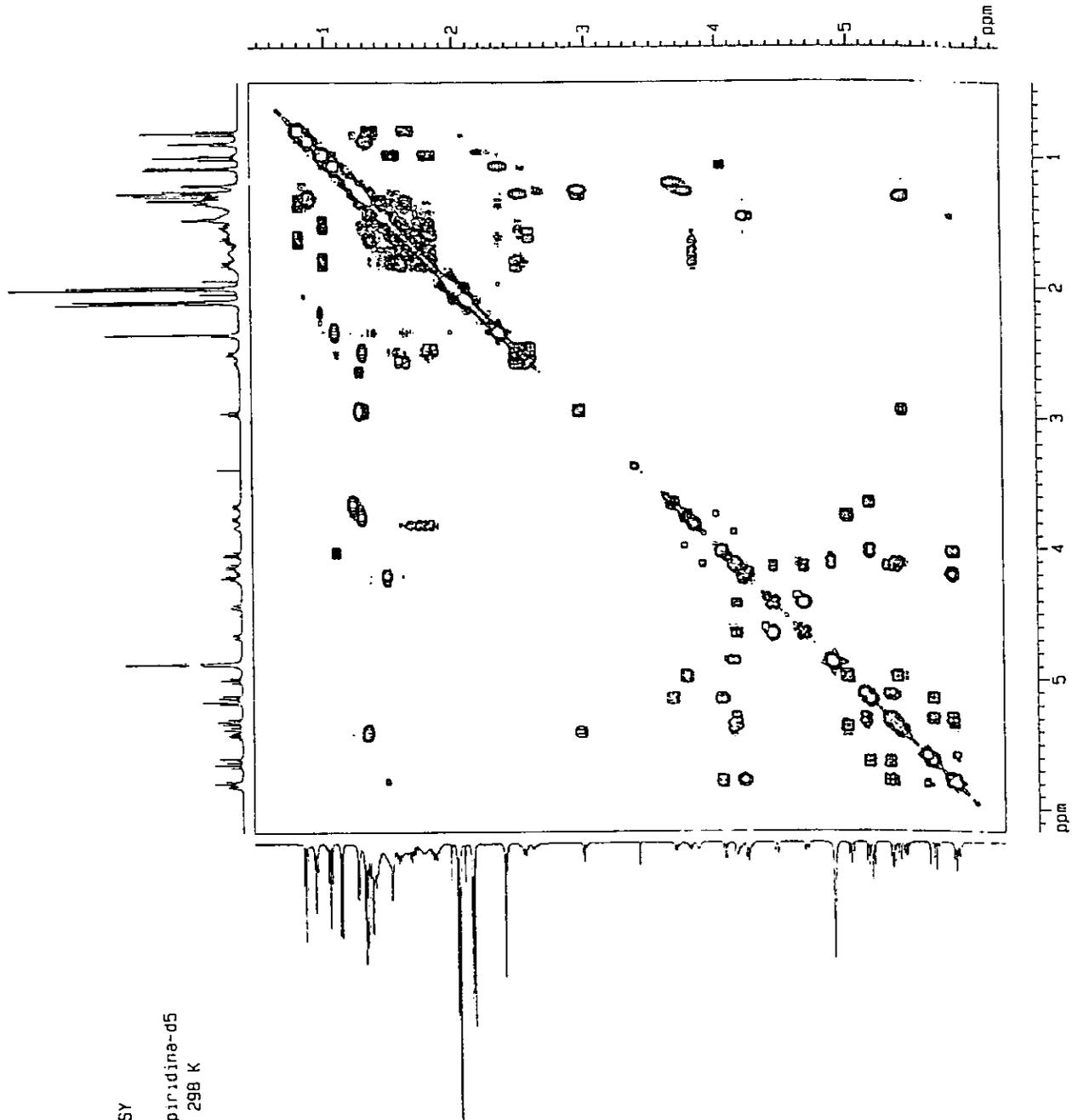
Gradiente-COSY

35.46 AC

Disolvente: piridina-d5

Temperatura: 298 K

DMX500



Current Data Parameters
PR: 256KHz
NAME
EXPNO 1
PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters
Date_ 9/10/10
Time 22.38
INSTRUM spect
PROBHD 5 mm NMLTNU
PULPROG zgpg30
TD 65536
SOLVENT dmsd
AQ 16
RG 327.5
SR 2665.922 Hz
FIDRES 2.799778 Hz
AQ 0.1786356 sec
RG 256
DE 174.400 usec
TE 30.00 usec
TE 30.00 usec
AQ 0.000030 sec
AQ 0.000030 sec
AQ 1.0000000 sec
P1 7.15 usec
P16 1000.00 usec
P17 0.00 sec
P18 0.00 sec
P19 0.00 sec
P20 5.00 sec
P21 5.00 sec
SFO 500.1316093 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0.00 Hz
PC 1.00

F1 - Acquisition Parameters
NS 1
DS 256
SFO 500.1316093 MHz
FIDRES 11.200520 Hz
SFO 500.1316093 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0.00 Hz
PC 1.00

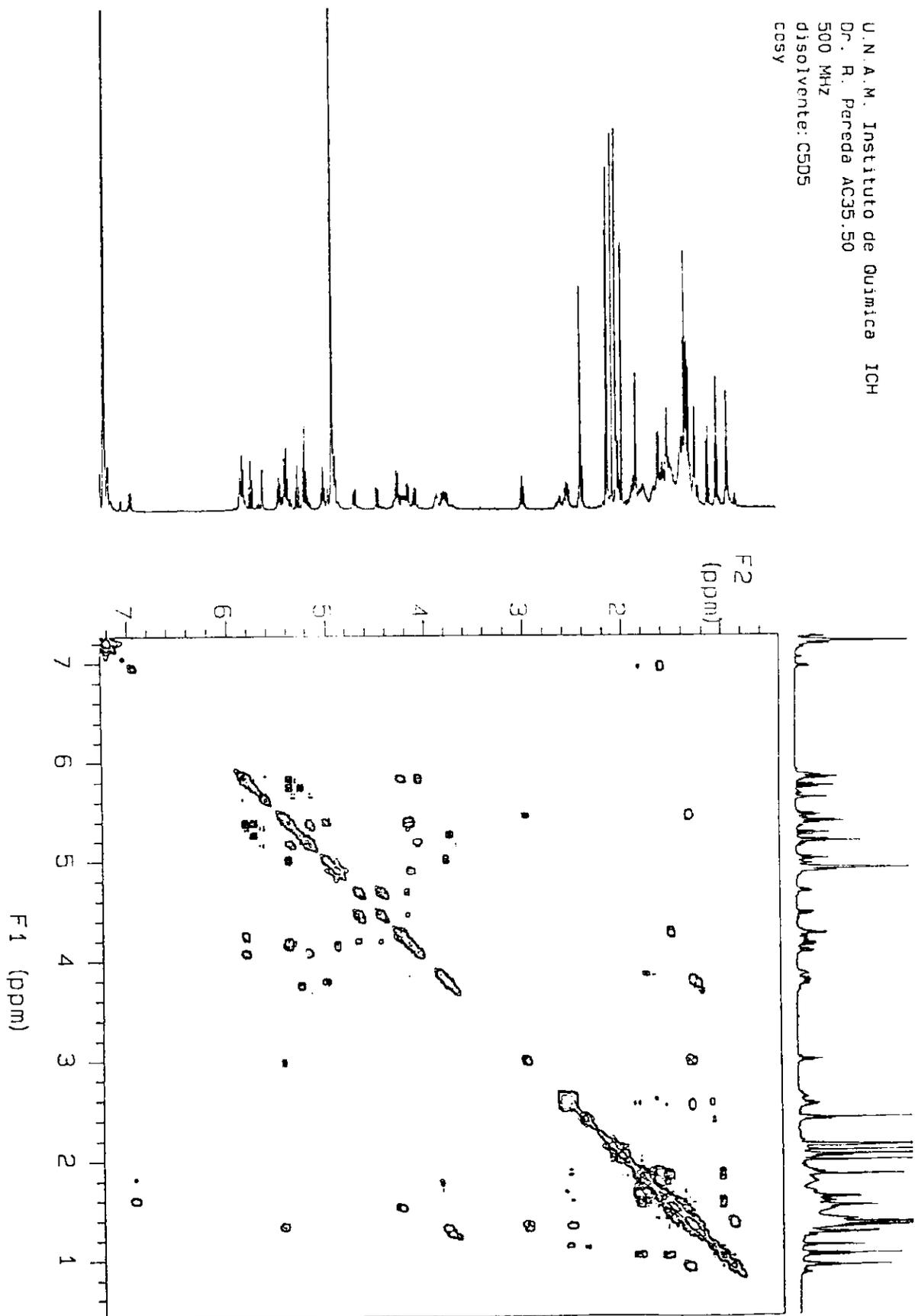
F2 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1316093 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0.00 Hz
PC 1.00

F1 - Processing parameters
SI 1024
SF 500.1316093 MHz
WDW EM
SSB 0
LB 0.00 Hz
GB 0.00 Hz
PC 1.00

20 NUC 21st parameters
NUC1 13.00 Cn
NUC2 13.00 Cn
NUC3 1.70 Oa
NUC4 1.70 Oa
NUC5 1.70 Oa
F2H1 218.03 Hz
F2H2 8.170 Oa
F2H3 3005.98 Hz
F2H4 0.435 Oa
F2H5 217.72 Hz
F2H6 0.440a Oa/Ca
F2H7 228.530a Oa/Ca
F2H8 228.530a Oa/Ca
F2H9 228.530a Oa/Ca

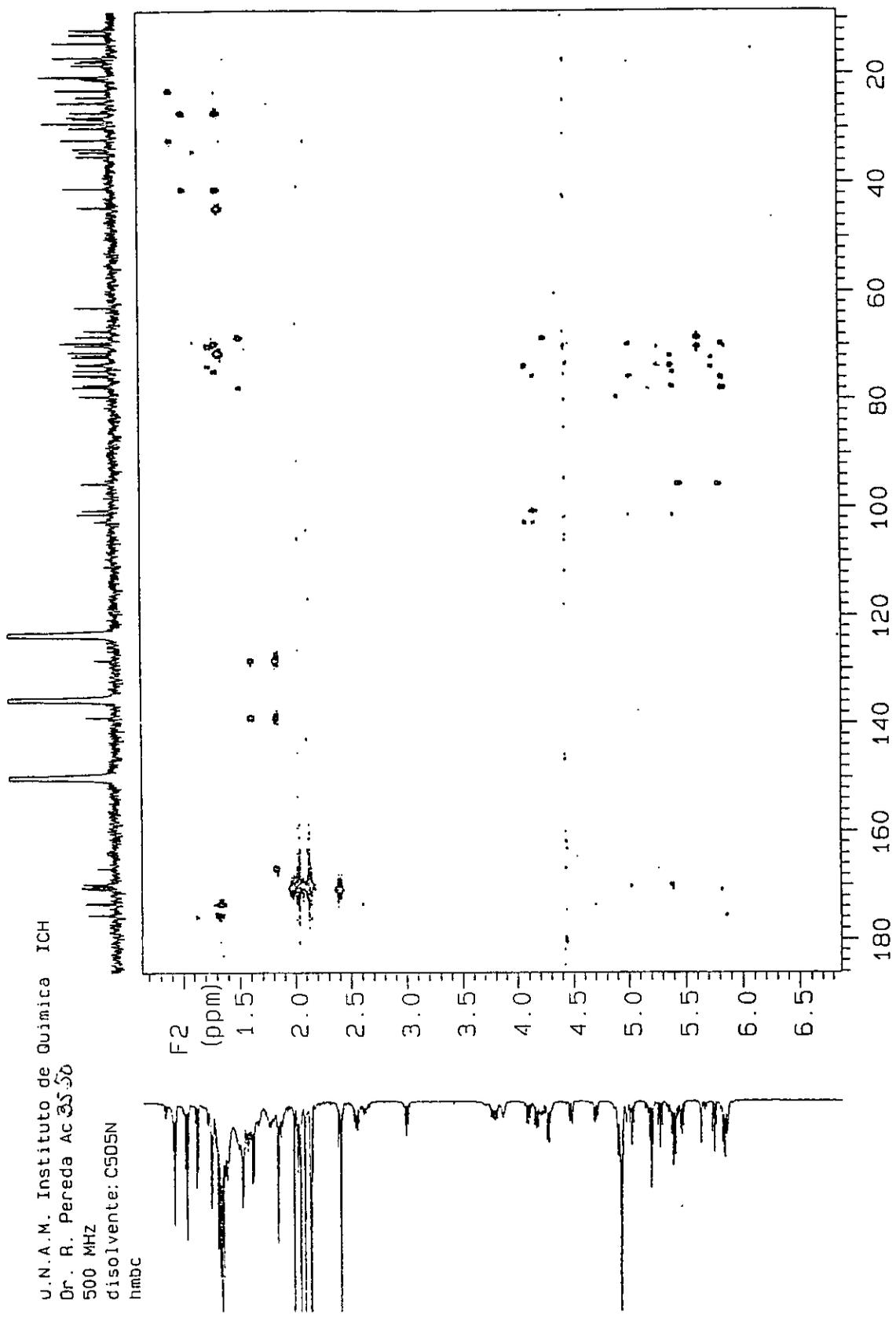
Espectro 25. COSY del derivado paracetilado 23.

U.N.A.M. Instituto de Quimica ICH
Dr. R. Pareda AC35.50
500 MHz
disolvente: C5D5
COSY



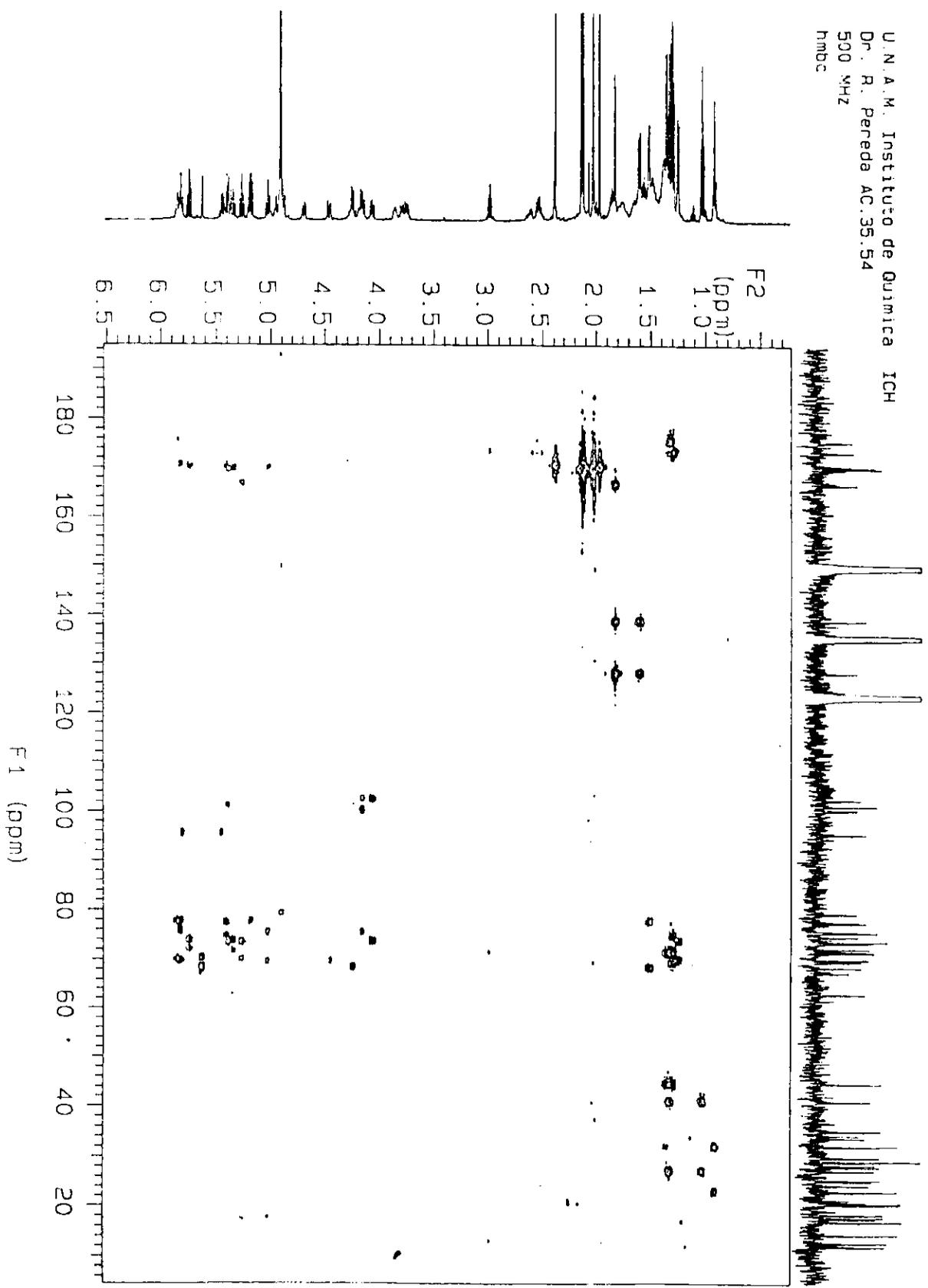
Espectro 26. COSY del derivado peracetilado 24.

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda Ac 3550
500 MHz
disolvente: C5D5N
hmbc



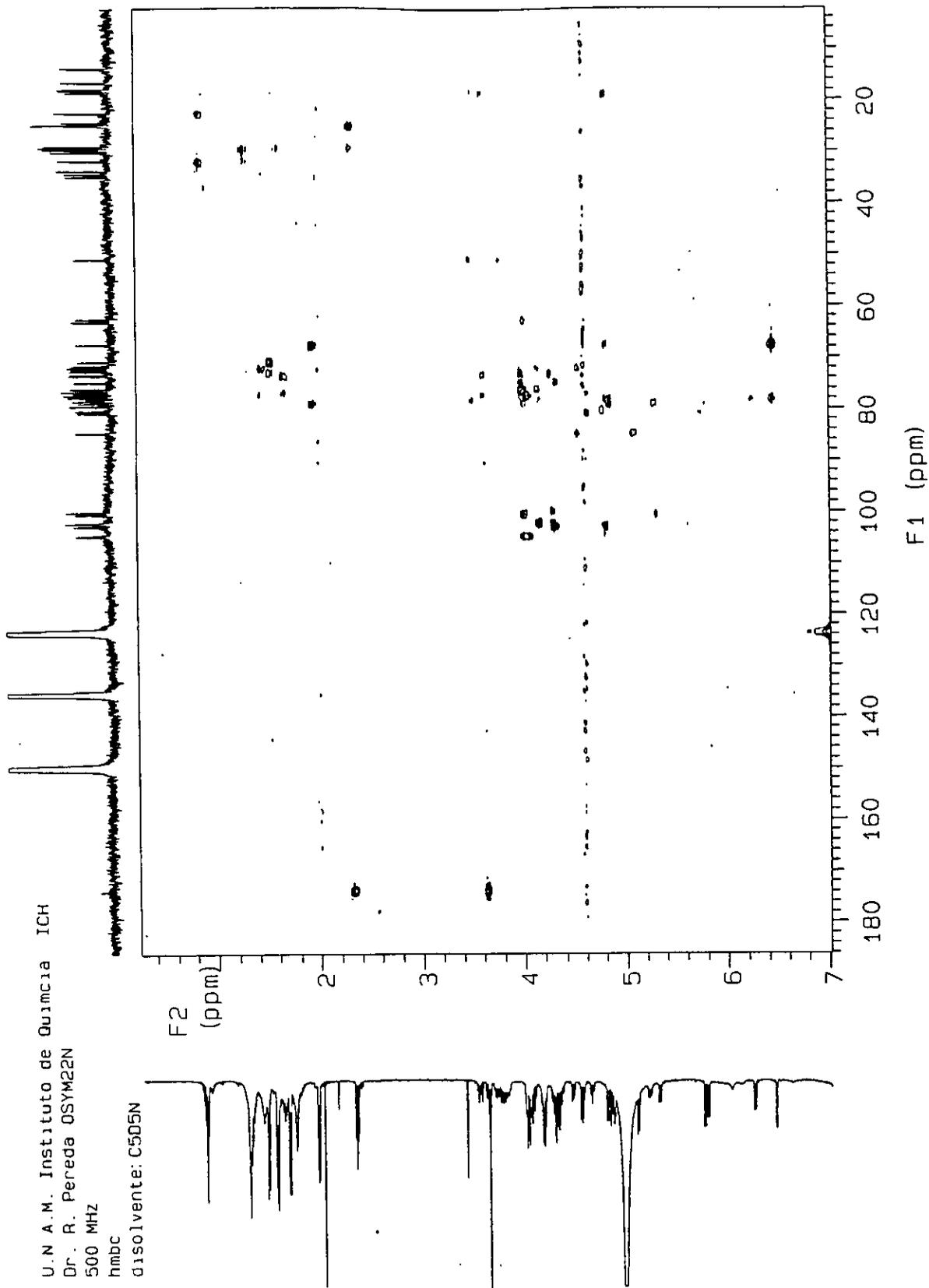
Espectro 27. HMBC del derivado peracetilado 24.

U. N. A. M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda AC.35.54
500 MHz
hmbc



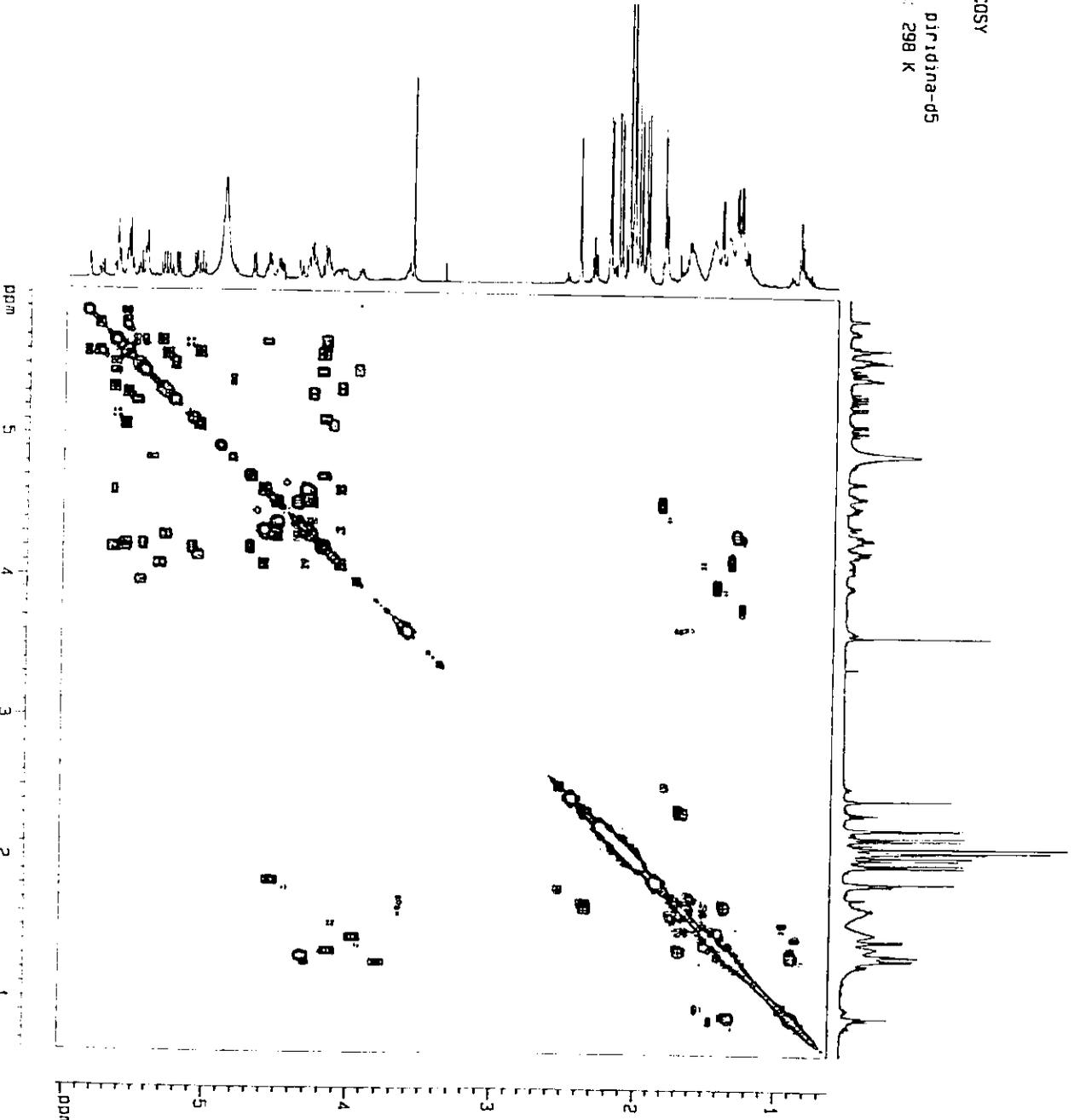
Espectro 28. HMBC del derivado peracetilado 25.

U.N.A.M. Instituto de Química ICH
Dr. R. Pereda QSYM22N
500 MHz
hmbc
disolvente: C5D5N



Espectro 29. HMBC del éster púrgico B (27).

Gradiente-COSY
 OsAce + 22
 Disolvente: piridina-d5
 Temperatura: 298 K
 DMX500



Espectro 30. COSY del derivado peracetilado del éster púrgico B (30).

Current Data Parameters

NAME pr04k22
 EXPNO 4
 PROCNO 1

F2 - Acquisition Parameters

DATE_ 971008
 TIME 23 22
 INSTRUM spect
 PULPROG zgpg30
 TD 1024
 SFO 500.136279 MHz
 DS 2
 AS 10
 SF 500.136279 MHz
 AF 500.136279 MHz
 QF 1.4000000
 RF 1.4000000
 WFO 1.4000000
 WFO2 1.4000000
 WFO3 1.4000000
 WFO4 1.4000000
 P1 10.0000000
 PRG 10.0000000
 IPR1 1000.0000000
 IPR2 1000.0000000
 IPR3 1000.0000000
 IPR4 1000.0000000
 IPR5 1000.0000000
 IPR6 1000.0000000
 IPR7 1000.0000000
 IPR8 1000.0000000
 IPR9 1000.0000000
 IPR10 1000.0000000
 SFO2 500.136279 MHz
 SFO3 500.136279 MHz
 SFO4 500.136279 MHz
 SFO5 500.136279 MHz
 SFO6 500.136279 MHz
 SFO7 500.136279 MHz
 SFO8 500.136279 MHz
 SFO9 500.136279 MHz
 SFO10 500.136279 MHz
 R1 0.0000000
 R2 0.0000000
 R3 0.0000000
 R4 0.0000000
 R5 0.0000000
 R6 0.0000000
 R7 0.0000000
 R8 0.0000000
 R9 0.0000000
 R10 0.0000000

F1 - Acquisition Parameters

NO 1
 NS 10
 DS 2
 SFO 500.136279 MHz
 FIDRES 11.890768 Hz
 SF 500.136279 MHz
 SW 5.0660000 MHz
 F2 - Processing parameters
 SI 7
 SF 500.136279 MHz
 DS 2
 SFO 500.136279 MHz
 FIDRES 11.890768 Hz
 SF 500.136279 MHz
 SW 5.0660000 MHz
 F3 - Processing parameters
 SI 7
 SF 500.136279 MHz
 DS 2
 SFO 500.136279 MHz
 FIDRES 11.890768 Hz
 SF 500.136279 MHz
 SW 5.0660000 MHz

F0 - Processing parameters

SI 7
 SF 500.136279 MHz
 DS 2
 SFO 500.136279 MHz
 FIDRES 11.890768 Hz
 SF 500.136279 MHz
 SW 5.0660000 MHz

F1 - Processing parameters

SI 7
 SF 500.136279 MHz
 DS 2
 SFO 500.136279 MHz
 FIDRES 11.890768 Hz
 SF 500.136279 MHz
 SW 5.0660000 MHz

F0 - Processing parameters

SI 7
 SF 500.136279 MHz
 DS 2
 SFO 500.136279 MHz
 FIDRES 11.890768 Hz
 SF 500.136279 MHz
 SW 5.0660000 MHz