

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

Aislamiento y caracterización estructural de cuatro lipopentasacáridos de *Ipomoea pes-caprae*

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Edgar Escalante Sánchez



TUTOR: Rogelio Pereda Miranda

AÑO: 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos:**

El logro de este trabajo 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 UNAM (proyectos: IN200902-2; IX234504).
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca escolar).
- Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por su continua asesoría relacionada con las técnicas cromatográficas utilizadas durante el desarrollo experimental de la presente tesis.
- A la M. en C. Georgina Duarte de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM por el registro de los espectros de masas de alta y baja resolución.
- A la M. en C. Rosa Isela del Villar de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM por la determinación de los espectros de RMN.
- Agradezco finalmente a los doctores. María Cristina Pérez Amador, Alfonso Romo de Vivar, Ricardo Reyes Chilpa, Yolanda Ríos Gómez y René Miranda Ruvalcaba, integrantes del jurado, por su valiosa participación en la revisión y corrección del presente trabajo.

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



Indice	Página
<b>Lista de figuras</b> .....	i
<b>Lista de cuadros</b> .....	v
<b>Glosario</b> .....	vi
<b>1. Introducción</b> .....	1
<b>2. Antecedentes</b> .....	3
<b>2.1</b> La familia Convolvulácea y el género <i>Ipomoea</i> .....	3
<b>2.2</b> Las resinas glicosídicas en la familia Convolvulácea.....	5
<b>2.2.1</b> Lipopentasacáridos de la familia Convolvulacea.....	9
<b>2.3</b> La especie <i>Ipomoea pes-caprae</i> .....	18
<b>3. Justificación</b> .....	23
<b>4. Objetivos</b> .....	24
<b>5. Parte experimental</b> .....	25
<b>5.1</b> Procedimientos generales.....	25
<b>5.1.1</b> Métodos cromatográficos.....	25
<b>5.1.2</b> Determinación de las constantes físicas.....	25
<b>5.2</b> Material vegetal.....	26
<b>5.2.1</b> Preparación del extracto del material vegetal de <i>I pes-caprae</i> ...	26
<b>5.3</b> Fraccionamiento primario del extracto hexánico por cromatografía en columna.....	26
<b>5.4</b> Purificación de la fracción primaria <b>FV</b> mediante cromatografía en columna abierta.....	27
<b>5.5</b> Preparación de derivados.....	28
<b>5.5.1</b> Hidrólisis alcalina.....	28
<b>5.5.2</b> Reacción de acetilación.....	29
<b>5.5.3</b> Reacción de alquilación con diazometano.....	29

5.5.3.1	Preparación del diazometano.....	29
5.5.3.2.	Reacción de alquilación.....	30
5.5.4	Hidrólisis ácida.....	30
5.5.4.1	Análisis de la mezcla de carbohidratos mediante RMN.....	30
5.6	Compuesto acetilado-metilado. Separación mediante CLAP....	31
5.7	Aislamiento y purificación de glicolípidos de la fracción primaria <b>FV</b> de <i>Ipomoea pes-caprae</i> por CLAP.....	31
5.7.1	Obtención de la estoloniferina III (1) y pescapreínas I-III (2- 4)..	31
5.8	Cromatografía líquida de alta presión.....	33
5.8.1	Purificación del derivado <b>FV-SAM</b> mediante CLAP.....	33
5.8.1.1	Condiciones instrumentales: nivel analítico.....	33
5.8.1.2	Condiciones instrumentales: nivel preparativo.....	34
5.8.2	Separación y purificación de glicolípidos de la fracción <b>FV</b> primaria.....	34
5.8.2.1	Condiciones instrumentales: nivel analítico.....	34
5.8.2.2	Condiciones instrumentales: nivel preparativo.....	35
6.	<b>Resultados y discusión</b> .....	36
6.1	Extracción y fraccionamiento.....	36
6.2	Hidrólisis ácida.....	37
6.2.1	Identificación de carbohidratos por RMN.....	37
6.3	Hidrólisis alcalina. Determinación de los ácidos grasos esterificados.....	39
6.4	Derivado acetilado-metilado. Análisis y purificación mediante CLAP.....	42
6.5	Aislamiento y purificación de los glicolípidos individuales a partir de la fracción primaria hexánica.....	45
6.5.1	Separación de los glicolípidos 1- 4.....	49
6.6	Elucidación estructural del ácido glicosídico.....	53

<b>6.7</b>	<b>Elucidación estructural de los glicolípidos 1-4.....</b>	<b>63</b>
<b>6.7.1</b>	<b>Asignación de señales de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C.....</b>	<b>63</b>
<b>6.7.2</b>	<b>Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación.....</b>	<b>82</b>
<b>6.7.3</b>	<b>Diferenciación de los glicolípidos mediante espectrometría de Masas.....</b>	<b>87</b>
<b>7.</b>	<b>Conclusiones.....</b>	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>Bibliografía.....</b>	<b>98</b>

## Lista de figuras

	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Estructura de las resinas glicosídicas de <i>Exogonium purga</i> de acuerdo con Mannich y Schuman (1938).....	8
<b>Figura 2.</b> Ácidos operculínicos A y B.....	10
<b>Figura 3.</b> Ácidos simónicos A y B, núcleos oligosacáridos presentes en <i>Ipomoea batatas</i> e <i>Ipomoea stolonifera</i> .....	10
<b>Figura 4.</b> Mamósidos f y g aislados de <i>Merremia mammosa</i> .....	12
<b>Figura 5.</b> Estructura de los merremósidos h <sub>1</sub> y h <sub>2</sub> .....	13
<b>Figura 6.</b> Estructura de los mamósidos H <sub>1</sub> y H <sub>2</sub> .....	13
<b>Figura 7.</b> Ácidos multifidínicos A y B, y quamoclínico de <i>Quamoclit Pennata</i> .....	14
<b>Figura 8.</b> Ácido microfílico aislado de <i>Convolvulus microphyllus</i> .....	15
<b>Figura 9.</b> Ácido farbítico C de <i>Pharbitis nil</i> .....	16
<b>Figura 10.</b> Ácido woodrosínico A de <i>Ipomoea tuberosa</i> .....	17
<b>Figura 11.</b> Estructura de las woodrosinas I y II ( <i>Ipomoea tuberosa</i> ).....	17
<b>Figura 12.</b> Fotografía de las partes aéreas de <i>Ipomoea pes-caprae</i> .....	19
<b>Figura 13.</b> Fotografía de la “hierba de la raya” en Bahía “La Chamela”, Jalisco.....	19
<b>Figura 14.</b> Fotografía de la flor de <i>Ipomoea pes-caprae</i> .....	20
<b>Figura 15.</b> Cromatograma correspondiente a la agrupación de las fracciones primarias FV a FIX mediante cromatografía en capa fina en gel de sílice.....	35
<b>Figura 16.</b> Espectros de RMN <sup>1</sup> H de la mezcla de carbohidratos generada por hidrólisis ácida de la FV hexánica y del estándar de ramnosa.....	37
<b>Figura 17.</b> Expansión de las señales de los espectros de la figura 16..	37

<b>Figura 18.</b>	Cromatograma de gases generado por la fase orgánica de la hidrólisis alcalina.....	38
<b>Figura 19.</b>	Espectros de masas de los ácidos grasos presentes en la fase etérea de la hidrólisis alcalina.....	39
<b>Figura 20.</b>	Cromatograma generado en nivel analítico por el derivado <b>FV-SAM</b> .....	42
<b>Figura 21.</b>	Cromatograma del derivado <b>FV-SAM</b> . Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación del ácido simónico B peracetilado y metilado.....	43
<b>Figura 22.</b>	Cromatograma de la fracción primaria <b>FV</b> en nivel analítico con detector UV.....	45
<b>Figura 23.</b>	Cromatograma de la fracción primaria <b>FV</b> en nivel analítico con detector de índice de refracción.....	46
<b>Figura 24.</b>	Cromatograma de la fracción primaria <b>FV</b> en nivel preparativo con detector de índice de refracción.....	48
<b>Figura 25.</b>	Cromatograma de la subfracción <b>B</b> . Aplicación del reciclaje para la purificación de la estoloniferina III (1).....	49
<b>Figura 26.</b>	Cromatograma de la subfracción <b>D</b> . Aplicación del reciclaje para la purificación de la pescapreína I (2).....	49
<b>Figura 27.</b>	Cromatograma de la subfracción <b>G</b> . Aplicación del reciclaje para la purificación de la pescapreína II (3).....	50
<b>Figura 28.</b>	Cromatograma de la subfracción <b>H</b> . Aplicación del reciclaje para la purificación de la pescapreína III (4).....	51
<b>Figura 29.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H del ácido simónico B acetilado y metilado.....	52
<b>Figura 30.</b>	Espectro de RMN <sup>13</sup> C del ácido simónico B acetilado y metilado.....	53
<b>Figura 31.</b>	Sección del espectro COSY para el núcleo oligosacárido del ácido simónico B acetilado y metilado.....	54
<b>Figura 32.</b>	Sección del espectro TOCSY para el núcleo oligosacárido del ácido simónico B acetilado y metilado.....	55

<b>Figura 33.</b>	Estructuras de las tres unidades monómeras propuestas para ensamblar la estructura del ácido simónico B acetilado y metilado.....	58
<b>Figura 34.</b>	Sección del espectro HMBC del ácido simónico B acetilado y metilado.....	59
<b>Figura 35.</b>	Sección del espectro HMBC del ácido simónico B acetilado y metilado.....	60
<b>Figura 36.</b>	Estructura del ácido simónico B acetilado y metilado obtenido de la purificación del derivado <b>FV-SAM</b> .....	61
<b>Figura 37.</b>	Espectros de RMN <sup>1</sup> H de la estoloniferina III (1) y de las pescapreínas I-III (2- 4).....	63
<b>Figura 38.</b>	Espectros de RMN <sup>13</sup> C de la estoloniferina III (1) y de las pescapreínas I-III (2- 4).....	64
<b>Figura 39.</b>	Secciones de los espectros de RMN <sup>1</sup> H del ácido simónico B (peracetilado y metilado) y de la pescapreína II (3)..	65
<b>Figura 40.</b>	Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida de la estoloniferina III (1).....	66
<b>Figura 41.</b>	Sección adicional del espectro COSY para la porción oligosacárida de la estoloniferina III (1).....	67
<b>Figura 42.</b>	Sección del espectro TOCSY para la porción oligosacárida de la estoloniferina III (1).....	68
<b>Figura 43.</b>	Sección del espectro TOCSY para la porción oligosacárida de la estoloniferina III (1).....	69
<b>Figura 44.</b>	Sección del espectro HMQC para la región oligosacárida de la pescapreína II (3).....	70
<b>Figura 45.</b>	Sección del espectro HMQC para la porción oligosacárida de la pescapreína II (3).....	71
<b>Figura 46.</b>	Sección del espectro HMQC de la pescapreína I (2) para la asignación de las resonancias de los átomos de carbono anoméricos.....	72
<b>Figura 47.</b>	Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la pescapreína II (3).....	73

<b>Figura 48.</b>	Sección del espectro HMBC. Asignación de resonancias para los átomos de carbono C-4 y C-5 de ramnosa.....	75
<b>Figura 49.</b>	Sección del espectro HMBC de la estoloniferina III (1) utilizado para la asignación de los carbonos carboxílicos (Jal, mb y dl) a través de las correlaciones $^2J_{C-H}$ en las unidades que esterifican el núcleo oligosacárido.....	76
<b>Figura 50.</b>	Sección del espectro HMBC de la pescapreína I (2).....	81
<b>Figura 51.</b>	Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la estoloniferina III (1).....	82
<b>Figura 52.</b>	Sección del espectro HMBC de la estoloniferina III (1) utilizado para determinar las posiciones de esterificación y lactonización del núcleo oligosacárido.....	83
<b>Figura 53.</b>	Correlaciones observadas en el espectro HMBC para confirmar la secuencia de glicosidación y los sitios de acilación en los compuestos 1- 4.....	84
<b>Figura 54.</b>	Esquema del patrón de fragmentación general generado por los compuestos 1- 4.....	86
<b>Figura 55.</b>	Espectro de masas FAB (modo negativo) generado por la estoloniferina III (1).....	89
<b>Figura 56.</b>	Espectro de masas FAB (modo negativo) generado por la pescapreína I (2).....	89
<b>Figura 57.</b>	Espectro de masas FAB (modo negativo) generado por la pescapreína II (3).....	90
<b>Figura 58.</b>	Espectro de masas FAB (modo negativo) generado por la pescapreína III (4).....	90
<b>Figura 59.</b>	Estructura de las simoninas III-V ( <i>Ipomoea batatas</i> ).....	92
<b>Figura 60.</b>	Estructura de las estoloniferinas constituidas por el ácido simónico B( <i>Ipomoea stolonifera</i> ).....	94
<b>Figura 61.</b>	Estructura de las pescapreínas I-III (2- 4) obtenidas de las subfracciones D, G y F de la fracción FV hexánica de <i>I. pes-caprae</i> .....	95

## Lista de cuadros

	Página
<b>Cuadro 1.</b> Productos de hidrólisis ácida de las resinas glicosídicas de La familia Convolvulaceae.....	7
<b>Cuadro 2.</b> Resumen del fraccionamiento preliminar mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico de la jalapina extraída de partes aéreas de <i>Ipomoea pes-caprae</i> ..	27
<b>Cuadro 3.</b> Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la fracción FV.....	28
<b>Cuadro 4.</b> Resultados de la dispersión óptica rotatoria efectuada para la estoloniferina III (1) y las pescapreínas I-III (2- 4).....	33
<b>Cuadro 5.</b> Resultados obtenidos mediante CG-EM para la fase orgánica obtenida de la hidrólisis ácida de la fracción FV.....	41
<b>Cuadro 6.</b> Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para el núcleo oligosacárido del ácido simónico B peracetilado y metilado.....	57
<b>Cuadro 7.</b> Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para la parte oligosacárida de la estoloniferina III (1), y de las pescapreínas I-III (2- 4).....	78
<b>Cuadro 8.</b> Desplazamientos químicos en la RMN $^1\text{H}$ para la aglicona y los residuos ácidos de la estoloniferina III (1) y de las pescapreínas I-III (2- 4).....	79
<b>Cuadro 9.</b> Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para la parte oligosacárida de la estoloniferina III (1) y de las pescapreínas I-III (2 - 4).....	80
<b>Cuadro 10.</b> Desplazamientos químicos en la RMN $^{13}\text{C}$ para la aglicona y los residuos ácidos de la estoloniferina III (1) y de las pescapreínas I-III (2- 4).....	81



## Glosario

Significado	Término o Abreviación
Acetato de etilo.	AcOEt
Anhídrido acético.	Ac <sub>2</sub> O
Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.	CG-EM
Cloroformo.	CHCl <sub>3</sub>
Acetonitrilo.	CH <sub>3</sub> CN
Diazometano.	CH <sub>2</sub> N <sub>2</sub>
Centímetros.	cm
Cromatografía de líquidos de alta presión.	CLAP
Categoría de resinas que se refiere a la fracción polar e insoluble en éter.	Convolvulina
Correlation Spectroscopy.	COSY
Espectrometría de masas.	EM
Éter.	Et <sub>2</sub> O
Alcohol etílico.	EtOH
Gramos.	g
Ácido clorhídrico.	HCl
Heteronuclear multiple bond coherence.	HMBC
Heteronuclear multiple quantum coherence.	HMQC

Agua.	H <sub>2</sub> O
<i>n</i> -hexano.	Hex.
Índice de refracción	I.R.
Categoría de resinas que se refiere a la fracción poco polar y soluble en éter.	Jalapina
Hidróxido de potasio.	KOH
Metros.	m
Metanol	MeOH
Miligramos.	mg
Minutos.	min.
Mililitros.	ml
Nitrógeno gaseoso.	N <sub>2</sub>
Sulfato de sodio anhidro.	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Nanómetros.	nm
Resonancia magnética nuclear de protones	RMN <sup>1</sup> H
Resonancia magnética nuclear de carbono trece.	RMN <sup>13</sup> C
Total correlation spectroscopy	TOCSY

## I. INTRODUCCION

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 inicia con aquellas especies que se sabe tienen antecedentes farmacológicos de acuerdo al conocimiento adquirido en la medicina 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* fue 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 (Iarwon 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 los encontrados en las plantas de las convolvuláceas (Jiang *et al.*, 1995).

## II. ANTECEDENTES

### 2.1 La familia Convolvuláceae y el género *Ipomoea*.

La familia de las convolvuláceas se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, siendo especialmente abundante en las zonas tropicales de Asia y América, particularmente en regiones que presentan temporadas de estiaje. En el mundo se estiman alrededor de 55 géneros y 1650 especies, los géneros más representativos son *Convolvulus* (250 especies), *Ipomoea* (500 especies) y *Cuscuta* (170 especies). Dentro de las angiospermas, la familia Convolvulaceae representa unas de las más grandes y diversas de México, reportándose 15 géneros y aproximadamente 217 especies, siendo el género *Ipomoea* uno de los mayoritarios con un grado de endemismo aproximadamente del 65 %, es decir, son 104 especies presentes en México de 160 especies en el género. La distribución de estas especies en el país muestra que el endemismo de *Ipomoea* está concentrado en las regiones subtropicales de la costa del pacífico, mientras que en el golfo de México sólo hay dos especies endémicas, *I. eximia* e *I. purga* en el estado de Veracruz, en contraste con un área de la misma dimensión de Jalisco a Oaxaca donde 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 *Tyrinthinae* 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 son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Existen unas 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. pes-caprae* 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*) forman arbustos perennes leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1.0 metro. Las especies *Ipomoea arborescens* e *Ipomoea muruoides* crecen en forma de árboles de madera suave y alcanzan de 3 a 9 metros de altura.

Las flores del grupo son típicamente conocidas por su aspecto tubular y sus colores brillantes, generalmente con duración efímera, limitándose a las horas matinales. Este grupo de plantas representa uno de los elementos más conspicuos de la flora mexicana.

## 2.2 Las resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae

Los glicolípidos del género *Ipomoea* constituyen una serie de oligosacáridos que tienen la particularidad de ser moléculas anfipáticas por la presencia simultánea en su estructura de un núcleo oligosacárido hidrofílico y una porción hidrofóbica constituida por la aglicona. Debido a esta característica estructural, se ha postulado que estos glicolípidos desempeñan un papel importante en la química de la familia de las convolvuláceas (Bah, 1997), ya que un gran número de sus propiedades biológicas pueden explicarse como un resultado de su posible acción ionofórica, e.g. la citotoxicidad, misma que provocaría perturbaciones en las membranas celulares (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002).

Se ha descrito la existencia de actividad alucinógena conocida para los miembros del género *Ipomoea*, la cual se debe a la presencia de alcaloides, compuestos característicos de la familia (Stauffer *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. parastica* (Amor-Prats y Harnborne, 1993) o la actividad analgésica de *I. intrapilosa* (Osuna *et al.*, 1996). Esta familia de plantas también ha mostrado una importante actividad alelopática por ejemplo *I. tricolor* (Anaya *et al.*, 1995) donde se ha demostrado que los compuestos responsables son las resinas glicosídicas presentes en las partes aéreas (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 que mostró la relación entre los glicolípidos con cierta actividad biológica es el efectuado en las partes aéreas de *I. leari* donde se aisló un glicósido denominado "Ipolearosido". Este glicolípido demostró poseer actividad anticancerígena (Sarin *et al.*, 1973). Las glicorresinas de *Ipomoea bahiensis* mostraron actividad antimicrobiana en *Staphylococcus aureus*, *Neurospora crassa* y *Streptococcus faecalis* (Bieber *et al.*, 1986).

La naturaleza química y la complejidad estructural de las resinas glicosídicas ha constituido un obstáculo que ha dificultado durante mucho tiempo el aislamiento de sus constituyentes individuales y, por lo tanto, la caracterización de su estructura molecular. Entre los métodos comunes de separación que se han empleado para tratar de resolver las mezclas complejas de oligosacáridos que conforman las resinas de las convolvuláceas se cuenta con los procedimientos de partición líquido-líquido y las técnicas cromatográficas en capa fina y columna. De las particiones, en un principio sólo se obtuvieron dos categorías de resinas, la fracción poco polar y soluble en éter denominada "jalapina" y la insoluble en ese disolvente o "convolvulina", de acuerdo a la clasificación de Mayer (Ono, 1989b).

Las resinas glicosídicas representan un complejo de glicolípidos de alto peso molecular. Por medio de la reacción de saponificación (hidrólisis alcalina), se ha logrado la separación de los ácidos orgánicos de cadena corta volátiles unidos por enlace de tipo éster al núcleo oligosacárido; la subsecuente hidrólisis ácida libera ácidos grasos hidroxilados y una mezcla de monosacáridos (figura 1). En el **cuadro 1** se enlistan algunos de los productos que con mayor frecuencia se obtienen de los procesos degradativos de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas.



Cabe destacar que al parecer el ácido jalapινόico representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas glicosídicas del género *Ipomoea*.

**Cuadro 1.** Principales productos de la hidrólisis de las resinas glicosídicas.

Ácidos volátiles	Ácidos grasos hidroxilados	Azúcares
Ácido acético	7-OH-C <sub>10</sub>	D-glucosa
Ácido propiónico	11-OH-C <sub>14</sub> (Ac. Convolvulinóico)	L-ramnosa
Ácido isobutírico	11-OH-C <sub>16</sub> (Ac. Jalapινόico)	D-fucosa
Ácido $\alpha$ -metil- $\beta$ -hidroxibutírico	3,12-di-OH-C <sub>16</sub> (Ac. Operculónico)	D-quinovosa
Ácido $\alpha$ -metilbutírico	3-11-di-OH-C <sub>14</sub> (Ac. Ipurónico)	
Ácido <i>n</i> -isovalérico	Tri-OH-C <sub>14</sub> (Ac. Brasilíolico)	
Ácido tíglico		
Ácido cinámico		

La determinación de la estructura de las resinas glicosídicas se ha realizado mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas para la identificación de las dos porciones principales que se obtienen de la saponificación de los productos naturales: en primer lugar, la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas permite la cuantificación de cada uno de los residuos que esterifican al núcleo oligosacárido a través del análisis de los cromatogramas registrados, en tanto que los espectros generados por impacto electrónico permiten establecer el peso y facilitan la identificación de los ácidos grasos ligados a la porción oligosacárida (Bah 1997). La secuencia de unión de los monosacáridos se ha determinado por permetilación e identificación de los azúcares metilados y de los acetatos derivados por hidrólisis ácida parcial de los polisacáridos (Okabe y Kawasaki, 1970). El empleo de la cromatografía de líquidos para la identificación de los azúcares generados mediante hidrólisis ácida de las resinas sólo permite establecer la naturaleza de éstos. Por lo tanto, se utiliza la resonancia magnética

nuclear de los ácidos glicosídicos y sus derivados peracetilados para confirmar la secuencia de glicosidación (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

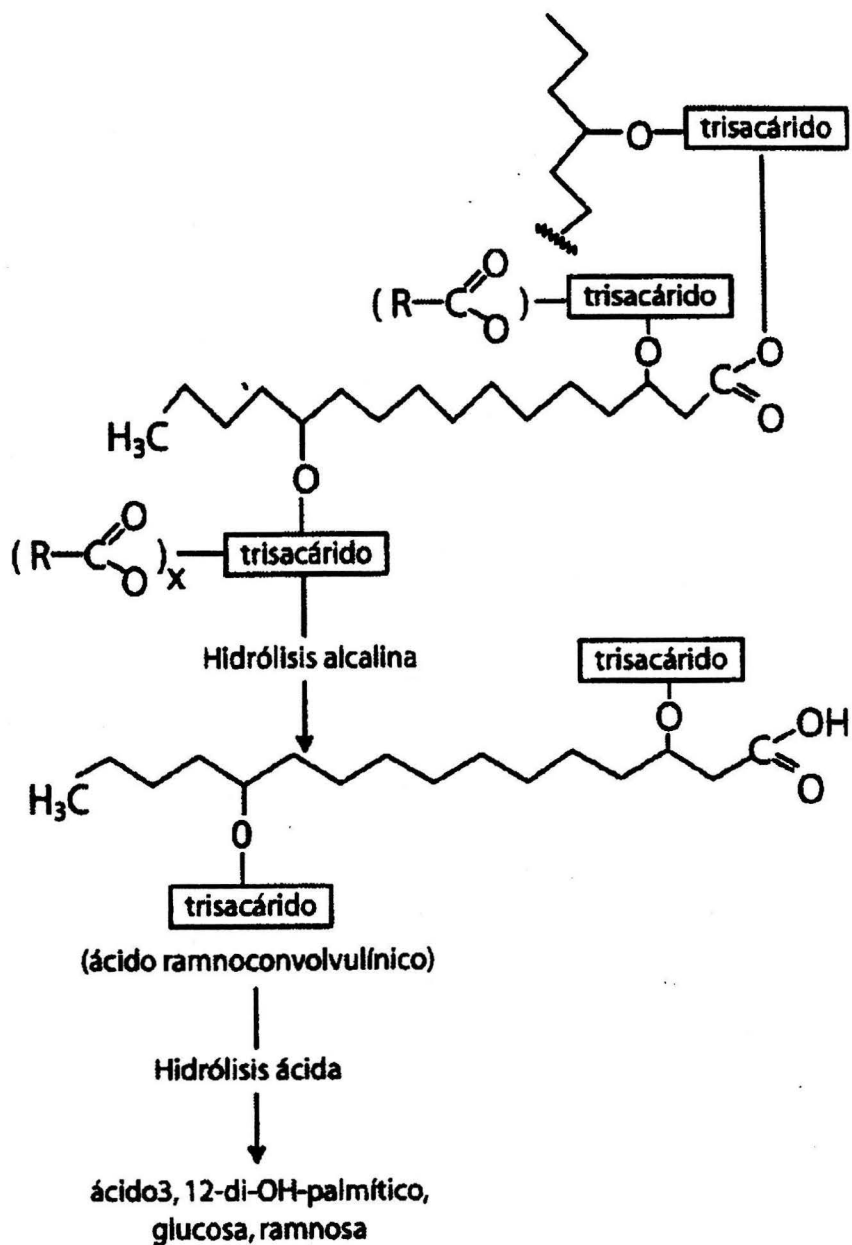


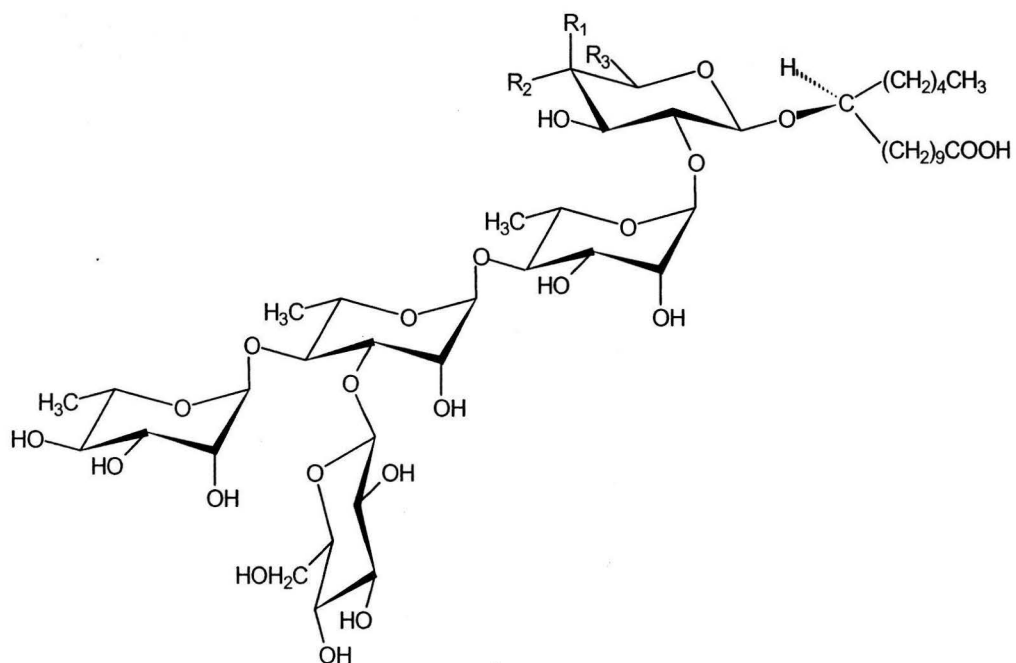
Figura 1. Estructura de las resinas glicosídicas de *Exogonium purga* (*Ipomoea purga*) de acuerdo con Mannich y Schuman (1938).

### 2.2.1 Lipopentasacáridos de la familia Convolvulaceae

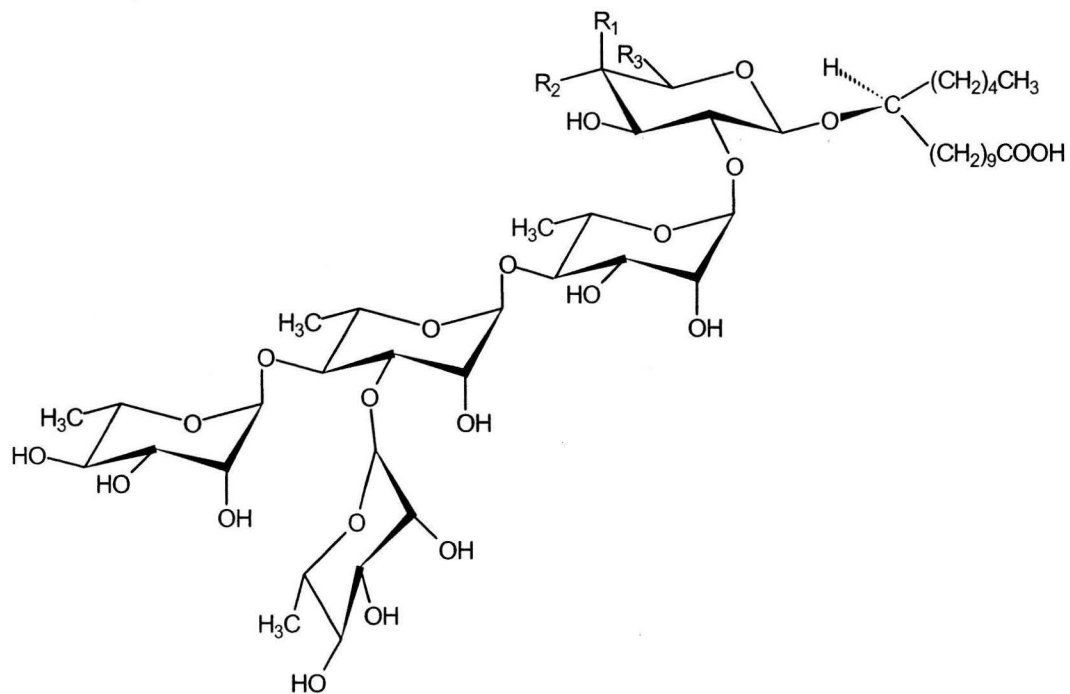
En la literatura se describen varios núcleos pentasacáridos presentes en diversas especies de convolvuláceas. En *Ipomoea operculata* los ácidos glicosídicos operculínicos A y B (fig. 2) fueron generados como productos de hidrólisis básica de las operculinas I-V, VII-X y XIII-XVIII (Ono, *et al.*, 1989; 1990; 1991; 1992) además, los ácidos; acético, tíglico, *n*-valérico, propiónico y (2S)-2-metilbutírico isovalérico. Del mismo modo el ácido operculínico A se describió también en las estoloníferas IV-VII (Noda *et al.*, 1994a) de la especie *Ipomoea stolonifera* y también en la especie *Quamoclit pennata* (Ono *et al.*, 1992) entre otras.

Los ácidos simónicos A y B (fig. 3) están presentes en las simoninas II-V obtenidas a partir de la fracción de la jalapina extraída de la raíz de *Ipomoea batatas* (Noda *et al.*, 1992a), cuya saponificación también generó restos de ácido (2S)-2-metilbutírico, *n*-octanóico, *n*-decanóico y *n*-dodecanóico. El ácido simónico B también se encuentra como uno de los núcleos oligosacáridos constitutivos de las estoloníferas I-III (Noda *et al.*, 1994). Los ácidos orgánicos liberados en la saponificación de las estoloníferas fueron (2S)-2-metilbutanoico, isobutanóico, *n*-hexanóico, *n*-octanóico y *n*-decanóico.

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*, *Merremia hungaiensis* (Noda *et al.*, 1994b; 1995) y *Merremia mammosa* (Kitakawa *et al.*, 1989).



**Figura 2.** Ácidos operculínicos A ( $R_1=OH$ ,  $R_2=R_3=H$ ) y B ( $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=CH_2OH$ ).



**Figura 3.** Ácidos simónicos A ( $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=CH_2OH$ ) y B ( $R_1=OH$ ,  $R_2=R_3=H$ ).

La saponificación de las tuguajalpinas I-X, (resinas glicosídicas obtenidas de la jalapina extraída de la raíz de *Merremia hungaiensis*) rindió ácido operculínico A y restos de acilación de cadena larga no reportados antes en ninguna especie de la familia convolvulaceae como los ácidos palmítico, esteárico y araquidónico (Noda *et al.*, 1994b; 1995).

### **Resinas pentasacáridas de *Merremia mammosa***

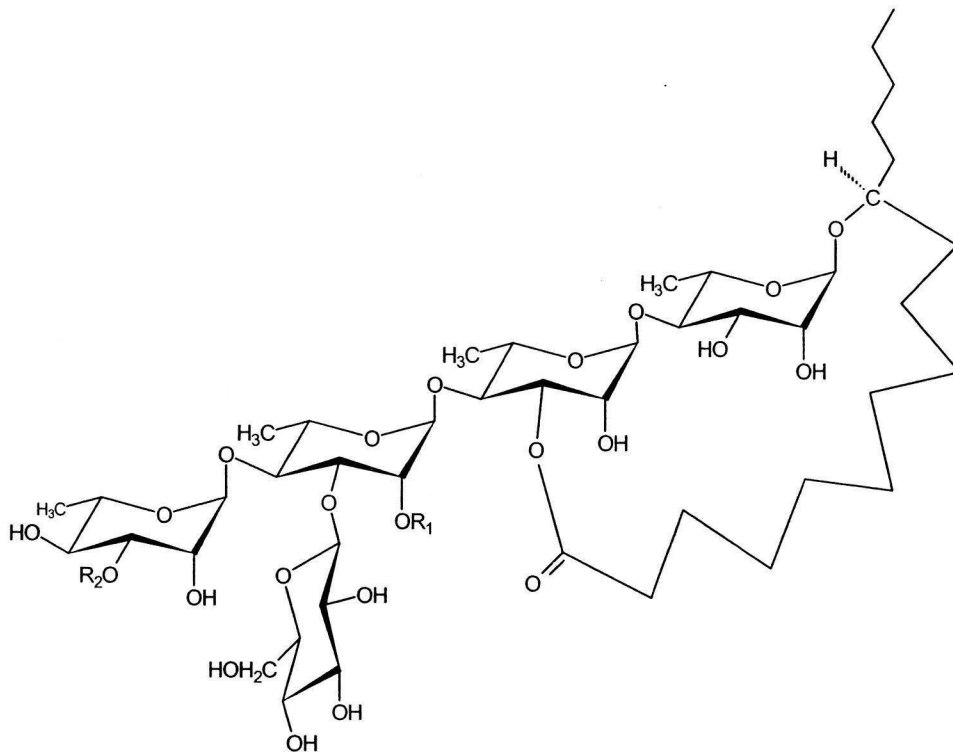
Se ha reportado la caracterización química de trece resinas glicosídicas obtenidas a partir del extracto clorofórmico del tubérculo fresco de *Merremia mammosa*.

Estos estudios se iniciaron desde hace algunos años por el grupo de Kitagawa (1988; 1989; 1996<sup>a</sup>; 1996b) cuando se aislaron los primeros nueve merremósidos. Así en las primeras publicaciones se menciona la interesante actividad ionofórica de los compuestos presentes en estas resinas y más recientemente la existencia de otras cuatro resinas nuevas; los mamósidos A, B, H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> (Kitagawa *et al.*, 1997).

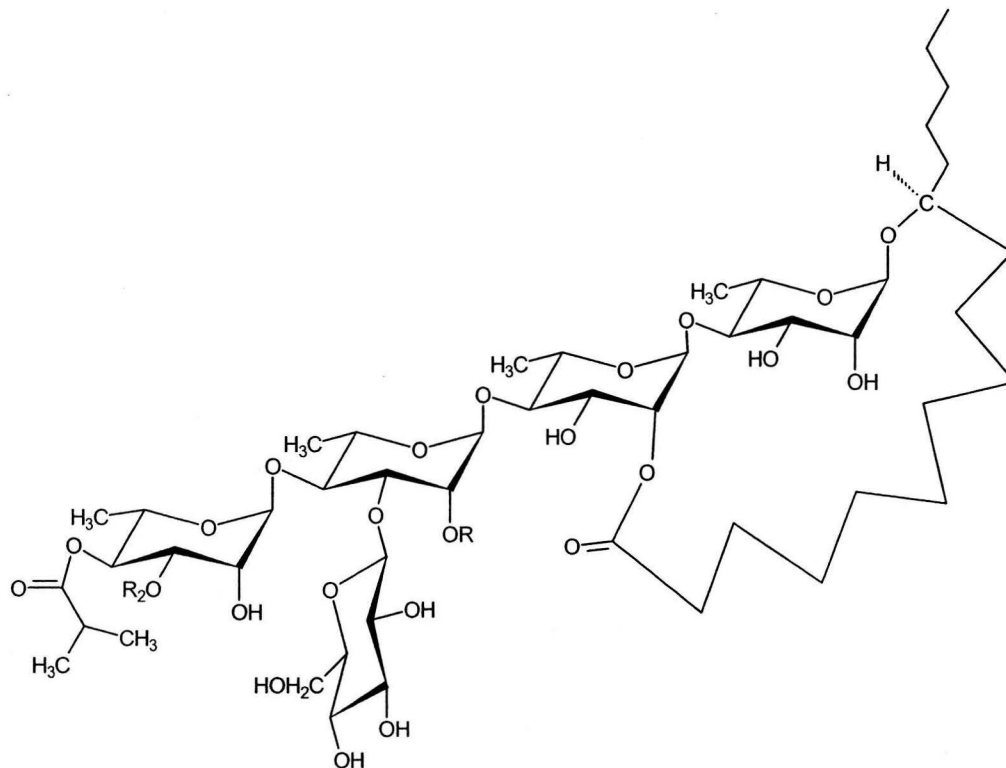
Sin embargo, la elucidación estructural de estos compuestos se efectuó recientemente (Kitakawa *et al.*, 1997), a partir de lo cual se elucidó un núcleo pentasacárido novedoso presente en los merremósidos f, g (fig. 4), h<sub>1</sub> y h<sub>2</sub> (fig.5) mientras que los mamósidos H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> (figura 6) poseen el núcleo pentasacárido ya conocido que es el ácido operculínico A. También, se elucidó un tetrasacárido nombrado mamósido I. 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 y la síntesis de uno de los ácidos glicosídicos (mamósido I) a partir del (11S)-jalipinolato de metilo.

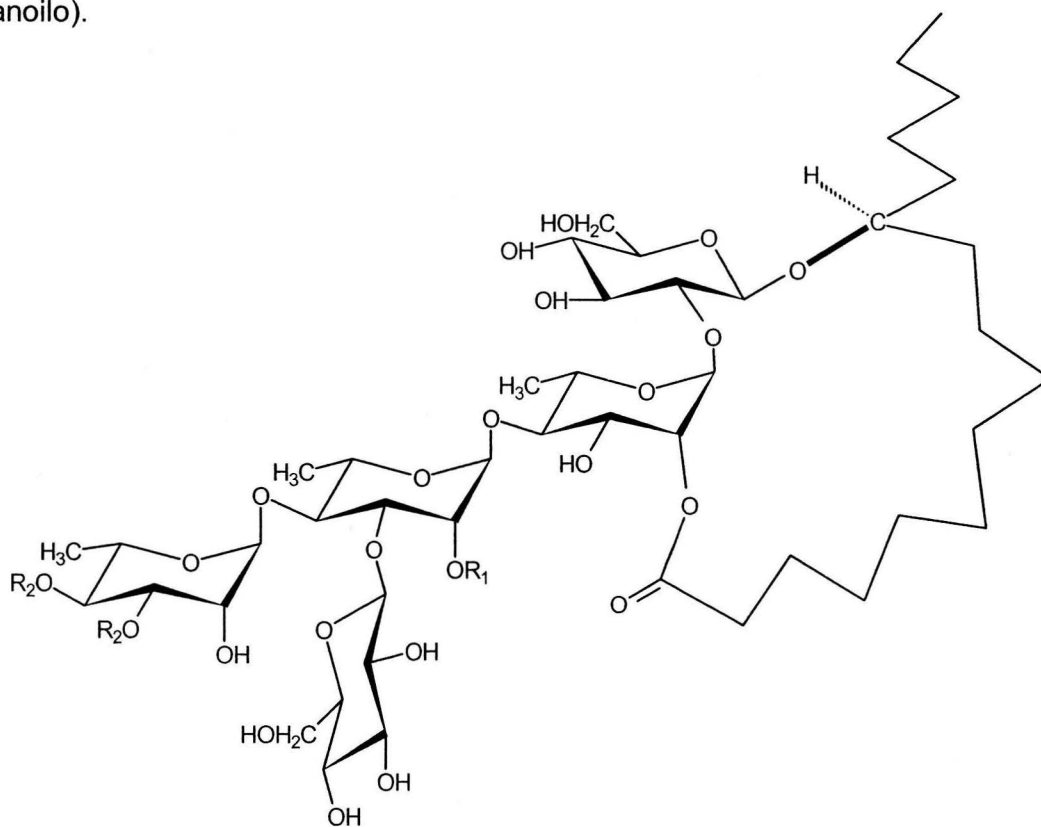
La secuencia de glicosidación en los compuestos se estableció a través de la metilación del ácido glicosídico respectivo seguida de la metanólisis para formar los monosacáridos metilados en las posiciones hidroxílicas libres. Es importante mencionar que aún cuando en la actualidad existe metodología en la RMN para lograr la elucidación estructural de estos glicolípidos, esta investigación se basó exclusivamente en los métodos degradativos tradicionales y de síntesis.



**Figura 4.** Merremósido f ( $R_1 = (2S)$ -2- metilbutanoilo,  $R_2 =$  isobutanoilo) y Merremósido g ( $R_1 = R_2 =$  isobutanoilo).



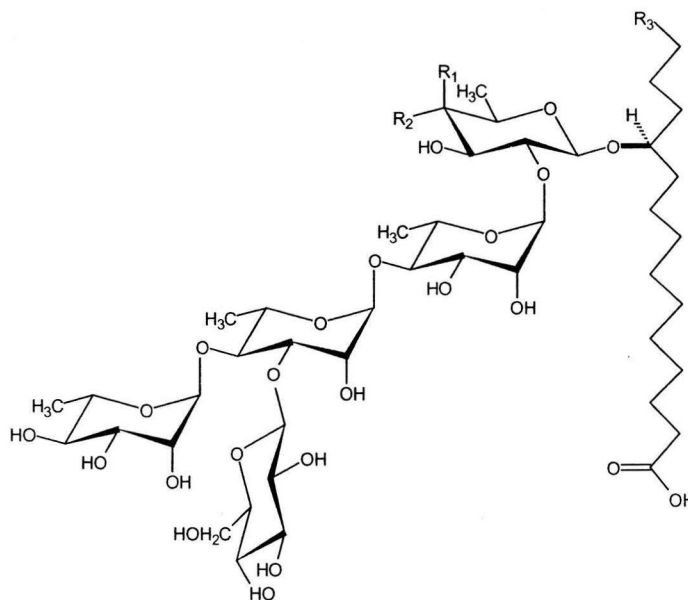
**Figura 5.** Merremósido  $h_1$  ( $R = (2S)$ -2-metilbutanoilo) y Merremósido  $h_2$  ( $R =$  isobutanoilo).



**Figura 6.** Mamósido  $H_1$ :  $R_1 = (2S)$ -2-metilbutanoilo,  $R_2 =$  isobutanoilo Mamósido  $H_2$ :  $R_1 = R_2 =$  isobutanoilo.

## Multifidinas I y II

De la jalapina de las hojas de *Quamoclit x multifida*, planta decorativa que es un híbrido de *Quemoclit pennata* (L.) Bojer (*Ipomoea* (L.) *quamoclit* L.) y *Q. Coccinea* Moench (*I. hederifolia*), 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). Los ácidos multifidínicos A y B se obtuvieron como pentasacáridos novedosos con las mismas unidades monosacáridas y secuencia de glicosidación (fig. 7), pero diferente aglicona; el ácido multifidínico A es un glicósido del ácido convolvulinólico mientras que el ácido multifidínico B es un glicósido del ácido jalapínico. La elucidación estructural de estos compuestos se hizo empleando métodos químicos, y análisis tanto de RMN bidimensional como de espectrometría de masas mediante bombardeo con átomos rápidos(Ono *et al.*, 1997).

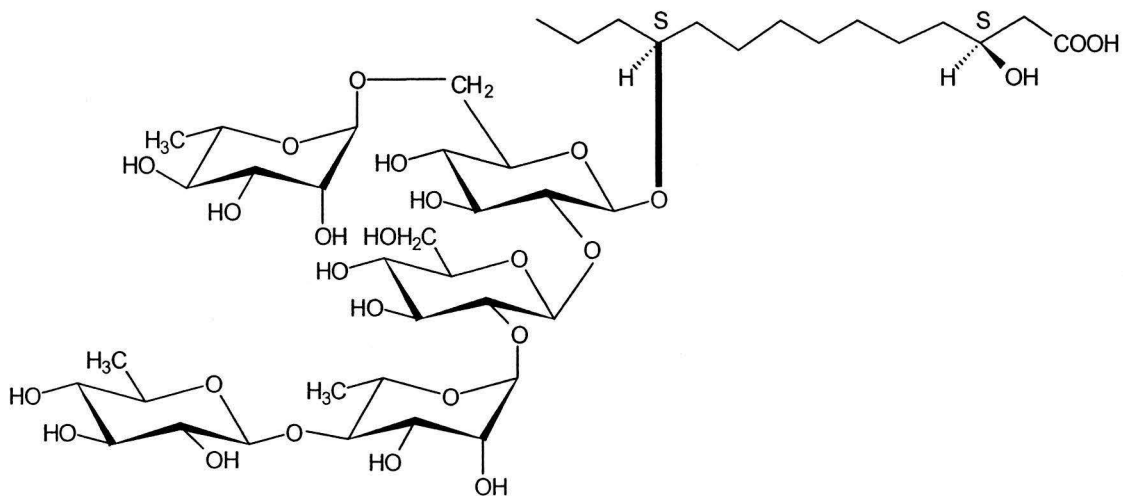


**Figura 7.** Ácidos multifidínicos: A ( $R_1=R_3=H$ ,  $R_2=OH$ ) y B ( $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=C_2H_5$ ). Ácido quamoclínico:  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=C_2H_5$ .





Estos ácidos glicosídicos tienen como aglicona al ácido ipurólico que es el (3S, 11S)-3,11-dihidroxihexadecanoico. Su estructura se elucidó mediante el empleo de RMN y EM (Ono *et al.*, 1990).



**Figura 9.** Estructura molecular del Ácido farbítico C.

Dos nuevas resinas glicosídicas llamadas woodrosinas I y II se aislaron de la fase insoluble en éter (convolvulina) extraída de los tallos de *Ipomoea tuberosa*. La hidrólisis alcalina de ambas woodrosinas proporcionó ácido (2S)-2-metilbutanóico y el glicósido pentasacárido nombrado como ácido woodrosínico A.

La hidrólisis ácida resultó en una mezcla de ácido jalapínico y de los azúcares monosacáridos ramnosa y glucosa. Sus estructuras también se determinaron a partir de la espectroscopía de RMN y espectrometría de masas.

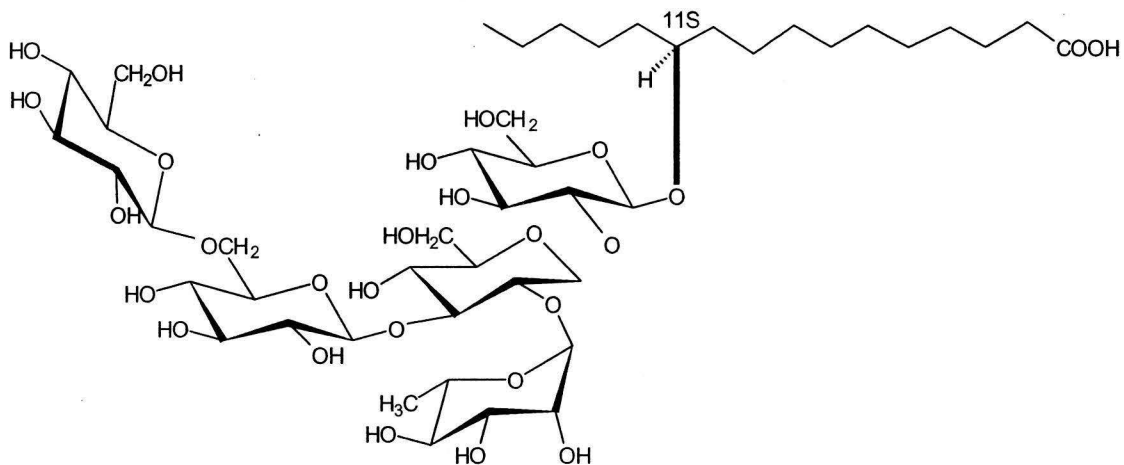


Figura 10. Estructura molecular del Ácido woodrosínico A.

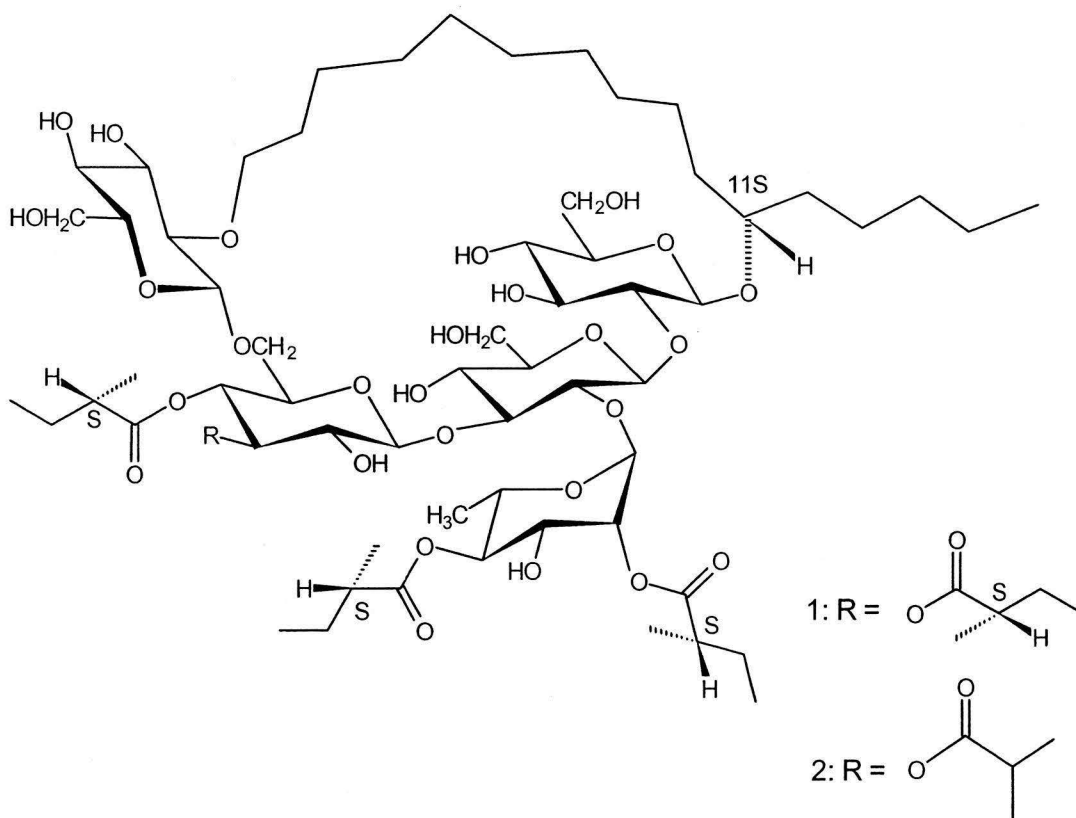
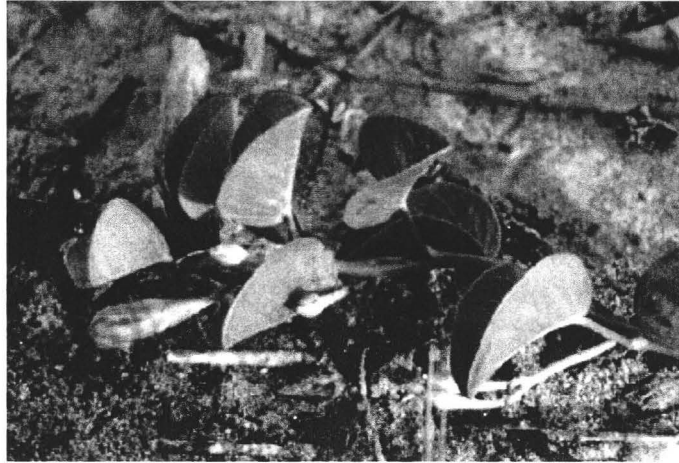


Figura 11. Estructura molecular de las woodrosinas I (1) y II (2).

Es importante aclarar, que la diversidad en las estructuras de los glicolípidos en las diferentes especies hace que no sea posible establecer una correlación de tipo quimiosistemático. Así aún cuando el género *Merremia* es un género diferente a *Ipomoea*, existe una incertidumbre en la clasificación de las especies incluidas en estos géneros, 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*, así también, *Pharbitis nil*, probablemente corresponda a *Ipomoea nil* (L.) Roth, serie *Pharbitis* (ácido farbítico D) (Ono *et al.*, 1990b) por lo tanto, es probable que de la misma forma también exista sinonimia para *Ipomoea operculata*.

### **2.3 La especie *Ipomoea pes-caprae***

En México la especie *Ipomoea pes-caprae* se conoce con los nombres de batatilla, churrystate de playa, hierba de la raya o riñonina. Es un bejuco frondoso y rastrero que crece muy bien en la orilla de la playa en el límite de la marea alta, donde forma grandes colonias. Es un bejuco suculento con tallo morado, grueso y postrado, puede extenderse por más de 10 metros, las hojas son simples y alternas, reniformes (en forma de riñón), coriáceas; su nombre es debido a la forma de la hoja pes-caprae o pata de cabra, debido a la similitud de la huella de la pezuña de las cabras. Las hojas más largas que anchas (suborbiculares), miden de 6 a 10 cm de largo, son de color verde oscuro con una superficie lisa y brillante, y comúnmente roídas en el ápice. Los pecíolos son tan largos como los limbos y también poseen lámina ancha.



**Figura 12.** Fotografía de las partes aéreas de la riñonina.

Esta especie se reconoce por su peculiar forma de tenderse sobre la arena, pues generalmente crece guiándose sobre dos grandes tallos paralelos que se extienden hasta medir aproximadamente 75 pies de largo. Es una planta que se desarrolla habitualmente en playas rocosas o arenosas aunque algunas veces también puede hacerlo a campo abierto.



**Figura 13.** Hierba de la raya. Bahía Chamela, Jalisco.

*Ipomoea pes-caprae* tiene flores llamativas de color púpura o rosadas que pueden crecer separadas o en racimo, de 15 cm de largo. Poseen pedúnculos robustos, 1-plurifloros: pedicelos más delgados que los pedúnculos. Tiene un cáliz de 5 sépalos lampiños, óvales o suborbiculares, como de 1 cm de largo, obtusos.

Corola en forma de embudo o campana de color rosa a púpura que mide de 3 a 5 cm de largo, su limbo onduladamente lobado de 5 a 8 cm de ancho, hueca y de 10 lóbulos. Por dentro en el cuello son de un color mucho más intenso; los filamentos, y estambres incluidos, el estigma y estilo son blancos; estas flores solamente duran un día.

Los frutos consisten en cápsulas o vainas, dehiscentes cuando se secan, ovoides a globulosas de 12 a 17 mm de largo. En cada cápsula se encuentran 4 semillas de color café oscuro, con muchos pelos cortos y se ven como si estuvieran forradas de terciopelo, y éstas miden de 6 a 10 mm de largo.



**Figura 14.** Flor de *Ipomoea pes-caprae*.

Sus semillas contienen sustancias químicas que resultan muy venenosas para cualquiera que quiera comerlas, excepto para un pequeño coleóptero de la familia de los gorgojos (Bruchidae) cuyo nombre científico es *Megacerus leucospilus*, es de la misma familia de los gorgojos que encontramos en los frijoles.

Se distribuye a todo lo largo de la costa mexicana, (aunque con mayor endemismo del lado del pacífico) desde los estados de Sonora, Sinaloa, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, así como también en Veracruz, Quintana Roo y Yucatán.

***Ipomoea pes-caprae*** es una planta medicinal usada en muchos países para el tratamiento de muchas enfermedades; se ha empleado en México como un remedio natural para curar procesos inflamatorios, cólicos, trastornos renales y gonorrea entre otras patologías. En Las salinas (Bahía Chamela) Jalisco por ejemplo se prepara un té con las hojas secas previamente trituradas de la planta y se pone en fomento para calmar el dolor en las zonas inflamadas. En la Sierra de los Tuxtlas en Veracruz se utiliza para curar el asma, mientras que en la región de Misantla de ese mismo estado se usa para curar los riñones del mal de orín, para calmar las reúmas y la lumbalgia así como para tratar la disentería, el dolor de cintura y sanar las picaduras de animales ponzoñosos.

Investigaciones clínicas y preclínicas han confirmado algunas propiedades farmacológicas de esta planta. El extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de esta planta exhibe una actividad anticonceptiva considerable así como también una acción analgésica (M.M. de Souza et al.; 1999).

El análisis fitoquímico indicó presencia de esteroides, terpenoides, alcaloides y flavonoides. Pongrpyoon et al., (1992) reportaron que el extracto etéreo de *Ipomoea pes-caprae* inhibía la contracción en íleon de cobayos. El fraccionamiento de los extractos guiado por el bioensayo resultó en el aislamiento de 2 compuestos; la  $\beta$ -damascenona y el *E*-fitol, que mostraron la misma potencia en el efecto biológico esperado con respecto a la propia papaverina.

El mismo extracto también mostró actividad desinflamatoria considerable en distintos modelos experimentales, lo cual se relaciona a la presencia de varios compuestos que interactúan con los procesos bioquímicos de la inflamación (Pongrpyoon et. al., 1991 a), 1992 b). Khan et. al. (1994) reportó que el extracto alcohólico obtenido de las hojas de *Ipomoea pes-caprae* presenta actividad hipoglucemiante.



### III. JUSTIFICACIÓN

Desde la época prehispánica, se conocen las propiedades purgantes de los miembros del género *Ipomoea* (Convolvulaceae), y recientemente, se ha descubierto que poseen además una poderosa actividad citotóxica de posible aplicación terapéutica (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Como parte de un proyecto de investigación interdisciplinario que se conduce en la Facultad de Química, se han publicado estudios sobre la actividad antineoplásica y fitotóxica de varios miembros de esta familia, mismos que han evidenciado el potencial de las convolvuláceas para la búsqueda de nuevos compuestos con aplicación terapéutica y agroquímica (Pereda-Miranda, 1995). Desde este contexto y de acuerdo a un criterio quimiotaxonómico, se eligió a la “hierba de la raya o riñonina” (*Ipomoea pescaprae*) para la realización de un estudio químico. Así, en el presente trabajo de investigación se plantea el aislamiento de las resinas glicosídicas solubles en la porción lipofílica (hexano) del extracto orgánico total y el establecimiento de su composición química mediante el reconocimiento de la estructura de los constituyentes oligosacáridos mayoritarios.

## IV. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo general

Caracterizar la estructura molecular del ácido glicosídico mayoritario generado mediante la hidrólisis alcalina de las resinas glicosídicas presentes en el extracto hexánico de *Ipomoea pes-caprae* y elucidar la estructura molecular de cuatro lipooligosacáridos constitutivos de estas resinas.

### 4.2 Objetivos particulares

- 4.2.1 Realizar la extracción de las resinas glicosídicas solubles en hexano (la jalapina) a partir del material vegetal.
- 4.2.2 Llevar a cabo el fraccionamiento de la jalapina vía cromatografía en columna abierta.
- 4.2.3 Realizar reacciones degradativas para determinar la composición química de la jalapina
- 4.2.4 Llevar a cabo la purificación del ácido glicosídico constitutivo de la jalapina, utilizando métodos cromatográficos de alta resolución (CLAP).
- 4.2.5 Caracterizar la estructura del núcleo oligosacárido de las resinas glicosídicas de *Ipomoea pes-caprae* mediante análisis espectroscópico.
- 4.2.6 Establecer las condiciones instrumentales a nivel analítico y preparativo en la cromatografía líquida de alta presión para aislar los constituyentes individuales mayoritarios presentes en una de las fracciones hexánicas.
- 4.2.7 Establecer la estructura molecular de cuatro constituyentes individuales aislados mediante métodos químicos y técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (FAB-MS).

## V. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Procedimientos generales

#### 5.1.1 Métodos cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron de la manera convencional, empleando placas de aluminio, recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) y diferentes sistemas de elución. Se utilizó la mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sulfato cérico como agente revelador, mediante calentamiento sobre una parrilla a 80 °C para llevar a cabo la oxidación y desarrollar el color. Para las separaciones cromatográficas en columna abierta se empleó gel de sílice 60 Merck (0.063-0.200mm) como adsorbente. La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA) equipado con un sistema de entrega de disolventes 600E, un refractómetro diferencial modelo 410 y una computadora (Optiplex 466/Le, Dee). El control del equipo, así como la adquisición y el procesamiento de la información se realizaron utilizando el programa Millennium 2000 Software (Waters).

#### 5.1.2 Determinación de las constantes físicas

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en un aparato Varian XL-500 y en una unidad Bruker AMX-500, los cuales operaron a una frecuencia de 500 MHz para el registro de los espectros de RMN-<sup>1</sup>H y a 125 MHz para los de <sup>13</sup>C. El registro de los espectros de masas se realizó mediante el bombardeo con átomos rápidos (FAB) y, en algunos casos, cuando se trató de una

muestra volátil, requirió del acoplamiento de un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard 5890 serie II al espectrómetro de masas modelo JEOL SX-102 A, utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) para lograr la ionización.

Las rotaciones ópticas se determinaron en un polarímetro Perkin Elmer 241 utilizando metanol como disolvente. Los puntos de fusión no están corregidos y fueron determinados en un aparato de Fisher-Johns.

## **5.2 Material Vegetal**

Para la obtención de las resinas glicosídicas se emplearon las partes aéreas de *Ipomoea pes-caprae* que se recolectaron en el municipio de La Huerta, Estado de Jalisco en noviembre de 1989.

### **5.2.1 Preparación del extracto del material vegetal de *Ipomoea pes-caprae***

El material vegetal seco y pulverizado (4.057 kg) fue sometido a una maceración exhaustiva preliminar con *n*-hexano para obtener constituyentes de baja polaridad.

Se prepararon subsecuentemente los extractos clorofórmico y metanólico. Al término de cada una de las extracciones, se filtró y concentró a sequedad a presión reducida. De esta manera, se obtuvo el extracto hexánico con un peso de 40.6 g, el extracto clorofórmico con un peso de 8 g y el extracto metanólico con un peso de 119 g.

### 5.3 Fraccionamiento primario del extracto hexánico por cromatografía en columna

El fraccionamiento de los 40.6 g del extracto hexánico se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta, la cual se empacó con 250 g de gel de sílice. En primer lugar, se inició la elución con *n*-hexano obteniéndose dos fracciones de 500 mL cada una. Posteriormente, se incrementó gradualmente la polaridad con los sistemas de elución constituidos por *n*-hexano-CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO, y CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO-MeOH.

Se colectaron 74 fracciones de 125 mL cada una. Cada fracción se analizó mediante cromatografía en capa fina y se reunieron todas aquellas que resultaron similares. De esta forma, se generaron ocho fracciones (que contienen las mezclas de glicolípidos) numeradas como fracción IV a fracción XI. En el **cuadro 2** se resume el fraccionamiento realizado mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico.

**Cuadro 2.** Resumen del fraccionamiento preliminar mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico.

Eluyente	Proporción	Fracciones	Fracciones reunidas	Claves	Peso (g)
<i>n</i> -hexano	100	1-2	27-29	FIV	1.0236
<i>n</i> -hexano-CHCl <sub>3</sub>	3:1	3-6	30-40	FV	3.3379
<i>n</i> -hexano-CHCl <sub>3</sub>	1:3	7-11	41-48	FVI	3.8482
CHCl <sub>3</sub>	100	12-18	49-52	FVII	4.1475
CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO	75:25	19-23	53-58	FVIII	2.8931
CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO	1:1	24-27	59-65	FIX	1.011
CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO-MeOH	45:45:10	28-43	66-67	FX	0.3617
CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO-MeOH	47.5:47.5:5	44-51	68-76	FXI	0.6968
CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO-MeOH	47:45.4:7.6	52-65			
CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO-MeOH	40:40:20	66-75			
CHCl <sub>3</sub> -Me <sub>2</sub> CO-MeOH	25:25:30	76			

La fracción FV se utilizó para el desarrollo del presente trabajo.

## 5.4 Purificación de la fracción primaria FV mediante cromatografía en columna abierta

La fracción FV (3.3379g) se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna abierta, empleando 56.30 g de gel de sílice de fase inversa (C-18) como adsorbente y eluyendo con MeOH. Se colectaron 17 eluatos que se reunieron para obtener 5 fracciones, por criterio cromatográfico (CCF) se optó por desechar la I y la V, y reunir las fracciones II, III y IV (el proceso de fraccionamiento se resume en el cuadro 3). Al final del proceso se obtuvieron 3.1906 g de la FV purificada.

**Cuadro 3.** Resumen del fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta de la FV hexánica.

Eluyente	Eluatos	Fracciones
MeOH puro	1-3	I
	4	II
	5-9	III
	10-11	IV
	12-17	V

## 5.5 Preparación de derivados

### 5.5.1 Hidrólisis alcalina

La fracción FV purificada se sometió a una hidrólisis alcalina. A 200 mg de la muestra problema se adicionaron 5 mL de KOH al 5%, la mezcla de reacción se mantuvo en reflujo (95 °C) con agitación durante dos horas. Al término de este tiempo, se ajustó el pH a 4 con HCl 4N y, posteriormente, se extrajo con Et<sub>2</sub>O (3×10 mL). La fase etérea proporcionó una mezcla de ácidos grasos la cual fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La fase acuosa se extrajo de nuevo con *n*-butanol (3×10 mL) y se concentró a presión reducida.

Posteriormente, la fracción resultante **FV-S** se sometió a una reacción de acetilación.

### 5.5.2 Reacción de acetilación

La fase orgánica (butanólica) obtenida de la hidrólisis alcalina se sometió a una reacción de acetilación. A 80.3 mg de **FV-S** se adicionaron 10 mL de  $\text{Ac}_2\text{O}$  y 7 mL de piridina. Esta mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 24 horas, al término de las cuales se adicionaron 5 mL de agua destilada y se procedió a la extracción con  $\text{AcOEt}$  ( $3 \times 10$  mL). La fase orgánica se trató con  $\text{HCl}$  1N ( $5 \times 5$  mL) y agitación, lavando por último con agua destilada ( $3 \times 5$  mL). La fase orgánica se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró a presión reducida (**FV-SA**).

### 5.5.3 Reacción de alquilación con diazometano

El producto de reacción de acetilación **FV-SA** (60 mg) fue sometido a una reacción de alquilación con diazometano para obtener el derivado metilado **FV-SAM**.

#### 5.5.3.1 Preparación del diazometano

Una disolución de  $\text{KOH}$  (5 g en 7.5 mL de agua), 25 mL de  $\text{EtOH}$  y 15 mL de éter, se hizo reaccionar con 30 mL de una disolución etérea de N-metil-N-nitroso-p-toluen-sulfonamida (30 mg). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua en baño maría (58-60 °C). El  $\text{CH}_2\text{N}_2$  generado se colectó mediante destilación en 20 mL de éter en baño de hielo.

### **5.5.3.2 Reacción de alquilación**

Se adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano a la fracción **FV-SA**, previamente disuelta en éter, para llevar a cabo la reacción de alquilación.

La adición del agente alquilante se suspendió cuando cesó la emisión del gas  $N_2$  en la mezcla de reacción.

### **5.5.4 Hidrólisis ácida**

Se adicionaron 10 mL de HCl 1N a 45 mg de la fracción **FV-S**, la mezcla se calentó a reflujo (90 °C) durante 5 horas. Posteriormente, se diluyó la mezcla de reacción con 5 mL de  $H_2O$  y se extrajo con  $Et_2O$  (3×10mL). La fase etérea proporcionó la aglicona. La fase acuosa se neutralizó con KOH y se extrajo con *n*-butanol (5×10 mL) agitando fuertemente en cada extracción. La fase butanólica se lavó con  $H_2O$  (2×5 mL) y se concentró en un rotaevaporador hasta sequedad total para obtener una mezcla de monosacáridos, la cual se analizó por espectroscopía de RMN  $^1H$ .

#### **5.5.4.1 Análisis de la mezcla de carbohidratos mediante RMN**

Se realizó una comparación entre los espectros de RMN  $^1H$  de la mezcla de monosacáridos obtenida de la hidrólisis ácida y los registrados para muestras auténticas de los siguientes azúcares: glucosa, ramnosa, fucosa y quinovosa.



## 5.6 Compuesto acetilado-metilado. Separación mediante HPLC

Con el propósito de lograr la purificación del ácido glicosídico peracetilado y metilado mayoritario presente en el extracto hexánico de *Ipomoea pes-caprae*, fue necesario el empleo de la cromatografía de líquidos (HPLC) a nivel analítico y preparativo para efectuar su posterior análisis espectroscópico (RMN).

## 5.7 Aislamiento y purificación de glicolípidos de la fracción primaria FV de *Ipomoea pes-caprae* por HPLC

### 5.7.1 Obtención de la estoloniferina III, y de las pescapreínas I, II y III

Las pruebas preliminares para lograr la separación de los glicolípidos individuales se efectuaron en columnas analíticas de fase inversa (C<sub>18</sub>) con un sistema de detección inicial en el UV (240 nm) y flujos de elución de 0.7 ml. El modo de detección se cambió al índice de índice de refracción cuando se encontró un sistema cromatográfico adecuado que consistió en una columna analítica C<sub>18</sub> y una fase móvil de CH<sub>3</sub>CN-MeOH (9:1). Por medio de HPLC en nivel preparativo aplicando las técnicas de sobrecarga de columna y corte del núcleo (Bidlingmeyer, 1992; Hostettmann, 1986), se agotó la fracción FV hexánica primaria para reunir cantidades suficientes de las subfracciones: **A** (t<sub>R</sub> = 9 a 11 min.), **B** (t<sub>R</sub> = 11.8 min.), **C** (t<sub>R</sub> = 12.9 min.), **D** (t<sub>R</sub> = 13.5 min.), **E** (t<sub>R</sub> = 14.3 min.), **F** (t<sub>R</sub> = 15.2 min.), **G** (t<sub>R</sub> = 16.1 min.), **H** (t<sub>R</sub> = 17.5 min.), **I** (t<sub>R</sub> = 18 a 28.5 min.), **J** (t<sub>R</sub> = 29.7 min.), **K** (t<sub>R</sub> = 33.4 min.), **L** (t<sub>R</sub> = 36.7 min.), y **M** (t<sub>R</sub> = 39.6 min.).

Las subfracciones **B**, **D**, **G** y **H** se reinyectaron en una columna C<sub>18</sub> preparativa con un sistema de elución binario constituido por CH<sub>3</sub>CN-MeOH (9:1). Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra (Kubo y Nakatsu, 1990), utilizándose de

10 a 20 ciclos para obtener la máxima separación de los constituyentes de estas subfracciones. Se obtuvieron 15.8 mg de la estoloniferina III a partir de la subfracción **B**, 7.6 mg de la pescapreína I a partir de la subfracción **D**, 53.2 mg de la pescapreína II a partir de la subfracción **G**, y 8 mg de la pescapreína III a partir de la subfracción **H**. Se realizó el análisis espectroscópico y espectrométrico de estos compuestos y se determinaron sus constantes físicas (punto de fusión y dispersión óptica rotatoria).

**Estoloniferina III (1)** ( $t_R = 11.8$  min): Sólido amorfo blanco; p.f. 120 -123 °C; RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (cuadros 6 a 9); FAB-MS (modo negativo)  $m/z$  : 1221  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1137  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}]^-$ , 1067  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O}]^-$ , 837  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4 - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}]^-$ , 545, 417, 271; HRFAB-MS  $m/z$  : 1221.7040  $[\text{M} - \text{H}]^-$  ;  $\text{C}_{61}\text{H}_{105}\text{O}_{24}$ , requiere 1221.6996.

**Pescapreína I (2)** ( $t_R = 13.5$  min): Sólido amorfo blanco; p.f. 120 -123 °C; RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (cuadros 6 a 9); FAB-MS (modo negativo)  $m/z$  : 1235  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1165  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_4\text{H}_6\text{O}]^-$ , 837  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4 - \text{C}_4\text{H}_6\text{O}]^-$ , 545, 417; HRFAB-MS  $m/z$  : 1235.7147  $[\text{M} - \text{H}]^-$  ;  $\text{C}_{62}\text{H}_{107}\text{O}_{24}$ , requiere 1235.7152.

**Pescapreína II (3)** ( $t_R = 16.2$  min): Sólido amorfo blanco; p.f. 120 -123 °C; RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (cuadros 6 a 9); FAB-MS (modo negativo)  $m/z$  : 1249  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1165  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}]^-$ , 1067  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}]^-$ , 837  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4 - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}]^-$ , 545, 417, 271; HRFAB-MS  $m/z$  : 1249.7224  $[\text{M} - \text{H}]^-$  ;  $\text{C}_{63}\text{H}_{109}\text{O}_{24}$ , requiere 1249.7308.

**Pescapreína III (4)** ( $t_R = 17.5$  min): Sólido amorfo blanco; p.f. 120 -123 °C; RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (cuadros 6 a 9); FAB-MS (modo negativo)  $m/z$  : 1263  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1165  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}]^-$ , 1081  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}]^-$ , 837  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}]^-$ , 546, 417, 271; HRFAB-MS  $m/z$  : 1263.7499  $[\text{M} - \text{H}]^-$  ;  $\text{C}_{64}\text{H}_{111}\text{O}_{24}$ , requiere 1263.7465.

Glicolípido:	$T_R$ (min)	c (g/100 ml)	$[\alpha]_{589}$	$[\alpha]_{578}$	$[\alpha]_{546}$	$[\alpha]_{436}$	$[\alpha]_{365}$
Estolon. III (1)	11.8	2.01	-64	-67	-76	-124	-185
Pescapr. I (2)	13.5	0.19	-81	-86	-102	-161	-242
Pescapr. II (3)	16.1	0.43	-70	-72	-82	-135	-201
Pescapr. III (4)	17.5	0.81	-60	-64	-71	-117	-176

**Cuadro 4.** Resultados de la dispersión óptica rotatoria efectuada para los glicolípidos aislados de *Ipomoea pes-caprae* (1- 4).

## 5.8 Cromatografía líquida de alta resolución

### 5.8.1 Purificación del derivado FV-SAM mediante HPLC

#### 5.8.1.1 Condiciones instrumentales: nivel analítico

**Columna:** Symetry  $\text{C}_{18}$ , tamaño de partícula 5  $\mu\text{m}$ ; 4.6 mm de diámetro interno  $\times$  250 mm de longitud (Waters)

**Fase móvil:** Acetonitrilo-Agua (95:5)

**Flujo:** 1 ml/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 10  $\mu\text{L}$

**Sensibilidad:** 128 RIU

**Tipo de elución:** isocrática

### **5.8.1.2 Condiciones instrumentales: nivel preparativo**

**Columna:** SymetryPrep C<sub>18</sub>, tamaño de partícula 7 µm, 19 mm de diámetro interno × 300 mm de longitud (Waters)

**Fase móvil:** Acetonitrilo-Agua (95:5)

**Flujo:** 9 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 500 µl

**Sensibilidad:** 128 RIU

**Tipo de elución:** isocrática

## **5.8.2 Separación y purificación de glicolípidos de la Fracción V primaria**

### **5.8.2.1 Condiciones instrumentales: nivel analítico**

**Columna:** Symetry C<sub>18</sub>, tamaño de partícula 5 µm; 4.6 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud (Waters)

**Fase móvil:** Acetonitrilo-MeOH (9:1)

**Flujo:** 0.7 ml/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 10 µL

**Sensibilidad:** 256 RIU

**Tipo de elución:** isocrática

### **5.8.2.2 Condiciones instrumentales: nivel preparativo**

**Columna:** SymetryPrep C<sub>18</sub>, tamaño de partícula 7 μm, 19 mm de diámetro interno × 300 mm de longitud (Waters)

**Fase móvil:** Acetonitrilo-MeOH (9:1)

**Flujo:** 9 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 500 μl

**Sensibilidad:** 256 RIU

**Tipo de elución:** isocrática

## VI. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 Extracción y fraccionamiento

El procedimiento de extracción realizado al material vegetal (*Ipomoea pes-caprae*) permitió obtener 40.6 g de extracto hexánico, 83 g de extracto clorofórmico, y 119 g de extracto metanólico. La selección primaria de *Ipomoea pes-caprae* se realizó de acuerdo a un criterio quimiotaxonómico, el cual considera las semejanzas del metabolismo secundario entre las especies filogenéticamente relacionadas y, por lo tanto, se esperaba la identificación de las resinas glicosídicas características de todas las especies pertenecientes a la familia de las convolvuláceas. El extracto hexánico se fraccionó de manera preliminar mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice iniciando el sistema de elución con hexano, posteriormente se incrementó gradualmente la polaridad con sistemas hexano-CHCl<sub>3</sub>, CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO, y CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO-MeOH lo que permitió la obtención de ocho fracciones primarias FIV-FXI (ver Parte Experimental, inciso 5.4). En la figura 15 se ilustra el cromatograma generado mediante CCF de las fracciones FV a FIX. Esta técnica permitió el agrupamiento de las respectivas fracciones primarias.



**Figura 15.** Cromatogramas en capa fina de las fracciones primarias FV a FIX (sistema de elución: CHCl<sub>3</sub>-MeOH, 9:1).

La fracción FV se sometió a una purificación inicial para la eliminación de pigmentos mediante cromatografía en columna abierta usando fase inversa obteniendo finalmente 3.3379 g.

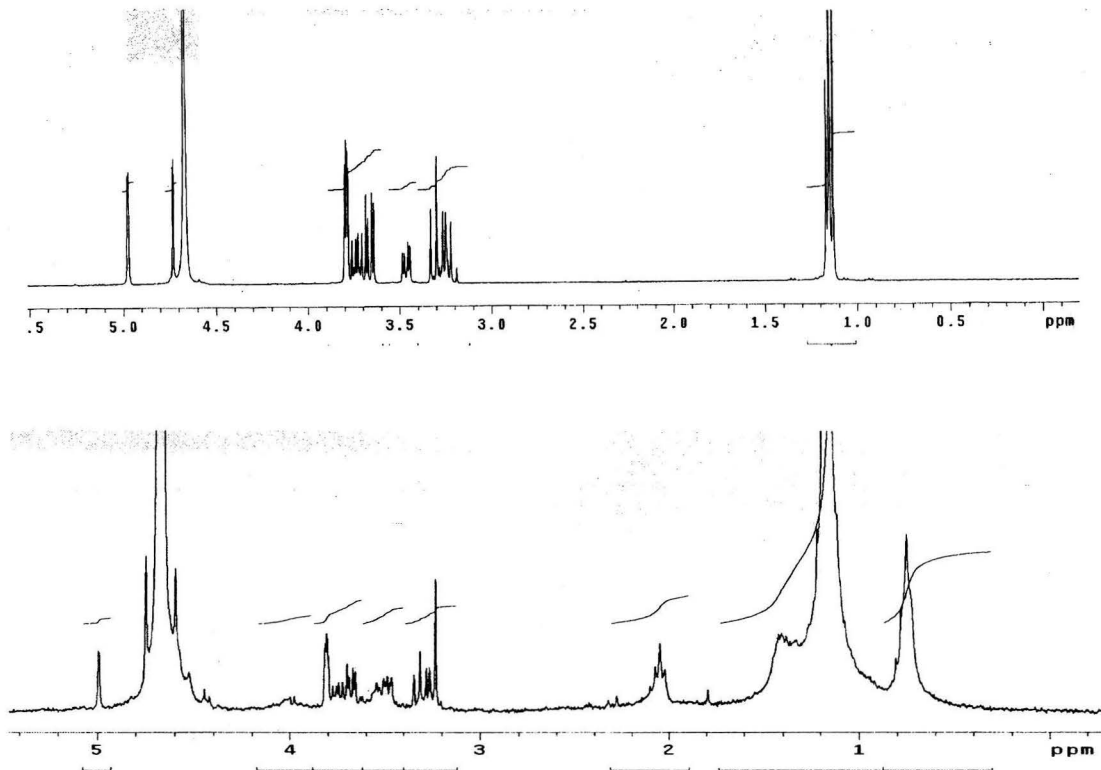
## **6.2 Hidrólisis ácida**

A partir de la hidrólisis ácida de los ácidos glicosídicos podemos obtener en la fase orgánica la aglicona mientras que en la fase butanólica se recupera la mezcla de monosacáridos constitutivos del oligosacárido.

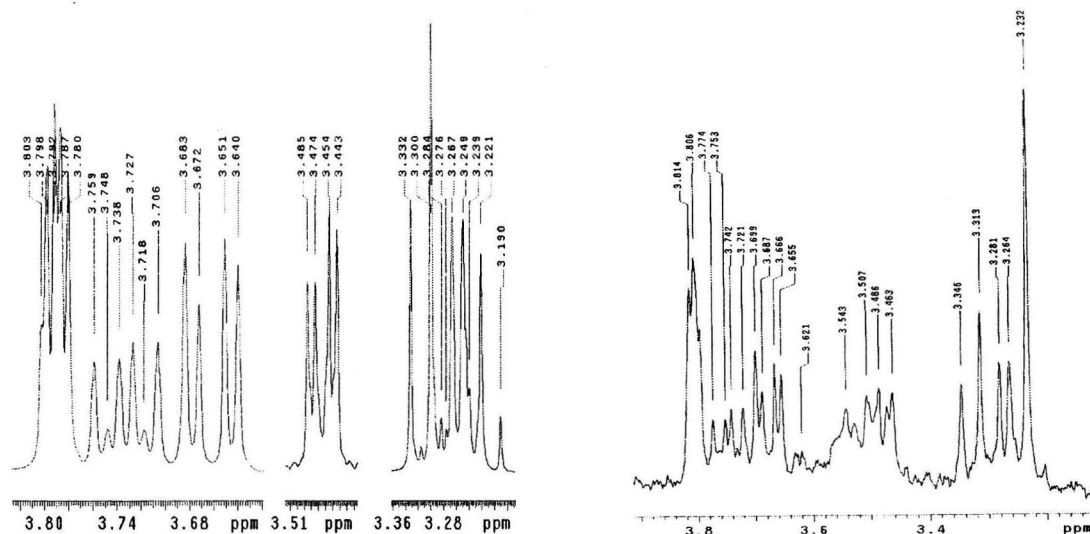
### **6.2.1 Identificación de Carbohidratos por RMN**

Sólo un monosacárido mayoritario contenido en la mezcla de carbohidratos obtenida a partir de la hidrólisis ácida de la fracción primaria FV se identificó mediante el registro del espectro unidimensionales de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla y su posterior comparación con los generados por cada uno de los estándares indicados en el apartado 5.6.4.1. De acuerdo con este análisis, el espectro de la mezcla de hidrólisis presenta señales muy parecidas a las del espectro del estándar de ramnosa y, por lo tanto, se confirmó que el oligosacárido estaba compuesto principalmente de este carbohidrato.

En los espectros completos de RMN  $^1\text{H}$  registrados para el estándar de ramnosa y para la mezcla de monosacáridos (sobre todo las señales que se encuentran centradas entre 3 y 4 ppm) puede observarse una similitud (figuras 16 y 17).



**Figura 16.** Arriba, espectro de RMN  $^1\text{H}$  del estándar de ramnosa. Abajo, espectro completo de RMN  $^1\text{H}$  de la mezcla de monosacáridos.



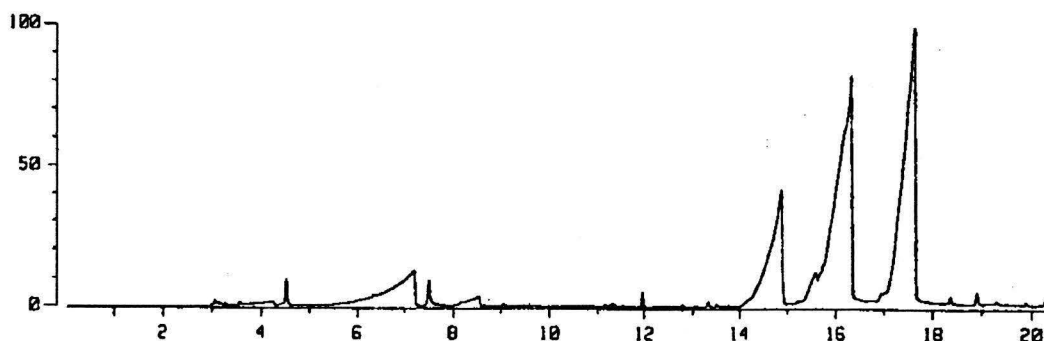
**Figura 17.** Expansión de las señales centradas entre 3 y 4 ppm de los dos espectros de la figura anterior. Izquierda; espectro del estándar de ramnosa. Derecha; espectro de la mezcla de hidrólisis.



Se estableció la naturaleza del segundo monosacárido constitutivo del oligosacárido como la fucosa mediante el empleo de las técnicas espectroscópicas bidimensionales en la RMN de los productos naturales. El análisis realizado se explicará detenidamente en los apartados que incluyen la elucidación estructural del núcleo oligosacárido.

### 6.3 Hidrólisis alcalina. Determinación de los ácidos grasos esterificados.

La fase etérea obtenida de la reacción de hidrólisis alcalina se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y se obtuvo el cromatograma que se presenta en la figura 18. El análisis por espectrometría de masas de los picos correspondientes se presenta en el cuadro 4. La identificación de cada uno de los constituyentes de esta mezcla se realizó mediante la comparación de los patrones de fragmentación observados para cada una de los picos con los generados por muestras auténticas.



**Figura 18.** Cromatograma de gases obtenido para la fase orgánica de la hidrólisis alcalina.

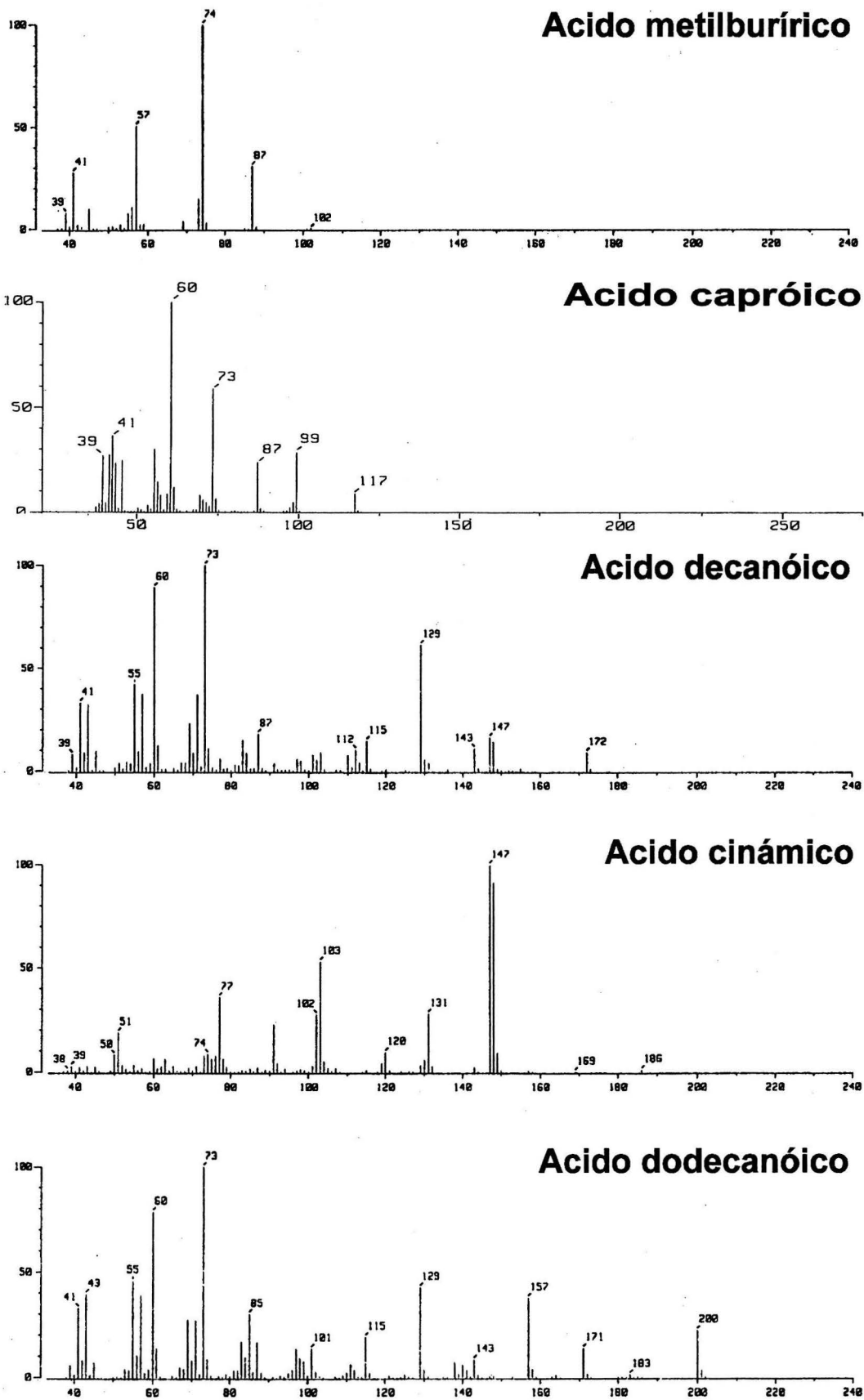


Figura 19. Espectros de masas para los ácidos grasos de la fase etérea

$t_R$ (min)		Identificación
6.89	M : 102(2); 87(33); 74 (100); 57(50); 41(28); 39(8)	Acido metil butírico
8.47	M : 116 (2); 99(3); 87(21); 73 (63); 60 (100); 41 (16) ; 39(7)	Acido caprónico
14.72	M : 172 (12); 155 (3); 143 (12); 129 (62); 115 (15); 112 (12); 87 (20); 73 (100); 60 (90); 57 (40); 43 (35); 41 (30)	Acido decanoico
16.15	M : 148 (90); {M-1} 147 (100); 131 (25); 103(40); 102 (20); 77 (25); 74 (8); 51 (20); 50 (8); 39 (5); 38 (4)	Acido cinámico
17.53	M : 200 (15); 183 (2); 171 (18); 157 (40); 143 (10); 129 (48); 115 (20); 101 (15); 85(33); 73 (100); 60 (80); 43 (44); 41 (30)	Acido dodecanoico

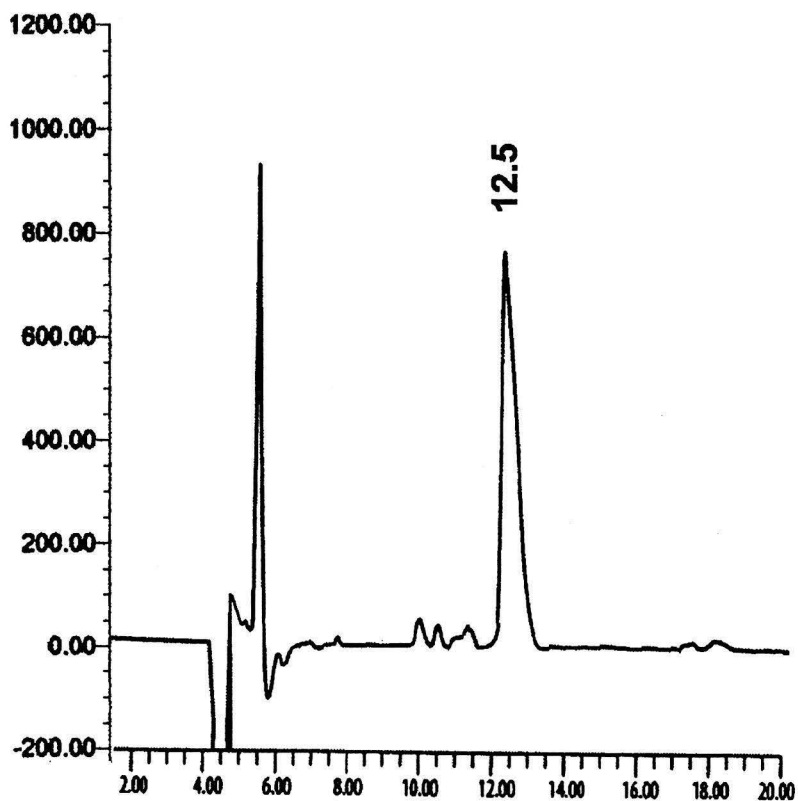
**Cuadro 5.** Análisis mediante CG-EM de la fase orgánica obtenida de la hidrólisis ácida de FV.

Estos ácidos se encuentran esterificando diferentes posiciones del núcleo oligosacárido, al hidrolizarlos se liberan. Este análisis cromatográfico únicamente permitió su identificación, sin poder determinar la posición de esterificación en la cadena oligosacárida.

#### 6.4 Derivado acetilado-metilado. Análisis y purificación mediante HPLC

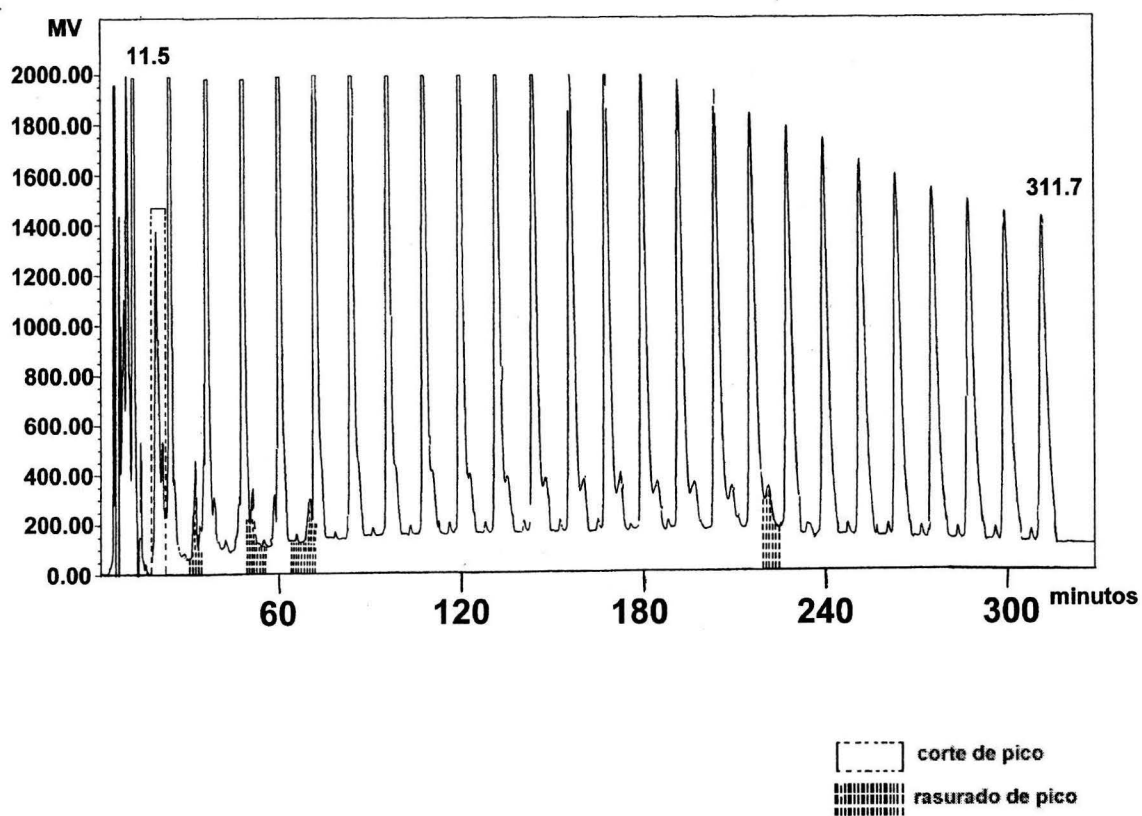
Con el propósito de lograr la purificación del ácido glicosídico mayoritario presente en el extracto hexánico de *Ipomoea pes-caprae*, se requirió de la implementación de la técnica de HPLC en nivel analítico y preparativo. La primera permitió determinar las condiciones instrumentales más adecuadas, en tanto que la segunda, se utilizó con el fin de separar y purificar al derivado mayoritario para su posterior análisis espectroscópico. Los procedimientos en nivel preparativo utilizaron las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo, así como el rasurado y el reciclaje de picos (Bah y Pereda- Miranda, 1996). La aplicación de esta metodología permitió la separación del pico con tiempo de retención de 12.5 minutos a partir del cromatograma analítico ilustrado en la figura 20.

El producto acetilado-metilado (**FV-SAM**) se analizó mediante RMN para verificar su pureza. Se utilizó la señal centrada en 2.47 ppm como diagnóstica, la cual debería aparecer como un triplete correspondiente al metileno en posición alfa al grupo carbonilo de la aglicona.



**Figura 20.** Cromatograma generado mediante HPLC a nivel analítico por el producto FV-SAM .

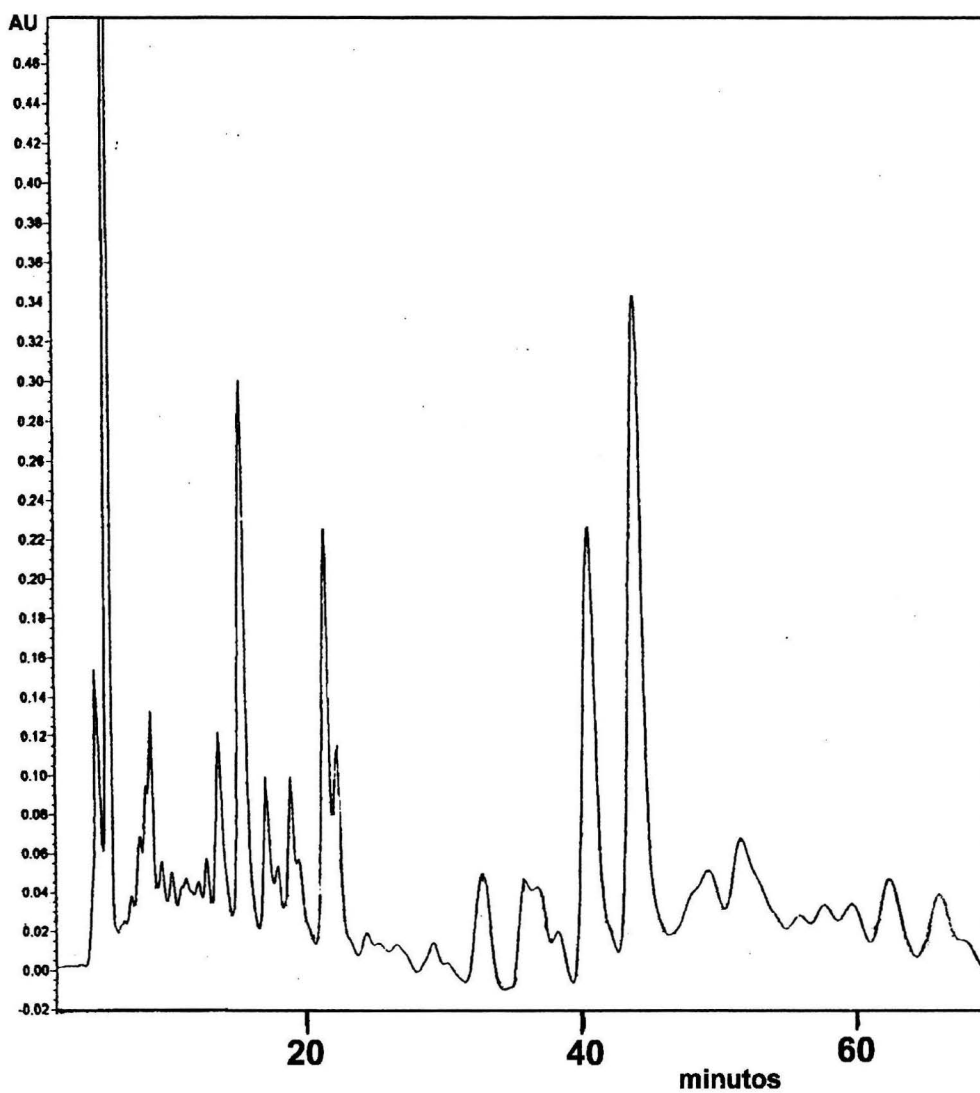
Es importante enfatizar que el escalamiento de estas condiciones instrumentales analíticas a un nivel preparativo, como son la dimensión de la columna, la cantidad de muestra y la velocidad de flujo de elución (Ver Parte Experimental, apartado 5.9.3) resultó en una disminución en el tiempo de retención de la muestra problema, sin representar un impedimento para la purificación exitosa del ácido glicosídico (figura 21).



**Figura 21.** Cromatograma correspondiente a la purificación mediante HPLC del derivado peracetilado-metilado **FV-SAM** en donde se ilustra el empleo de las técnicas de corte de núcleo, rasurado de pico y reciclaje de la muestra. Condiciones instrumentales: columna C<sub>18</sub> (19 X 300 mm, 7 μm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (95:5).

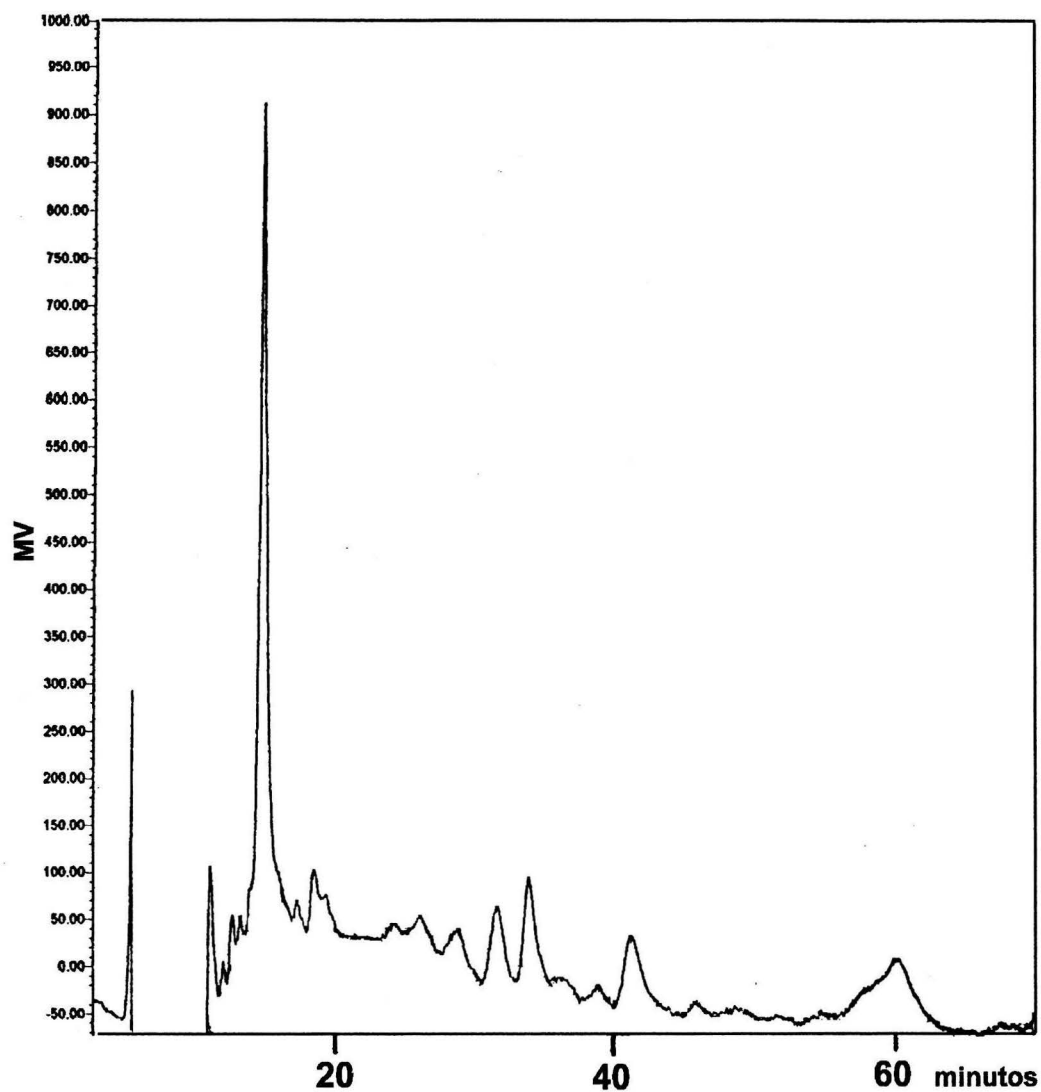
## **6.5 Aislamiento y purificación de los glicolípidos individuales a partir de la fracción primaria hexánica.**

Una vez efectuado el análisis cromatográfico y la separación del ácido glicosídico peracetilado y metilado obtenido a partir de la saponificación, acetilación y metilación de la fracción hexánica **FV**, se iniciaron las primeras pruebas de purificación en cromatografía líquida de alta presión en fase inversa ( $C_{18}$ ) con esta fracción sin derivatizar. La cromatografía en capa fina de esta fracción demostró la presencia de componentes visibles al UV y, por tal razón, las primeras pruebas de separación en HPLC se efectuaron con un detector de UV-VIS. También, se realizaron pruebas de separación con un detector IR (figuras 22 y 23 ). Estos análisis se realizaron empleando  $CH_3CN$  puro como fase móvil.



**Figura 22.** Análisis mediante HPLC de la fracción primaria **FV**. Condiciones instrumentales: columna  $C_{18}$  (4.6 X 250 mm, 5  $\mu$ m); fase móvil:  $CH_3CN$ ; flujo de elución: 0.7 mL/min; detector: UV (240 nm); volumen de inyección de la muestra: 10  $\mu$ L (1 mg/100  $\mu$ L) .

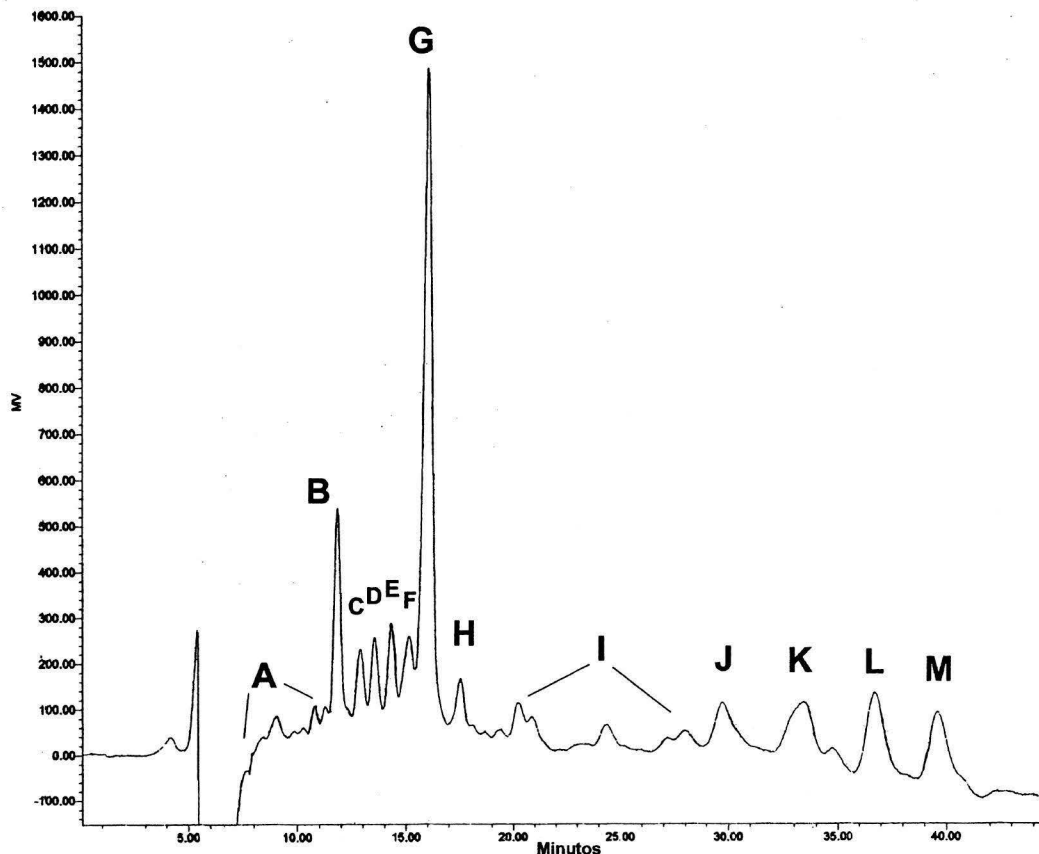




**Figura 23.** Análisis mediante HPLC de la fracción primaria **FV** hexánica. Condiciones instrumentales: columna  $C_{18}$  (4.6 X 250 mm, 5  $\mu$ m); fase móvil:  $CH_3CN$  puro; flujo de elución: 0.7 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: 10  $\mu$ L (1 mg/100  $\mu$ L).

Al haber una escasa coincidencia entre los dos cromatogramas, se presentó el problema de elegir el método más confiable. Por lo tanto, se realizaron pruebas de colecta de subfracciones con ambos detectores, se observó que en el método que utilizó la luz UV (240 nm) hubo una relación muy pobre entre la intensidad de los picos y la cantidad de la subfracción colectada: Por lo tanto, se descartó el uso de este último y se eligió el método cromatográfico con el detector de índice de refracción. Finalmente, se decidió agregar un poco de metanol a la fase móvil para aumentar la afinidad de la fase estacionaria por los componentes de la mezcla. Con la presencia del disolvente prótico polar (MeOH), los tiempos de retención aumentaron ligeramente y la resolución del cromatograma se mejoró considerablemente. En la figura 24 se ilustra el perfil cromatográfico en nivel preparativo empleando un detector de índice de refacción y la fase móvil compuesta por CH<sub>3</sub>CN-MeOH (9:1).

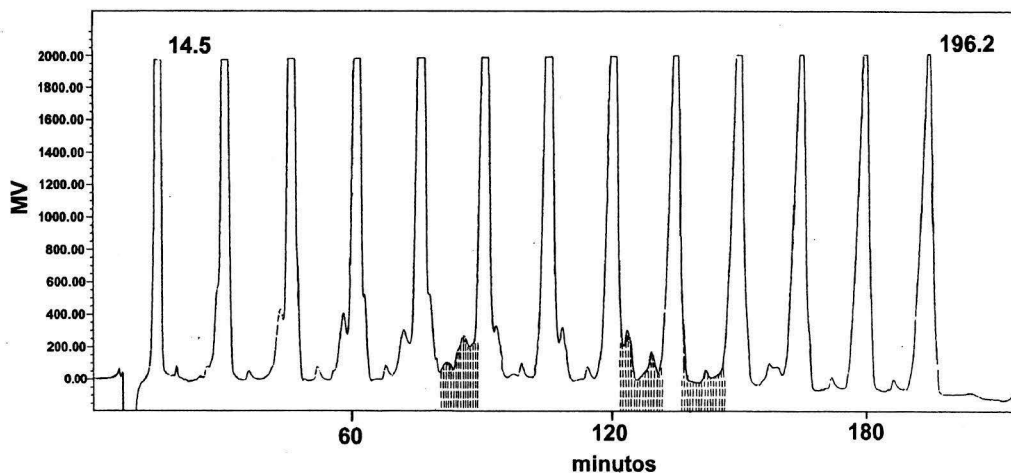
El fraccionamiento de **FV** en una columna C<sub>18</sub> en nivel preparativo mediante de corte de núcleo se efectuó para reunir cantidades suficientes de las subfracciones **A-M** (apartado 5.8). De estas se inyectaron las subfracciones **B, D, G y H** de manera independiente para utilizar la técnica de reciclaje de muestra, y así poder separar sus constituyentes (Bah y Pereda-Miranda 1996; Kubo y Nakatsu, 1990).



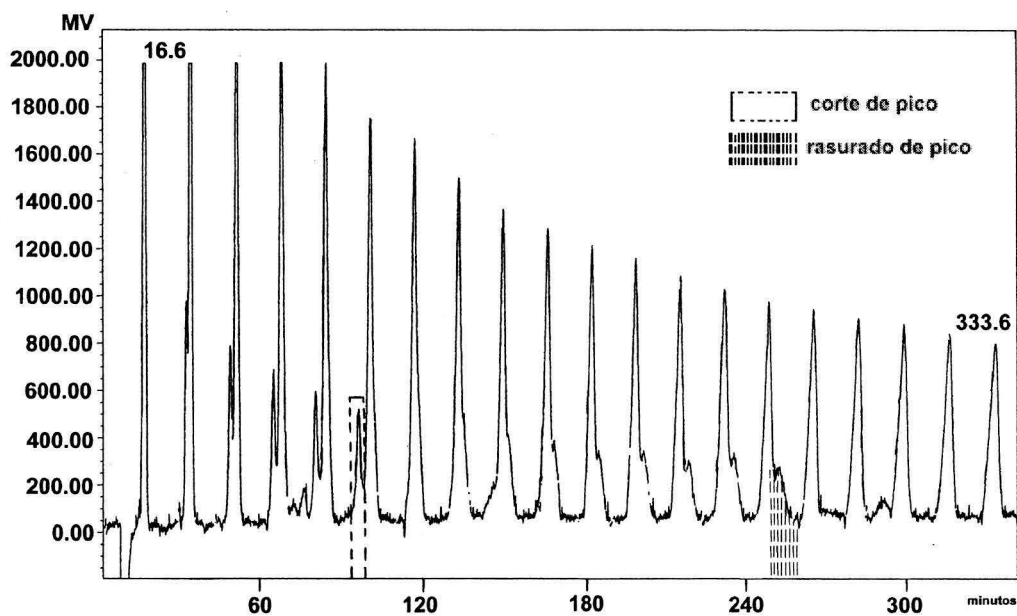
**Figura 24.** Cromatograma de líquidos de la fracción primaria FV a una escala preparativa. Condiciones instrumentales: columna C<sub>18</sub> (19 X 300 mm, 7 μm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-MeOH (9:1); flujo de elución: 9 mL/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μL (60 mg/ ml); detector: índice de refracción.

### 6.5.1 Separación de los glicolípidos 1- 4.

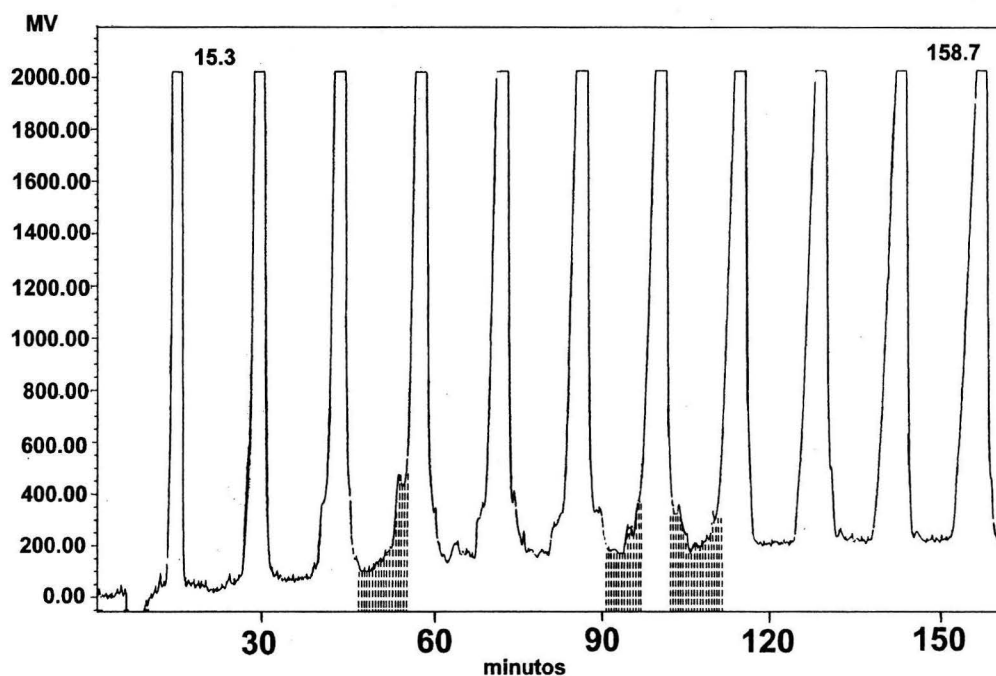
Tomando en cuenta que se obtuvo una buena resolución en la separación de las subfracciones **B** a **H** se consideró que las condiciones anteriormente utilizadas para el nuevo fraccionamiento de la **FV** eran adecuadas para la separación de los glicolípidos presentes en cualquiera de estas subfracciones. El reciclaje de las muestras **B**, **D**, **G** y **H** permitió la purificación de los compuestos **1** – **4** (figuras 25 a 28).



**Figura 25.** Cromatograma de líquidos de la subfracción **B**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la estoloniferina III (**1**). Condiciones instrumentales: columna  $C_{18}$  (19 X 300 mm, 7  $\mu$ m); fase móvil:  $CH_3CN$ -MeOH (9:1); flujo de elución: 7 ml/min; volumen de inyección la muestra: 500  $\mu$ l (30 mg/ml).

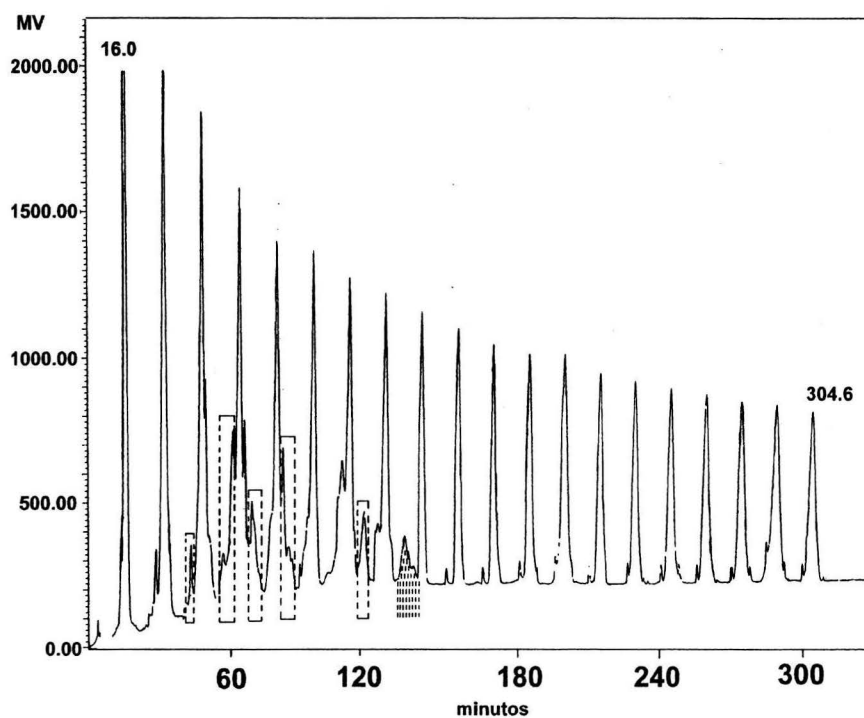


**Figura 26.** Cromatograma de líquidos de la subfracción **D**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la pescapreína I (**2**). Condiciones instrumentales: columna:  $C_{18}$  (19 X 300 mm, 7  $\mu$ m); fase móvil:  $CH_3CN$ -MeOH (9:1); flujo de elución: 7 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500  $\mu$ l (15 mg/ml).



**Figura 27.** Cromatograma de líquidos de la subfracción **G**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la pescapreína II (**3**). Condiciones instrumentales: columna C<sub>18</sub> (19 X 300 mm, 7 μm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN-MeOH (9:1); flujo de elución: 9 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μl (30 mg/ml).

Es importante mencionar que para la obtención de los compuestos **1** y **2** fue necesario disminuir la velocidad de flujo para incrementar el tiempo de retención, con esto se logró mejorar la separación de los constituyentes al evitar la sobreposición de los picos durante su reciclaje a través de la columna.

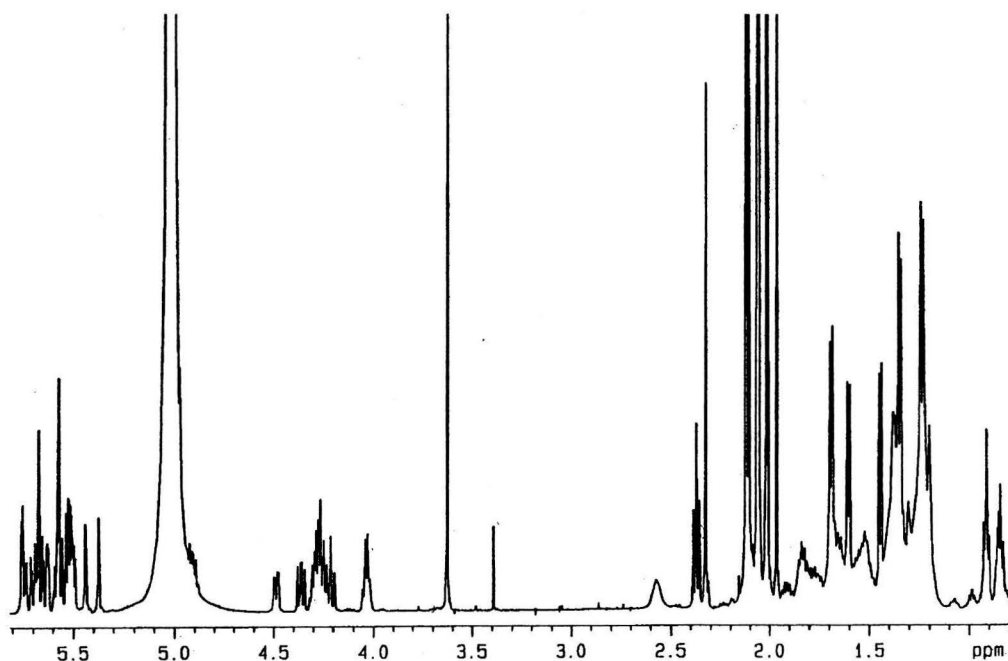


**Figura 28.** Cromatograma de líquidos de la subfracción **H**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la piscapreina III (**4**). Condiciones instrumentales: columna  $C_{18}$  (19 X 300 mm, 7  $\mu$ m); fase móvil:  $CH_3CN$ -MeOH (9:1); flujo de elución: 9 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500  $\mu$ l (30 mg/ml).

## 6.6 Elucidación estructural del ácido glicosídico

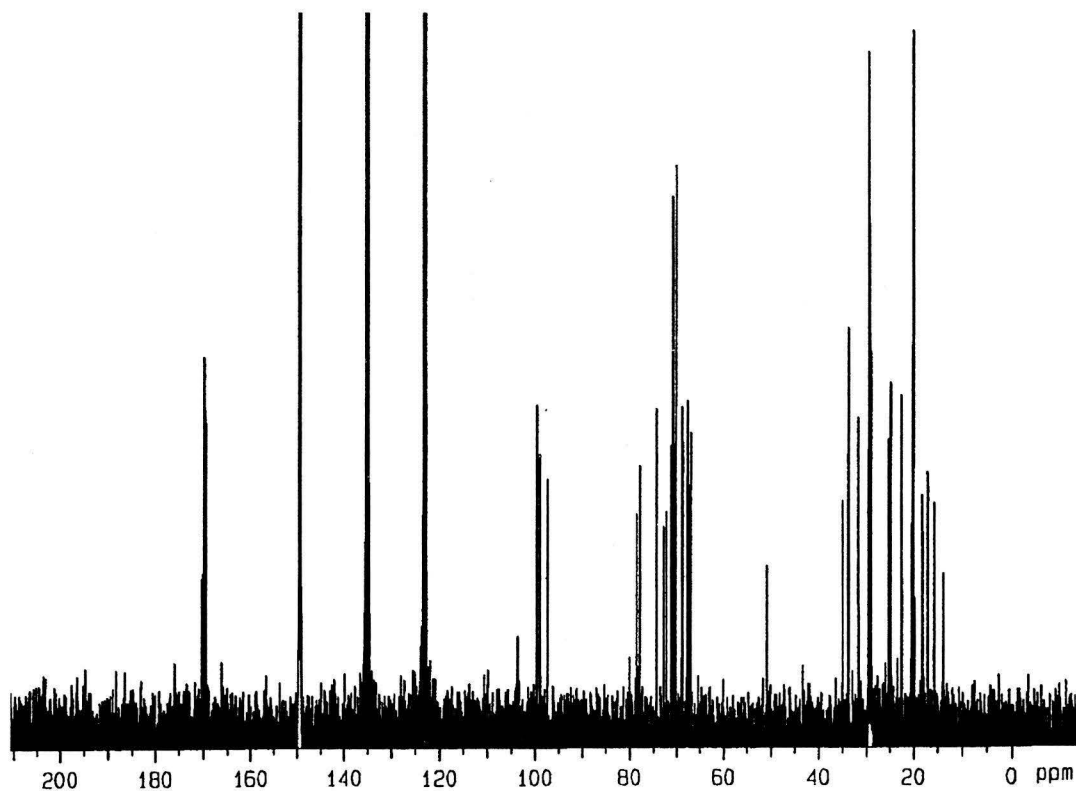
El registro de los espectros unidimensionales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del ácido glicosídico peracetilado y metilado fue el primer paso para obtener una información general acerca de su estructura. La primera observación importante fue el número de señales dobletes observadas entre los desplazamientos químicos de 1 y 2 ppm en el espectro de RMN  $^1\text{H}$ . Éstas, corresponden a protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas.

Estas señales diagnósticas, junto con el número de señales singuletes características de los grupos metilo, presentes entre 2 y 2.5 ppm, típicas de unidades de acetato, fueron las evidencias necesarias para establecer que el número de unidades monosacáridas presentes en el núcleo oligosacárido es de cinco y todas metilpentosas.



**Figura 29.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del derivado peracetilado-metilado FV-SAM.

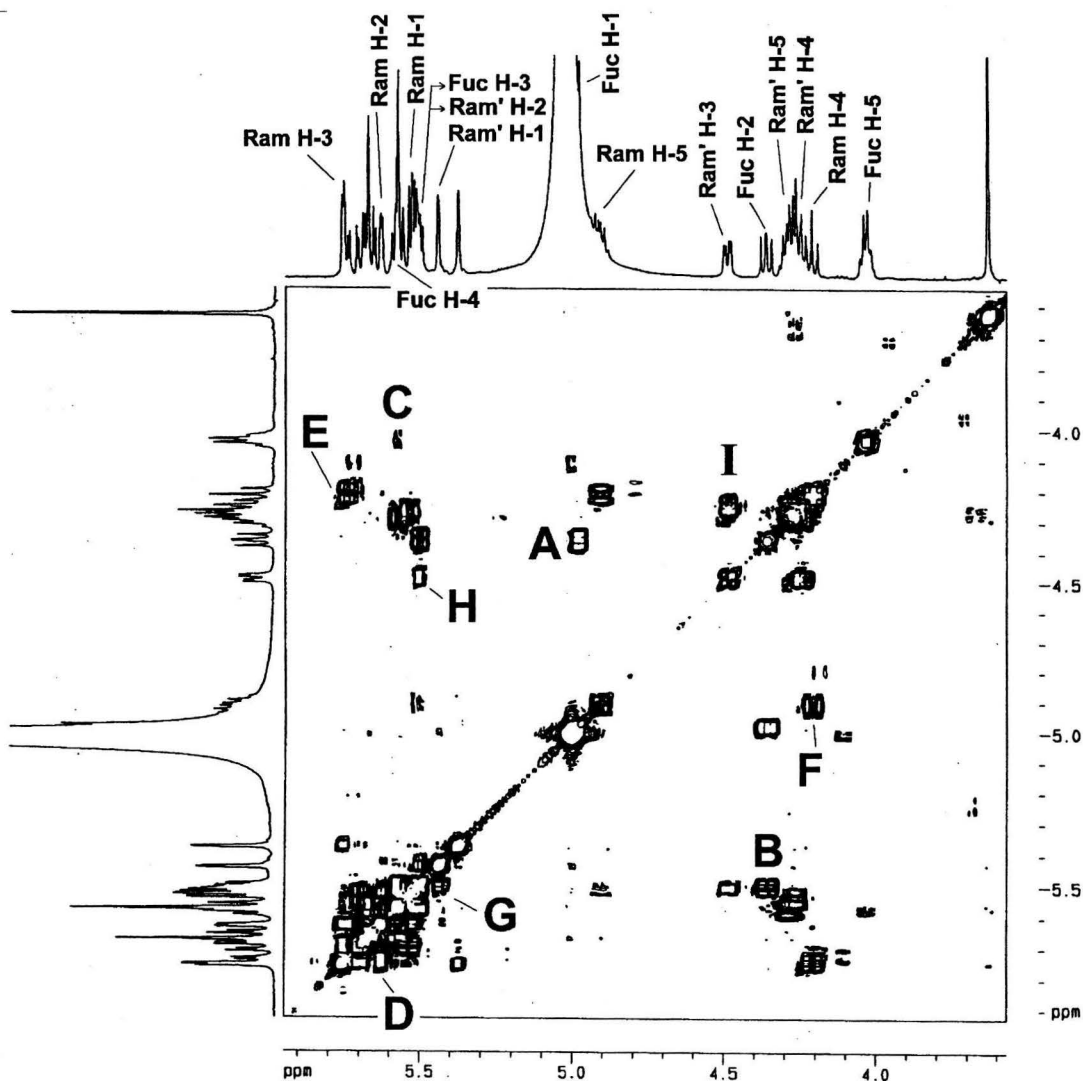
Con el auxilio de las técnicas espectroscópicas bidimensionales en la RMN (COSY, TOCSY) y, al considerar que el núcleo está compuesto de cinco metilpentosas, además de que éstas son en su mayoría ramnosa (por el análisis de carbohidratos descrito en el apartado 6.2), se pudo resolver la asignación de las señales para los protones metinos centrados entre 4.0-5.7 ppm. Esta zona presentó una gran complejidad en su multiplicidad producto de la sobreposición de las señales. También, se logró identificar la presencia de la fucosa como la quinta unidad sacárida del núcleo oligoscárido a través de los valores para las constantes de acoplamiento observados para esta unidad sacárida (Pereda-Miranda y Bah, 2003). Finalmente, de las correlaciones C-H se logró establecer la secuencia de glicosidación y proponer la estructura molecular del ácido glicosídico.



**Figura 30.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del derivado peracetilado-metilado FV-SAM

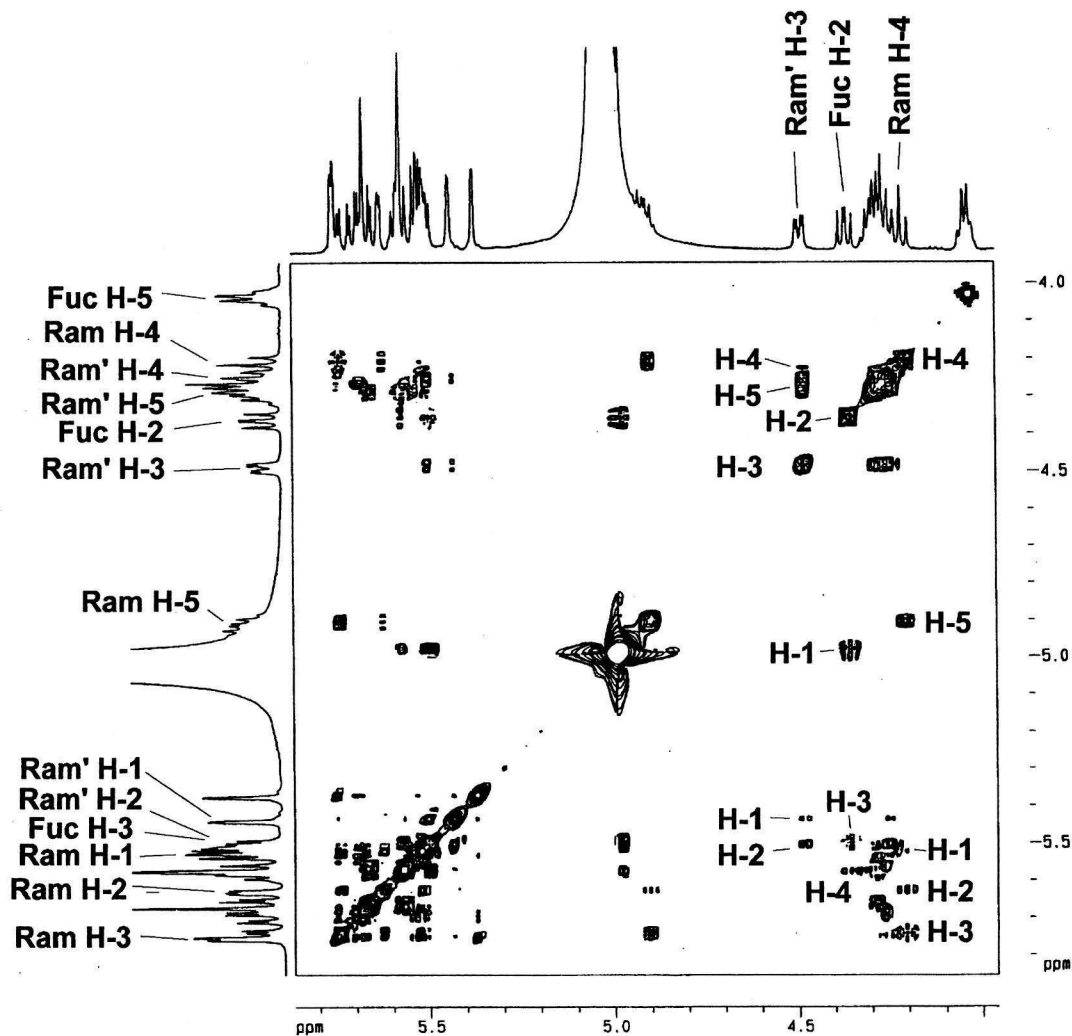


El procedimiento de asignación se inició localizando las señales mejor resueltas y diagnósticas; e.g. H<sub>2</sub> para la fucosa, así como las cinco señales anoméricas y H<sub>4</sub> para una de las unidades de ramnosa. Como segundo paso, se dio seguimiento a los cuadros de conectividades para estas señales en el experimento COSY, como se ilustra en la figura 31.



**Figura 31.** Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida del ácido glicosídico. Correlaciones ( $^3J_{H-H}$ ): **A**; Fuc H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, **B**; Fuc H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, **C**; Fuc H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>, **D**; Ram H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, **E**; Ram H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, **F**; Ram H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>, **G**; Ram' H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, **H**; Ram' H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, **I**; Ram' H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>.

Posteriormente, se procedió a localizar las señales adicionales que correspondían a cada una de las unidades sacáridas en el espectro TOCSY y, por último, se completó la secuencia de interacciones vecinales ( $^3J_{H-H}$ ) de nueva cuenta con la ayuda del experimento COSY.



**Figura 32.** Sección del espectro TOCSY para la porción oligosacárida del ácido glicosídico. Abreviaciones: Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior.

En las figuras que ilustran los espectros COSY (Fig. 31) y TOCSY (Fig. 32), se aprecia que la asignación de las resonancias para la porción sacárida sólo fue posible para tres metilpentosas, entre las que se incluyen la fucosa y dos unidades de ramnosa. Las tres unidades monosacáridas se nombran en todos los espectros con las abreviaciones Fuc, Ram y Ram', respectivamente.

**Cuadro 6.** Desplazamientos químicos en RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del ácido glicosídico peracetilado y metilado FV-SAM.

Posición	Protón <sup>a</sup>	Carbono <sup>b</sup>
Fuc-1	4.98 *	99.68
2	4.36 (dd, 10.1, 7.7)	74.53
3	5.51 (dd, 10.1, 3.5)	74.53
4	5.58 *	71.08
5	4.04 (q, 6.3)	67.09
6	1.24 (d, 6.4)	15.88
Ram-1	5.53 (d, 1.4)	97.37
2	5.63 (dd, 3.3, 1.7)	70.51
3	5.75 (dd, 9.9, 3.2)	71.00
4	4.22 (dd, 9.7, 9.7)	80.13
5	4.91 (dq, 9.7, 6.0)	67.84
6	1.69 (d, 6.1)	18.14
Ram'-1	5.44 (d, 1.6)	99.13
2	5.51 (dd, 3.1, 1.6)	72.34
3	4.49 (dd, 8.7, 3.1)	78.66
4	4.25 (dd, 8.7, 8.7)	78.66
5	4.31 (dq, 8.7, 5.8)	67.84
6	1.61 (d, 5.8)	18.27

<sup>a</sup> Datos registrados a 500 MHz en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están en ppm en relación al TMS. Los acoplamientos ( $J$ ) se encuentran en paréntesis y están expresados en Hz.

\* indican señales sobrepuestas.

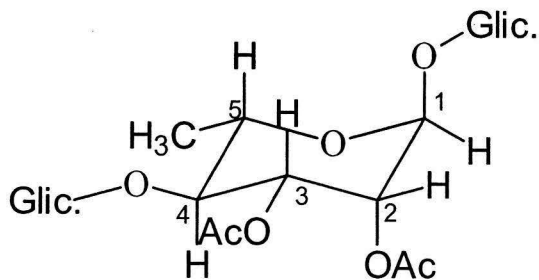
Abreviaciones; s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuádruple. Las asignaciones se basaron en los experimentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY.

<sup>b</sup> Datos registrados a 125 MHz en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están en ppm relativos al TMS.

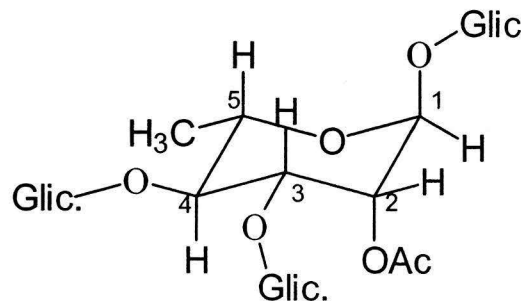
Todas las asignaciones se basan en los experimentos HMQC.

El establecimiento de la secuencia de glicosidación se inició considerando, en primer lugar, los desplazamientos químicos de las señales localizadas fácilmente en los experimentos COSY y TOCSY para las tres metilpentosas. En segundo lugar, partiendo del conocimiento de que los grupos hidroxilo de los azúcares se convirtieron en ésteres de acetato por tratamiento con anhídrido acético y piridina (ver Parte Experimental, apartado 5.6.2) y que esta reacción acetiló sólo a los grupos hidroxilo disponibles en el núcleo oligosacárido original (en los oligosacáridos cualquier grupo hidroxilo de un azúcar puede perder su disponibilidad a la reacción de acetilación al estar enlazado con el carbono anomérico de otro, i.e. formando un acetal en los enlaces glicosídicos), entonces las señales cuyos desplazamientos químicos aparecieron a campos altos por arriba de 5.3 ppm indicaban las respectivas posiciones de glicosidación de las metilpentosas y, las que estuvieron por debajo correspondían a las posiciones anoméricas y de acetilación. El efecto desprotector más fuerte del grupo acetato (que desplaza las resonancias a campos más bajos) con respecto al efecto de los enlaces etéreos glicosídicos hizo posible la distinción de las posiciones que están glicosiladas, de aquellas que están acetiladas.

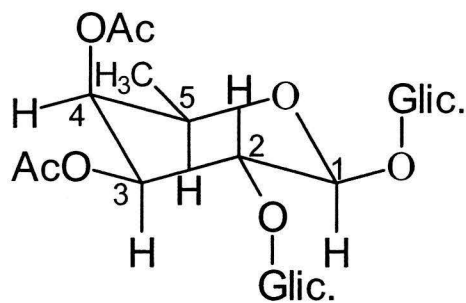
Tomando en cuenta esta explicación, se propuso la situación estructural ilustrada en la figura 33 para cada una de las tres metilpentosas encontradas. Finalmente, se llegó a la secuencia completa de glicosidación para el compuesto a partir de las principales conectividades observadas en los espectros HMBC, mismas que se ilustran en las figuras 34 y 35.



$\alpha$ -L-ramnosa (Ram)

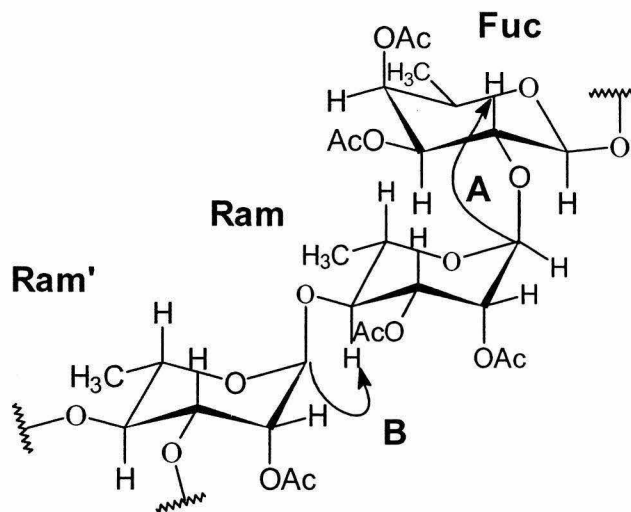
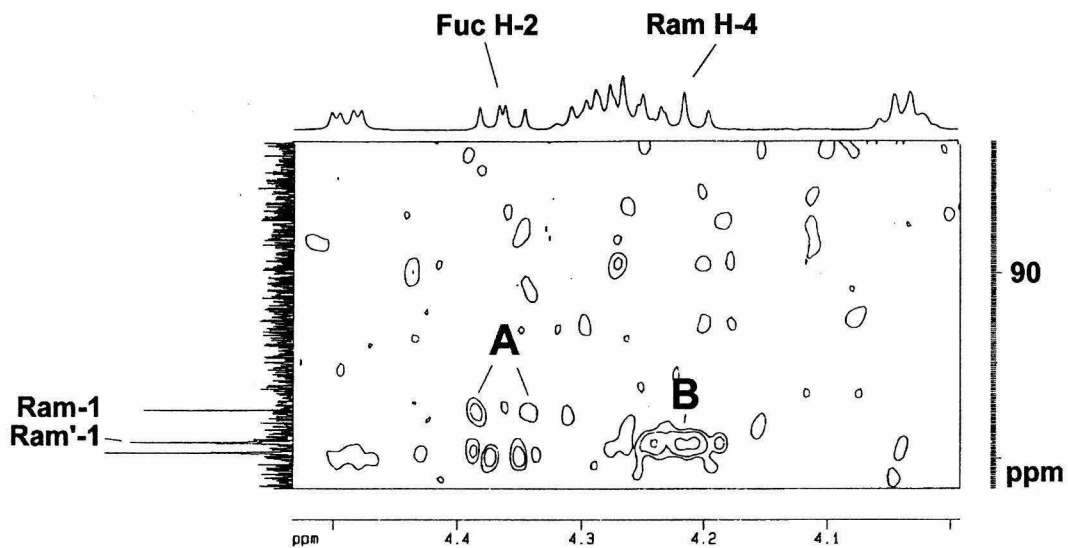


$\alpha$ -L-ramnosa (Ram')

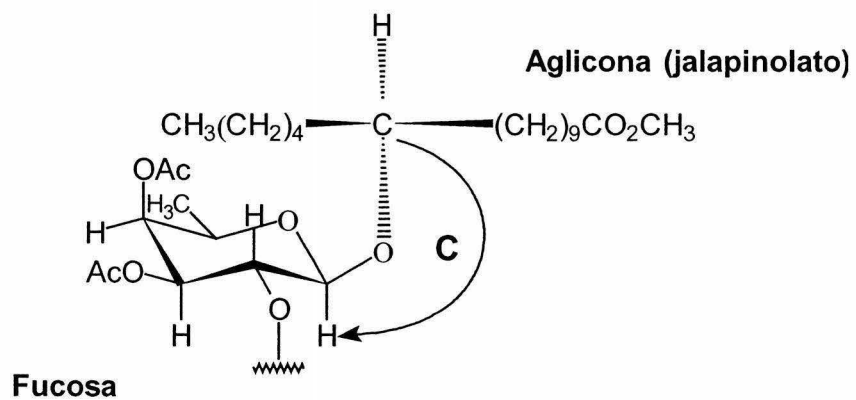
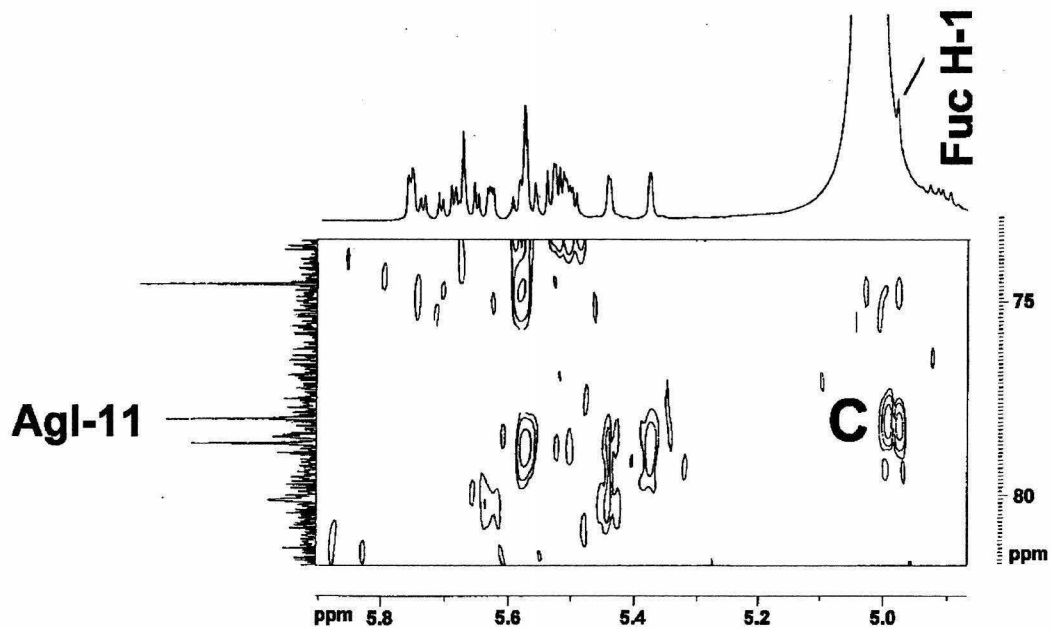


$\beta$ -D-fucosa (Fuc)

**Figura 33.** Propuestas estructurales para cada una de las tres metilpentosas del núcleo oligosacárido. Abreviaciones: AcO. = posición acetilada, Glic. = posición glicosidada.

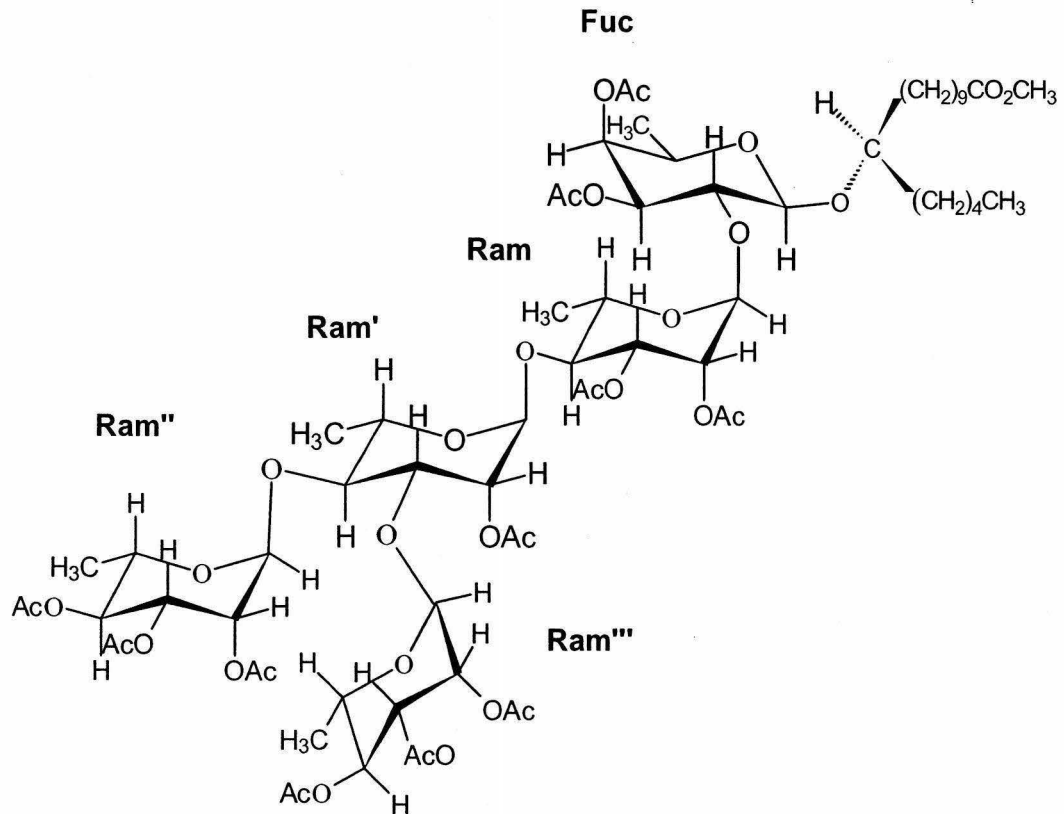


**Figura 34.** Sección del espectro HMBC y conectividades heteronucleares  $^3J_{C-H}$  observadas en el del ácido glicosídico peracetilado-metilado FV-SAM. Correlaciones: A;  $C_1\text{Ram}-H_2\text{Fuc}$  y B;  $C_1\text{Ram}'-H_4\text{Ram}$ .



**Figura 35.** Sección del espectro HMBC del ácido glicosídico peracetilado y metilado en donde se muestra la correación entre el C-1 de la fucosa con el H-11 del resto jalapinolato (aglicona) .

Con estas evidencias y considerando que hay dos unidades adicionales de ramnosa (que se nombran como Ram'' y Ram'''), se logró establecer la estructura del derivado peracetilado y metilado obtenido a partir de la saponificación de la FV hexánica (Fig. 36).



**Figura 36.** Estructura del derivado **FV-SAM**. Abreviaciones: Fuc = fucosa, Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, y Ram''' = ramnosa externa inferior.

Los resultados anteriores permitieron establecer la estructura del ácido glicosídico constitutivo de las resinas de la especie *Ipomoea pes-caprae* como el 11-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 4)]  $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico, que es el mismo núcleo oligosacárido presente en la jalapina de la planta *Ipomoea stolonifera* e *Ipomoea batatas* y conocido como el ácido simónico B (Noda et al., 1992; 1994).

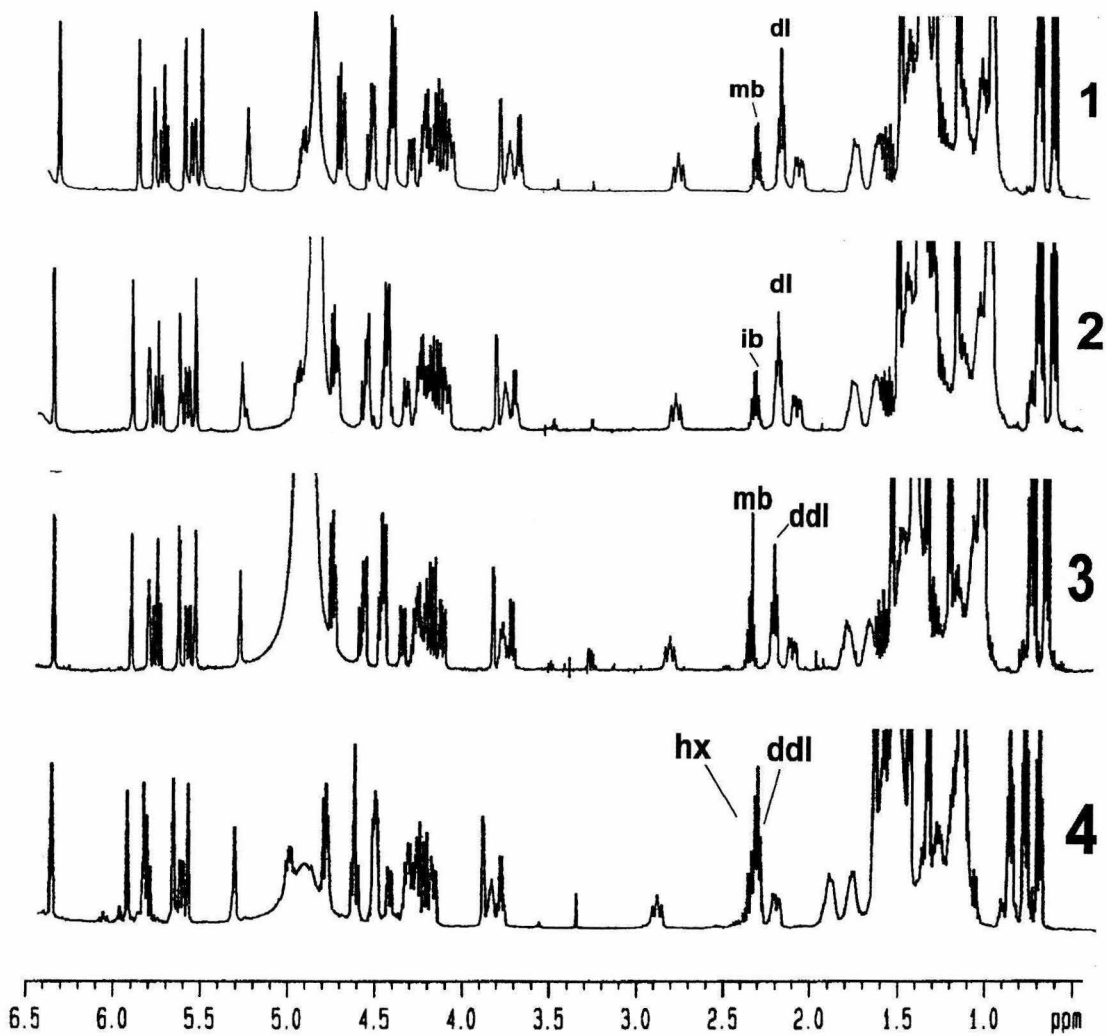


## 6.7 Elucidación estructural de los glicolípidos 1-4

Debido a que los cuatro compuestos aislados poseen al ácido simónico B como su núcleo oligosacárido constitutivo, la elucidación estructural de cada uno de estos constituyentes individuales (obtenidos a partir de las mezclas de glicolípidos de la fracción hexánica **FV** de *Ipomoea pes-caprae*), se realizó mediante la comparación de sus respectivas constantes espectroscópicas, y su diferenciación se logró a través del análisis individual de la espectrometría de masas. Los cuatro compuestos presentan prácticamente las mismas señales en los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (figuras 37, y 38). Sin embargo, presentan diferencias en sus pesos moleculares debido a la diversidad en los ácidos que se encuentran esterificando a los azúcares de la cadena oligosacárida.

### 6.7.1 Asignación de señales de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$

La asignación de las señales de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  se realizó mediante técnicas bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY). Este análisis permitió la asignación de las cuatro unidades de ramnosa y la única de unidad de fucosa. Es importante mencionar que la asignación fue más sencilla en los glicolípidos naturales que en el ácido simónico B debido a que hay una mayor dispersión de las señales del núcleo oligosacárido (figura 39).



**Figura 37.** Espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los glicolípidos aislados 1- 4. Se indican las señales que identifican los residuos de 2-metilbutanoilo (mb, H-2), isobutanoilo (ib, H-2), *n*-hexanoilo o caproilo (hx, H-2), *n*-decanoilo (dl, H-2) y *n*-dodecanoilo (ddl, H-2); 500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

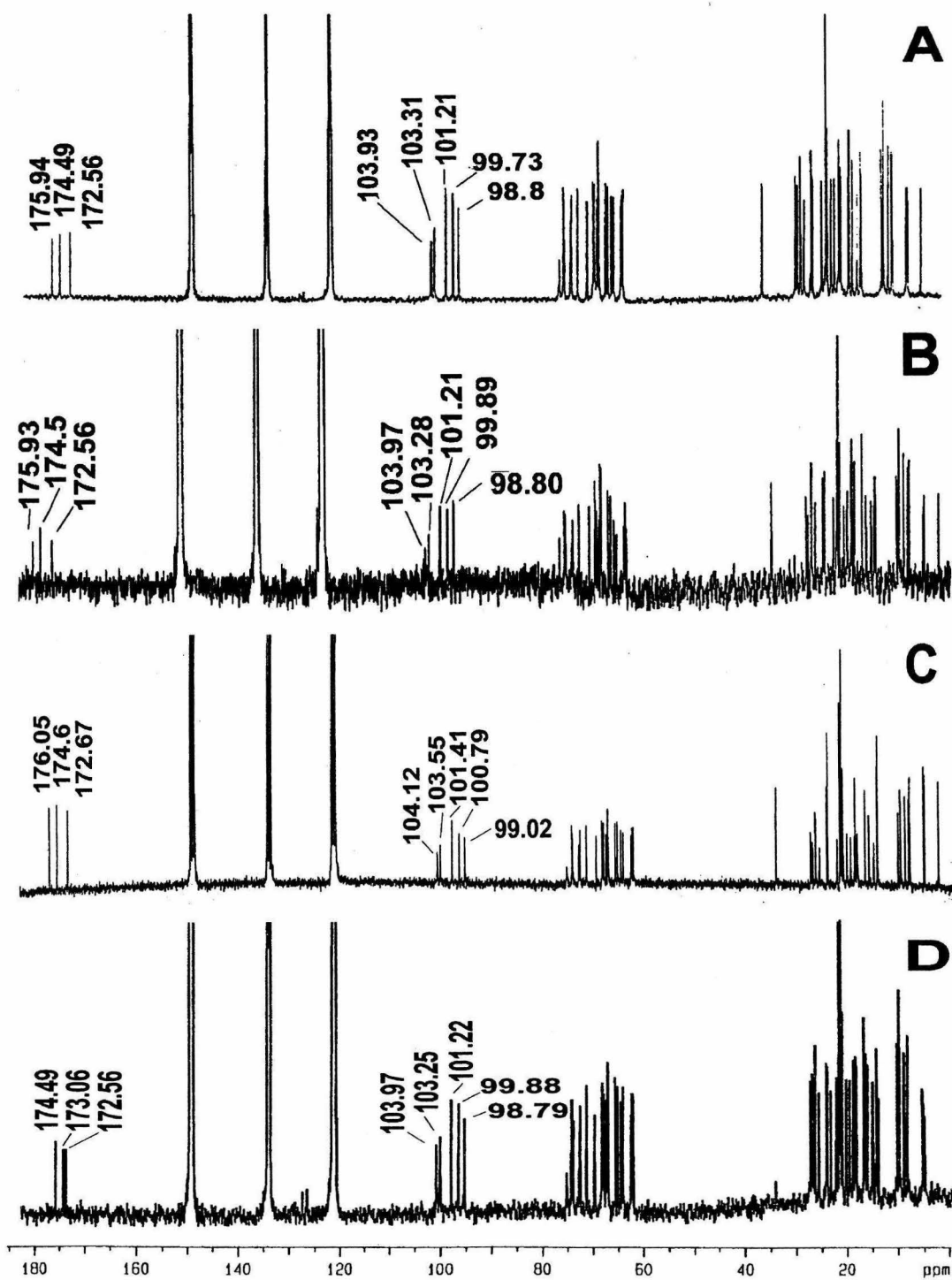
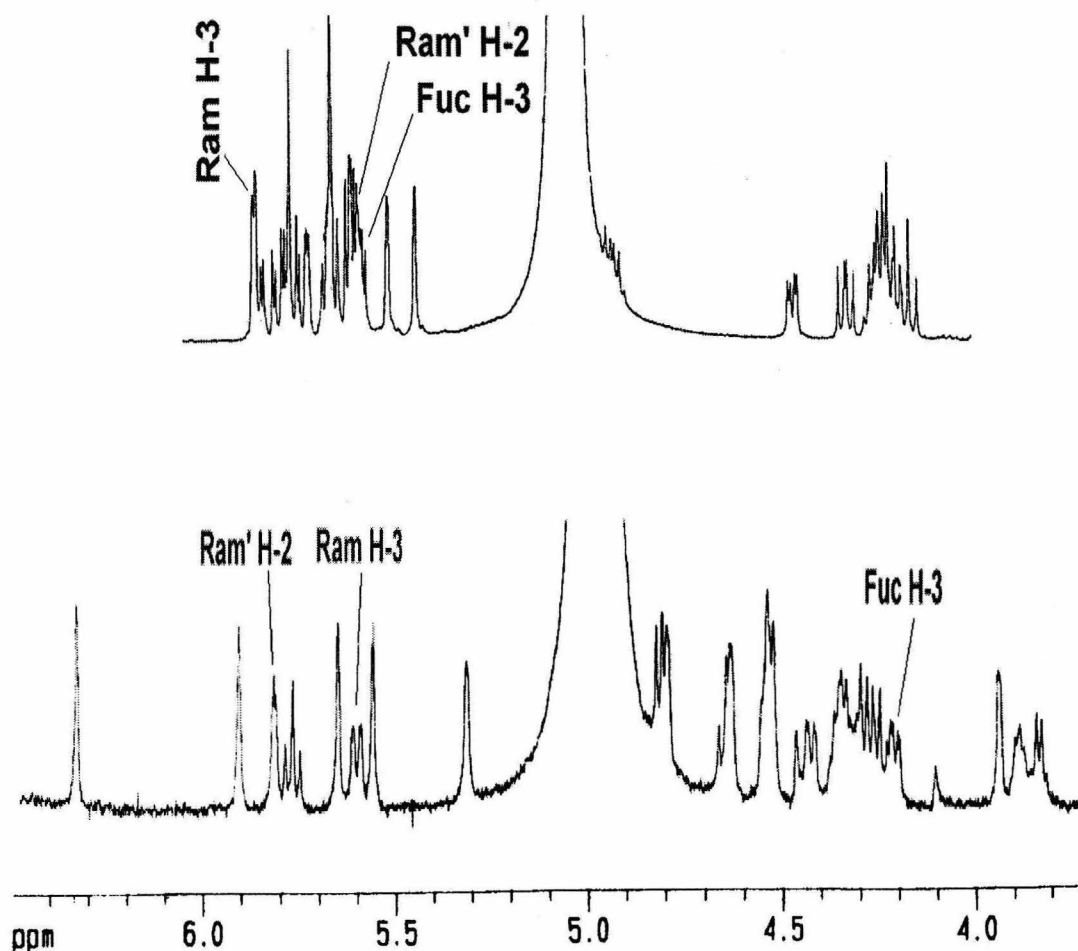
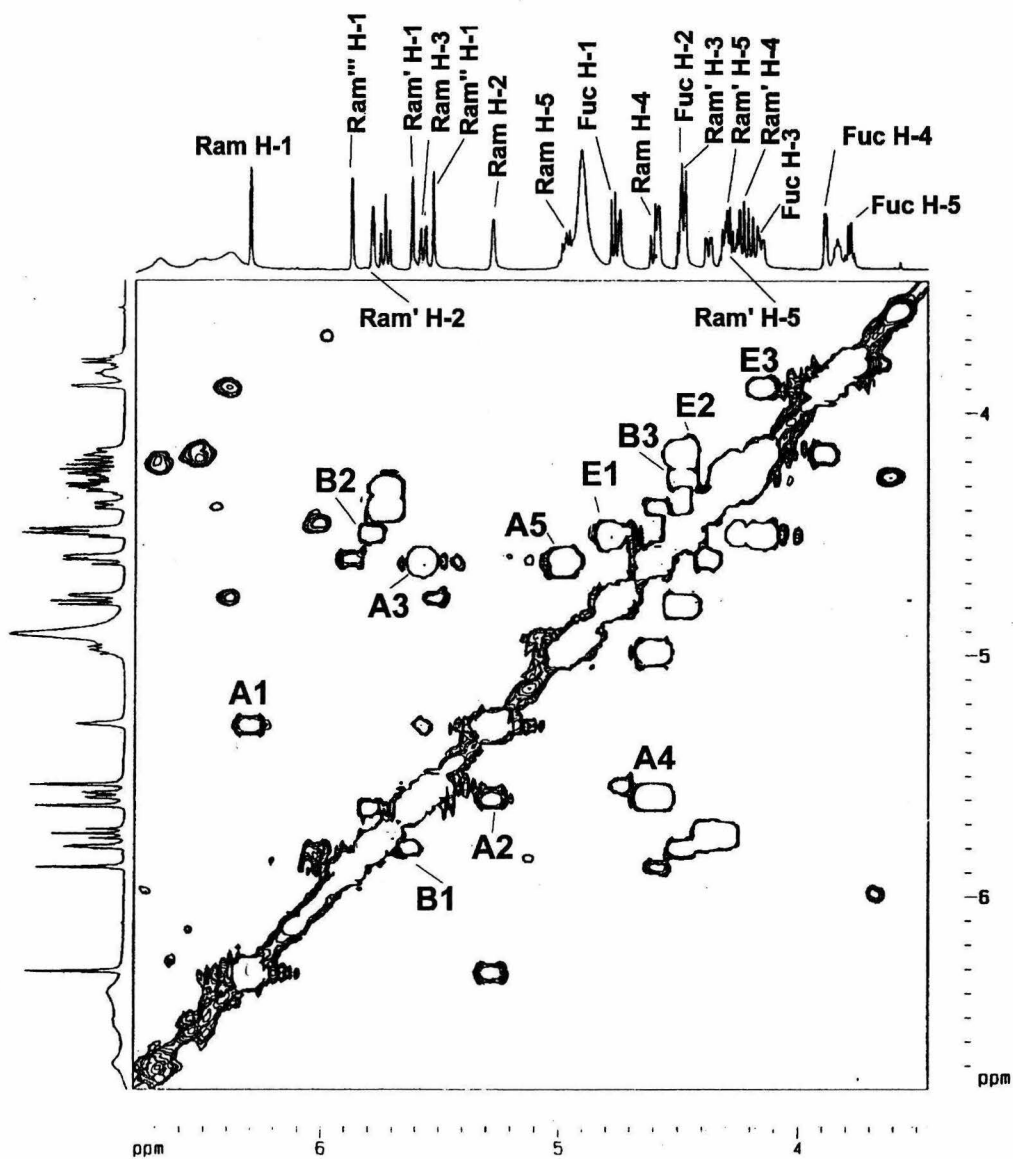


Figura 38. Espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$  de los glicolípidos aislados 1-4 (espectros A-D, 125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).



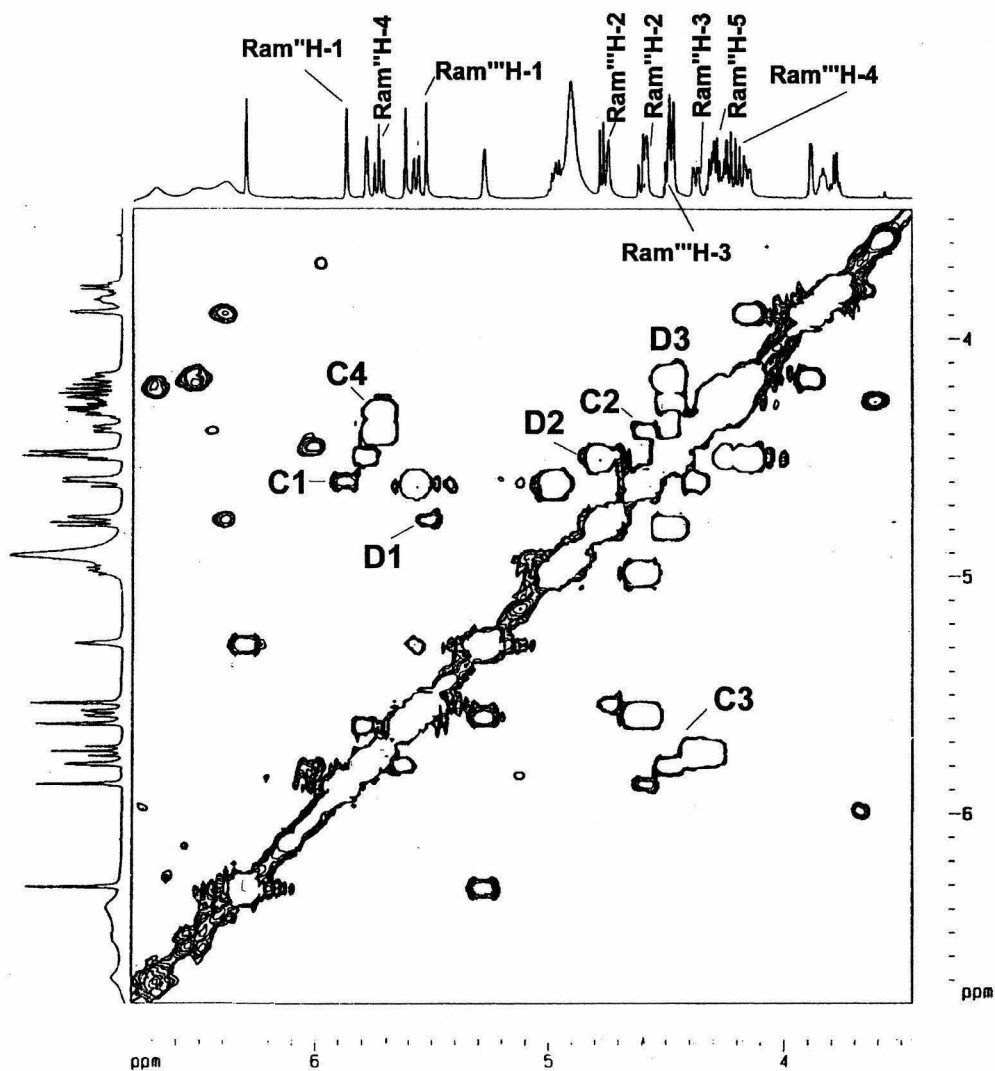
**Figura 39.** Región oligosacárida de los espectros de RMN <sup>1</sup>H. Arriba: derivado peracetilado-metilado (**FV-SAM**). Abajo: glicolípido natural **pescapreína II (3)**. Abreviaciones; Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Fuc = fucosa.

El procedimiento de asignación de las resonancias de las resinas **1- 4** se realizó del mismo modo que en el caso del ácido simónico B, primero se inició localizando las señales mejor resueltas y diagnósticas; e.g. H<sub>2</sub> para la fucosa, así como las cinco señales anoméricas y H<sub>4</sub> para una de las unidades de ramnosa. Como segundo paso, se dio seguimiento a los cuadros de conectividades para estas señales en el experimento COSY, como se ilustra en las figuras 40 y 41.



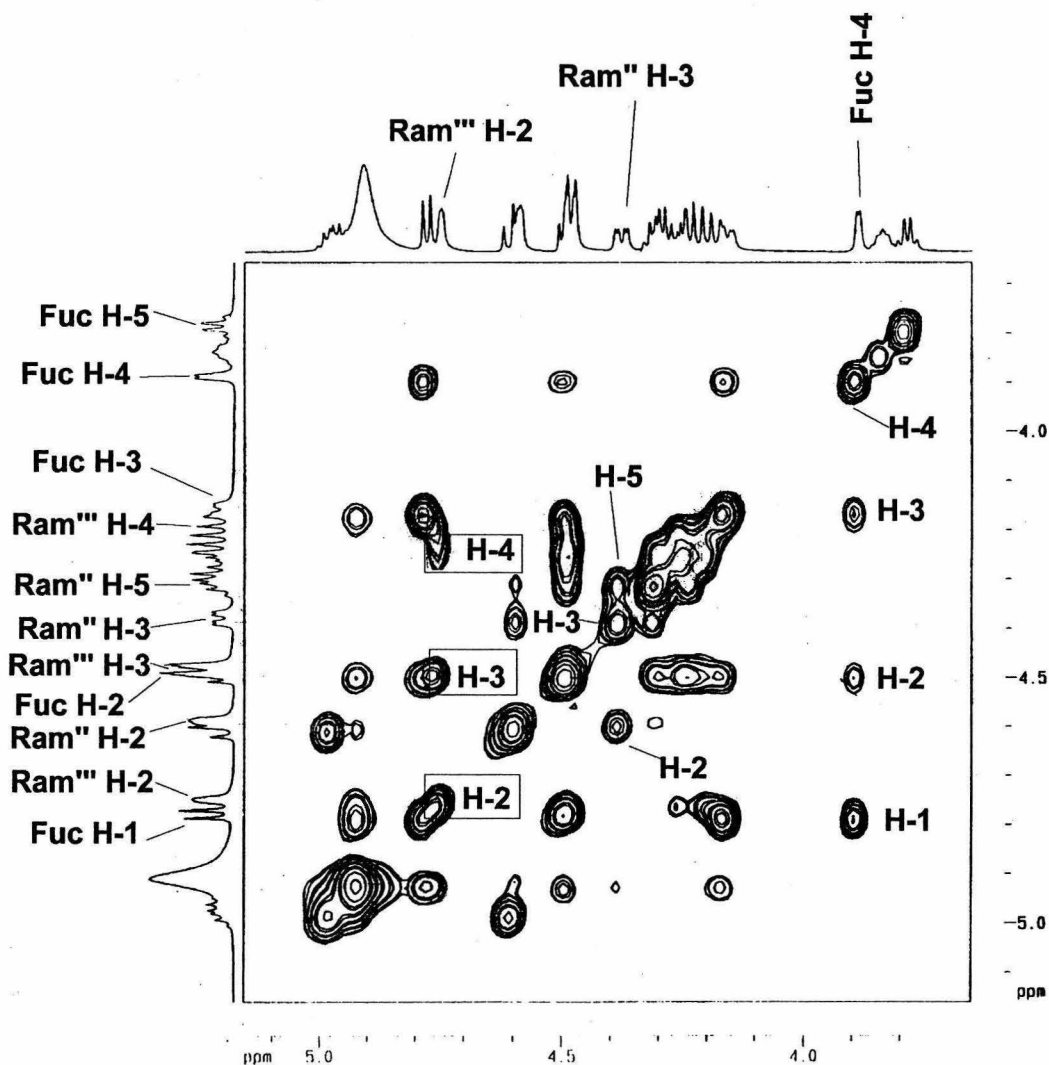
**Figura40.** Sección del espectro **COSY** para la porción oligosacárida del glicolípido **1**. Correlaciones ( $^3J_{H-H}$ ) en señal cruzada: A1; Ram H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, A2; Ram H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, A3; Ram H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, A4; Ram H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>, A5; Ram H<sub>5</sub>-H<sub>4</sub>, B1; Ram' H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, B2; Ram' H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, B3; Ram' H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, E1; Fuc H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, E2; Fuc H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, E3; Fuc H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>. Abreviaciones : Fuc = fucosa, Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior.

Con el fin de evitar la sobreposición de asignaciones en la figura 40, es importante aclarar que en la figura 41, que ilustra la misma sección del espectro COSY se incluyeron asignaciones no señaladas en la figura 40.



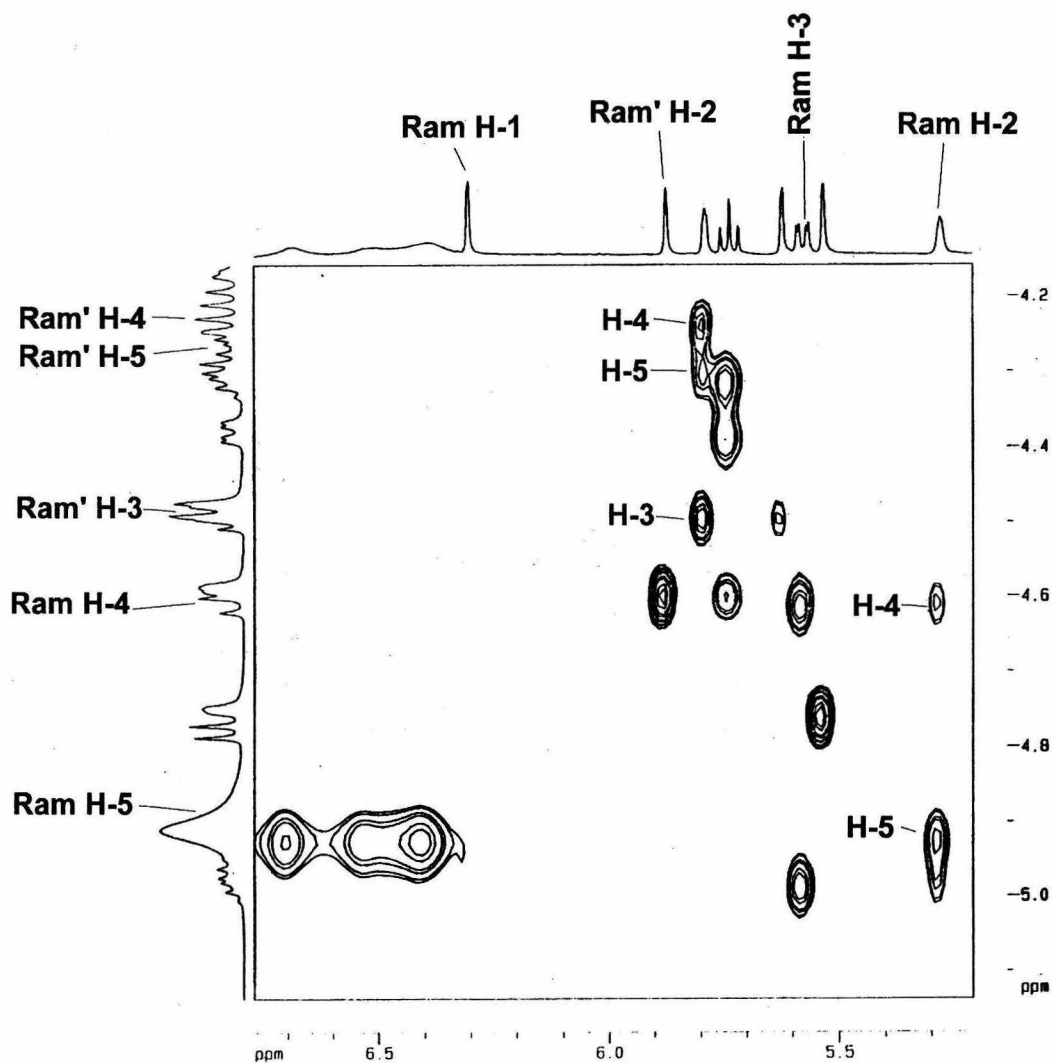
**Figura 41.** Sección del espectro COSY adicional para la porción oligosacárida del glicolípido 1. Correlaciones ( $^3J_{H-H}$ ) en señal cruzada: C1; Ram'' H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, C2; Ram'' H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, C3; Ram'' H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, C4; Ram'' H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>, D1; Ram''' H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, D2; Ram''' H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, D3; Ram''' H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>. Abreviaciones : Ram'' = ramnosa externa superior, Ram''' = ramnosa externa inferior.

Posteriormente, se procedió a localizar las señales adicionales que correspondían a cada una de las unidades sacáridas en el espectro TOCSY (figuras 42 y 43) y, por último, se completó la secuencia de interacciones vecinales ( $^3J_{H-H}$ ) de nueva cuenta con la ayuda del experimento COSY.



**Figura 42.** Sección del espectro **TOCSY** para la porción oligosacárida del glicolípido 1. Abreviaciones: Fuc = fucosa, Ram'' = ramnosa externa superior, Ram''' = ramnosa externa inferior.

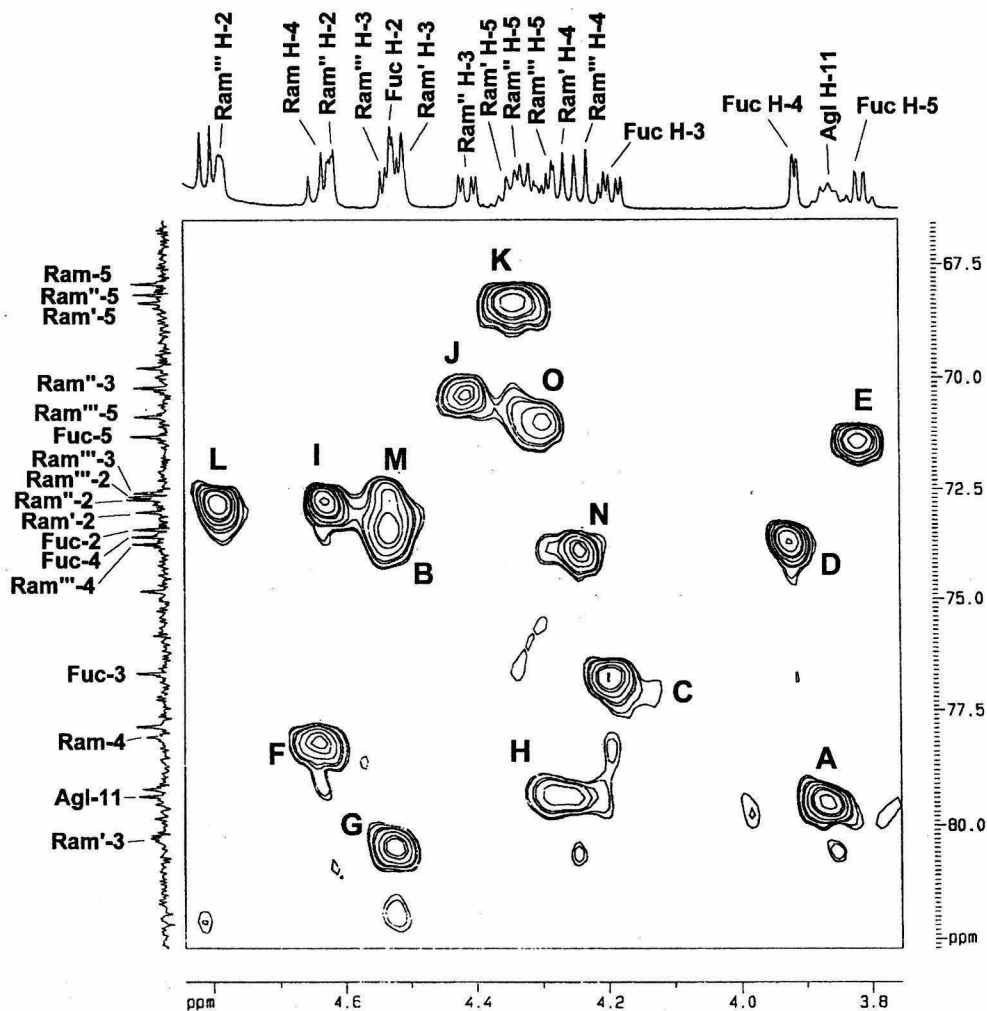
Del mismo modo que en los experimentos COSY, en la figura 43 se esquematiza una sección adicional para la porción oligosacárida del espectro TOCSY del glicolípido **1** indicando las asignaciones que no se incluyeron en la figura 42.



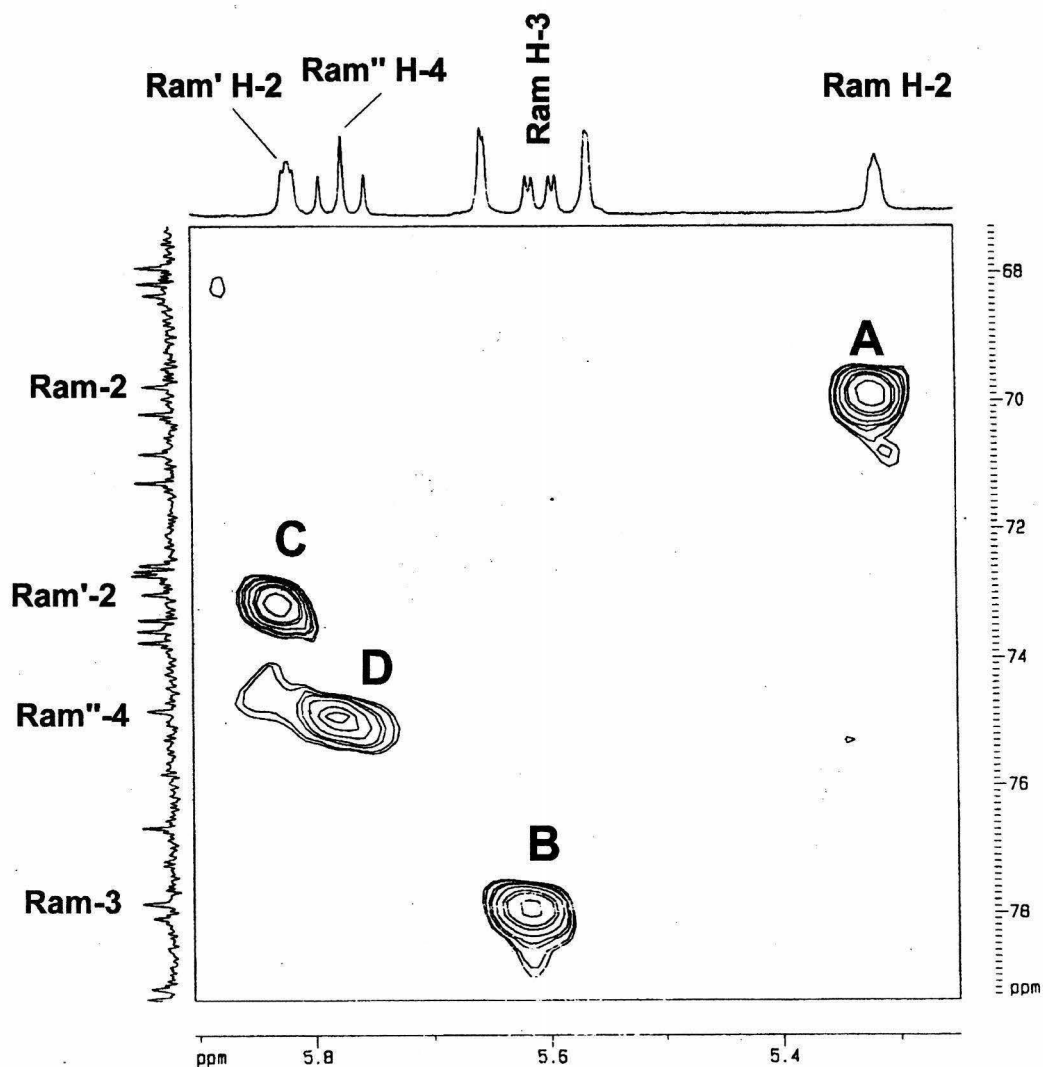
**Figura 43.** Sección adicional del espectro **TOCSY** para la porción oligosacárida del glicolípido **1**. Abreviaciones: Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior.



La asignación de las señales de RMN  $^{13}\text{C}$  (cuadros 8 y 9) se logró principalmente mediante la técnica HMQC, aunque también se empleó la técnica HMBC para verificar que las resonancias hayan sido correctamente asignadas sobre todo en las regiones donde se observó una mayor sobreposición de señales.

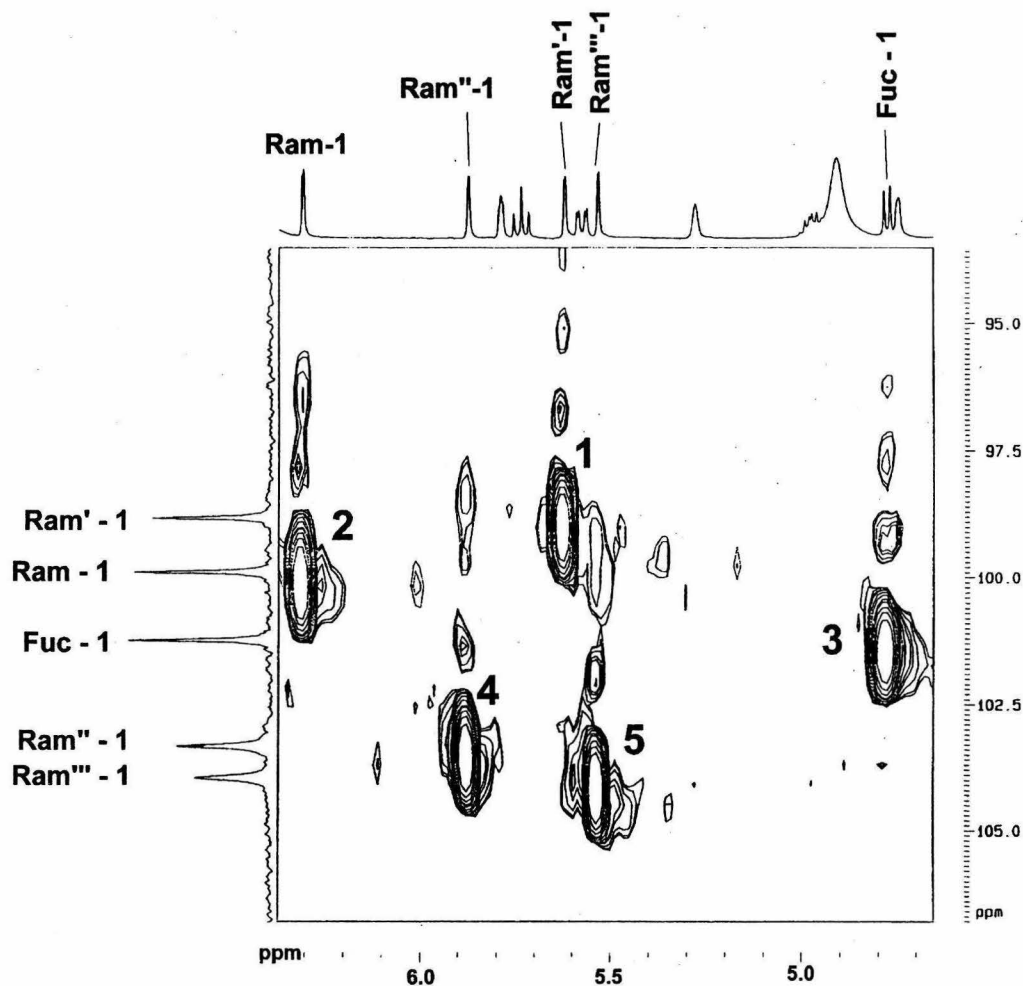


**Figura 44.** Sección del espectro HMQC para la región oligosacárida de la **pescapreína II (3)**. Asignación de las resonancias de  $^{13}\text{C}$ ; **A**;  $\text{C}_{11}\text{Agl}$ , **B**;  $\text{C}_2\text{Fuc}$ , **C**;  $\text{C}_3\text{Fuc}$ , **D**;  $\text{C}_4\text{Fuc}$ , **E**;  $\text{C}_5\text{Fuc}$ , **F**;  $\text{C}_4\text{Ram}$ , **G**;  $\text{C}_3\text{Ram}'$ , **H**;  $\text{C}_4\text{Ram}'$ , **I**;  $\text{C}_2\text{Ram}''$ , **J**;  $\text{C}_3\text{Ram}'''$ , **K**;  $\text{C}_5\text{Ram}'$  y  $\text{C}_5\text{Ram}''$ , **L**;  $\text{C}_2\text{Ram}'''$ , **M**;  $\text{C}_3\text{Ram}'''$ , **N**;  $\text{C}_4\text{Ram}'''$ , **O**;  $\text{C}_5\text{Ram}'''$ .



**Figura 45.** Sección del espectro HMQC para la región oligosacárida de la pescapreína II (3). Asignación de las resonancias de  $^{13}\text{C}$ ; **A**;  $\text{C}_2\text{Ram}$ , **B**;  $\text{C}_3\text{Ram}$ , **C**;  $\text{C}_2\text{Ram}'$ , **D**;  $\text{C}_4\text{Ram}''$ .

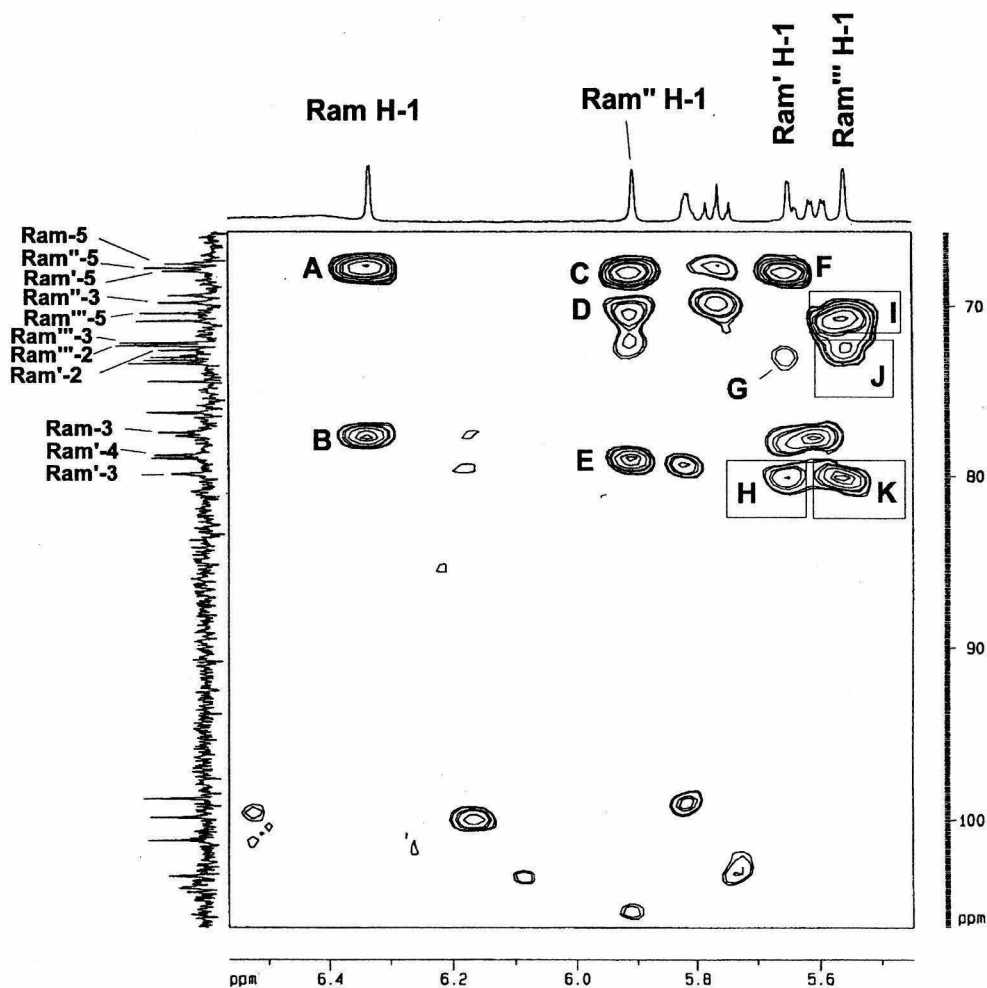
Después de identificar y diferenciar las señales aportadas por los protones anoméricos de las cuatro unidades sacáridas de ramnosa y por la de fucosa en la RMN  $^1\text{H}$  por medio de los experimentos COSY y TOCSY, se dio seguimiento a la asignación de las resonancias en la RMN  $^{13}\text{C}$ , para los átomos de carbono anoméricos que se ilustra en la figura 46.



**Figura 46.** Sección del espectro HMQC del glicolípido **pescapreína I (2)**. Asignación de las resonancias de  $^{13}\text{C}$  para la identificación de carbonos anoméricos. Asignaciones: **1**;  $\text{C}_1$  Ram', **2**;  $\text{C}_1$  Ram, **3**;  $\text{C}_1$ Fuc, **4**;  $\text{C}_1$ Ram'', **5**;  $\text{C}_1$ Ram'''.

En el espectro HMQC de la figura 44 (compuesto **3**) no fue posible asignar las señales de los núcleos C-5 de las unidades **Ram'**, **Ram''**, y **Ram'''** a partir de las señales de hidrógeno correspondientes (H-5) debido a que se localizaron sobrepuestas en el intervalo de desplazamientos,  $\delta$  4.2-4.4 ppm, por lo tanto, existen por lo menos tres posibilidades ( $\delta$  68.17, 68.35 y 70.85) para asignar la resonancia de los núcleos C-5.

Para sustentar esta asignación se analizaron conectividades entre los núcleos de carbono e hidrógeno en los espectros HMBC, tanto las correlaciones ( $^3J_{C-H}$ ) H<sub>1</sub>-C<sub>5</sub>, como las correlaciones ( $^2J_{C-H}$ ) H<sub>6</sub>-C<sub>5</sub>, de las mismas unidades sacáridas (figuras 47 y 48).

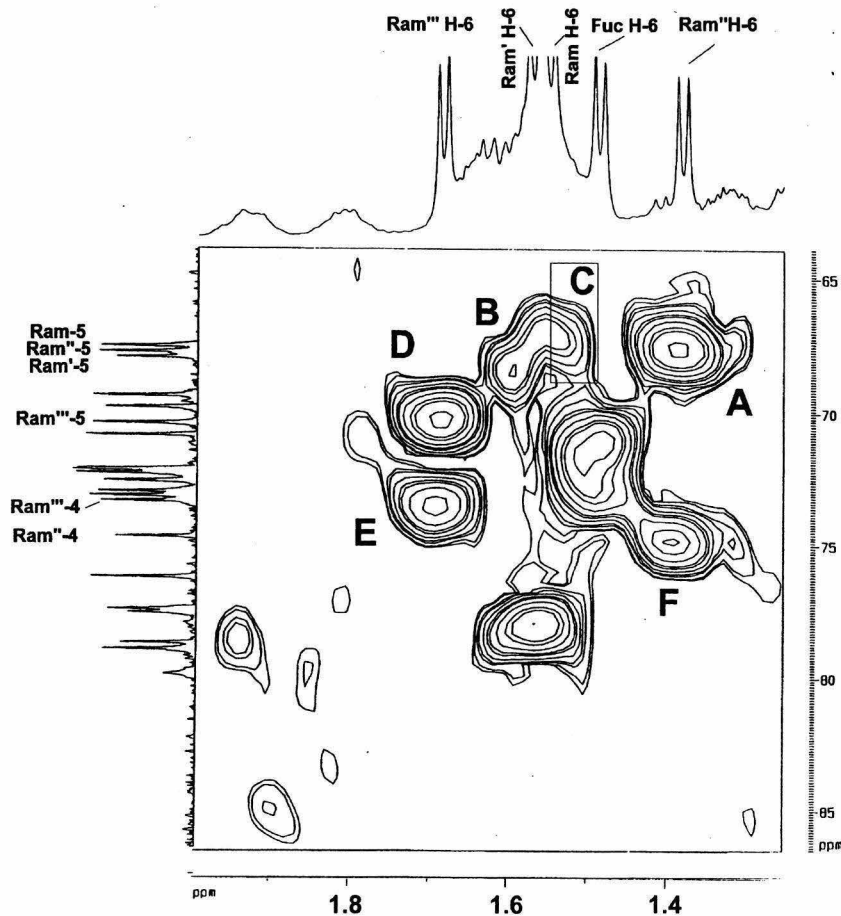


**Figura 47.** Sección del espectro HMBC de la pescapreína I (2). Asignaciones a larga distancia para el  $^{13}C$ . Correlaciones ( $^3J_{C-H}$ ): **A**; H<sub>1</sub>Ram-C<sub>5</sub>Ram, **B**; H<sub>1</sub>Ram-C<sub>3</sub>Ram, **C**; H<sub>1</sub>Ram'-C<sub>5</sub>Ram'', **D**; H<sub>1</sub>Ram-C<sub>3</sub>Ram, **E**; H<sub>1</sub>Ram''-C<sub>4</sub>Ram', **F**; H<sub>1</sub>Ram'-C<sub>5</sub>Ram', **H**; H<sub>1</sub>Ram'-C<sub>3</sub>Ram', **I**; H<sub>1</sub>Ram'''-C<sub>5</sub>Ram''', **J**; H<sub>1</sub>Ram'''-C<sub>3</sub>Ram''', **K**; H<sub>1</sub>Ram'''-C<sub>3</sub>Ram'. Correlaciones ( $^2J_{C-H}$ ): **G**; H<sub>1</sub>Ram'-C<sub>2</sub>Ram', **J**; H<sub>1</sub>Ram'''-C<sub>2</sub>Ram'''.

Se siguió una estrategia similar para C-3 de las unidades de **Ram'** y **Ram''** así como C-2 de **Fuc**. Considerando que los centros que están formando los enlaces glicosídicos (C-3 de **Ram'** y C-2 de **Fuc**) se deben encontrar desplazadas paramagnéticamente, entonces es probable que C-3 de **Ram''** sea la menos desplazada con  $\delta$  72.15. Para sustentar esta deducción, también se analizaron las conectividades entre los núcleos de carbono e hidrógeno en los espectros HMBC del compuesto **2**.

El espectro HMBC de la figura 47 presentó una correlación entre la resonancia en  $\delta$  70.43 con la del protón anomérico H-1 ( $\delta$  5.56) de la ramnosa externa inferior (**Ram''**) y esta última con otra señal del carbono C-3 de la misma unidad. Así, se puede concluir que la resonancia en  $\delta$  70.43 corresponde al núcleo C-5 de la misma unidad y que la resonancia  $\delta$  72.15 corresponde al núcleo C-3.

También, se observó la conectividad entre la resonancia en  $\delta$  79.88 con la de H-1 ( $\delta$  5.65) de la ramnosa interna superior (**Ram'**) y así se asigna para el núcleo C-3 de esta unidad un desplazamiento centrado en  $\delta$  79.88. Para la asignación de los núcleos C-5 de las unidades de ramnosa interna superior y ramnosa externa superior (**Ram'** y **Ram''**) puede aplicarse el mismo razonamiento, sin embargo, las interacciones H<sub>1</sub> – C<sub>5</sub> en el experimento HMBC anterior no están bien diferenciadas para estas dos unidades. Siendo así, para su asignación se recurrió al análisis de las interacciones de los núcleos de carbono de los grupos metilo C-6 con H-5 de estas unidades y adicionalmente con H – 4. Para esto, se utilizó el espectro HMBC del compuesto **4** (fig. 48).

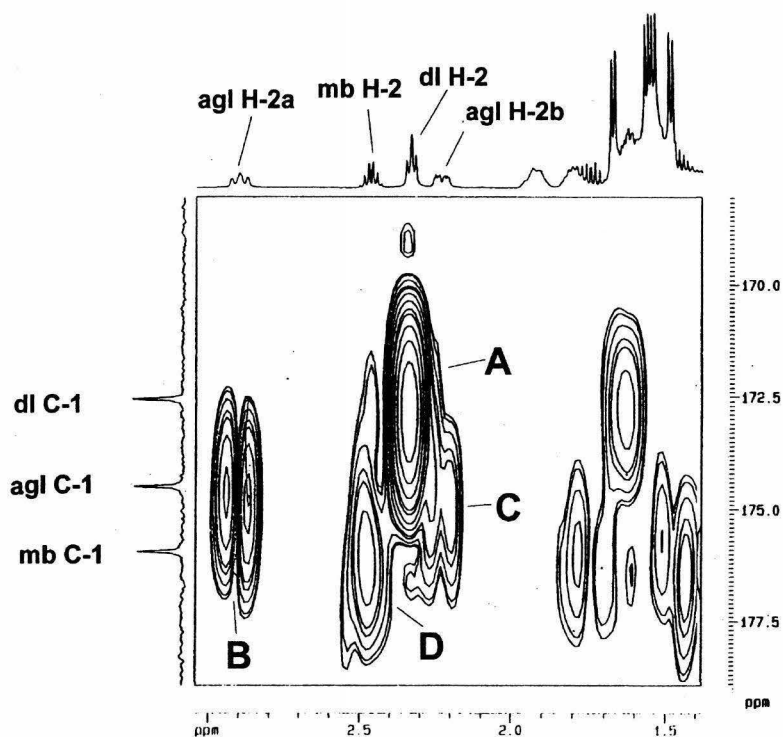


**Figura 48.** Sección del espectro HMBC para la asignación de los carbonos C-4 y C-5 de ramnosa. Conectividades: **A**; H<sub>6</sub>Ram''-C<sub>5</sub>Ram''', **B**; H<sub>6</sub>Ram'-C<sub>5</sub>Ram''', **C**; H<sub>6</sub>Ram-C<sub>5</sub>Ram''', **D**; H<sub>6</sub>Ram'''-C<sub>5</sub>Ram''', **E**; H<sub>6</sub>Ram'''-C<sub>4</sub>Ram''', **F**; H<sub>6</sub>Ram''-C<sub>4</sub>Ram'''.

Aplicando un razonamiento similar, con el espectro anterior pudo asignarse definitivamente la resonancia para los núcleos C-5 de **Ram'** y **Ram''** con desplazamientos  $\delta$  67.94 y 67.74, respectivamente (compuesto **4**).

Para localizar las posiciones de esterificación y lactonización en los oligosacáridos es de suma importancia realizar una asignación correcta para los núcleos de carbono correspondientes a los grupos carbonilo de los ácidos que se encuentran esterificando el núcleo oligosacárido, así como del grupo carbonilo aportado por la aglicona que forma la macrolactona característica de estos

compuestos. Para esta asignación, se realizó un análisis de las interacciones que se presentan entre el núcleo de carbono de los grupos carbonilo y los protones H-2 de los correspondientes ácidos y de la aglicona, como se ejemplifica para el compuesto **1** en la siguiente figura.



**Figura 49.** Sección del espectro HMBC de la **estoloniferina III (1)**. Aisgnación de señales de  $^{13}\text{C}$  de grupos carbonilo para la aglicona, y ácidos grasos. Correlaciones ( $^2J_{\text{C-H}}$ ): A;  $\text{C}_1\text{-H}_{2\text{dl}}$ , B;  $\text{C}_1\text{-H}_{2\text{a}}$  agl, C;  $\text{C}_1\text{-H}_{2\text{b}}$  agl, D;  $\text{C}_1\text{-H}_2$  mb. Abreviaciones: dl = decanoilo, mb = 2-metilbutanoilo, agl = aglicona.

Las tablas de desplazamientos en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los glicolípidos **1 – 4** se incluyen en los siguientes cuadros (6 a 9). En los cuadros 6 y 8 se enlistan los desplazamientos para la región oligosacárida de los glicolípidos mientras que en los cuadros 7 y 9 se desglosan los desplazamientos para la región de la aglicona y los residuos ácidos.

**Cuadro 7.** Constantes espectroscópicas en la RMN  $^1\text{H}$  para la región oligoscárida de la estoloniferina III (1) y pescapreínas I - III (2-4)<sup>a</sup>.

Protón <sup>b</sup>	1	2	3	4
Fuc-1	4.80 (d, 7.9)	4.81 (d, 7.6)	4.81 (d, 7.9)	4.78 (d, 7.9)
2	4.51 (dd, 9.4, 7.9)	4.52 (dd, 9.5, 7.6)	4.53 (dd, 9.5, 7.5)	4.50 (dd, 9.5, 7.9)
3	4.18 (dd, 9.4, 3.7)	4.19 (dd, 9.5, 3.4)	4.19 (dd, 9.6, 3.4)	4.16 (dd, 9.5, 3.3)
4	3.91 (d, 3.7)	3.91 (d, 3.4)	3.91 (d, 3.3)	3.89 (d, 3.3)
5	3.82 (q, 6.4)	3.82 (q, 6.4)	3.81 (q, 6.5)	3.79 (q, 6.4)
6	1.52 (d, 6.4)	1.52 (d, 6.4)	1.51 (d, 6.4)	1.49 (d, 6.4)
Ram-1	6.32 (d, 1.5)	6.32 (d, 1.5)	6.35 (d, 1.4)	6.32 (s)
2	5.30 (dd, 2.8, 1.5)	5.30 (dd, 2.8, 1.5)	5.32 (dd, 2.8, 1.5)	5.29 (d, 2.5)
3	5.61 (dd, 9.8, 2.8)	5.61 (dd, 9.8, 2.8)	5.60 (dd, 10.2, 2.6)	5.58 (dd, 10.1, 2.5)
4	4.63 (dd, 9.8, 9.8)	4.63 (dd, 9.8, 9.8)	4.63 (dd, 9.8, 9.8)	4.61 (dd, 10.1, 10.1)
5	5.00 (dq, 9.8, 6.1)	5.00 (dq, 9.8, 6.7)	5.00 (dq, 9.8, 6.2)	4.98 (dq, 10.1, 6.2)
6	1.58 (d, 6.1)	1.58 (d, 6.7)	1.57 (d, 6.2)	1.55 (d, 6.2)
Ram'-1	5.65 (d, 1.5)	5.65 (d, 1.5)	5.66 (d, 1.5)	5.63 (s)
2	5.82 (dd, 3.2, 1.5)	5.82 (dd, 3.3, 1.5)	5.82 (dd, 3.2, 1.5)	5.80 (dd, 2.0, 1.5)
3	4.52 (dd, 8.9, 3.2)	4.52 (dd, 8.7, 3.3)	4.52 (dd, 9.5, 3.2)	4.50 (dd, 9.4, 2.0)
4	4.25 (dd, 8.9, 8.9)	4.25 (dd, 8.7, 8.7)	4.23 (dd, 9.4, 9.4)	4.20 (dd, 9.4, 9.4)
5	4.32 (dq, 8.9, 6.1)	4.32 (dq, 8.7, 6.4)	4.32 (dq, 9.4, 6.0)	4.31 (dq, 9.4, 6.0)
6	1.69 (d, 6.1)	1.60 (d, 6.4)	1.59 (d, 6.0)	1.57 (d, 6.0)
Ram''-1	5.90 (s)	5.89 (s)	5.92 (s)	5.90 (s)
2	4.61 (dd, 3.4, 1.5)	4.62 (dd, 3.3, 1.5)	4.62 (dd, 3.4, 1.5)	4.61 (dd, 3.2, 1.0)
3	4.40 (dd, 9.8, 3.4)	4.42 (dd, 9.8, 3.3)	4.41 (dd, 9.7, 3.4)	4.41 (dd, 9.7, 3.2)
4	5.76 (dd, 9.8, 9.8)	5.76 (dd, 9.8, 9.8)	5.78 (dd, 9.7, 9.7)	5.78 (dd, 9.7, 9.7)
5	4.34 (dq, 9.8, 6.1)	4.33 (dq, 9.8, 6.1)	4.35 (dq, 9.7, 6.3)	4.33 (dq, 9.7, 6.2)
6	1.39 (d, 6.1)	1.38 (d, 6.1)	1.38 (d, 6.3)	1.38 (d, 6.2)
Ram'''-1	5.56 (d 1.0)	5.56 (s)	5.56 (d 1.0)	5.55 (s)
2	4.77 (dd, 3.7, 1.0)	4.78 (dd, 3.0, 1.5)	4.79 (dd, 3.7, 1.0)	4.76 (dd, 3.0, 1.0)
3	4.50 (dd, 9.2, 2.7)	4.51 (dd, 9.5, 3.0)	4.53 (dd, 9.1, 3.7)	4.50 (dd, 9.2, 3.0)
4	4.21 (dd, 9.2, 9.2)	4.21 (dd, 9.5, 9.5)	4.26 (dd, 9.1, 9.1)	4.24 (dd, 9.2, 9.2)
5	4.27 (dq, 9.2, 6.1)	4.27 (dq, 9.5, 5.8)	4.28 (dq, 9.1, 6.1)	4.27 (dq, 9.2, 6.0)
6	1.70 (d, 6.1)	1.71 (d, 5.8)	1.70 (d, 6.1)	1.68 (d, 6.0)

<sup>a</sup>Datos registrados a 500 MHz en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están en ppm en relación con TMS. Los acoplamientos (J) se encuentran en paréntesis y se expresan en Hz.

<sup>b</sup>Abreviaciones; s = señal simple d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuádruple, m = señal múltiple

Las asignaciones se basaron en los experimentos  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY.

Fuc = fucosa, Ram = ramnosa, Jal = 11-hidroxihexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo, ib = isobutanoilo (2-metil propanoilo), hexa = *n*-hexanoilo, deca = *n*-decanoilo, dodeca = *n*-dodecanoilo.



**Cuadro 8.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^1\text{H}$  para la aglicona y los residuos ácidos de la **estoloniferina III (1)** y **pescapreínas I - III (2-4)**<sup>a</sup>.

Protón <sup>b</sup>	1	2	3	4
Jal-2a	2.27 (ddd, 15.3, 6.7, 2.7)	2.28 (m)	2.25 (ddd, 15.3, 7.1, 3.1)	2.24 (m)
2b	2.93 (t, 12.2)	2.93 (t, 12.5)	2.93 (t, 11.7)	2.91 (t, 12.7)
11	3.87 (m)	3.87 (m)	3.86 (m)	3.89 (m)
16	0.85 (t, 7.0)	0.86 (t, 7.0)	0.85 (t, 6.8)	0.83 (t, 6.7)
Mb-2	2.50 (tq, 7.0, 6.7)		2.48 (tq, 7.0, 6.7)	
4	0.94 (t, 7.3)		0.92 (t, 7.42)	
5	1.20 (d, 7.0)		1.19 (d, 7.2)	
Ib-2		2.64 (qq, 7.0, 7.0)		
3		1.17 (d, 7.0)		
4		1.20 (d, 7.0)		
Hexa-2				2.38 (m)
6				0.75 (t, 7.1)
Deca-2	2.37 (t, 7.3)			
10	0.95 (t, 6.7)			
Dodeca-2		2.38 (t, 7.3)	2.35 (t, 7.2)	2.34 (t, 7.5)
12		0.95 (t, 7.0)	0.93 (t, 6.8)	0.91 (t, 6.8)

<sup>a y b</sup> Ver cuadro 7.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

**Cuadro 9.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para la porción oligosacárida de la **estoloniferina III (1)** y **pescapreínas I - III(2-4)**<sup>a</sup>.

Carbono <sup>b</sup>	1	2	3	4
Fuc-1	101.21	101.21	101.62	101.22
2	73.00	73.01	73.41	73.01
3	76.25	76.26	76.67	76.25
4	73.16	73.17	73.58	73.17
5	70.87	70.88	71.29	70.87
6	16.83	16.83	17.25	16.83
Ram-1	99.87	99.89	100.30	99.89
2	69.37	69.38	69.78	69.38
3	77.44	77.45	77.85	77.46
4	77.66	77.64	78.09	77.58
5	67.52	67.52	67.92	67.52
6	18.78	18.79	19.21	18.78
Ram'-1	98.80	98.80	99.22	98.79
2	72.59	72.60	73.01	72.61
3	79.86	79.88	80.29	79.90
4	78.82	78.79	79.21	78.73
5	67.93	67.93	68.35	67.94
6	18.35	18.36	18.79	18.37
Ram''-1	103.31	103.28	104.35	103.25
2	72.27	72.32	72.72	72.32
3	69.80	69.80	70.21	69.82
4	74.41	74.41	74.82	74.71
5	67.75	67.75	68.17	67.74
6	17.47	17.48	17.89	17.50
Ram'''-1	103.93	103.97	103.75	103.97
2	72.27	72.32	72.66	72.20
3	72.15	72.15	72.57	72.16
4	73.34	73.36	73.75	73.37
5	70.42	70.43	70.85	70.42
6	18.35	18.36	18.79	18.37

<sup>a</sup>Datos registrados a 125 MHz en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están en ppm relativos al TMS.

Todas las asignaciones están basadas en los experimentos HMQC.

<sup>b</sup>Abreviaciones: Fuc = Fucosa, Ram = Ramnosa, Jal = 11-hidroxi-hexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo; ib = 2-metilpropanoilo (isobutanoilo), hexa = *n*-hexanoilo, deca = *n*-decanoilo, dodeca = *n*-dodecanoilo.

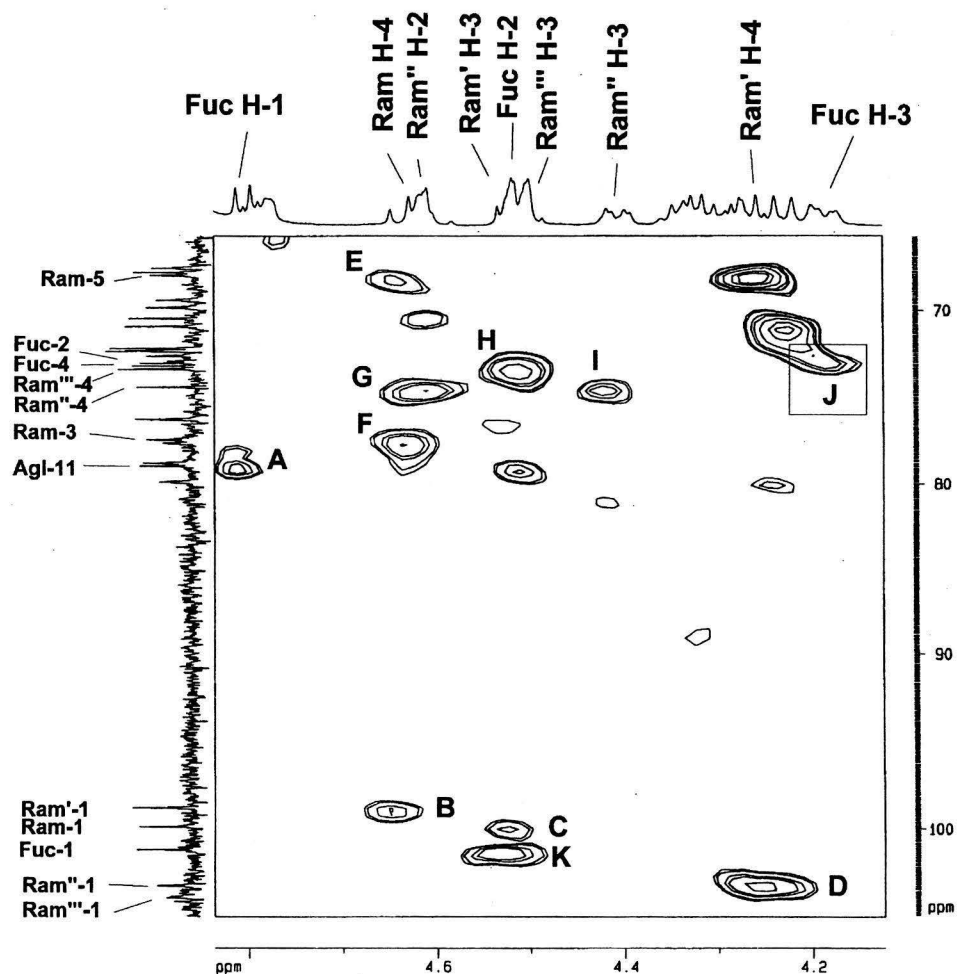
**Cuadro 10.** Desplazamientos químicos en la RMN  $^{13}\text{C}$  para la aglicona y los residuos ácidos de la **estoloniferina III (1)** y **pescapreínas I - III (2-4)<sup>a</sup>**.

Carbono <sup>b</sup>	1	2	3	4
Jal-1	174.49	174.50	174.92	174.49
2	33.30	33.31	33.71	33.30
11	78.95	78.96	79.37	78.97
16	13.88	13.88	14.31	13.88
Mb-1	175.94		176.36	
2	41.17		41.58	
4	11.38		11.79	
5	16.62		17.04	
Ib-1		175.93		
2		41.17		
3		11.37		
4		16.62		
Hexa-1				173.10
2				34.00
6				13.60
Deca-1	172.56			
2	33.99			
10	14.03			
Dodeca-1		172.56	172.98	172.56
2		34.00	34.41	34.24
12		14.03	14.45	14.03

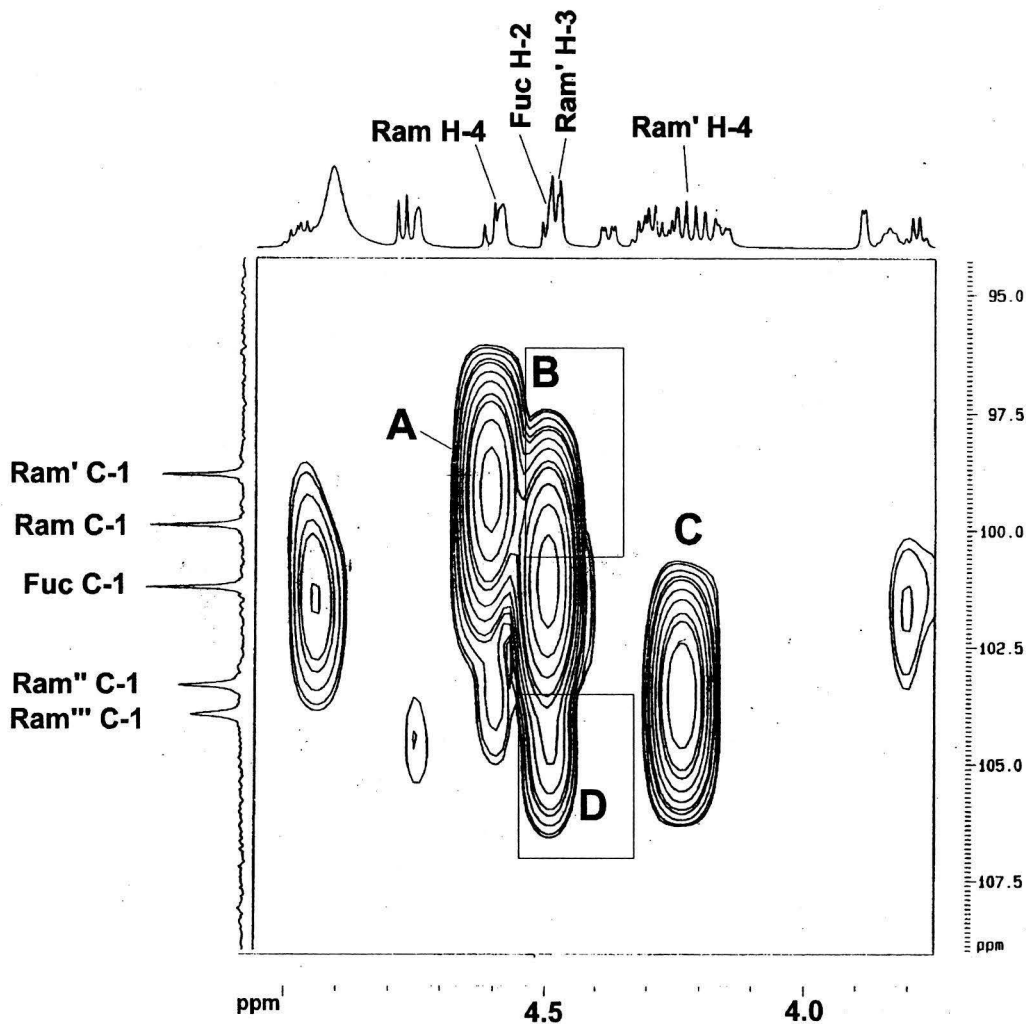
<sup>a</sup> y <sup>b</sup> Ver cuadro 9.

### 6.7.2 Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación

Se estableció la secuencia de glicosidación a partir de las correlaciones  $^3J_{C-H}$  en los espectros HMBC de los compuestos **1** y **2**.



**Figura 50.** Sección del espectro HMBC de la pescareína I (**2**). Conectividades: **A**;  $C_{11}Agl-H_1Fuc$ , **B**;  $C_1Ram'-H_4Ram$ , **C**;  $C_1Ram-H_2Fuc$ , **D**;  $C_1Ram''-H_4Ram'$ , **E**;  $C_5Ram-H_4Ram$ , **F**;  $C_3Ram-H_4Ram$ , **G**;  $C_4Ram''-H_2Ram''$ , **H**;  $C_4Ram'''-H_3Ram'''$ , **I**;  $C_4Ram''-H_3Ram''$ , **J**;  $C_4Fuc-H_3Fuc$ ,  $C_2Fuc-H_3Fuc$ ,  $C_4Ram'''-H_3Ram'''$ , **K**;  $C_1Fuc-H_2Fuc$ .

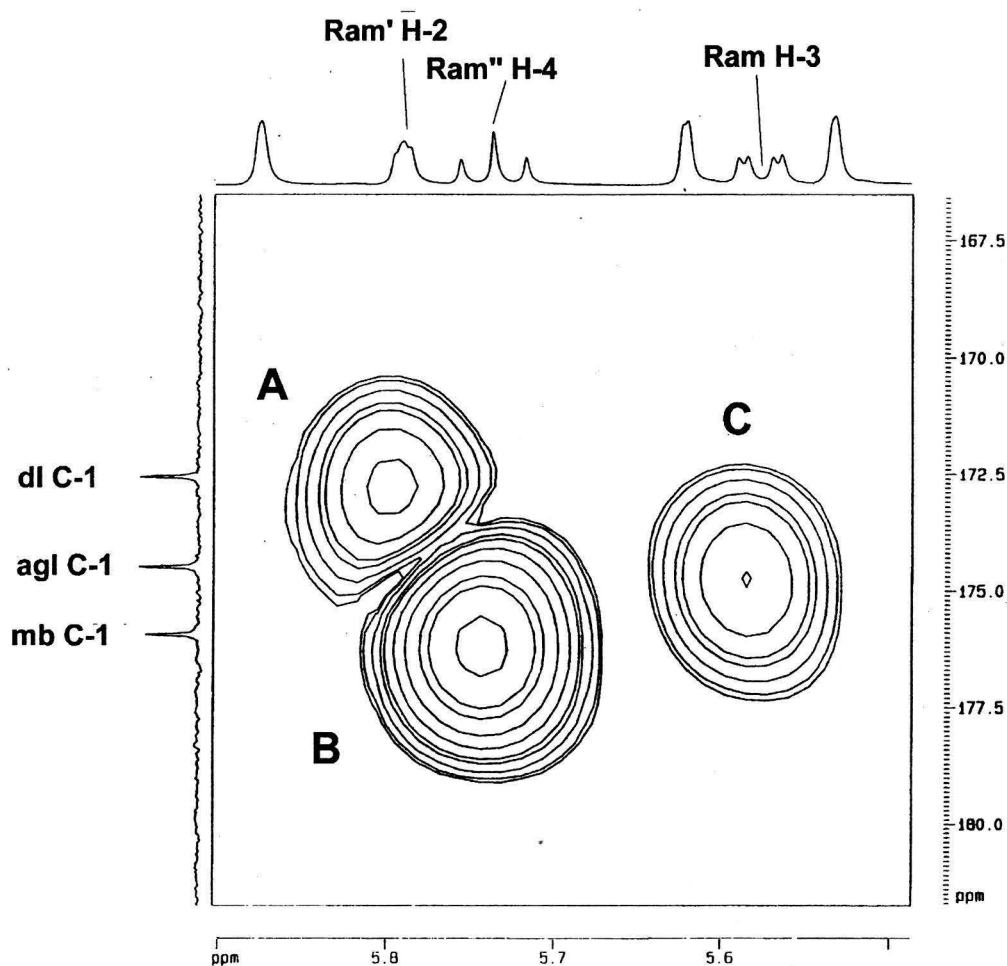


**Figura 51.** Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la **estoloniferina III (1)**. Conectividades; **A**; Ram' C<sub>1</sub>-Ram H<sub>4</sub>, **B**; Ram C<sub>1</sub>-Fuc H<sub>2</sub>, **C**; Ram'' C<sub>1</sub>-Ram' H<sub>4</sub>, **D** Ram''' C<sub>1</sub>-Ram' H<sub>3</sub>. Abreviaciones; Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, Ram''' = ramnosa externa inferior.

Las correlaciones más importantes presentes en los espectros HMBC (figuras 50 y 51) fueron las siguientes: a) la señal del carbono C-2 de la unidad de fucosa con el H-11 de la aglicona; b) la señal del carbono C-1 de la unidad de ramnosa interna superior (Ram) con el H-2 de la fucosa (Fuc); c) la señal del carbono C-1 de la unidad de ramnosa interna inferior (Ram') con el H-4 de la ramnosa interna

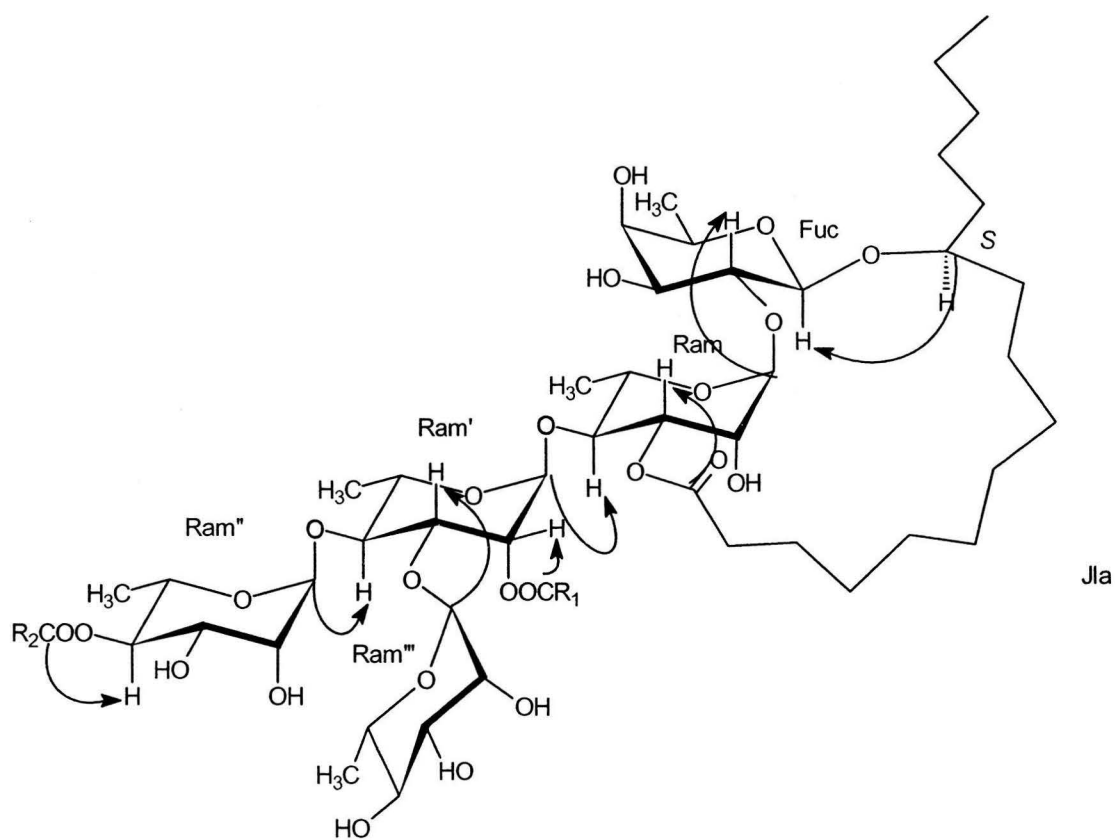
superior (Ram); d) la señal del carbono C-1 de la unidad de ramnosa externa superior (Ram'') con el H-4 de la ramnosa interna inferior (Ram') y e) la señal del carbono C-1 de la unidad de ramnosa externa inferior (Ram''') con el H-3 de la ramnosa interna inferior (Ram').

La figura 52 ilustra la determinación de los sitios de acilación para los residuos de los ácidos (isobutanoilo **ib**, metilbutanoilo **mb**, *n*-hexanoilo **hx**, *n*-decanoilo **dl** y *n*-dodecanoilo **ddl**), así como para la aglicona (**Agl**).



**Figura 52.** Sección del espectro HMBC del compuesto **1** para la determinación de los sitios de acilación. Conectividades : **A**; C<sub>1</sub>dl-H<sub>2</sub>Ram', **B**; C<sub>1</sub>mb-H<sub>4</sub>Ram'', **C**; C<sub>1</sub>Agl-H<sub>3</sub>Ram. Abreviaciones: Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, Agl = aglicona.

Específicamente en el compuesto **1** se encontraron los residuos ácidos de metilbanoilo y *n*-decanoilo (determinado por espectrometría de masas), cuyas señales para los carbonos C-1 ( $\delta$  175.94 y 172.56) presentaron conectividades con las resonancias de los hidrógenos H- 4 ( $\delta$  5.76) de la ramnosa (Ram'') y H-2 ( $\delta$  5.82) de la ramnosa (Ram'). Otra correlación observada para este mismo compuesto es la producida entre el núcleo C-1 de aglicona con el H-3 de la ramnosa interna superior (Ram), correlación que indica la posición de lactonización (figura 53).



**Figura 53.** Correlaciones  $^3J_{C-H}$  observadas en el espectro HMBC del compuesto **1**.

A continuación se presentan los resultados del análisis de los espectros de RMN de los compuestos **1 – 4** :

Los glicolípidos **1 – 4** presentan cuatro unidades de ramnosa y una de fucosa.

La estoloniferina III (**1**) y las pescapreínas I-III (**2 – 4**) están esterificadas por los distintos residuos ácidos encontrados en la posición 2 de la ramnosa interna inferior (**Ram'**) y en la posición 4 de la ramnosa externa superior (**Ram''**) del núcleo oligosacárido. La posición 2 de la ramnosa interna inferior está esterificada con restos ácidos de cadena larga (decanoico y dodecanoico), y la posición 4 de la ramnosa externa superior está esterificada con restos ácidos de cadena corta (restos isobutanoilo y 2-metilbutanoilo).

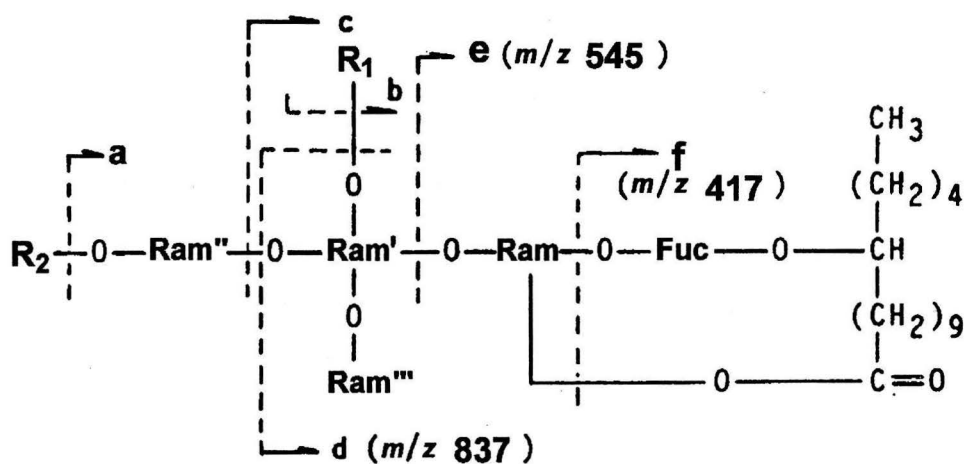
Después de haber verificado la secuencia de glicosidación en los espectros HMBC de los cuatro compuestos se confirmó que todos tienen el mismo núcleo oligosacárido. Este núcleo oligosacárido, el ácido simónico B, también está presente en otras resinas glicosídicas ya reportadas (figuras 59 y 60) como las estoloniferinas I-III y VIII-X de la jalapina de *Ipomoea stolonifera* (Noda *et al.*, 1994 y 1998) y en las simoninas III-V de *Ipomoea batatas* (Noda *et al.*, 1992).

El núcleo oligosacárido de la estoloniferina III (**1**) y las pescapreínas I-III (**2 – 4**) está lactonizado por el residuo ácido jalapinolato en la posición 3 de la ramnosa interna superior (**Ram**) del núcleo oligosacárido.



### 6.7.3 Diferenciación de los glicolípidos mediante espectrometría de masas

Los espectros de masas FAB (modo negativo) de los glicolípidos 1 – 4 permitieron calcular la fórmula molecular para cada uno de ellos (Ver Parte experimental, apartado 5.8.1). En cada uno de los espectros se observaron los picos comunes provocados por las rupturas de los enlaces glicosídicos y que son similares a los generados por las operculinas presentes *Ipomoea operculata* (Kubo et al., 1989). La figura 54, ilustra el patrón de fragmentación característico de esta clase de moléculas.



**Figura 54.** Patrón de fragmentación de los glicolípidos 1-4.

De acuerdo a los espectros de masas FAB (modo negativo), los cuatro compuestos muestran patrones de fragmentación semejantes ya que todos muestran los iones **d**, **e** y **f** de la figura anterior. Sin embargo, para establecer las diferencias entre los cuatro glicolípidos fue útil analizar las diferencias de peso que hay entre sus respectivos iones pseudomoleculares  $[M - 1]$  y los iones **a** y **b**.

Estas diferencias corresponden a las pérdidas de los ácidos que esterifican los núcleos oligosacáridos y que representan los restos de los ácidos grasos que marcan la diferencia entre cada uno de los compuestos.

Comenzando con el fragmento **a** que corresponde a la pérdida de restos metilbutanoilo, isobutanoilo y *n*-hexanoilo, se presentan los siguientes fragmentos:

Compuesto 1: Fragmento de  $m/z$  1137 que corresponde a la pérdida del residuo de 2-metilbutanoilo con una diferencia de 84 una con respecto al ión pseudomolecular  $[M-1]$  de  $m/z$  1221.

Compuesto 2: Fragmento de  $m/z$  1165 que corresponde a la pérdida del residuo de isobutanoilo con una diferencia de 70 daltons con respecto al peso del ión pseudomolecular  $[M-1]$  de  $m/z$  1235 unidades.

Compuesto 3: Fragmento de  $m/z$  1165 que corresponde a la pérdida del residuo de 2-metilbutanoilo con una diferencia de 84 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular  $[M-1]$  de  $m/z$  1249 unidades.

Compuesto 4: Fragmento de  $m/z$  1165 que corresponde a la pérdida del residuo de *n*-hexanoilo con una diferencia de 98 de unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular  $[M-1]$  de  $m/z$  1263 unidades.

En relación con el fragmento **B** que representa las pérdidas de los ácidos grasos de cadena larga *n*-decanóico y *n*-dodecanóico, se registraron los siguientes fragmentos:

Compuesto 1: Fragmento de  $m/z$  1067 que corresponde a la pérdida del residuo de decanoilo con una diferencia de 154 una con respecto al ión pseudomolecular  $[M-1]$  de  $m/z$  1221 unidades.

Compuesto 2: En la pescapreína I (2), el fragmento **d** fue el que se halló en correlación con la pérdida de un residuo de *n*-dodecanoilo, pues no se registró ningún fragmento **b** en el espectro de este compuesto (figura 56). El fragmento **d** equivale a  $m/z$  837  $[M - H - C_{12}H_{22}O - C_6H_{10}O_4 - C_4H_6O]^-$  que corresponde a una diferencia de 398 unidades con respecto al ión pseudomolecular  $[M - 1]$  de  $m/z$  1235 unidades.

Compuesto 3: Fragmento de  $m/z$  1067 que corresponde a la pérdida del residuo de dodecanoilo con una diferencia de 182 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular  $[M - 1]$  de  $m/z$  1249 unidades.

Compuesto 4: Fragmento de  $m/z$  1081 que corresponde a la pérdida del residuo de dodecanoilo con una diferencia de 182 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular  $[M - 1]$  de  $m/z$  1263 unidades.

Toda la información espectrométrica explicada puede verificarse en los espectros de masas generados por los compuestos **1 – 4** ilustrados en las figuras 55 a 58.

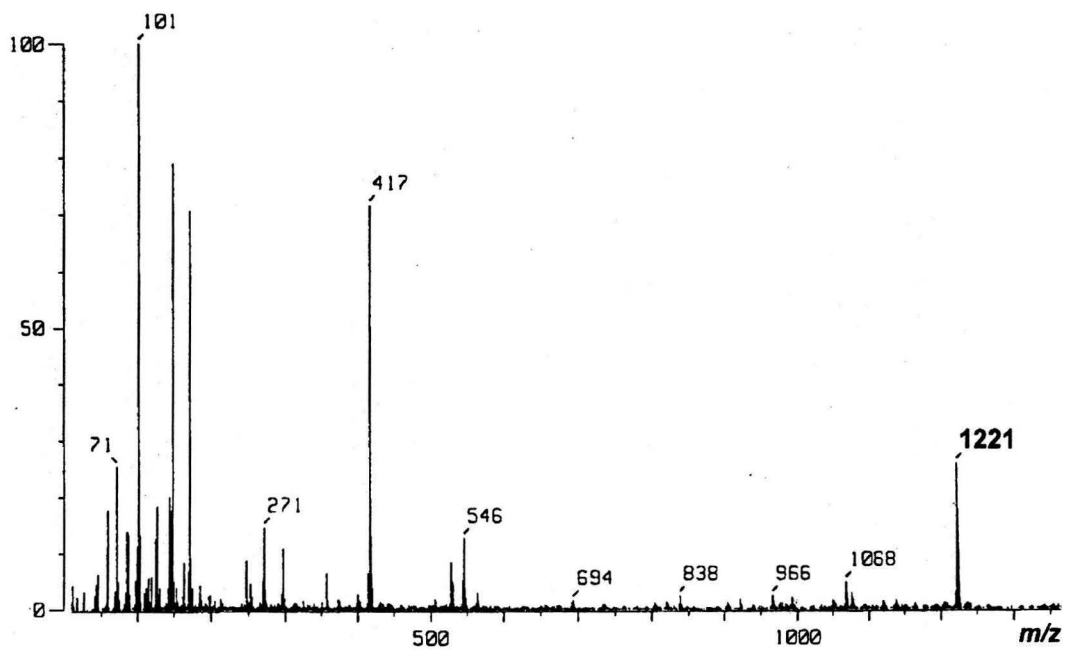


Figura 55. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la estoloniferina III (1).

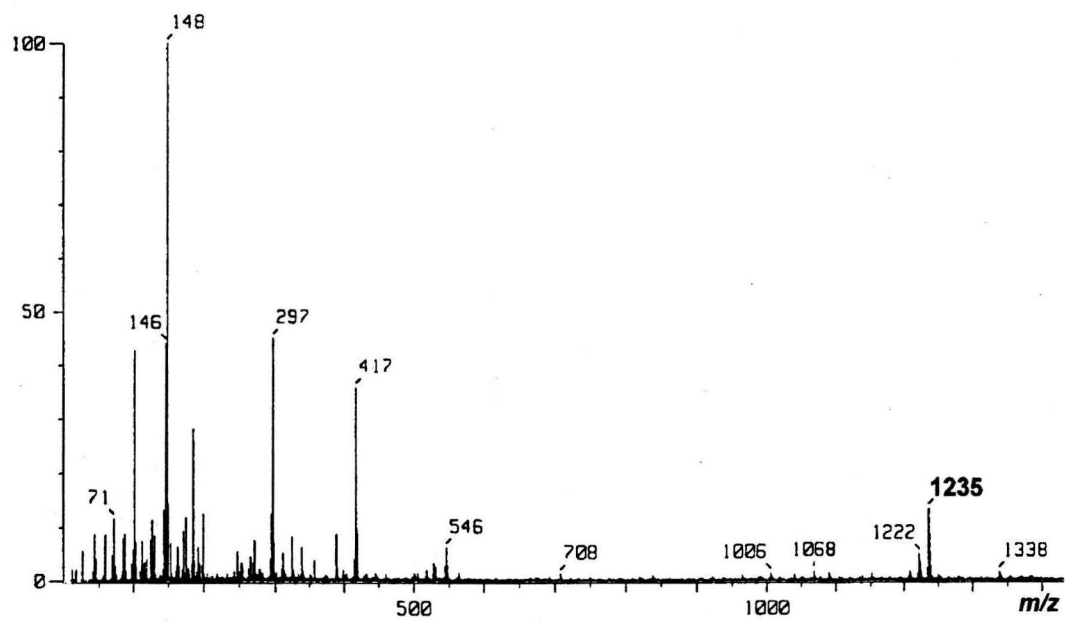


Figura 56. Espectros de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína I (2).

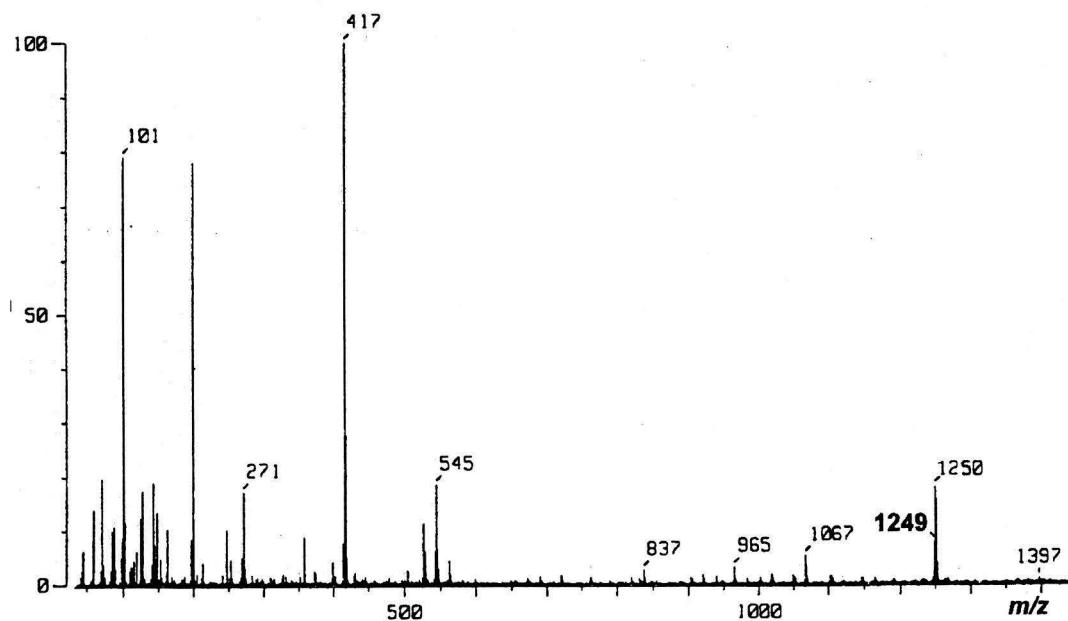


Figura 57. Espectros de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína II (3).

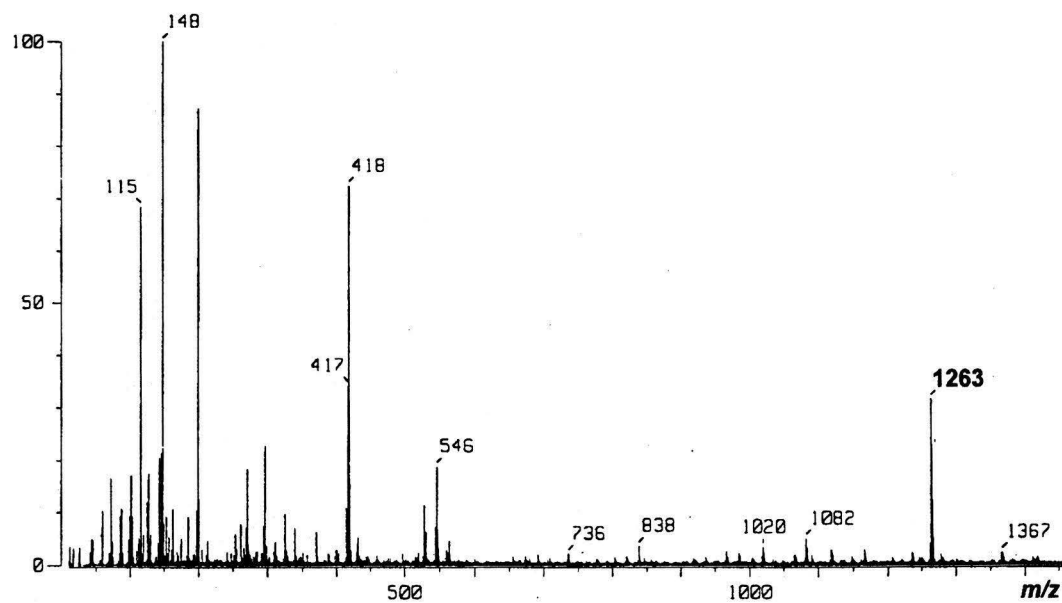


Figura 58. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína III (4).

De acuerdo con toda la información espectroscópica y espectrométrica analizada anteriormente se propusieron las siguientes estructuras para los glicolípidos **1 – 4**:

**Glicolípido 1:** éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – (2S) – 2 – metilbutiril –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-decanoil) –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4) – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→2) –  $\beta$  – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

**Glicolípido 2:** éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – isobutanoil –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4) – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→2) –  $\beta$  – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

**Glicolípido 3:** éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – (2S) – 2 – metilbutiril –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4) – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→2) –  $\beta$  – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

**Glicolípido 4:** éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – *n* – hexanoil –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→4) – O –  $\alpha$  – L – ramnopiranosil – (1→2) –  $\beta$  – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

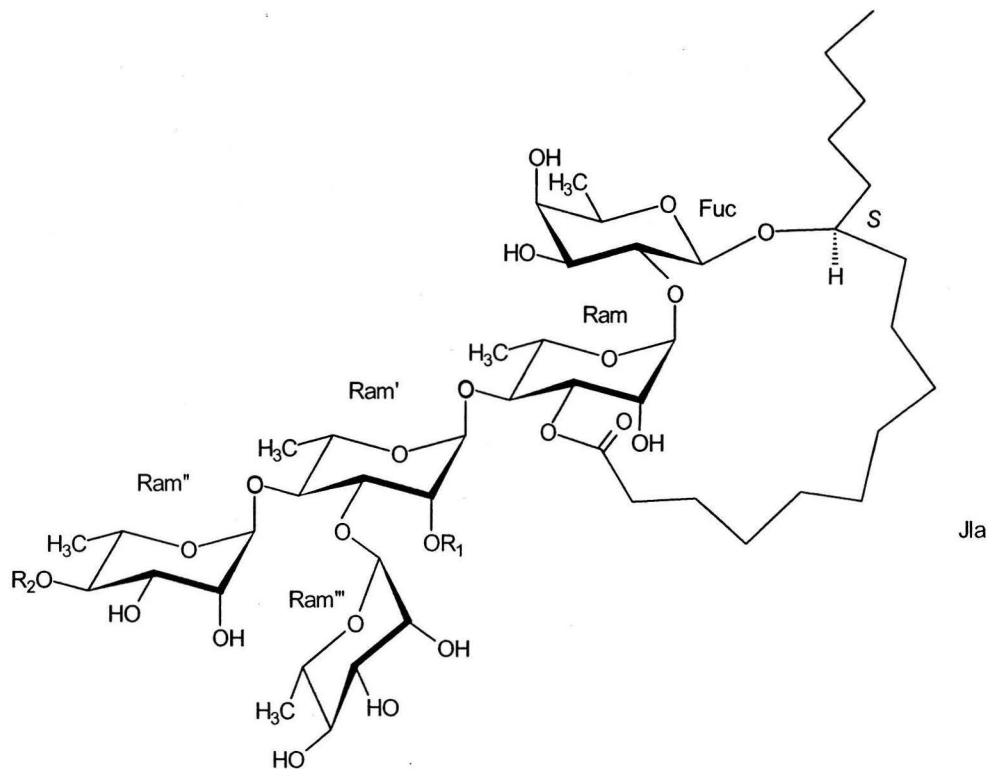


Las estoloniferinas I a III están lactonizadas en la misma posición que los compuestos **1 – 4**, como se mencionó previamente, el compuesto **1** corresponde a la estoloniferina III (figura 60), el compuesto **2** está acilado con ácido dodecanoico, mientras que la estoloniferina II con ácido decanoico (figuras 60 y 61). Como se ilustra en la figura 61, el compuesto **3** es un diasteroisómero de la estoloniferina X.

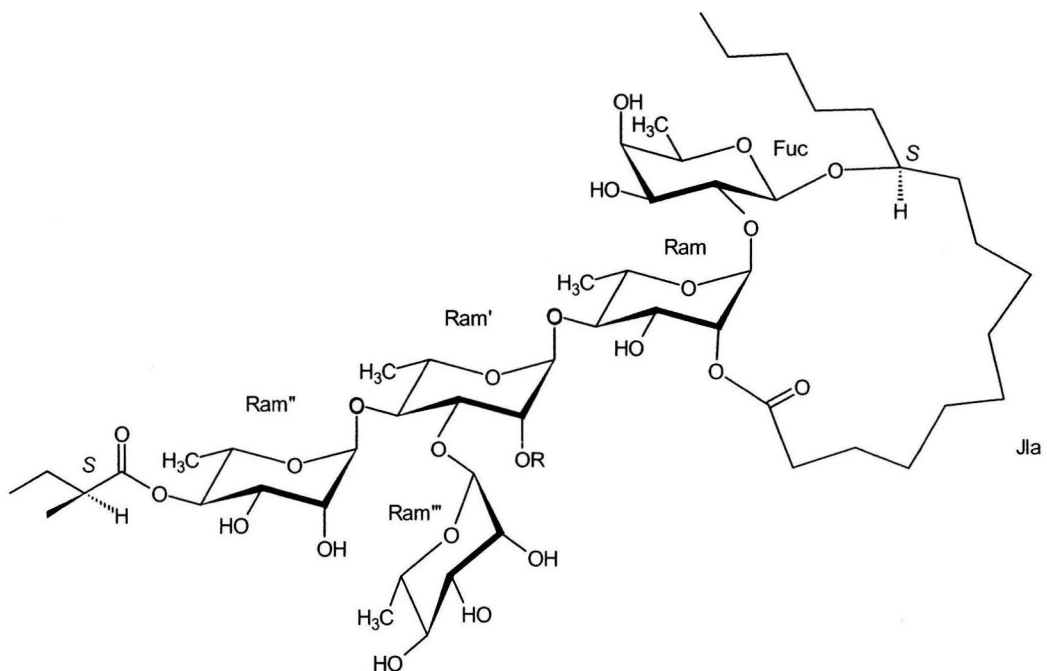
Esta última está formando un éster macrocíclico en la posición 2 de la unidad sacárida de ramnosa correspondiente (figura 60), mientras que el compuesto **3** lo hace en la posición 3 de esta misma unidad. Con respecto al compuesto **4**, ningún pentasacárido compuesto por el ácido simónico B se ha descrito en forma de éster del ácido hexanóico.

En la figura 61 se ilustran las estructuras moleculares propuestas para los compuestos **2 – 4**. Los cuatro glicolípidos obtenidos de las subfracciones **B, D, G, y F** de la FV hexánica se asignaron, de acuerdo a los resultados anteriores, con los nombres estoloniferina III (**1**) (compuesto asignado con este nombre por Noda y sus colaboradores en 1994) y pescareínas I a III (**2 – 4**) respectivamente.



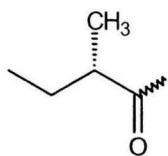
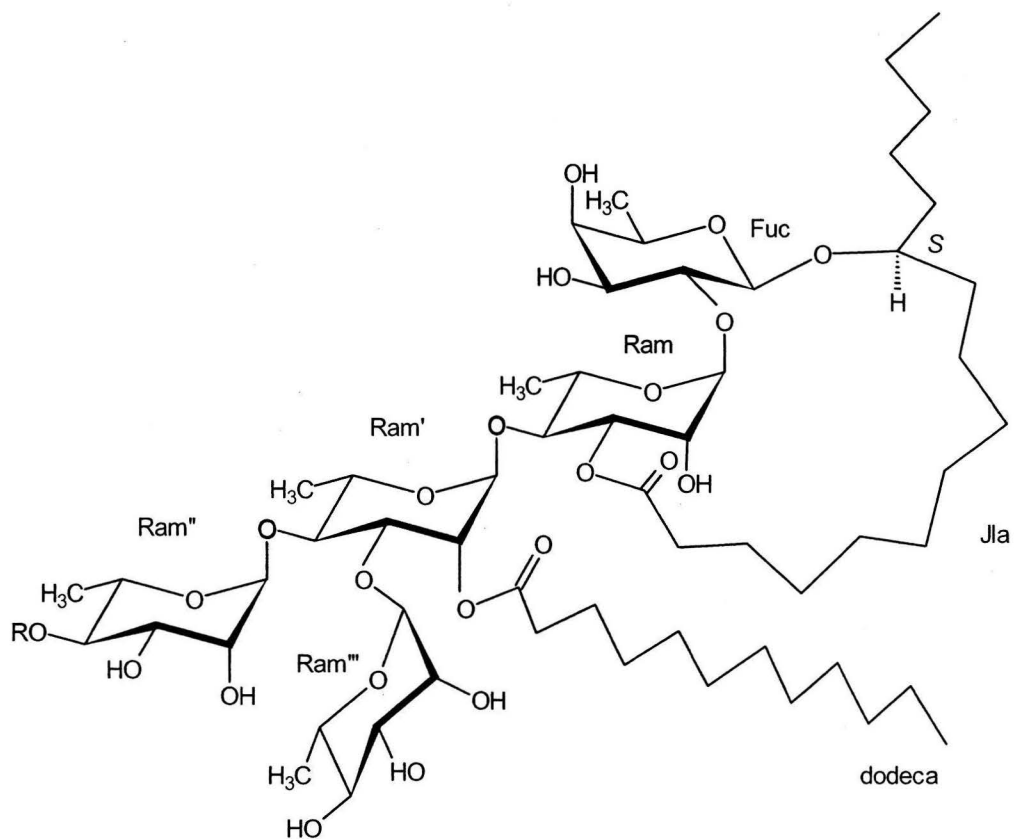


Estoloniferina I :  $R_1 = R_2 = 2(S)\text{-2-metilbutanoilo}$   
 Estoloniferina II :  $R_1 = n\text{-decanoilo}$ ,  $R_2 = n\text{-isobutanoilo}$   
 Estoloniferina III :  $R_1 = n\text{-decanoilo}$ ,  $R_2 = 2(S)\text{-2-metilbutanoilo}$

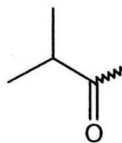


Estoloniferina VIII :  $R = n\text{-octanoilo}$   
 Estoloniferina IX :  $R = n\text{-decanoilo}$   
 Estoloniferina X :  $R = n\text{-dodecanoilo}$

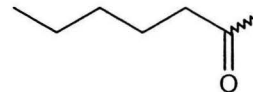
**Figura 60.** Estructura de las estoloniferinas compuestas por el ácido simónico B.



mb



ib



hx

mb = 2-metilbutanoilo, ib = isobutanoilo y hx = *n*-hexanoilo

Pescapreína

R

I

ib

II

mb

III

hx

Figura 61. Estructura de las pescapreínas I a III (2- 4).

## VII. CONCLUSIONES

- 7.1 Usando técnicas en la CLAP se obtuvieron tres glicolípidos novedosos a partir de la jalapina de *Ipomoea pes-caprae* con el mismo núcleo oligosacárido, las pescapreínas I (2) – III (4) junto con la previamente descrita estoloniferina III (1).
- 7.2 Las pescapreínas I (2) – III (4) presentaron como núcleo oligosacárido al 11-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 4)]  $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxhexadecanoico, que es el mismo núcleo oligosacárido presente en la jalapina de la planta *Ipomoea stolonifera* e *Ipomoea batatas* y conocido como el ácido simónico B (Noda *et al.*, 1992; 1994).
- 7.3 Los cuatro glicolípidos mostraron cinco residuos ácidos esterificando el núcleo oligosacárido. Estos residuos ácidos fueron el metilbutanoilo, *n*-hexanoilo, isobutanoilo, *n*-decanoilo y *n*-dodecanoilo.
- 7.4 El sitio de lactonización del núcleo oligosacárido con la aglicona en las pescapreínas fue en la posición C-3 de la unidad de ramnosa.

## VIII. BIBLIOGRAFÍA

- **Argueta, A.** (1994). Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México.
- **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, 292 pp.
- **Bah, M. Y Pereda-Miranda, R.** (1996) Detailed FAB-Mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individual oligosacharides from the resins of *Ipomoea tricolor*. **Tethraedron** 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.
- **Contreras C.M., Chacón, L. Y Enríquez, R.G.** (1996) Anticonvulsant properties of *Ipomoea stans*. **Phytomedicine** 3, 41-44.
- **De Souza, M. M., Madeira, A., Berti, C., Krogh, R., Yunes, R. A., y Cechinel-Filho, V.** (2000). Anticonceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., **Journal of Ethnopharmacology** 69, 85-90.
- **Díaz, J. L.** (1976) Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas I. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A.C.IME PLAM. México.
- **Díaz, J. L.** (1976) Usos de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas II. Instituto Mexicano Para el Estudio de las Plantas Medicinales A.C. IME PLAM. México.
- **FONT QUER.** (1973) Diccionario de Botánica. Editorial Labor. España.
- **Hernández, B.** (2000) 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 doctoral. Facultad de Química, UNAM.
- **Kitagawa, I., Ohashi, K., InBaek, N., Sakagami, M., Yoshikawa, M. y Shibuya, H.** (1997). Indonesian Medinal Plants. XIX. Chemical Structures of four Additional Resin-Glycosides, Mammosides A, B, H<sub>1</sub> and H<sub>2</sub>, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, 45, 786-794.

- **Kubo, I. y Nakatsu, T.** (1990). Recent examples of preparative-scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. **LC-CG**, 8, 933-939.
- **Lara, F. y Márquez, C.** (1996) Plantas Medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México.
- **Lara, F. y Márquez, C., Esquivel, B. Y Mata, R.** (1999). Plantas Medicinales de México II. UNAM. México.
- **Mannich, C. Y Schumann, P.** (1938) Jalap Resins and its principal constituent, convolvulin. **Archiv der Pharmazie** 276, 211-226.
- **Matuda, E.** (1963) El género *Ipomoea* en México. **An. Inst. Biol. México**. Vol 34:85-145.
- **Matuda, E.** (1964) El género *Ipomoea* en México. **An. Inst. Biol. México**. Vol 35:85-76.
- **Matuda, E.** (1965) El género *Ipomoea* en México. **An. Inst. Biol. México**. Vol 36:85-106.
- **Martínez, M.** (1987). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- **Martínez, M.** (1989) Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas. México.
- **McDonald, A.** (1991) Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. **Anales Inst. Bio. Univ. Nac. Autón. México. Sec. Bot.** 62 (1):65-82.
- **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., 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, CR.** (1994b). Resin Glycosides XXI. Tuguajalpíns 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., Takahashi, N., Miyara, K. y Yang, CR.** (1998). Stoloniferins VII-XII, Resin Glycosides, from *Ipomoea stolonifera*. **Phytochemistry**, 48, 837-841.

- **Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K. y Kawasaki, T.** (1989a). Operculin I and II, new ether soluble resin glycosides ("Jalapin") with fatty acid ester groups from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea operculata*). **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., 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, 1892-2897).
- **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 rhizoma Jalapae Braziliensis (Root 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, 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., 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 *Quemoclit x multifida*. **Chem. Pharm. Bull.**, 45, 1955-1960.
- **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.

- **Pereda-Miranda, R. y Hernández-Carlos, B.** (2002) HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. **Tetrahedron**, 58, 3145-3154.
- **Pereda-Miranda, R. y Bah, M.** (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 3, 1-20.
- **Reynolds, W. F. y Enriquez, R. G.** (1995). Isolation and characterization of cytotoxic and antimicrobial glycosides from *Ipomoea stans*. **Journal of Natural Products**, 58, 1730-1734.
- **Srivastava, R. y Kassam, S.** (1991). Structure of pescaproside E, a fatty acid glycoside from *Ipomoea pes-caprae*. **Carbohydrate Research**, 212, 169-176.
- **Trease, G. E. y Evans, W. C.** (2002). Pharmacognosy. 15<sup>th</sup> ed. WB Saunders, USA.
- **Wagner, H. Y Schwarting, G.** (1997), Struktur der microphyllinsäure aus dem harz von *Convolvulus Microphyllus*. **Phytochemistry**, 16, 715-717.