

00550



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO

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

**“CARACTERIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS LIPOPENTASACÁRIDOS
MAYORITARIOS DE IPOMOEA MURUCOIDES”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Q. LILIA YANETH CHÉRIGO RODRÍGUEZ



TUTOR: Dr. Rogelio Pereda Miranda AÑO: 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Biblioteca Central

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM



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.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. Leovigildo Quijano
Vocal:	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario:	Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib
Primer suplente:	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Segundo suplente:	Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123
Facultad de Química
Universidad Nacional Autónoma de México

Asesor: Dr. Rogelio Pereda Miranda

Autorizo a la Dirección General de Informes de la
UNAM a publicar los datos electrónicos de este el
contenido de este trabajo académico.

NOMBRE: Lilia Y. Chérigo

FECHA: 02/08/04

FIRMA: Lilia Y. Chérigo

AGRADECIMIENTOS

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

- ❖ Esta tesis corresponde a los estudios realizados con una beca otorgada por la Secretaría de Relaciones Exteriores del Gobierno de México (Unidad de Asuntos Culturales de Intercambio Académico).
- ❖ A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN 200902-2; IX 234504-1) por el financiamiento parcial de esta investigación.
- ❖ En la determinación de los espectros de RMN: al M. en C. Atilano Gutiérrez (Universidad Autónoma Metropolitana), al M. en C. Oscar Yañez y a la M. en C. Rosa Isela del Villar (Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM).
- ❖ A la M. en C. Georgina Duarte (USAI, Facultad de Química) por el registro de los espectros de masas.
- ❖ A la Q.F.B. Marisela Gutiérrez (USAI, Facultad de Química) por el registro de las rotaciones ópticas.
- ❖ A los miembros del jurado por sus comentarios y observaciones que permitieron la corrección de este manuscrito de tesis.
- ❖ Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por todo el tiempo dedicado a mi formación académica, por su constante interés y apoyo brindado en la realización de esta investigación.

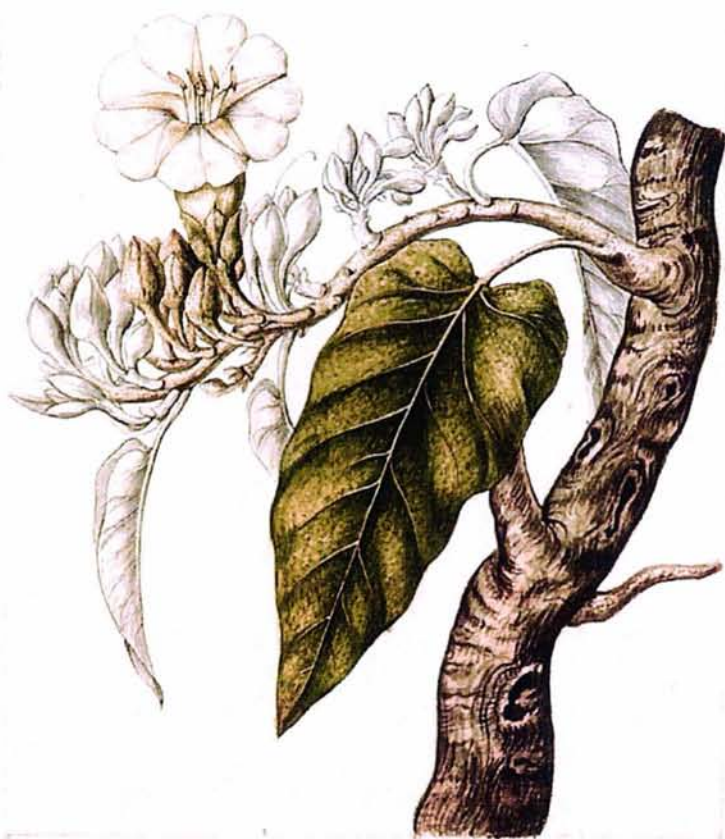
RESUMEN

La presente investigación contempló la separación, purificación y caracterización estructural de los glicolípidos mayoritarios presentes en la resina glicosídica de las flores de la especie vegetal *Ipomoea murucoides*.

La primera fase de la investigación consistió en la estandarización de las condiciones en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia para lograr la máxima resolución de los glicolípidos individuales de la especie en estudio. La purificación de cada uno de ellos se logró a través del empleo de una columna de fase reversa (C-18), utilizando mezclas de acetonitrilo-agua y acetonitrilo-metanol en diferentes proporciones como sistemas de elución, y un detector de índice de refracción. El empleo de esas condiciones permitió la separación y la purificación de cuatro glicolípidos, de los cuales tres corresponden a estructuras novedosas en la literatura y que se denominaron como las murucoidinas I-III.

La segunda etapa contempló la elucidación estructural de los constituyentes purificados, utilizando métodos químicos, espectrométricos (EM-FAB) y espectroscópicos (RMN) de alta resolución. Con el empleo de métodos de degradación química (saponificación) de la fracción mayoritaria y la comparación de los datos espectroscópicos registrados para los productos de reacción con los descritos en la literatura se logró la identificación estructural de los dos núcleos pentasacáridos constitutivos de las resinas glicosídicas de *Ipomoea murucoides* como el ácido simónico B y el ácido operculínico A.

Las estructuras moleculares de los glicolípidos individuales corresponden a diastereoisómeros, diferenciándose en la posición de lactonización. Cada uno de los glicolípidos naturales de esta serie presentó la esterificación por el ácido 2-(*S*)-metilbutírico en las posiciones C-2 y C-4 de las ramnosas Ram' y Ram'', respectivamente. La naturaleza de los glicolípidos, el sitio y la secuencia de glicosilación, así como la localización de los grupos acilantes sobre la cadena oligosacárida se determinó a través del empleo de dos técnicas de análisis estructural de alta resolución: la espectrometría de masas de bombardeo por átomos acelerados (EM-FAB) y la espectroscopia en la resonancia magnética nuclear de protones (^1H -RMN) y de carbono-13 (^{13}C -RMN).



Convolvulus Quahutzehual. Sp. N.

Ipomoea in *Bot. Mex.* 1847. p. 15. t. 1. f. 1.

[199]

La ilustración corresponde a una especie arbórea del género *Ipomoea* identificada con el nombre de *Convolvulus quahutzehuatl* y elaborada durante La Real Expedición Científica a Nueva España (siglo XVIII) comandada por los naturalistas José Mariano Mociño de origen mexicano y el español Martín Sessé. Se observa una segunda anotación identificándola como *Ipomoea multiflora*. Sin embargo, el nombre vernáculo “*Quauzehuatl*” (Quauh = árbol; zahuatl, çahuatl o çauatl = roña, tiña) utilizado para su clasificación botánica corresponde a la variante del náhuatl contemporáneo de la palabra *cazahuátic*, que en el estado de Morelos derivó en cazahuate para nombrar a esta planta. Esto permite su identificación inequívoca como *Ipomoea murucoides* Roem. & Schult. [Véase R. McVaugh. Botanical Results of the Sessé & Mociño Expedition (1787–1803). Vol. VII. A Guide to Relevant Scientific Names of Plants. Hunt Institute for Botanical Documentation. Pittsburg, Carnegie Mellon University, 2000: pp. 193–196. Turner Collection no. 1065].

INDICE

	Página
Lista de Esquemas	<i>IV</i>
Lista de Cuadros	<i>IV</i>
Lista de Figuras	<i>V</i>
Lista de Espectros	<i>IX</i>
Lista de Abreviaturas	<i>X</i>
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	6
2.1 Características de la familia Convolvulaceae	6
2.2 El género <i>Ipomoea</i>	7
2.3 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de <i>Ipomoea murucoides</i>	8
2.4 Resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae	11
2.4.1 Oligopentasacáridos de las resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae	12
2.4.1.1 Acido microfilico	12
2.4.1.2 Acidos operculínicos A y B	13
2.4.1.2.1 Operculinas	14
2.4.1.2.2 Estoloniferinas	15
2.4.1.2.3 Quamoclinas	17
2.4.1.2.4 Tuguajalapinas	18
2.4.1.2.5 Mamósidos	20
2.4.1.3 Acido merremósido j	21
2.4.1.3.1 Merremósidos	21
2.4.1.4 Acidos multifidínicos A y B	23
2.4.1.4.1 Multifidinas	23
2.4.1.5 Acido woodrosínico A	24
2.4.1.5.1 Woodrosinas	25
2.4.1.6 Ácido farbítico C	26

INDICE (continuación)

	Pág.
2.4.1.7 Acido simónico A y B	27
2.4.1.7.1 Simoninas	28
2.4.1.7.2 Estoloniferinas	29
III. JUSTIFICACION	31
IV. OBJETIVOS	32
4.1 Objetivos generales	32
4.2 Objetivos específicos	32
V. PARTE EXPERIMENTAL	33
5.1 Determinación de las constantes físicas	33
5.2 Métodos cromatográficos	33
5.3 Material vegetal	34
5.3.1 Obtención de las resinas glicosídicas	34
5.4 Preparación de derivados a partir de la jalapina	35
5.4.1 Hidrólisis alcalina	35
5.4.2 Reacción de acetilación	37
5.4.3 Reacción de alquilación con diazometano	37
5.4.3.1 Generación del reactivo	37
5.4.3.2 Reacción de alquilación	37
5.5 Separación de los ácidos glicosídicos peracetilados-metilados mediante CLAE	38
5.5.1 Purificación de AG-1 y AG-2	39
5.6 Separación y purificación de los glicolípidos de la jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i>	40
5.6.1 Obtención de la murucoidina I (1)	41
5.6.2 Obtención de la murucoidina II (2)	42
5.6.3 Obtención de la murucoidina III (3) y estoloniferina I (4)	44
5.7 Preparación de derivados de la jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i>	46

INDICE (continuación)

	Pág.
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
6.1 Hidrólisis alcalina. Determinación de los ácidos grasos	49
6.2 Separación de los ácidos glicosídicos acetilados–metilados mayoritarios mediante CLAE	51
6.2.1 Caracterización de los ácidos AG-1 y AG-2	53
6.3 Análisis mediante CLAE de la fracción primaria XX de la jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i>	58
6.4 Separación y purificación de los glicolípidos individuales de los glicolípidos de la fracción primaria XX de la jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i>	59
6.5 Caracterización de los glicolípidos de la jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i>	61
6.5.1 Asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C de murucoidina I (1) y estoloniferina I (4)	61
6.5.2 Asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C de murucoidina II (2) y III (3)	65
6.5.3 Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación para la murucoidina I y estoloniferina I	68
6.5.4 Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación para la murucoidina II (2) y III (3)	71
6.6 Análisis de los derivados peracetilados de las subfracciones H y J	76
6.7 Diferenciación de los glicolípidos mediante espectrometría de masas	77
6.7.1 Espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo de la murucoidina I (1) y estoloniferina I (4)	79
6.7.2 Espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo de la murucoidina II (2) y murucoidina III (3)	80
VII. CONCLUSIÓN	83
VIII. BIBLIOGRAFÍA	84
IX. APÉNDICE (Espectros)	90

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema	Contenido	Pág.
1	Procedimientos experimentales utilizados en el análisis químico de las resinas glicosídicas presentes en las flores de <i>Ipomoea murucoides</i>	36

LISTA DE CUADROS

Cuadro	Contenido	Pág.
1	Análisis mediante CG-EM de la fase éterea obtenida de la hidrólisis Alcalina de la fracción primaria XX de <i>Ipomoea murucoides</i>	51
2	Desplazamientos químicos RMN ^1H y ^{13}C para las señales anómericas y los grupos metilos de los monosacáridos presentes en los ácidos glicosídicos acetilados-metilados mayoritarios de la porción jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i>	54
3	Desplazamientos químicos en la RMN ^1H de las murucoidinas I-III (1-3) y estoloniferina I (4)	74
4	Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C de las murucoidinas I-III (1-3) y estoloniferina I (4)	75

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Morfología general de las Convolvuláceas.	6
2	Distribución del género <i>Ipomoea</i> en México.	7
3	<i>Ipomoea murucoides</i>	9
4	Ilustración del cazahuate en el Códice Badiano (F.9.r.)	11
5	Estructura del ácido microfilico constituyente mayoritario de <i>Convolvulus microphyllus</i> .	12
6	Estructuras de los ácidos Operculínico A y B de <i>Ipomoea operculata</i> .	13
7	Estructuras de las operculinas con el núcleo del ácido operculínico A.	14
8	Estructuras de las operculinas con el núcleo del ácido operculínico B.	15
9	Estructuras de las estoloniferinas IV-VII, constituyentes de la porción jalapina de <i>Ipomoea stolonifera</i> con el núcleo del ácido operculínico A.	16
10	Estructura de las quamoclinas I, III y IV constituyentes de la porción jalapina de <i>Quamoclit pennata</i> .	17
11	Estructura de la quamoclina II, constituyente de <i>Quamoclit pennata</i> .	18
12	Estructuras de las tuguajalapinas I-X, constituyentes de la resina glicosídica de <i>Merremia hungaiensis</i>	19
13	Estructuras de los mamósidos H ₁ y H ₂ , constituyentes de la porción jalapina de <i>Merremia mammosa</i> con el núcleo del ácido operculínico A.	20
14	Estructura del ácido merremósido j, constituyente de <i>Merremia mammosa</i> .	21

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Contenido	Pág.
15	Estructuras de los merremósidos f, g, h ₁ y h ₂ , constituyentes de la jalapina de <i>Merremia mammosa</i> .	22
16	Estructuras de los ácidos multifidínicos A y B, constituyentes de las resinas de <i>Quamoclit multifida</i> .	23
17	Estructuras de las multifidinas I y II, constituyentes de la porción jalapina de <i>Quamoclit multifida</i> con los núcleos de los ácidos multifidínicos A y B.	24
18	Estructura del ácido woodrosínico A constituyentes de las resinas de <i>Ipomoea tuberosa</i> .	24
19	Estructuras de las woodrosina I y II, constituyentes de la convolvulina de <i>Ipomoea tuberosa</i> .	26
20	Estructura del ácido farbítico C constituyentes de las resinas de <i>Ipomoea tuberosa</i> .	27
21	Estructuras de los ácidos simónico A y B constituyentes de las resinas de <i>Ipomoea batatas</i> .	28
22	Estructuras de las simoninas II- V, constituyentes de las resinas de <i>Ipomoea batatas</i> .	29
23	Estructuras de las estoloniferinas I-III y VIII-X, constituyentes de la jalapina de <i>Ipomoea stolonifera</i> .	30
24	Cromatograma en capa fina de los eluatos obtenidos durante el fraccionamiento primario de la jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i> .	35
25	Cromatograma de gases obtenido para la fase etérea de la hidrólisis alcalina de la fracción primaria XX de la jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i> .	49

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Contenido	Pág.
26	Espectros de masas para los ácidos grasos metilbutarilo, octanóico y decanóico de la fase etérea de la hidrólisis alcalina.	50
27	Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo por el producto XX-HAM .	52
28	Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE del derivado peracetilado-metilado AG-1 .	53
29	Sección del espectro HMBC del ácido glicosídico AG-1 .	56
30	Sección del espectro HMBC del ácido glicosídico AG-2 .	56
31	Estructuras de los ácidos glicosídicos acetilados-metilados de la fracción primaria XX de la porción jalapina de <i>Ipomoea murucoides</i> .	57
32	Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo para la fracción primaria XX .	59
33	Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo para la subfracción B.	60
34	Espectros de RMN ^1H de los compuestos murucoidina I (1) y estoloniferina I (4).	63
35	Sección de la porción oligosacárida del espectro COSY de la murucoidina I.	64
36	Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la murucoidina I.	65
37	Espectros de RMN ^1H de los compuestos murucoidina II (2) y murucoidina III (3).	67
38	Ilustración de los dobletes entre 1.4-1.6 ppm para la murucoidina III.	68

LISTA DE FIGURAS (Continuación)

Figura	Contenido	Pág.
39	Sección del espectro HMBC de la murucoidina I donde se ilustran las conectividades entre los carbonos del carboxilo de cada uno de los ésteres con los hidrógenos de los metilenos.	69
40	Sección del espectro HMBC de la murucoidina I donde se ilustran las conectividades entre los carbonos del carboxilo de cada uno de los ésteres (jal y mba) con las señales protónicas geminales a estos grupos.	70
41	Sección de la región oligosacárida de la murucoidina I (1) del espectro HMBC.	71
42	Sección de la región oligosacárida de la murucoidina II (2) del espectro HMBC donde se ilustran las conectividades entre los carbonos del carboxilo.	72
43	Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la murucoidina II (2) donde se ilustran las conectividades entre los protones anómericos.	73
44	Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida del derivado peracetilado J-Ac .	77
45	Patrón de fragmentación de los glicolípidos 1-4 .	78
46	Espectro de masas modo FAB negativo para la estoloniferina I (4).	79
47	Espectro de masas modo FAB negativo para la murucoidina II (2).	80
48	Estructuras moleculares de los cuatro glicolípidos mayoritarios aislados de la jalapina de la fracción primaria XX de <i>Ipomoea murucoides</i> .	82

LISTA DE ESPECTROS

		Pág.
1	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto AG-1 .	91
1a	Sección de protones anoméricos del compuesto AG-1 .	92
2	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto AG-1 .	93
2a	Sección de carbonos anoméricos del compuesto AG-1 .	94
3	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto AG-2 .	95
3a	Sección de protones anoméricos del compuesto AG-2 .	96
4	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto AG-2 .	97
4a	Sección de carbonos anoméricos del compuesto AG-2 .	98
5	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto murucoidina I.	99
6	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto murucoidina II.	100
7	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto murucoidina III.	101
8	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto estoloniferina I.	102
9	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto H-Ac .	103
10	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto H-Ac .	104
11	Espectro de RMN- ¹ H del compuesto J-Ac .	105
12	Espectro de RMN- ¹³ C del compuesto J-Ac .	102
13	Espectro bidimensional TOCSY del compuesto murucoidina II.	107
14	Espectro bidimensional TOCSY del compuesto murucoidina III.	108

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
α	Rotación observada en el polarímetro
cm	Centímetro
J	Constante de acoplamiento
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CHCl ₃	Cloroformo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
COSY	Correlación homonuclear
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
eV	Electron volts
°C	Grados centígrados
FAB ⁻	Bombardeo rápido de átomos modalidad negativa
g	Gramo
Hz	Hertz
Int. Rel.	Intensidad relativa
[M-1] ⁺	Ion pseudomolecular
Kg	Kilogramo
L	Litro
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
min	Minutos

LISTA DE ABREVIATURAS (continuación)

Abreviatura	Significado
mg	Miligramos
mL	Mililitros
μ L	Microlitros
μ m	Micrometro
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
<i>m/z</i>	Relación masa-carga
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
sa	Singlete ancho
t	Triplete

I. INTRODUCCION

Existen evidencias de orden arqueológico, mediante estudios especializados en la investigación de polen fósil y coprolitos (heces petrificadas), de que los primeros habitantes del actual México hace miles de años ya conocían, seleccionaban y utilizaban plantas curativas.¹

En México, el conocimiento y uso de las plantas medicinales proviene directamente de la época prehispánica, de más de quinientos años de antigüedad. La flora medicinal del centro y sur de México, donde surgieron las culturas mesoamericanas más importantes, es ampliamente conocida; en dichas regiones abundan las fuentes autóctonas para el conocimiento de su botánica medicinal: pictografías, códices, libros sagrados, pinturas murales, esculturas y figurillas de cerámica, así como una rica tradición oral de los diferentes grupos étnicos aún existentes.

El registro escrito más antiguo sobre plantas medicinales, mal llamado “*Códice Badiano*”, es el *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* (Opúsculo acerca de las hierbas medicinales de los Indios) que fue dictado en Náhuatl en 1552 por el médico indígena, Martín de la Cruz de Tlatelolco, traducido y escrito al latín, por otro indígena xochimilca, Juan Badiano. Esta obra contiene 185 ilustraciones de las plantas a color y menciona el uso de 270 especies vegetales.² De igual forma en el siglo XVI, Fray Bernardino de Sahagún, escribió su obra “*Historia General de las Cosas de la Nueva España*”, también conocida como el *Códice Florentino*; el texto fue escrito en español y náhuatl y contiene información sobre aproximadamente 250 plantas medicinales, acompañado por numerosas ilustraciones delineadas y coloridas.

Algunos años después, *La Historia Natural de la Nueva España* fue escrita por Francisco Hernández, el protomédico del rey Felipe II de España, quien fue comisionado para llevar a cabo una expedición que diera cuenta de las riquezas naturales de la Nueva España y su extenso trabajo contiene 3,076 plantas medicinales.³

Las fuentes citadas, entre otras representan una rica información etnomédica prehispánica para la preselección efectiva de plantas medicinales en la búsqueda de fuentes potenciales de nuevos medicamentos. Una de las familias que se encuentra mejor representada por sus propiedades medicinales, purgativas y alucinógenas (de uso en los rituales religiosos) es la de las convolvuláceas donde los géneros más significativos son *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Exogonium* y *Operculina*.³

Los remedios purgativos (*tlanoquiloni*) conocidos de los aztecas prehispánicos consistían principalmente de extractos de tubérculos conocidos como “*cacomotli tlanoquiloni*” (camotli = raíz comestible, “camote”) todas estas raíces fueron identificadas como especies del género *Ipomoea*, que incluía entre otras a *Ipomoea aquatica*, *Ipomoea batatoides*, *Ipomoea emetica*, *Ipomoea quinquefolia* e *Ipomoea stans*.³

Entre las ilustraciones del *Códice Badiano* se destaca la representación de un miembro del complejo medicinal “*cacomotli tlanoquiloni*”, un tubérculo grande con flores rojas clasificada como una especie del género *Ipomoea*, donde se describe sus propiedades purgativas del abdomen.⁴



Ilustración de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) ingrediente purgativo de la hierba medicinal prehispánica conocida como *Velicpahtli* (uelic = sabroso, pahtli = remedio) (F.32.r.).

Aparte de sus propiedades purgativas en la época prehispánica esta familia se utilizaba en los rituales con fines adivinatorios, es decir como alucinógenos, donde podemos citar las plantas llamadas bado (*Turbina corymbosa*) y bado negro (*Ipomoea violacea*). Estas son originarias del sureste mexicano y constituyen uno de los principales alucinógenos sagrados de los grupos indígenas de Oaxaca, sus semillas se conocen genéricamente como *ololiuhqui*, y su primera mención data del siglo XVI en el *Códice Florentino*,⁵ donde Sahagún describe: “Hay una planta que llaman *coatl xoxouhqui* (planta serpiente). Da un grano que lleva el nombre de *ololiuhqui* (cosa redonda). Embriaga y vuelve loco, es medicinal”. Francisco Hernández también hace mención del ritual realizado con semillas de *ololiuhqui* que incorpora muchos elementos cristianos.³

El uso ritual de estas semillas sagradas estuvo ampliamente difundido en la época prehispánica, como lo atestigua el mural de Tepantitla que forma parte de la arqueología Teotihuacana. Donde las flores de la planta que florece en el Tlalocan, el paraíso del Dios Tláloc, representa probablemente a una de las especies arborescentes de *Ipomoea* conocidas como cazahuates.



Fragmento del mural de Teotihuacán (500 A.C.), que representa a *Xochiquétzal* la madre Diosa de las aguas terrenales y se relaciona con los alucinógenos del *ololiuhqui* o de alguna especie arborescente del género *Ipomoea*.

En la actualidad, continúan en uso y al parecer con el resurgimiento de los fitofármacos, constituyen fuente de materias primas que cuando se les ingiere en forma de infusiones o son aplicadas tópicamente ejercen su acción terapéutica. En la mayoría de los casos la población emplea estos recursos de manera empírica, ya que el conocimiento de las plantas y su uso específico se ha transmitido verbalmente de una generación a otra.

Una de las características más notables de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas en sus tejidos foliares y radiculares.⁶ Estas glicoresinas constituyen uno de los aspectos quimiotaxonómicos responsables de la acción purgativa, propiedad medicinal más reconocida para estas plantas.³

Desde el punto de vista químico, las resinas glicosídicas de las convolvuláceas son derivados glicosilados de ácidos grasos mono o dihidroxilados de 14 a 16 átomos de carbono, conocidos como glicolípidos o lipopolisacáridos. Los glicolípidos característicos del género *Ipomoea* constituyen una serie de oligosacáridos que tienen la particularidad de ser moléculas anfipáticas por la presencia simultánea en su estructura molecular de un núcleo oligosacárido hidrofílico y una porción hidrofóbica constituida por la aglicona, la cual forma generalmente un éster intramolecular con la cadena oligosacárida.³

La investigación química de las resinas glicosídicas se inició a mediados del siglo XIX,⁷ la naturaleza química y la complejidad estructural de las resinas glicosídicas ha constituido un obstáculo que ha dificultado el aislamiento de sus constituyentes individuales y la caracterización estructural de los mismos. Gracias a los avances tecnológicos en los procedimientos de aislamiento y purificación como la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) y resonancia magnética nuclear de alta resolución (500-600 MHz) para la identificación de las estructuras químicas, se ha logrado la caracterización total de las complejas estructuras de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas durante la última década.

Estas resinas glicosídicas están constituidas por ácidos grasos volátiles, no volátiles y carbohidratos. Los residuos volátiles identificados con mayor frecuencia incluyen a los ácidos tíglico, isobutírico, metilbutírico, nílico⁸ y cinámico. Los ácidos grasos de alto peso molecular caracterizados en las especies del género *Ipomoea* incluyen a los ácidos hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico. El ácido hexadecanoico hidroxilado en la posición C-11, conocido con el nombre de ácido jalapínico, representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas del género *Ipomoea*. Por otra parte, los carbohidratos incluyen a la D-glucosa, la D-fucosa, la D-quinovosa y la L-ramnosa.⁷ En la especie *Ipomoea operculata* se ha establecido la presencia de la D-xilosa como una de las unidades sacáridas constitutivas.⁹

Las propiedades biológicas de las resinas glicosídicas son diversas y no se puede generalizar sobre sus propiedades terapéuticas; estas abarcan actividades antimicrobianas, antiepilépticas, anticancerígenas (*Ipomoea stans*)^{10,11} y en especial, purgativas (*Ipomoea purga*, *Ipomoea orizabensis*, entre otras).^{3,12}

El amplio espectro de actividades biológicas atribuidas a las resinas glicosídicas, así como la complejidad y la diversidad estructural de sus glicolípidos individuales, convierten a estos metabolitos en un sujeto de estudio atractivo y prácticamente inexplorado. El principal objetivo planteado para el desarrollo experimental de la presente disertación contempló el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas de *Ipomoea murucoides* y de los glicolípidos individuales mayoritarios mediante el empleo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia para el aislamiento y purificación, así como de la resonancia magnética nuclear de alta resolución (500-600 MHz) para su caracterización estructural.

II. ANTECEDENTES

2.1 Características de la familia Convolvulaceae

La familia de las convolvuláceas se encuentra ampliamente distribuida a nivel mundial, en especial en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios. En el mundo se estiman alrededor de 55 géneros y 1650 especies, los géneros más representativos son *Ipomoea* (500 especies), *Convolvulus* (250 especies) y *Cuscuta* (170 especies).

El nombre de la familia deriva del latín *convolvere* que significa entrelazarse y se refiere en términos generales a su forma de crecimiento. Todos los géneros de esta familia tienen una morfología parecida (Figura 1), siendo la mayoría enredaderas con hojas alternas y simples (1); tallos generalmente trepadores (2); flores muy grandes y vistosas, su cáliz constituido por cinco sépalos libres (3) y una corola con cinco pétalos fusionados formando un claro embudo (4). Dentro de las angiospermas, la familia de las convolvuláceas representa una de las más grandes y diversas de México, reportándose quince géneros y aproximadamente 217 especies.¹³

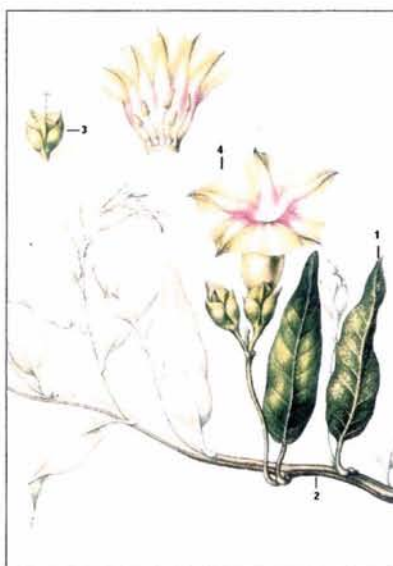


Figura 1. Morfología general de las Convolvuláceas.

2.2 El género *Ipomoea*

En México, el género *Ipomoea* es uno de los mayoritarios con un grado de endemismo de aproximadamente el 65%. La distribución de estas especies en el país se ilustra en la figura 2, de la cual se deduce que el endemismo de *Ipomoea* está concentrado en las regiones subtropicales de la costa del Pacífico.

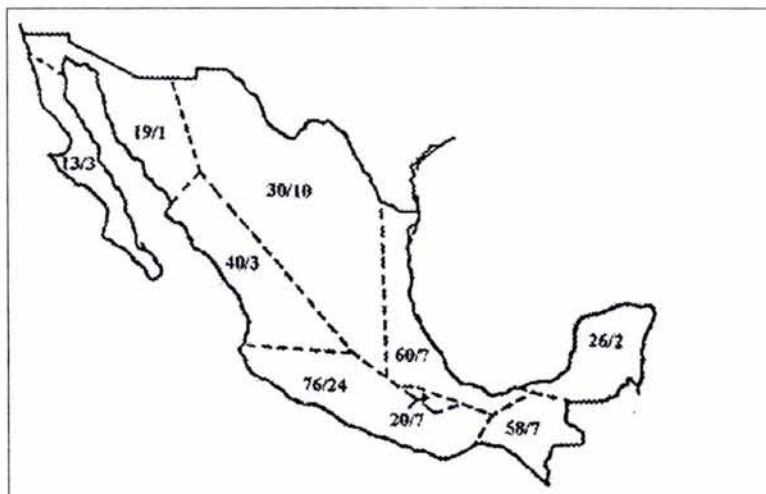


Figura 2. Distribución del género *Ipomoea* en México. El primer número representa el número de especies que existen en cada región y el segundo el número de especies endémicas en la misma.

La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Existen unas cuantas especies como *Ipomoea phillomega* e *Ipomoea santillanii* que son lianas tropicales y alcanzan alturas de hasta 15 metros. Otras especies como *Ipomoea imperata* e *Ipomoea 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 (*Ipomoea stans*, *Ipomoea duranguensis* e *Ipomoea sescossiana*) son arbustos perennes, leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1.0 metro. La especie *Ipomoea carneae* existe como un arbusto leñoso tropical que crece de 2 a 4 metros. Otras especies de *Ipomoea* de la serie arborescentes crecen en forma de árboles de madera suave y alcanza de 3 a 9 metros de altura.

Este género tiene importancia económica por sus usos alimenticios (*Ipomoea batatas*),¹⁴ ornamentales (*Ipomoea carnea*, *Ipomoea alba*, entre otras) y medicinales (*Ipomoea purga* e *Ipomoea stans*). Entre los principales usos medicinales de este género destacan sus propiedades purgativas,^{15,16} siendo el principal exponente la raíz de jalapa, *Ipomoea purga*. En el centro de México, la raíz de *Ipomoea stans*,¹⁷ se usa como catártico y junto con la jalapa ligera (*Ipomoea orizabensis*), constituye un adulterante de la verdadera raíz de jalapa (*Ipomoea purga*). En algunos casos, la actividad biológica descrita se debe a la presencia de alcaloides del tipo ergolina, compuestos característicos de la familia.¹⁸⁻²⁵ Algunos ejemplos de la actividad biológica de los alcaloides presentes en las convolvuláceas son la actividad analgésica de *Ipomoea intrapilosa*,²⁶ las alucinaciones de uso ritual entre los pueblos mesoamericanos³ y las intoxicaciones provocadas en algunos animales debido a la ingestión de plantas forrajeras contaminadas con estas malezas (*Ipomoea lonchophylla*).²⁷

2.3 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de *Ipomoea murucoides*

De la especie medicinal mexicana *Ipomoea murucoides*, hasta la fecha, no existen estudios previos en la literatura sobre la composición química de sus resinas glicosídicas. Se han descrito estudios sobre el contenido de ácidos grasos en las semillas y algunas investigaciones de carácter veterinario sobre su posible toxicidad al ganado.²⁸

Ipomoea murucoides (figura 3) es nativa de México, crece en las zonas tropicales²⁹ formando parte de matorrales áridos abiertos, a menudo sobre pendientes rocosas o planas, frecuentemente en bosques de robles, entre 600 y 2000 m al nivel del mar. Entre los nombres comunes de *Ipomoea murucoides* encontramos los siguientes: cazahuate, cazahuate negro, micaquáhuatl, ozote, pájaro bobo, árbol de venado, palo blanco, palo santo, siete camisas, siete pellejos, tonche, palo flojo, palo de muerto.³⁰ Esta especie se encuentra distribuida en Guerrero (Xalpatláhuac), Jalisco (San Martín Hidalgo), Michoacán (Zitácuaro, El Cerrito), Oaxaca (Huayapan, Santos Reyes Tepejillo), Estado de México (Nepantla de Sor Juana, Malinalco); Querétaro (Esperanza), Puebla (Valsequillo) y Morelos (Oaxtepec).

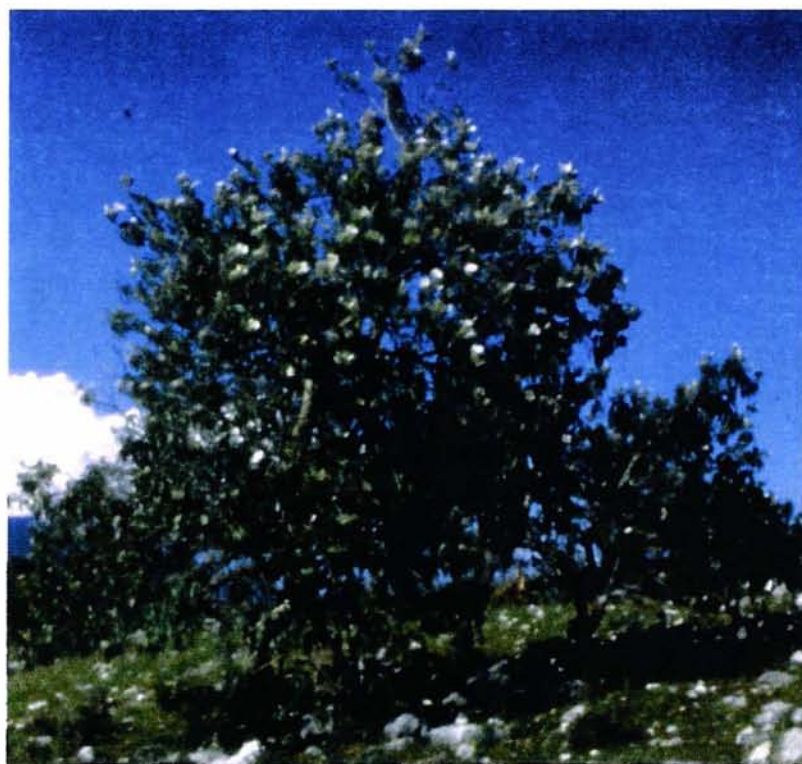


Figura 3. *Ipomoea murucoides* Roem. & Schult.

Esta especie de *Ipomoea* es un árbol de 4 a 8 m de altura, de madera blanda pero resistente que produce látex, de tronco claro; con ramas floríferas de 5-6 mm de diámetro, flores solitarias, axilares o en panículas terminales. Sépalos desiguales; los exteriores de 20-25 mm de largo por 14-15 mm de ancho. Corola blanca, ampliamente acampanulada, pubescente por fuera, de 7-7.5 cm de diámetro; ovario cónico glabro. Semillas de 11-12 mm de longitud, con largos pelos en la parte dorsal, superior y en los bordes, por lo demás, lisas, hojas oblongo-lanceoladas, 7-12 cm de largo, redondeadas a obtusas hacia la base, largamente acuminadas, pubescencia tomentosa en el envés, florece de octubre a abril y pierde las hojas de noviembre a diciembre.

La figura 4 corresponde a la planta *xiuhamolli* del *Códice De la Cruz Badiano*, que se ha interpretado con el nombre azteca de cauhzahuatl o cazahuate (zahuatl = roñoso; quauh = árbol), como se conoce en la actualidad en el estado de Morelos.³¹ Las especies *Ipomoea murucoides* o *Ipomoea intrapilosa* se han identificado como la convolvulácea arbórea representada en esta ilustración. En el manuscrito azteca esta planta se recomienda contra la caída del pelo, aplicando la hierba triturada y cocida en orina de perro.

La flor del cazahuate se utiliza para detener las hemorragias. Su corteza se emplea como antídoto en la picadura de alacranes y mordedura de serpientes; su látex se aplica sobre heridas y llagas. Por otra parte la corteza del cazahuate se combina con otras plantas para tratar la inflamación estomacal. Además, el cazahuate se utiliza contra la hidropesía y la parálisis y su cáscara hervida para evitar la caída del cabello refregándolo después de haberlo lavado.³⁰ *Ipomoea murucoides* forma parte de la lista de plantas medicinales y aromáticas de procedencia nacional con mayor demanda comercial en México.³²

Los cazahuates se consideran mágicos desde la época precolombina en todo el altiplano mexicano. La floración en la época de sequías, según las creencias populares, anuncia las primeras lluvias y las flores se aplican sobre el cuerpo para tratar padecimientos “del agua y el frío”, de manera semejante a como se utilizan los toloaches (*Datura* sp.).³³



Figura 4. Ilustración del cazahuate en el *Códice Badiano* (F.9.r.). El símbolo del agua por debajo de las raíces de la planta indica que este arbolillo se nutre del agua profunda durante la época de sequía cuando florece.

2.4 Resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae

Uno de los primeros estudios en donde se pretende relacionar a los glicolípidos con alguna actividad biológica es el efectuado en las partes aéreas de *Ipomoea leari* donde se aisló un glicósido denominado “ipolearósido”. Este glicolípido demostró poseer actividad anticancerígena.³⁴ En *Ipomoea stans* estas resinas han demostrado propiedades anticonvulsivas,³⁵ citotóxicas,¹¹ y efectos vasoactivos.³⁶ En el caso de la actividad alelopática de *Ipomoea tricolor*,³⁷ se demostró que los compuestos responsables son la resinas glicosídicas presentes en la raíz.^{38,15} Otro ejemplo es el estudio de la actividad anticancerígena y antimicrobiana de las glicoresinas de *Ipomoea bahiensis*.³⁹

La característica estructural común que poseen los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas encontradas en el género *Ipomoea* y en la familia Convolvulaceae es el núcleo oligosacárido (acilado en la mayoría de los casos) combinado con el grupo carboxilo de la aglicona para formar un éster macrocíclico. En todos los estudios sobre la actividad

biológica se encontró que la lactona macrocíclica constituye una característica estructural importante para la actividad de estos compuestos, ya que al hidrolizarse el enlace éster, la actividad biológica desaparece o disminuye considerablemente.^{15,40} La diversidad estructural de estos compuestos depende de las diferencias observadas en el tipo y número de unidades monosacáridas que constituyen el núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosilación y en la posición de acilación y lactonización. A pesar de que la literatura relacionada con la caracterización estructural de lipopolisacáridos de la familia de las convolvuláceas no es tan abundante como la relacionada con otras clases de metabolitos secundarios, e.g. los alcaloides, y debido a que los compuestos aislados y caracterizados durante el desarrollo experimental de la presente disertación corresponden a resinas glicosídicas con núcleos estructurales pentasacáridos, en la presente sección sólo se discutirá la diversidad estructural de éstos en la familia en estudio.

2.4.1 Oligopentasacáridos de las resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae

2.4.1.1 Ácido microfílico

De *Convolvulus microphyllus* como constituyente mayoritario del núcleo oligosacárido de su resina soluble en éter se aisló el ácido microfílico identificado como el O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-[O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- β -D-fucopiranosido del ácido 11-hidroxipalmitico (figura 5).⁴¹

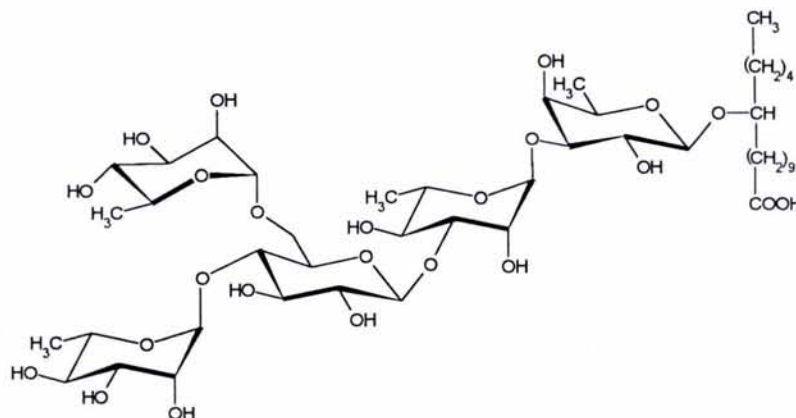


Figura 5. Estructura del ácido microfílico constituyente mayoritario de *Convolvulus microphyllus*.

2.4.1.2 Ácidos operculínicos A y B

En *Ipomoea operculata*^{9,42,43} los ácidos operculínicos A-G fueron generados como los productos de hidrólisis alcalina de las operculinas I-XVIII (figuras 7 y 8), los ácidos A y B (figura 6) son pentasacáridos. Al parecer, el ácido operculínico A es frecuente en la familia de las convolvuláceas ya que también forma parte de los núcleos glicosídicos de las especies *Ipomoea stolonifera*,⁴⁴ *Quamoclit pennata*,⁴⁵ *Merremia hungaiensis*⁴⁶ y *Merremia mammosa*.⁴⁷⁻⁴⁹

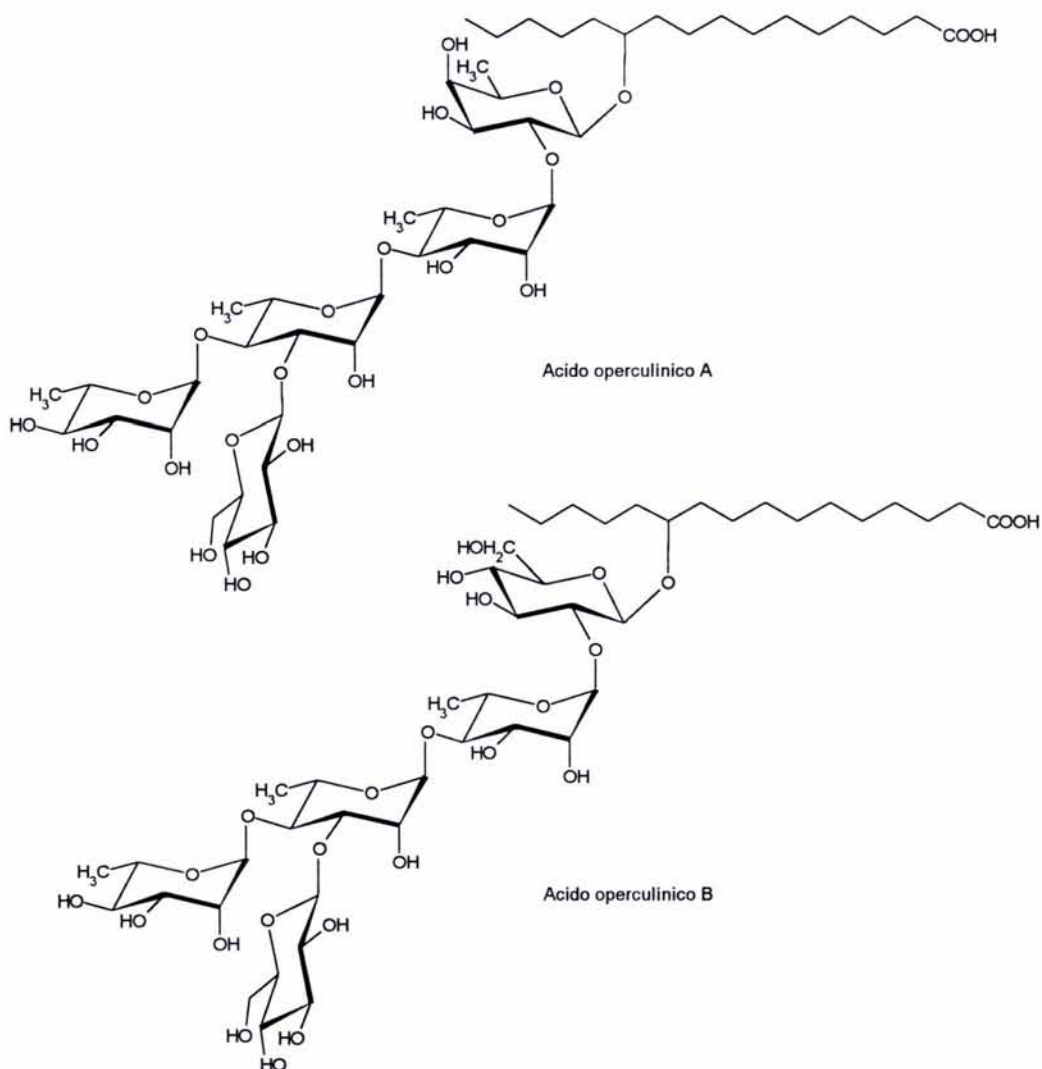


Figura 6. Estructuras de los ácidos operculínico A y B de *Ipomoea operculata*.

2.4.1.2.1 Operculinas

Las raíces de *Ipomoea operculata* son un laxante drástico y se han utilizado como substitutos de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) en Europa.⁴² De la porción jalapina, se han aislado las operculinas I-XVIII.⁵⁰⁻⁵² A continuación se ilustran sólo las estructuras de las operculinas con el núcleo del ácido operculínico A (figura 7) y B (figura 8).

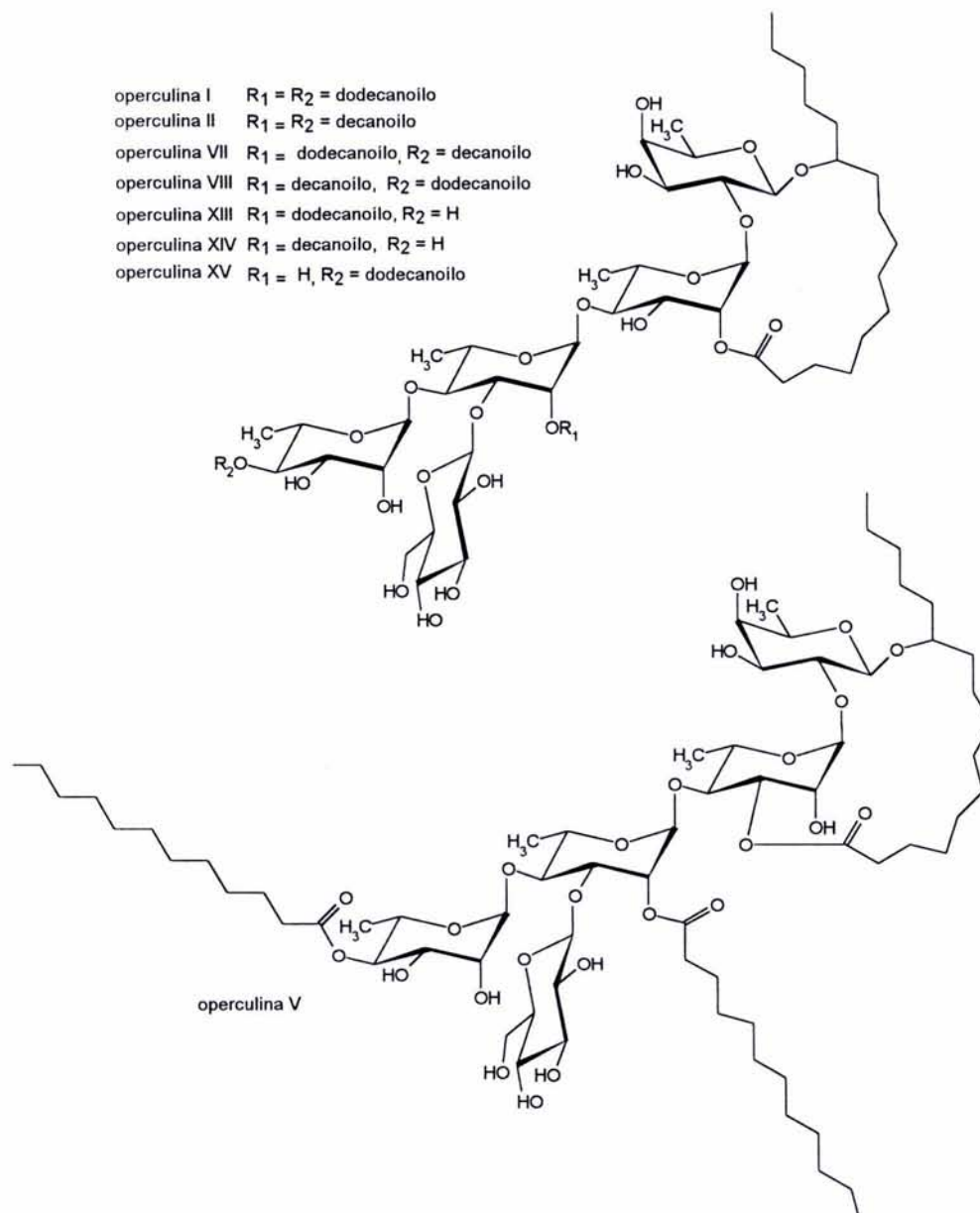


Figura 7. Estructuras de las operculinas con el núcleo del ácido operculínico A.

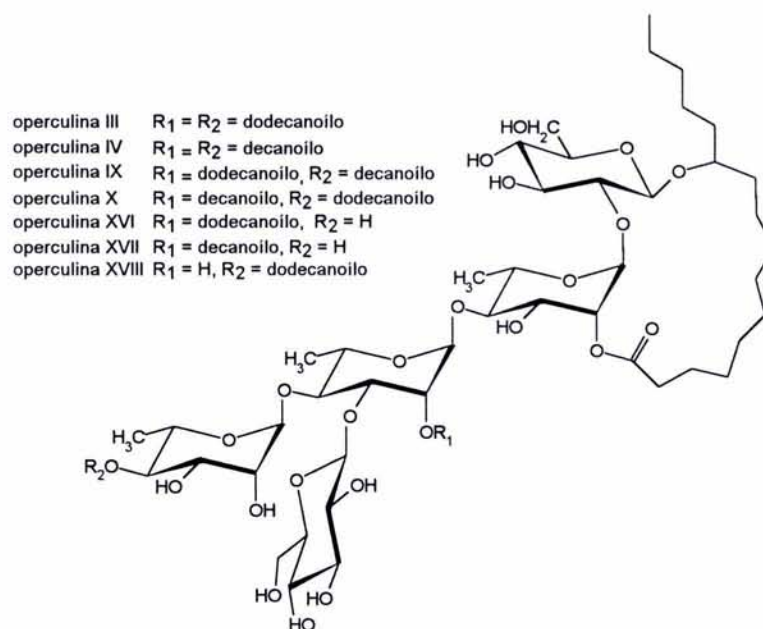


Figura 8. Estructuras de las operculinas con el núcleo del ácido operculínico B.

2.4.1.2.2 Estoloniferinas

De la porción soluble en éter (jalapina) que resultó del fraccionamiento del extracto metanólico de *Ipomoea stolonifera*, se aislaron doce constituyentes, las estoloniferinas I-XII.^{44,53} Las estoloniferinas con el núcleo del ácido operculínico A se diferencian en la posición de la esterificación intramolecular con la aglicona sobre la unidad de ramnosa interna. En el caso de las estoloniferinas V, VI y VII, la lactonización se establece en la posición C-2 para generar una estructura macrocíclica de 18 miembros, mientras que la estoloniferina IV presenta un macrociclo de 19 miembros mediante la esterificación intramolecular por la aglicona en la posición C-3 de la unidad de ramnosa interna (figura 9).

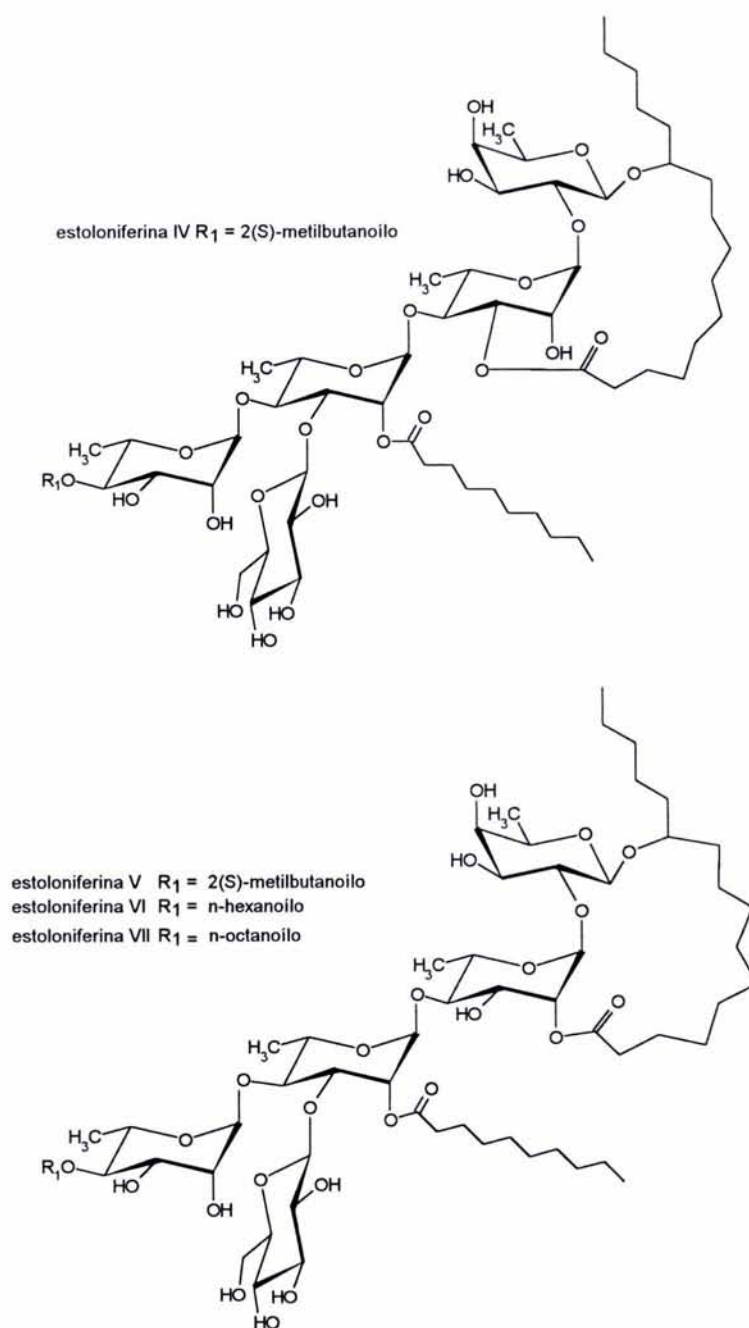


Figura 9. Estructuras de las estoloniferinas IV-VII, constituyentes de la porción jalapina de *Ipomoea stolonifera* con el núcleo del ácido operculínico A.

2.4.1.2.3 Quamoclinas

El estudio de la composición química de la jalapina de la especie *Quamoclit pennata*⁴⁵ condujo al aislamiento de las quamoclinas I-IV. Las cuales fueron aisladas y purificadas mediante cromatografía líquida de alta eficiencia. Todos los compuestos se encuentran formados por una cadena ramificada de monosacáridos, los cuales consisten en unidades de fucosa, ramnosa y glucosa (núcleo del ácido operculínico A).

Las quamoclinas I, III y IV (figura 10) corresponden a macrolactonas cuya esterificación intramolecular se localiza en la posición C-2 de la ramnosa interna. En tanto que para la quamoclina II (figura 11), la lactonización ocurre en la posición C-3 de la misma unidad de metilpentosa. La aglicona que forma la lactona en estos constituyentes de la jalapina de *Quamoclit pennata* fue identificada como el ácido 11-hidroxitetradecanoico (convolvulínico) en las quamoclinas II y III. En el caso de las quamoclinas I y IV, se identificó al ácido 11-hidroxihexadecanoico como la aglicona de estas moléculas.

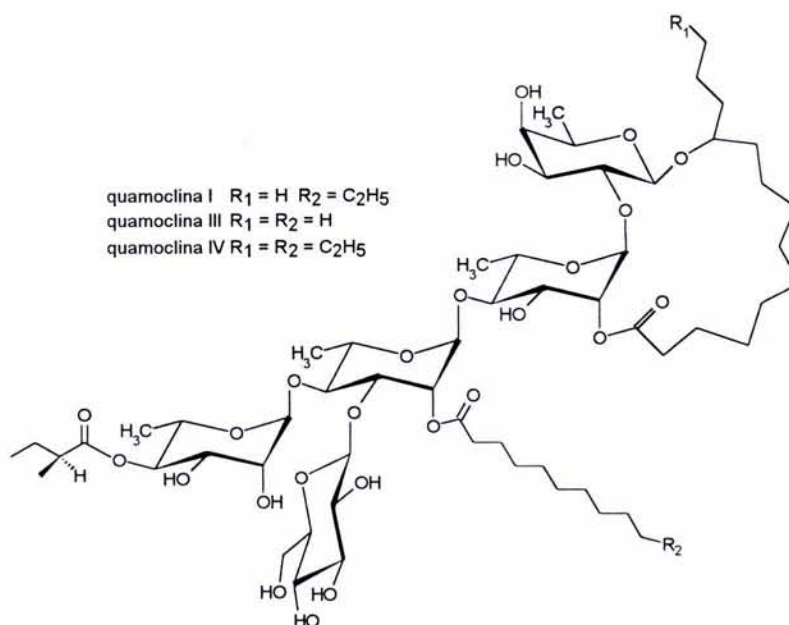


Figura 10. Estructuras de las quamoclinas I, III y IV constituyentes de la porción jalapina de *Quamoclit pennata*.

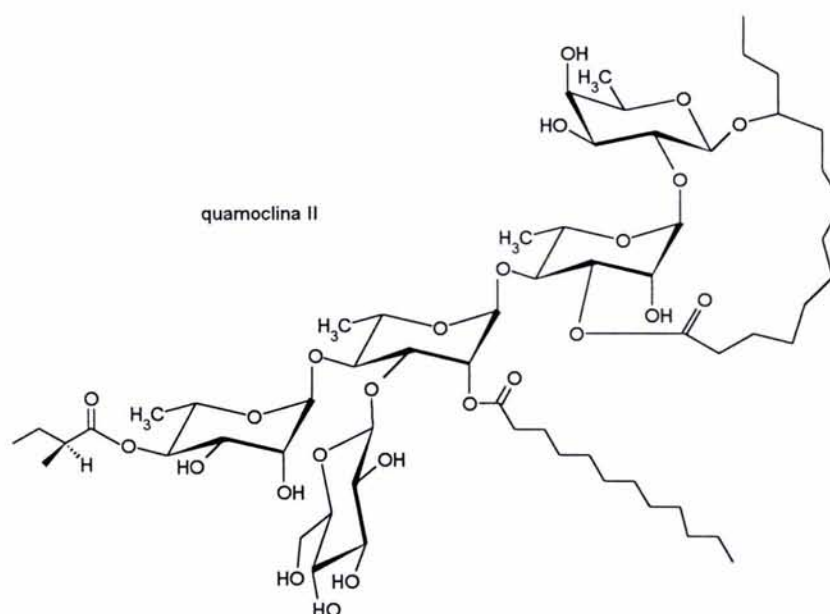


Figura 11. Estructura de la quamoclina II, constituyente de *Quamoclit pennata*.

2.4.1.2.4 Tuguajalapinas

La raíz de *Merremia hungaiensis*⁴⁶ es un remedio tradicional chino conocido como “Tu Gua” y utilizado en el tratamiento de la hepatitis crónica y la hernia. El estudio fitoquímico de esta especie medicinal permitió aislar y caracterizar a diez glicolípidos, las tuguajalapinas I-X (figura 12). Las tuguajalapinas I, IV y IX son macrolactonas cuya esterificación intramolecular se localiza en la posición C-3 de la ramnosa interna. En tanto que para las demás tuguajalapinas, la lactonización ocurre en la posición C-2 de la misma unidad de metilpentosa.

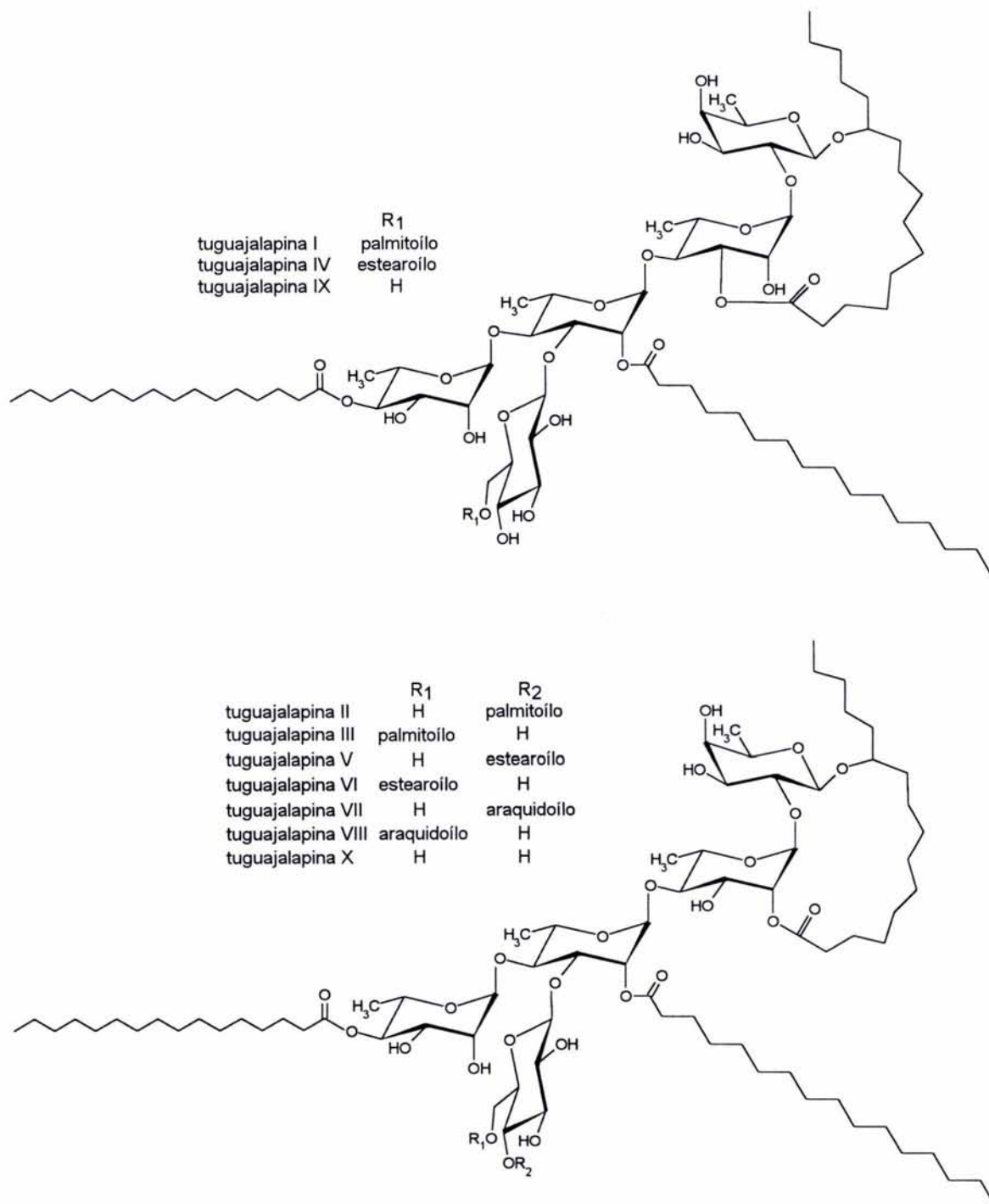


Figura 12. Estructuras de las tuguajalapinas I-X, constituyentes de la resina glicosídica de *Merremia hungaiensis*.

2.4.1.2.5 Mamósidos

Los tubérculos de *Merremia mammosa* forman parte de los componentes de un remedio crudo utilizando en Indonesia para el tratamiento de la diabetes y para malestares del sistema respiratorio.⁵⁴ La investigación fitoquímica⁴⁷⁻⁴⁹ de esta especie condujo al aislamiento de trece glicolípidos nombrados como merremósidos a-h₂, mamósidos A, B, H₁ y H₂.⁵⁵

Estos glicolípidos aislados de la porción soluble en éter de la resina glicosídica preparada a partir de los tubérculos frescos de *Merremia mammosa* difieren tanto por el número y la naturaleza de los grupos acilantes y de los monosacáridos que integran las cadenas oligosacáridas como por el sitio de esterificación intramolecular. Sólo se muestran los pentasacáridos con el núcleo del ácido operculínico A (mamósidos H₁ y H₂) en la figura 13. La localización de los grupos ésteres en los merremósidos naturales se logró combinando la información obtenida a través de los efectos causados por la acilación en sus respectivos espectros de RMN de ¹H y el estudio de los patrones de fragmentación en sus espectros de masas.

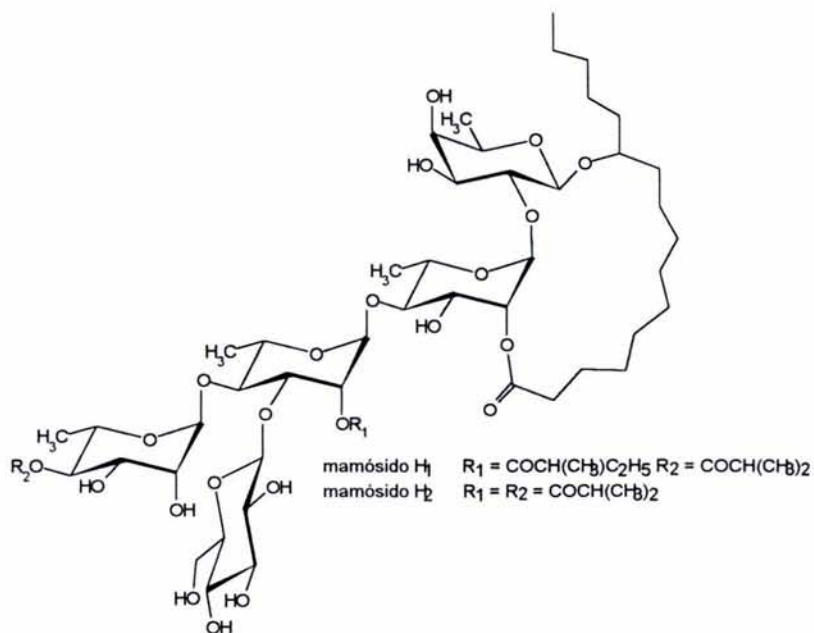


Figura 13. Estructuras de los mamósidos H₁ y H₂, constituyentes de la porción jalapina de *Merremia mammosa* con el núcleo del ácido operculínico A.

2.4.1.3 Ácido merremósido j

De la jalapina de los tubérculos de *Merremia mammosa*, se obtuvo el ácido merremósido j, como pentasacárido novedoso, identificado como el 11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-(3-O- β -D-glucopiranosil)- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico (Figura 14).

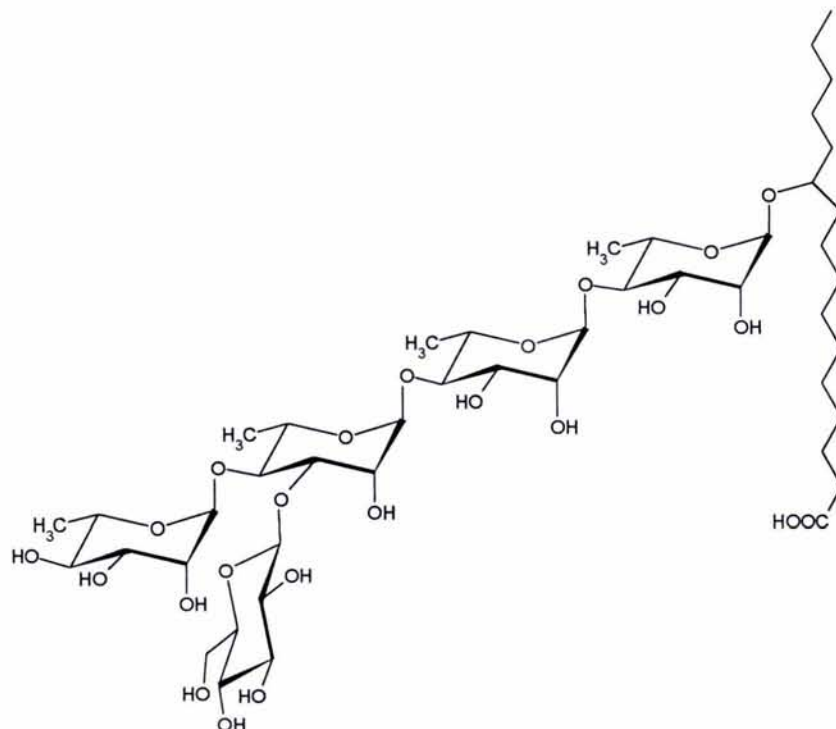


Figura 14. Estructura del ácido merremósido j, constituyente de *Merremia mammosa*.

2.4.1.3.1 Merremósidos

Continuando con *Merremia mammosa*, entre los pentasacáridos de esta especie se encuentran los merremósidos f, g, h₁ y h₂ (Figura 15), los cuales tienen el núcleo del ácido merremósido j.

Finalmente, la capacidad ionofórica de los merremósidos a–d y f–h₂ se evaluó *in vitro* empleando eritrocitos humanos. Los merremósidos con cinco unidades sacáridas demostraron una mayor capacidad para acarrear los iones de Na⁺, K⁺ y Ca⁺, mostrando cada uno de estos glicolípidos una selectividad para los diferentes iones. La ruptura de la estructura macrocíclica provocó la pérdida total de la actividad ionofórica.⁴⁷

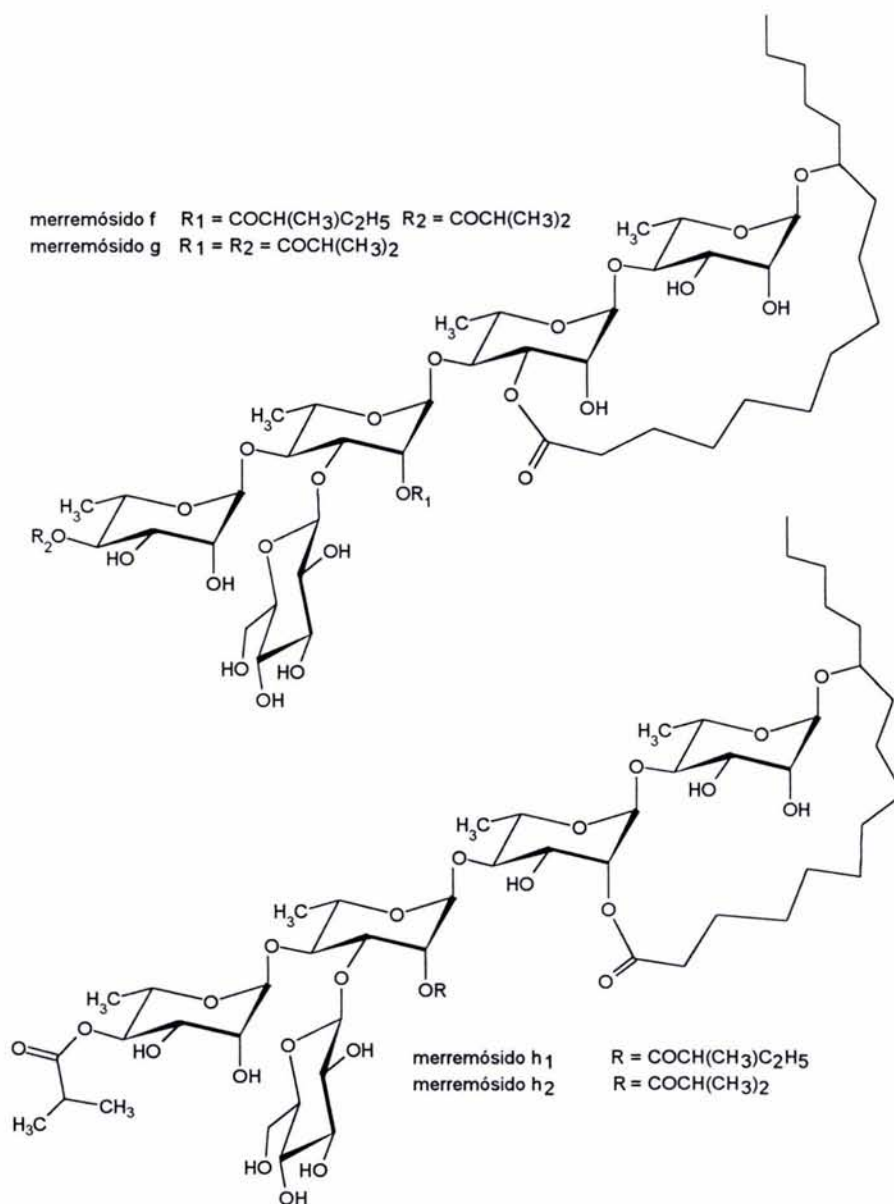


Figura 15. Estructuras de los merremósidos f, g, h₁ y h₂, constituyentes de la jalapina de *Merremia mammosa*.

2.4.1.4 Ácidos multifidínicos A y B

De la jalapina de las hojas de *Quamoclit multifida*, se obtuvieron los ácidos multifidínicos A y B (figura 16) como pentasacáridos novedosos con las mismas unidades monosacáridas y secuencia de glicosidación, pero diferente aglicona. La elucidación estructural de estos compuestos se realizó a través de métodos químicos degradativos, el análisis de la RMN bidimensional y EM-FAB.⁵⁶

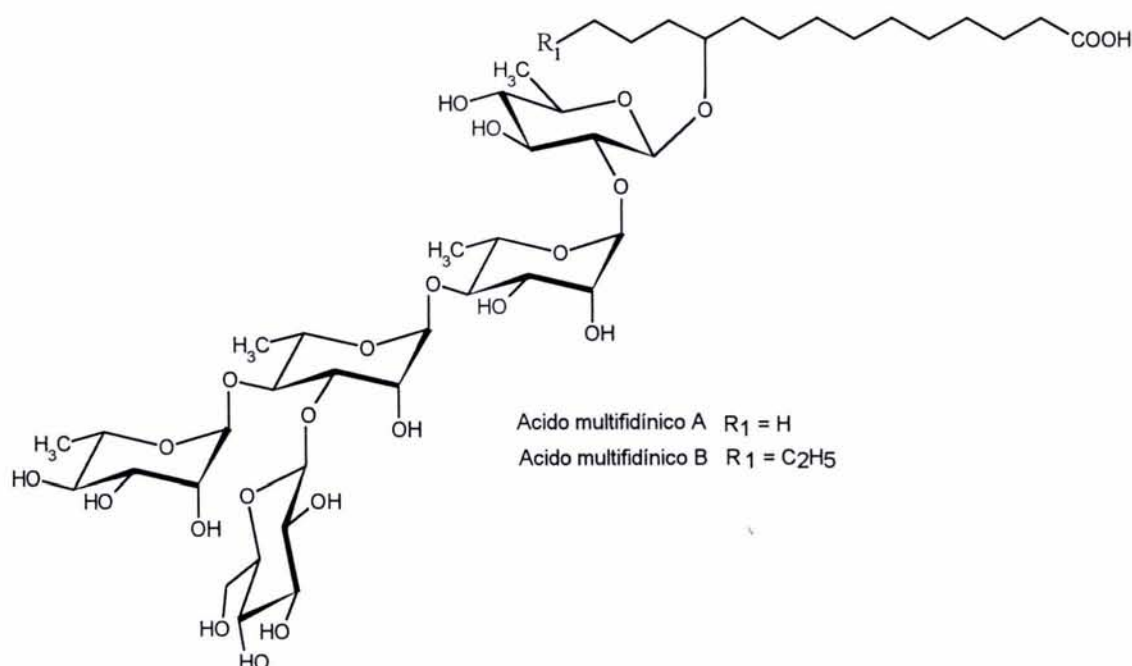


Figura 16. Estructuras de los ácidos multifidínicos A y B, constituyentes de las resinas de *Quamoclit multifida*.

2.4.1.4.1 Multifidinas

De la *Quamoclit multifida*, planta decorativa que es un híbrido de *Quamoclit pennata* (L.) Bojer (*Ipomoea quamoclit* L.) y *Quamoclit coccinea* Moench (*Ipomoea hederifolia* L.), se obtuvieron las multifidinas I y II (Figura 17) junto con las quamoclinas I-IV (sección 2.4.1.2.3).

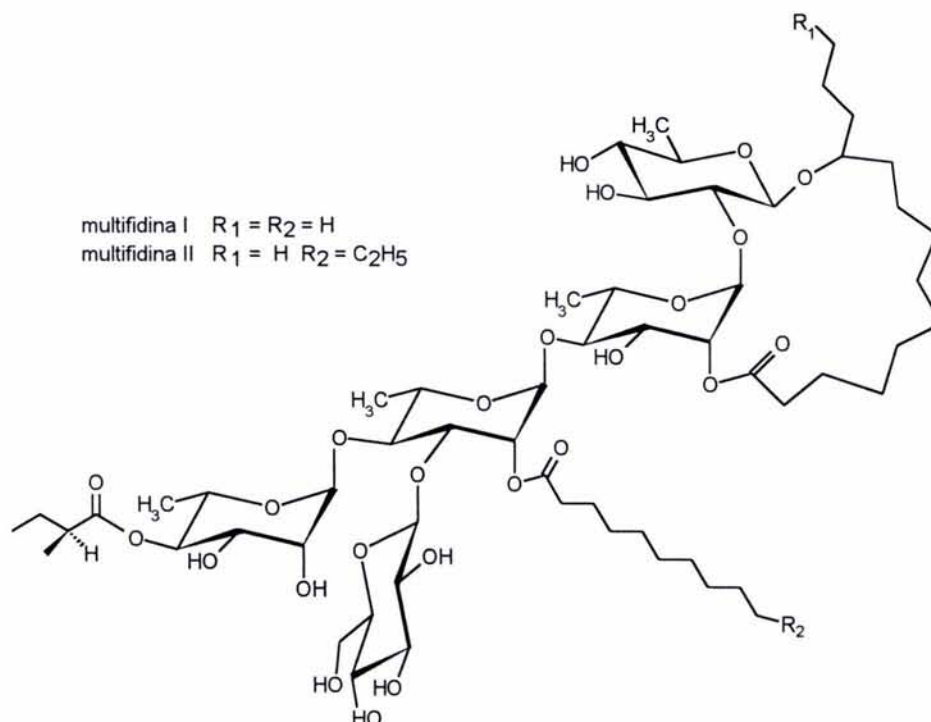


Figura 17. Estructuras de las multifidinas I y II, constituyentes de la porción jalapina de *Quamoclit multifida* con los núcleos de los ácidos multifidínicos A y B.

2.4.1.5 Ácido woodrosínico A

De *Ipomoea tuberosa* se obtuvo el ácido woodrosínico A identificado como el 11-O-β-D-glucopiranosil-(1→6)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-glucopiranosido del ácido jalapínico (figura 18).⁵⁷

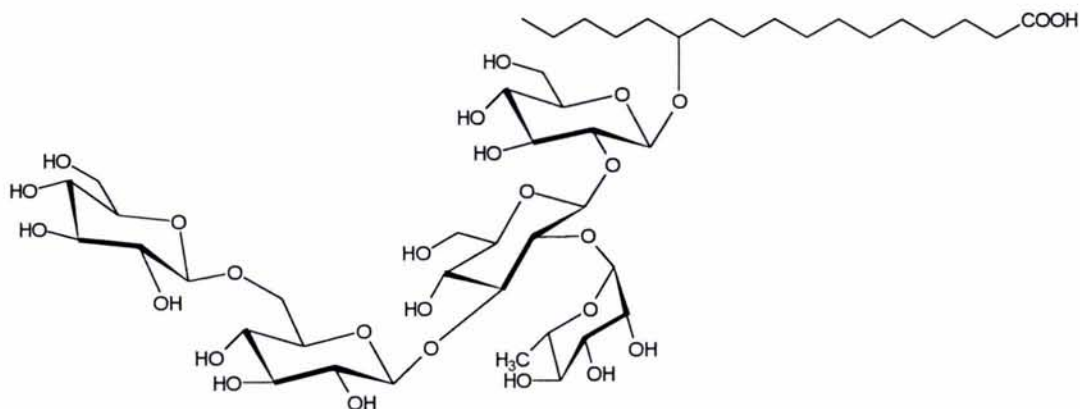


Figura 18. Estructura del ácido woodrosínico A constituyentes de las resinas de *Ipomoea tuberosa*

2.4.1.5.1 Woodrosinas

Ipomoea tuberosa (*Merremia tuberosa*) es una especie conocida en Japón con el nombre común de palo de rosa (“woodrose”) por la coloración de sus cálices. Los tubérculos, así como las hojas y semillas se consumen como alimentos. El estudio fitoquímico de las resinas glicosídicas de esta especie condujo al aislamiento de dos glicolípidos mediante el procesamiento de la convolvulina preparada a partir de los tallos.

Los metabolitos aislados y nombrados como woodrosinas I y II (figura 19) están formados por el mismo núcleo glicosídico, el ácido woodrosínico A. Las dos woodrosinas se encuentran esterificadas cada una en cuatro posiciones idénticas de la cadena oligosacárida.

La saponificación de estos metabolitos produjo el ácido (2*S*)-metilbutírico como único residuo volátil presente en la woodrosina I, mientras que la woodrosina II produjo además el ácido 2-metilpropanoico. La localización de los sustituyentes acilos sobre la cadena oligosacárida se estableció mediante el análisis comparativo de los desplazamientos químicos de los protones ($\Delta\delta$) en el ácido preparado y las señales en los productos naturales. La esterificación intramolecular en la posición C-2 de la glucosa externa se corroboró a través de la solvólisis de las woodrosinas I y II, mediante su tratamiento con 3% de trietilamina en MeOH. De esta forma, la comparación de los desplazamientos químicos de los núcleos de ^1H del éster metílico correspondiente a la apertura de la lactona con los observados para el ácido woodrosínico A permitió observar un desplazamiento químico a campo alto para el protón H-2 de la unidad de glucosa terminal. Por lo tanto, esta posición representa el sitio de esterificación intramolecular en los productos naturales para la generación del macrociclo de 33 miembros.

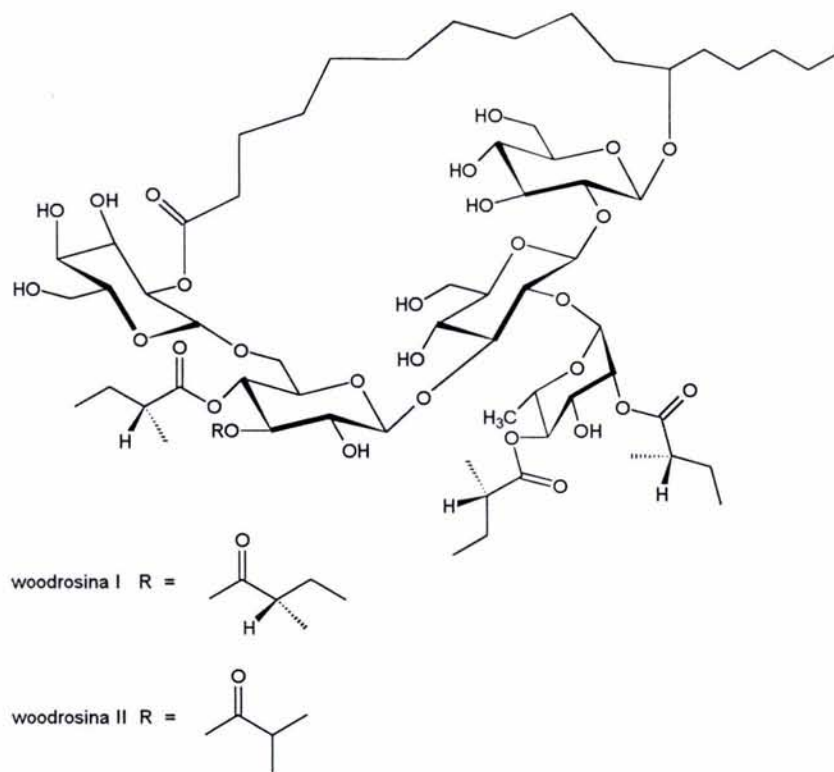


Figura 19. Estructuras de las woodrosina I y II, constituyentes de la convolvulina de *Ipomoea tuberosa*.

2.4.1.6 Acido farbítico C

En las semillas de la especie *Pharbitis nil*,⁵⁸ la saponificación de la farbitina en un principio se pensaba que proporcionaba un solo ácido glicosídico llamado “farbítico”. Sin embargo, a lo largo de varias décadas, se han reportado diferentes productos derivados de las reacciones de hidrólisis alcalina y ácida de la farbitina. A principios de los años setenta y en lo que constituye la primera “resolución” cromatográfica de glicolípidos de las convolvuláceas, se estableció mediante análisis por cromatografía en capa fina (CCF) sobre gel de sílice (BuOH-AcOH-H₂O, 4:1:5) que el “ácido farbítico” consistía en una mezcla de por lo menos cuatro ácidos, denominados farbíticos A, B, C y D de acuerdo a sus factores de retención (R_f). Los ácidos farbíticos C y D, fueron separados en forma de ésteres de *p*-fenilfenacilo mediante una CCF preparativa sobre gel de sílice, utilizando como sistema eluyente la mezcla ternaria de CHCl₃-MeOH-H₂O (7:3:1).⁵⁹ Se propusieron

las estructuras completas de los ácidos farbíticos C y D con base en las evidencias químicas y datos espectrométricos y espectroscópicos.^{58,60} Sin embargo, fue hasta 1990 cuando se estableció de manera inequívoca la estructura de los ácidos glicosídicos B, C y D producidos por la saponificación de la farbitina. Estos ácidos difieren en el número de monosacáridos y en el tamaño de la aglicona. En la figura 20, sólo se muestra la estructura del ácido farbítico C, el cual correspondió a un pentasacárido.⁶¹

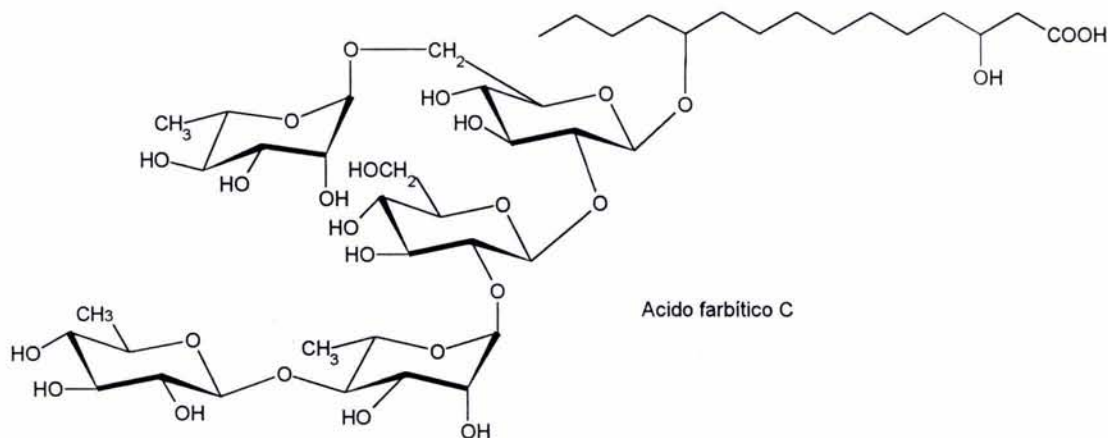


Figura 20. Estructura del ácido farbítico C constituyentes de las resinas de *Ipomoea tuberosa*.

2.4.1.7 Acido simónico A y B

En *Ipomoea batatas*, además del ácido operculínico C están presentes los ácidos simónicos A y B (figura 21).⁶² Este último también se encuentra como uno de los núcleos oligosacáridos constitutivos de las resinas de *Ipomoea stolonifera*⁴⁴ e *Ipomoea pes-caprae*.⁶³

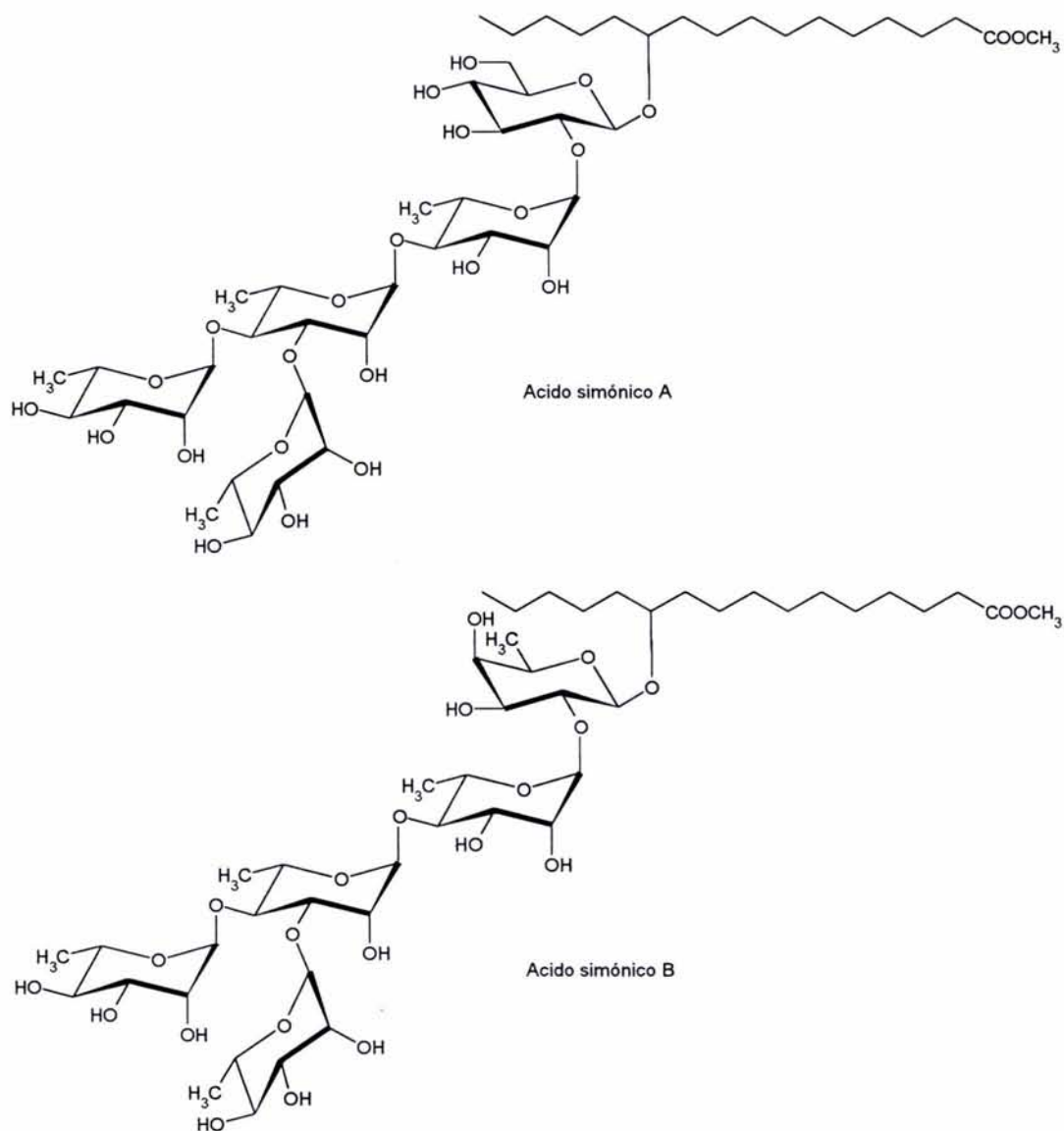


Figura 21. Estructuras de los ácidos simónico A y B constituyentes de las resinas de *Ipomoea batatas*.

2.4.1.7.1 Simoninas

Los tubérculos de *Ipomoea batatas* se utilizan como alimento. Se ha reportado que sus hojas y raíces son efectivas para el tratamiento de la leucemia, la anemia, la hipertensión, la diabetes y las hemorragias.⁶² En *Ipomoea batatas* se han aislados cinco glicorresinas, las simoninas I-V de la jalapina de esta raíz, siendo la simonina I el primer ejemplo de una jalapina esterificada en uno de los monosacáridos con el ácido transcinámico.⁶² Para ilustrar

las resinas del camote, sólo se utilizarán los pentasacáridos con el núcleo del ácido simónico A y B, las simonina II–V (Figura 22).

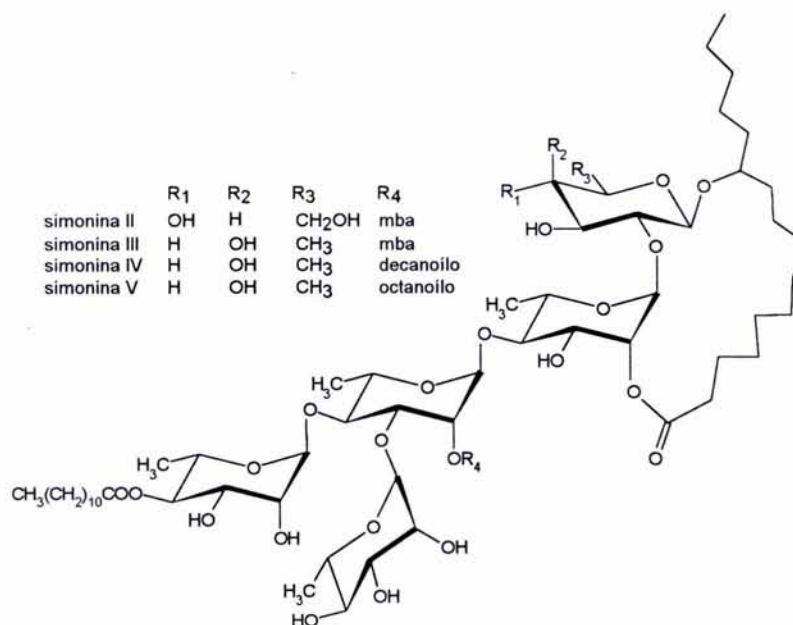


Figura 22. Estructuras de las simoninas II- V, constituyentes de las resinas de *Ipomoea batatas*.

2.4.1.7.2 Estoloniferinas

Continuando con las estoloniferinas de *Ipomoea stolonifera*, entre los pentasacáridos de este especie con el núcleo del ácido simónico B, encontramos las estoloniferinas I, II, III, VIII, IX y X. En las tres primeras, la lactonización se establece en la posición C–3 para generar una estructura macrocíclica de 19 miembros. Las estoloniferinas VIII, IX y X presentan un macrociclo de 18 miembros mediante la esterificación intramolecular por la aglicona en la posición C–2 de la unidad de ramnosa interna (figura 23).

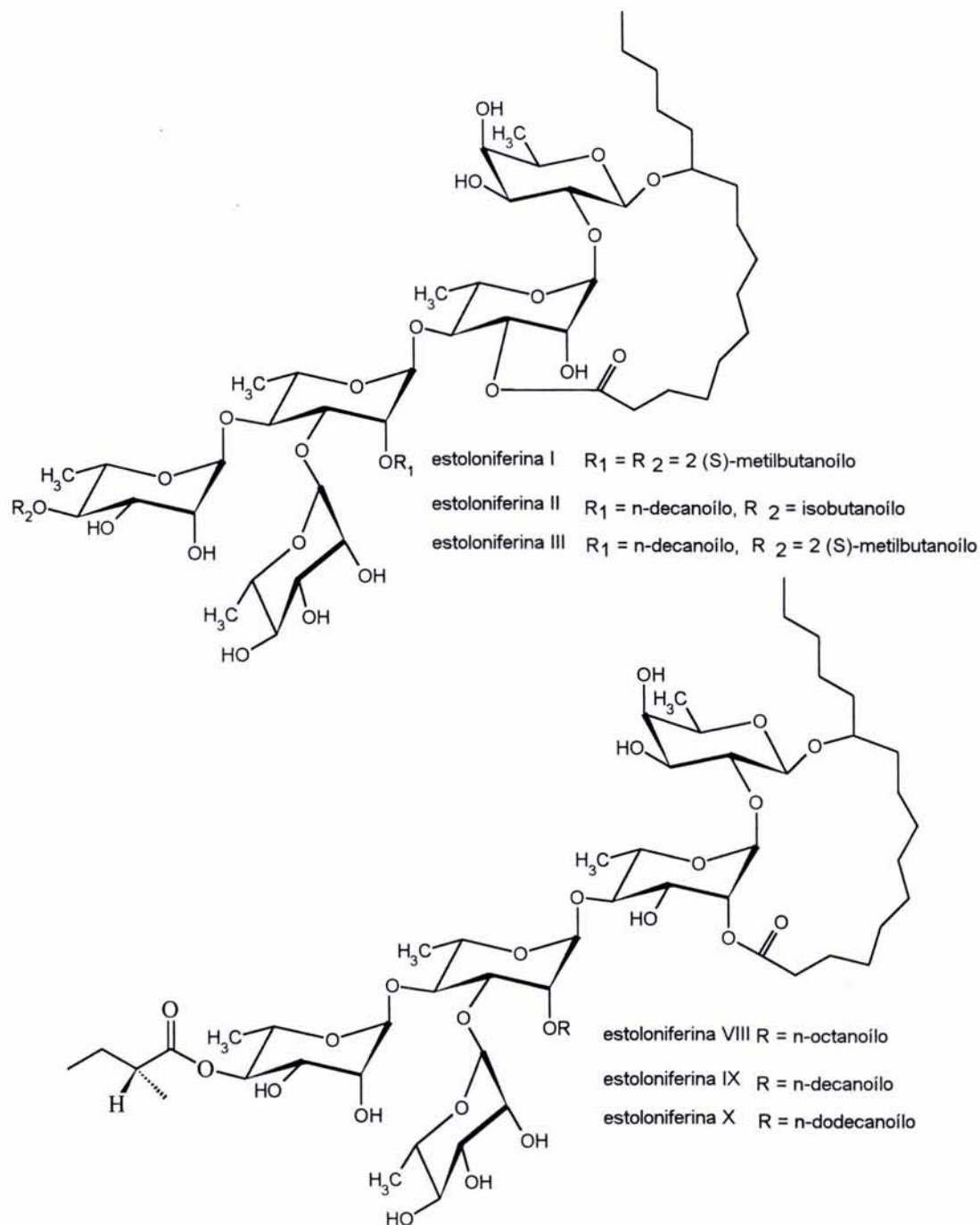


Figura 23. Estructuras de las estoloniiferinas I-III y VIII-X, constituyentes de la jalapina de *Ipomoea stolonifera*.

III. JUSTIFICACION

El género *Ipomoea* posee poderosas actividades biológicas, entre las que destacan sus propiedades citotóxicas de posible aplicación terapéutica. Desde este contexto, se eligió para la realización de un estudio fitoquímico, de acuerdo al criterio quimiotaxonómico, a la especie medicinal mexicana *Ipomoea murucoides*, de la cual no existen estudios previos en la literatura sobre la composición química de sus resinas glicosídicas.

El aislamiento y la caracterización de la composición química de estos compuestos permitirá ampliar el escaso conocimiento relacionado con la diversidad estructural de estos metabolitos biodinámicos y realizar una exploración de los requerimientos estructurales necesarios para su actividad citotóxica.

Así, el presente trabajo de investigación plantea la obtención de las resinas glicosídicas solubles en la porción lipofílica (cloroformo) del extracto orgánico y el establecimiento de su composición química mediante el reconocimiento de las estructuras de los constituyentes mayoritarios.

IV. OBJETIVOS

4.1 Objetivos generales

4.1.1 Caracterizar las estructuras moleculares de los ácidos glicosídicos mayoritarios generados mediante la hidrólisis alcalina de las resinas glicosídicas presentes en el extracto clorofórmico de *Ipomoea murucoides*.

4.1.2 Aislar y purificar mediante la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) los glicolípidos individuales mayoritarios que constituyen las complejas mezclas de las resinas glicosídicas presentes en el material vegetal de estudio.

4.2 Objetivos específicos

4.2.1 Realizar reacciones degradativas para determinar la composición química de la jalapina de *Ipomoea murucoides*.

4.2.2 Establecer las condiciones instrumentales en la cromatografía líquida de alta eficiencia para aislar los constituyentes individuales mayoritarios presentes en la jalapina.

4.2.3 Llevar a cabo la purificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios constitutivos de la jalapina, utilizando métodos cromatográficos de alta eficiencia (CLAE).

4.2.4 Caracterizar las estructuras de los núcleos oligosacáridos y de los constituyentes individuales mayoritarios mediante técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB) de las resinas glicosídicas de *Ipomoea murucoides*.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Determinación de las constantes físicas

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

5.2 Métodos cromatográficos

Los procedimientos cromatográficos involucrados para la realización del presente trabajo consistieron en la aplicación de la cromatografía en columna abierta para lograr el fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de *Ipomoea murucoides*. Se utilizó gel de sílice 60 Merck (70-230 mesh) para montar las columnas.

El análisis de la homogeneidad cromatográfica para las fracciones obtenidas, así como el seguimiento de las reacciones efectuadas, se llevó a cabo mediante la cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizaron cromatoplasas (5×4 cm; 5×2 cm) recubiertas de gel de sílice 60 F₅₄ Merck. Las placas se humedecieron con un agente cromógeno (mezcla H_2SO_4 -sulfato cérico) y se revelaron por calentamiento sobre una parrilla a una temperatura de 80 °C.

Las separaciones que utilizaron a la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) se realizaron empleando las siguientes columnas:

Columna analítica de fase reversa C-18 ($4.6 \times 300\text{mm}$, $5 \mu\text{m}$).

Columna preparativa de fase reversa C-18 ($19 \times 300\text{mm}$, $7 \mu\text{m}$).

Los disolventes utilizados fueron acetonitrilo, metanol y agua.

La instrumentación estuvo constituida por una bomba (Waters 600 controller) y un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA), un refractómetro diferencial Waters 410 e integrado a un equipo de computo (OptiPlex 466/Le, Dell). El control del equipo, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se hicieron a través del software Millenium 2000 (Waters). Una válvula de reciclaje de muestra se adaptó al sistema cromatográfico.

5.3 Material vegetal

La muestra analizada consistió en flores secas (426.8 g) de *Ipomoea murucoides*, colectadas en la Ciudad Universitaria, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos. La identificación del material fue hecha por el Biólogo Gustavo Soria Rocha.

5.3.1 Obtención de las resinas glicosídicas

El material vegetal seco y pulverizado se sometió a una extracción con cloroformo y metanol mediante un proceso de maceración en periodos de tres días durante dos semanas para cada disolvente. Una vez concluido el tiempo de extracción, la solución se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvo un rendimiento del 13.82% para el extracto clorofórmico y del 13.25% para el metanólico.

El fraccionamiento primario del extracto clorofórmico (59 g) se realizó mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice usando un sistema de elución constituido por la mezcla de CHCl_3 -MeOH, incrementándose gradualmente la polaridad (10% MeOH en eluatos de tres litros), iniciando la elución con un 100% de cloroformo y terminado con un 100% de metanol. Así, se obtuvieron 27 fracciones primarias (I-XXVII). En la figura 24 se presenta el cromatograma en capa fina de estas fracciones.

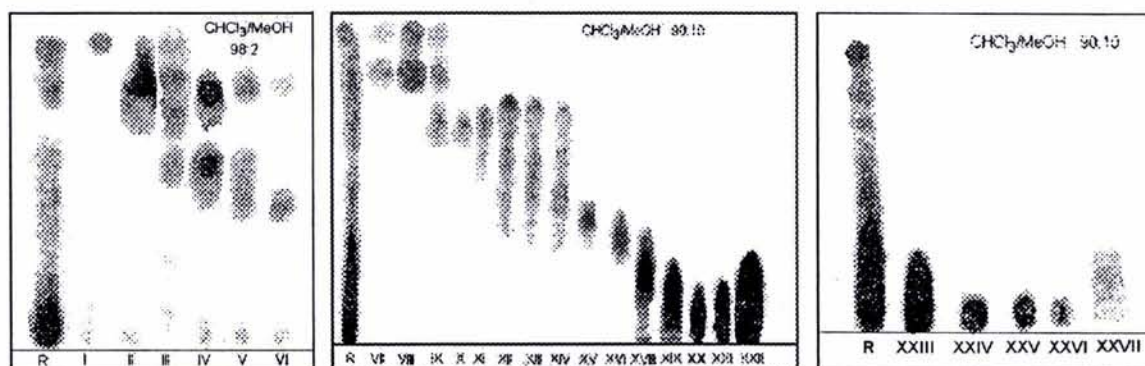


Figura 24. Cromatograma en capa fina de los eluatos obtenidos durante el fraccionamiento primario de la jalapina de *Ipomoea murucoides*.

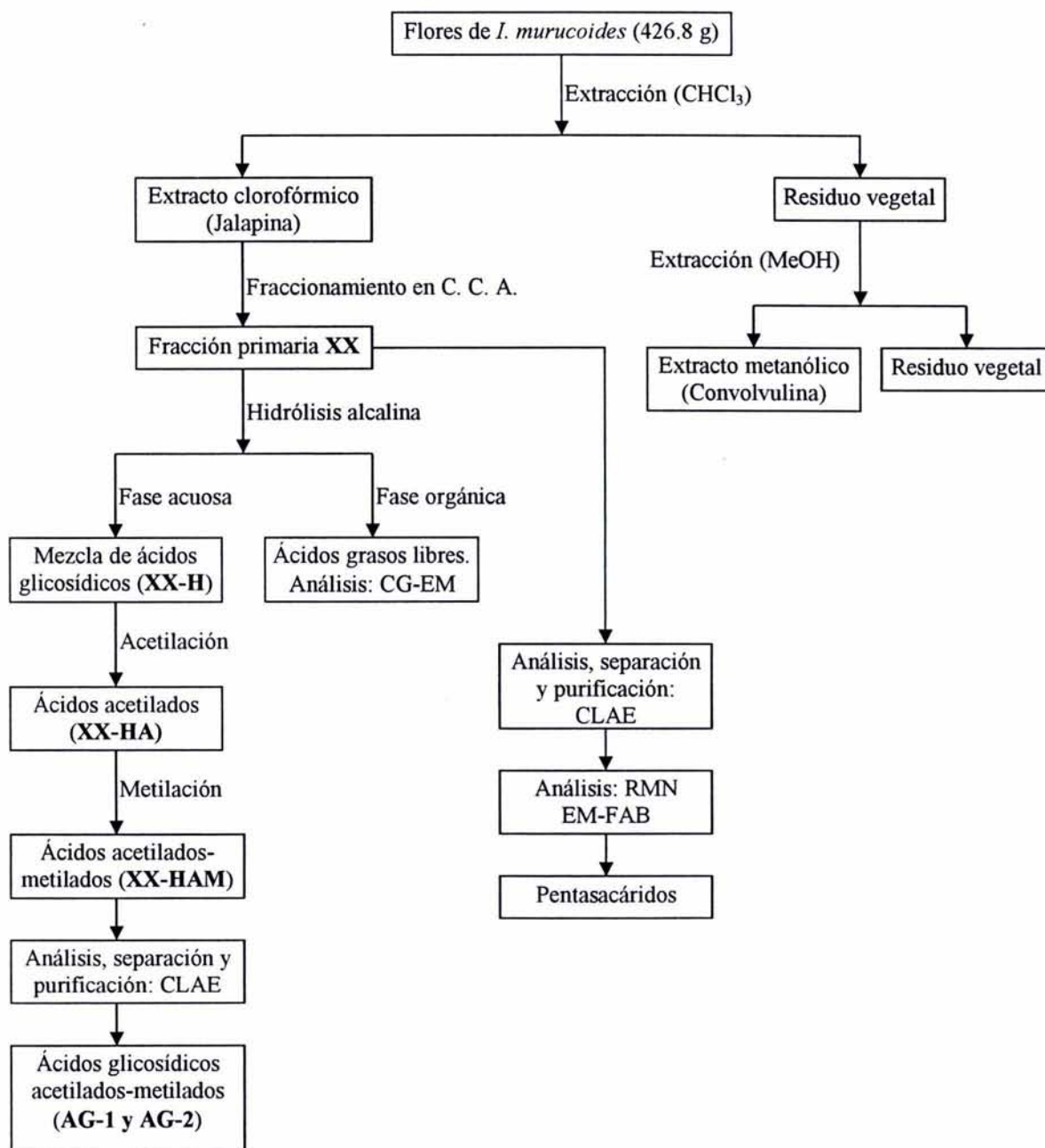
5.4 Preparación de derivados a partir de la jalapina

El trabajo experimental que se discute en esta tesis, se efectuó con la fracción primaria mayoritaria XX (5.7 g) para obtener los glicolípidos constitutivos de las resinas de la planta en estudio. La fracción primaria XX se sometió a una reacción de saponificación con el fin de generar los ácidos glicosídicos derivados de este crudo resinoso de acuerdo a los procedimientos resumidos en el esquema 1.

5.4.1 Hidrólisis alcalina

La fracción problema (400 mg) se sometió a una hidrólisis alcalina en medio acuoso (8 mL de KOH al 5%). La mezcla de reacción se dejó a reflujo (95 °C) con agitación constante durante tres horas. Al término de este tiempo, se ajustó el pH a 4 con HCl 4N y, posteriormente, se extrajo con éter etílico (3 × 10 mL). La fase etérea proporcionó una mezcla de ácidos grasos la cual se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a

espectrometría de masas. La fase acuosa se sometió a extracciones con *n*-butanol (3×10 mL) y la fase orgánica se concentró a sequedad con ayuda de una bomba de alto vacío, obteniéndose 320 mg del ácido glicosídico (**XX-H**).



Esquema 1. Procedimientos experimentales utilizados en el análisis químico de las resinas glicosídicas presentes en las flores de *Ipomoea murucoides*.

5.4.2 Reacción de acetilación

El producto hidrolizado **XX-H** (154 mg) se disolvió en 2.5 mL de piridina y 4.5 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 48 h, al término de las cuales se adicionaron 8 mL de H₂O y se efectuaron tres extracciones sucesivas, utilizando en cada uno de ellas volúmenes de 10 mL de acetato de etilo. La fase orgánica se trató con HCl 1N (2 × 10 mL), seguido de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO₃ (2 × 10 mL). Por último, la fase orgánica se lavó con H₂O (2 × 10 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Esta reacción produjo 200 mg del producto acetilado (**XX-HA**).

5.4.3 Reacción de alquilación con diazometano

El producto de la reacción de acetilación (**XX-HA**) fue sometido a una reacción de alquilación con diazometano para obtener el derivado metilado (**XX-HAM**).

5.4.3.1 Generación del reactivo

A una solución de KOH (5 g en 7.5 mL de agua), 25 mL de EtOH y 60 mL de éter, se hizo reaccionar con N-metil-N-nitroso-O-toluensulfonamida (21.5 g) en 30 mL de éter. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua en baño de vapor (58–60 °C). Después de 5 minutos, el CH₂N₂ generado se colectó mediante destilación en 20 mL de éter en baño de hielo.

5.4.3.2 Reacción de alquilación

Se adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano a la mezcla **XX-HA** disuelta en 10 mL de metanol para llevar a cabo la reacción de alquilación. La adición del agente alquilante se realizó hasta que cesó el desprendimiento de N₂ en el medio de reacción.

Se obtuvieron 186 mg como producto de alquilación (**XX-HAM**). La mezcla de componentes de **XX-HAM** se analizó por CLAE utilizando una columna de fase reversa C-18. Los eluatos con tiempo de retención 9.23, 9.54, 12.86 y 13.66 min se recolectaron y analizaron mediante cromatografía en capa fina. Posteriormente, cada uno fue reinyectado y reciclado en el cromatógrafo de líquidos a nivel preparativo para lograr la purificación de los ácidos glicosídicos constitutivos de la resina en su forma de peracetatos metilados.

5.5 Separación de los ácidos glicosídicos peracetilados-metilados mediante CLAE

Se realizaron pruebas a nivel analítico de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados-metilados utilizando una columna fase reversa utilizando como adsorbente dimetiloctadecilsilano (C-18), ya que esta columna se ha descrito para la separación y purificación de los ácidos glicosídicos resultantes del proceso de hidrólisis alcalina de las resinas.⁵¹ Los resultados fueron satisfactorios pues se encontró una resolución total de los constituyentes presentes en la muestra al utilizarse el sistema de elución binario constituido con CH₃CN-H₂O (95:5) y un flujo de 0.6 mL/min.

Una vez encontradas las condiciones a nivel analítico para la resolución de la muestra problema (**XX-HAM**), se procedió a extrapolar estas condiciones a un nivel preparativo para lograr el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en la muestra.

Las condiciones instrumentales a nivel preparativo fueron las siguientes: columna fase reversa utilizando como adsorbente dimetiloctadecilsilano (C-18), 7 µm; 19 × 300 mm; fase móvil CH₃CN-H₂O (95:5); flujo de 9 mL/min; detector, índice de refracción (sensibilidad 125 RIU); concentración de la muestra 10 mg/200 µL; volumen de inyección, 200 µL.

La muestra problema **XX-HAM** (80 mg) se resolvió en cuatro diferentes constituyentes (AG 1-4), cuyos tiempos de retención son los siguientes: 9.23 (**AG-1**), 9.54 (**AG-2**), 12.86 (**AG-3**) y 13.66 (**AG-4**) minutos.

5.5.1 Purificación de AG-1 y AG-2

Para lograr la purificación del compuesto **AG-1** ($t_R = 9.23$ min) y **AG-2** ($t_R = 9.54$ min), se realizó una inyección adicional a nivel preparativo, sólo que en esta ocasión se utilizó la técnica de corte y reciclaje de la muestra para lograr una máxima separación y pureza, en las condiciones instrumentales descritas en el inciso anterior. Estas condiciones permitieron la purificación de 10 mg de cada uno de los diferentes ácidos glicosídicos a partir de la fracción **XX**.

AG-1: p.f. 80-85°C; **RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS):** δ 1.21 (d, $J = 6.3$ Hz, Fuc-6), 4.00 (q, $J = 6.4$ Hz, Fuc-5), 4.33 (dd, $J = 7.8, 10$ Hz, Fuc-2), 4.96 (d, $J = 7.7$ Hz, Fuc-1), 5.47 (dd, $J = 10.2, 3.4$ Hz, Fuc-3), 5.55* (Fuc-4), 1.32 (d, $J = 6.2$ Hz, Ram-6), 4.23* (dd, $J = 8.4, 8.4$ Hz, Ram-4), 4.28* (Ram-5), 5.55* (Ram-2), 5.57* (Ram-3), 5.65* (Ram-1), 1.42 (d, $J = 6.2$ Hz, Ram'-6), 4.21 (dd, $J = 9.1, 10.0$ Hz, Ram'-4), 4.25* (Ram'-5), 5.53* (Ram'-1), 5.67 (dd, $J = 3.2$ Hz, Ram'-2), 5.72 (dd, $J = 3.2, 9.9$ Hz, Ram'-3), 1.66 (d, $J = 6.2$ Hz, Ram''-6), 4.20 (dd, $J = 9.1, 10.0$ Hz, Ram''-4), 4.90* (Ram''-5), 5.41* (Ram''-1), 5.60 (dd, $J = 1.7, 3.0$ Hz, Ram''-2), 5.72 (dd, $J = 3.7, 9.9$ Hz, Ram''-3), 1.58 (d, $J = 5.8$ Hz, Ram'''-6), 4.23* (dd, $J = 8.4, 8.4$ Hz, Ram'''-4), 4.25* (dq, 5.8, 9.8 Hz, Ram'''-5), 4.46 (dd, $J = 8.6, 3.0$ Hz, Ram'''-3), 5.35* (Ram'''-1), 5.49* (dd, $J = 3.1$ Hz, Ram'''-2), 0.89 (t, $J = 6.7$ Hz, Jal-16), 2.35 (t, $J = 7.5$ Hz, MeCO₂), 3.60 (s, MeO), 4.00* (Jal-11) [Espectro 1].

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 15.9 (Fuc-6), 67.8 (Fuc-5), 71.4 (Fuc-4), 73.0 (Fuc-2), 74.5 (Fuc-3), 99.7 (Fuc-1), 17.1 (Ram-6), 67.6 (Ram-5), 71.4 (Ram-3), 72.3 (Ram-2), 78.6 (Ram-4), 99.1 (Ram-1), 17.2 (Ram'-6), 67.6 (Ram'-5), 70.5 (Ram'-2), 71.0 (Ram'-3), 80.1 (Ram'-4), 97.4 (Ram'-1), 18.1 (Ram''-6), 67.1 (Ram''-5), 71.0 (Ram''-2), 78.6

(Ram''-4), 71.0 (Ram''-3), 99.1 (Ram''-1), 18.3 (Ram'''-6), 67.6 (Ram'''-5), 72.3 (Ram'''-2), 78.6 (Ram'''-3), 78.6 (Ram'''-4), 99.7 (Ram'''-1), 13.9 (Jal-16), 33.9 (MeCO₂), 50.8 (MeO), 78.0 (Jal-11), 173.6 (CO) [Espectro 2].

AG-2: p.f. 79-83°C; RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 1.22 (d, J = 6.4 Hz, Fuc-6), 4.04* (q, J = 6.3 Hz, Fuc-5), 4.24 (dd, J = 8.3, 11.8 Hz, Fuc-2), 4.97 (d, J = 7.72 Hz, Fuc-1), 5.52* (dd, J = 6.8, 3.2 Hz, Fuc-3), 5.55 (dd, J = 3.4, 9.8 Hz, Fuc-4), 1.67 (d, J = 6.1 Hz, Ram-6), 4.17 (dd, J = 9.7, 9.7 Hz, Ram-4), 4.80* (Ram-5), 5.48* (Ram-1), 5.58* (Ram-2), 5.71* (Ram-3), 1.56 (d, J = 5.5 Hz, Ram'-6), 4.05* (Ram'-4), 4.17* (Ram'-5), 4.55* (dd, J = 3.5, 7.9 Hz, Ram'-3), 5.33* (Ram'-1), 5.50* (dd, J = 2.9 Hz, Ram'-2), 1.30 (d, J = 6.2 Hz, Ram''-6), 4.24 (dq, J = 5.9, 11.6 Hz, Ram''-5), 5.55* (dd, J = 9.8 Hz, Ram''-4), 5.65 (dd, J = 3.4, 10.3 Hz, Ram''-3), 5.68* (Ram''-1), 5.73 (dd, J = 3.2 Hz, Ram''-2), 4.04* (dq, J = 6.3 Hz, Glu-5), 4.50* (Glu-6a), 4.78* (Glu-6b), 5.20 (d, J = 7.8 Hz, Glu-1), 5.35 (dd, J = 7.9 Hz, Glu-2), 5.52* (Glu-4), 5.73* (Glu-3), 0.88 (t, J = 6.4 Hz, Jal-16), 2.36 (t, J = 7.5 Hz, MeCO₂), 3.60 (s, MeO), 4.04* (Jal-11) [Espectro 3].

RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 16.8 (Fuc-6), 68.2 (Fuc-3), 67.9 (Fuc-5), 74.3 (Fuc-4), 77.1 (Fuc-2), 99.8 (Fuc-1), 18.2 (Ram-6), 67.3 (Ram-5), 69.9 (Ram-2), 72.4 (Ram-3), 81.2 (Ram-4), 97.8 (Ram-1), 18.5 (Ram'-6), 72.0 (Ram'-2), 72.0 (Ram'-4), 77.0 (Ram'-3), 81.2 (Ram'-5), 100.0 (Ram'-1), 17.5 (Ram''-6), 67.3 (Ram''-5), 69.0 (Ram''-3), 70.9 (Ram''-4), 72.6 (Ram''-2), 97.7 (Ram''-1), 61.3 (Glu-6), 67.9 (Glu-5), 68.3 (Glu-4), 72.0 (Glu-2), 74.3 (Glu-3), 99.9 (Glu-1), 14.0 (Jal-16), 34.0 (MeCO₂), 50.8 (MeO), 77.9 (Jal-11), 173.5 (CO) [Espectro 4].

5.6 Separación y purificación de los glicolípidos de la jalapina de *Ipomoea murucoides*

Las pruebas preliminares para lograr la separación de los principios presentes en la fracción primaria **XX** se efectuaron en columnas analíticas de fase reversa (C-18) y aminopropilmetilsilano (amino) con un sistema de detección de índice de refracción y flujo

de 0.7 mL/min. El sistema cromatográfico adecuado consistió en una columna analítica C-18 (4.6×300 mm, 5 μ m); flujo: 0.7 mL/min; fase móvil CH₃CN-MeOH (90:10) isocrático; volumen de inyección 10 μ L (1 mg/100 μ L).

Las condiciones instrumentales a nivel preparativo adecuadas fueron las siguientes: columna C-18 preparativa Symetry, (19×300 mm, 7 μ m); fase móvil: CH₃CN-MeOH (90:10); flujo: 9.0 mL/min; detector: índice de refracción; concentración de la muestra: 50 mg/500 μ L y volumen de inyección: 500 μ L. El cromatograma obtenido en estas condiciones se muestra en la figura 32 (Resultados y discusión, sección 6.3), adquiriéndose 14 subfracciones (A-N).

5.6.1 Obtención de la murucoidina I (1)

Se trabajó con 2.0 g de la fracción primaria **XX** obteniéndose 300 mg de la subfracción H. La subfracción H ($t_R = 24.35$ min) fue reinyectada en la columna C-18 Symetry con un sistema de elución binario constituido por CH₃CN-MeOH (90:10); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección: 500 μ L. Se aplicó la técnica de reciclaje de muestra, utilizándose de 5 a 8 ciclos para obtener la máxima separación y garantizar una pureza > 99% de los constituyentes presentes en esta subfracción.

Murucoidina I (1): sólido blanco; p.f. 148-153°C; $[\alpha]_D -42.0$ (c 0.1, MeOH); **EM-FAB (modo negativo) m/z (%)**: 1151 [M-H]⁻ (50) (C₅₆H₉₇O₂₄), 1067 [M-H- C₅H₉O (mba-H)]⁻ (10), 921 [1067- 146 (metilpentosa)]⁻ (10), 545 [921- 2 x 146 (metilpentosa)- C₅H₉O]⁻ (30), 417 [545 + 18 (hidrólisis de la lactona) - 146 (metilpentosa)]⁻ (100), 271 [417 - 146 (metilpentosa); ácido jalapínico -H]⁻ (52).

RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N, TMS): δ 1.48 (d, $J = 6.4$ Hz, Fuc-6), 3.74 (dq, $J = 0.7, 6.2$ Hz, Fuc-5), 3.96 (dd, $J = 3.4$ Hz, Fuc-4), 4.04 (dd, $J = 9.6, 3.5$ Hz, Fuc-3), 4.14 (dd, $J = 7.4$,

9.5 Hz, Fuc-2), 4.70 (d, $J = 7.4$ Hz, Fuc-1), 1.58 (d, $J = 6.2$ Hz, Ram-6), 4.18 (dd, $J = 9.5$ Hz, Ram-4), 4.40 (dq, $J = 6.2, 9.5$ Hz, Ram-5), 4.98 (dd, $J = 9.6$ Hz, Ram-3), 5.45 (d, $J = 1.56$ Hz, Ram-1), 5.92 (dd, $J = 1.9, 3.3$ Hz, Ram-2), 1.62 (d, $J = 6.1$ Hz, Ram'-6), 4.23 (dd, $J = 9.4, 5.6$ Hz, Ram'-4), 4.32 (dq, $J = 9.3$ Hz, Ram'-5), 4.58 (dd, $J = 3.1, 9.3$ Hz, Ram'-3), 5.94 (dd, $J = 1.9, 3.0$ Hz, Ram'-2), 6.08 (d, $J = 1.7$ Hz, Ram'-1), 1.37 (d, $J = 6.3$ Hz, Ram''-6), 4.35 (dq, $J = 9.4$ Hz, Ram''-5), 4.45 (dd, $J = 3.2, 9.6$ Hz, Ram''-3), 4.68 (dd, $J = 1.4, 3.0$ Hz, Ram''-2), 5.78 (dd, $J = 9.7, 9.7$ Hz, Ram''-4), 5.86 (d, $J = 1.0$ Hz, Ram''-1), 1.53 (d, $J = 5.8$ Hz, Ram'''-6), 4.19 (dd, $J = 9.4$ Hz, Ram'''-5), 4.21 (dd, $J = 9.3$ Hz, Ram'''-4), 4.38 (dd, $J = 3.4$ Hz, Ram'''-3), 4.80 (dd, $J = 1.9$ Hz, Ram'''-2), 5.60 (d, $J = 1.1$ Hz, Ram'''-1), 0.85 (t, $J = 7.0$ Hz, Jal-16), 2.21 (ddd, $J = 3.9, 8.2, 14.7$ Hz, Jal-2a), 2.37 (ddd, $J = 3.9, 8.7, 14.2$ Hz, Jal-2b), 3.83 (m, Jal-11), 0.82 (t, $J = 7.4$ Hz, mba-4), 1.04 (d, $J = 7.0$ Hz, mba-5), 2.32 (tq, $J = 7.1$ Hz, mba-2), 0.91 (t, $J = 7.4$, mba'-4), 1.18 (d, $J = 7.0$, mba'-5), 2.47 (tq, $J = 7.0$ Hz, mba'-2) (Resultados y discusión, sección 6.5.1, figura 34).

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 17.3 (Fuc-6), 70.8 (Fuc-5), 73.3 (Fuc-4), 73.4 (Fuc-3), 80.2 (Fuc-2), 104.2 (Fuc-1), 19.4 (Ram-6), 69.9 (Ram-3), 72.5 (Ram-5), 73.9 (Ram-2), 79.9 (Ram-4), 98.7 (Ram-1), 18.8 (Ram'-6), 68.2 (Ram'-5), 72.9 (Ram'-2), 79.5 (Ram'-3), 80.1 (Ram'-4), 99.2 (Ram'-1), 17.8 (Ram''-6), 68.5 (Ram''-5), 70.2 (Ram''-3), 72.7 (Ram''-2), 74.7 (Ram''-4), 103.8 (Ram''-1), 18.5 (Ram'''-6), 68.6 (Ram'''-3), 70.5 (Ram'''-5), 72.5 (Ram'''-2), 73.4 (Ram'''-4), 104.8 (Ram'''-1), 14.3 (Jal-16), 34.3 (Jal-2), 82.3 (Jal-11), 173.1 (Jal-1), 11.7 (mba-4), 16.8 (mba-5), 41.4 (mba-2), 175.5 (mba-1), 11.7 (mba'-4), 16.9 (mba'-5), 41.5 (mba'-2), 176.3 (mba'-1) [Espectro 5].

5.6.2 Obtención de la murucoidina II (2)

La subfracción J ($t_R = 30.09$ min) fue reinyectada en la columna C-18 Symetry con un sistema de elución binario constituido por $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ (90:10); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección: 500 μL . Se aplicó la técnica de reciclaje de muestra, para garantizar la pureza de la subfracción, de la cual se obtuvieron 352 mg de la fracción primaria XX.

Murucoidina II (2): Sólido blanco; **p.f.** 150-159°C; $[\alpha]_D -28.7$ (c 0.1, MeOH); **EM-FAB (modo negativo) m/z (%)**: 1167 $[M-H]^-$ (35) ($C_{56}H_{97}O_{25}$), 1083 $[M-H-C_5H_9O(mba-H)]^-$ (5), 937 $[1083-146(\text{metilpentosa})]^-$ (5), 545 $[939-162(\text{hexosa})-146(\text{metilpentosa})-C_5H_9O]^-$ (30), 417 $[545+18(\text{hidrólisis de la lactona})-146(\text{metilpentosa})]^-$ (100), 271 $[417-146(\text{metilpentosa}); \text{ácido jalapινόlico}-H]^-$ (20) (Resultados y discusión, sección 6.5.5.2, figura 47).

RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N , TMS): δ 1.48 (d, $J = 6.4$ Hz, Fuc-6), 3.72 (q, $J = 6.7$ Hz, Fuc-5), 3.93 (dd, $J = 2.7$ Hz, Fuc-4), 4.00 (dd, $J = 3.0, 9.7$ Hz, Fuc-3), 4.12 (dd, $J = 7.6, 9.4$ Hz, Fuc-2), 4.68 (d, $J = 7.5$ Hz, Fuc-1), 1.62 (d, $J = 6.1$, Ram-6), 4.14 (dd, $J = 9.4$ Hz, Ram-4), 4.45 (dq, $J = 6.2$ Hz, Ram-5), 4.97* (Ram-3), 5.48* (Ram-1), 5.90 (dd, $J = 2.5$ Hz, Ram-2), 1.64 (d, $J = 6.2$ Hz, Ram'-6), 4.27 (t, $J = 9.3$ Hz, Ram'-4), 4.36 (dq, $J = 6.1$ Hz, Ram'-5), 4.70 (dd, $J = 3.2, 9.2$ Hz, Ram'-3), 5.82 (d, $J = 0.97$ Hz, Ram'-1), 6.30 (dd, $J = 2.7$ Hz, Ram''-2), 1.40 (d, $J = 6.2$ Hz, Ram''-6), 4.36* (dq, $J = 6.1$ Hz, Ram''-5), 4.52 (dd, $J = 3.3, 9.2$ Hz, Ram''-3), 4.92* (Ram''-2), 5.74 (t, $J = 9.3$ Hz, Ram''-4), 6.18 (d, $J = 1.3$ Hz, Ram''-1), 3.73* (dd, $J = 6.7$ Hz, Glu-5), 3.90* (dd, $J = 9.1$ Hz, Glu-2), 3.93* (Glu-4), 4.01 (dd, $J = 3.0, 6.6$ Hz, Glu-6a), 4.04* (Glu-3), 4.35* (dd, $J = 3.9$ Hz, Glu-6b), 5.02 (d, $J = 7.7$ Hz, Glu-1), 0.85 (t, $J = 7.0$ Hz, Jal-16), 2.25 (ddd, $J = 3.8, 7.9, 14.6$ Hz, Jal-2a), 2.42* (ddd, $J = 3.9, 14.8$ Hz, Jal-2b), 3.81 (m, Jal-11), 0.77 (t, $J = 7.4$ Hz, mba-4), 1.01 (d, $J = 7.0$ Hz, mba-5), 2.39* (tq, $J = 6.9$ Hz, mba-2), 0.92 (t, $J = 7.4$, mba'-4), 1.19 (d, $J = 7.0$, mba'-5), 2.50 (tq, $J = 6.9$ Hz, mba'-2) (Resultados y discusión, sección 6.5.2, figura 37).

RMN ^{13}C (125 MHz, C_5D_5N , TMS): δ 17.3 (Fuc-6), 70.8 (Fuc-5), 72.9 (Fuc-4), 73.4 (Fuc-3), 80.0 (Fuc-2), 104.3 (Fuc-1), 19.1 (Ram-6), 68.9 (Ram-5), 69.4 (Ram-3), 73.6 (Ram-2), 81.4 (Ram-4), 98.5 (Ram-1), 18.9 (Ram'-6), 68.2 (Ram'-5), 73.0 (Ram'-2), 78.9 (Ram'-4), 80.2 (Ram'-3), 100.0 (Ram'-1), 18.0 (Ram''-6), 68.4 (Ram''-5), 70.3 (Ram''-3), 72.5 (Ram''-2), 75.2 (Ram''-4), 103.3 (Ram''-1), 62.9 (Glu-6), 71.5 (Glu-4), 75.2 (Glu-2), 78.0 (Glu-5), 78.5 (Glu-3), 105.5 (Glu-1), 14.3 (Jal-16), 34.2 (Jal-2), 82.3 (Jal-11), 173.1 (Jal-1), 11.4 (mba-4), 16.6 (mba-5), 41.2 (mba-2), 176.3 (mba-1), 11.8 (mba'-4), 17.0 (mba'-5), 41.5 (mba'-2), 176.3 (mba-1) [Espectro 6].

5.6.3 Obtención de la murucoidina III (3) y estoloniferina I (4)

Las pruebas preliminares para lograr la resolución de la subfracción B ($t_R = 7.16$ min) se efectuaron en columnas analíticas de fase reversa (C-18 y NH_2) con un sistema de detección de índice de refracción y un flujo de 0.7 mL/min. El sistema cromatográfico adecuado consintió en una columna analítica C-18 (4.6×300 mm, 5 μm); flujo: 0.7 mL/min; fase móvil $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (7:3); volumen de inyección 10 μL (1 mg/100 μL). Las condiciones instrumentales a nivel preparativo fueron las siguientes: columna C-18 preparativa Symetry, (19×300 mm, 7 μm); fase móvil: $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (7:3); flujo: 7.0 mL/min; detector: índice de refracción; concentración de la muestra: 10 mg/100 μL y volumen de inyección: 100 μL . El cromatograma obtenido en estas condiciones se muestra en la figura 33 (Resultados y discusión, sección 6.4). En esta ocasión, de la fracción primaria XX se obtuvieron 180 mg de la subfracción B, la cual se encuentra constituida por dos compuestos mayoritarios, B-5 ($t_R = 17.54$ min) y B-7 ($t_R = 26.86$ min). Cada uno de estos picos se cortaron y, posteriormente, los compuestos mayoritarios fueron reciclados mediante la técnica de sobrecarga de columna y corte del núcleo. Este análisis de la subfracción B proporcionó la **estoloniferina I (B-5)** y la **murucoidina III (B-7)**.

Murucoidina III (3): sólido blanco; p.f. 146-150°C; $[\alpha]_D -29.3$ (c 0.1, MeOH); **EM-FAB (modo negativo) m/z (%):** 1167 $[\text{M-H}]^-$ (55) ($\text{C}_{56}\text{H}_{96}\text{O}_{25}$), 1083 $[\text{M-H} - \text{C}_5\text{H}_9\text{O} (\text{mba-H})]^-$ (10), 937 $[1085 - 146 (\text{metilpentosa})]^-$ (5), 545 $[939 - 162 (\text{hexosa}) - 146 (\text{metilpentosa}) - \text{C}_5\text{H}_9\text{O}]^-$ (35), 417 $[545 + 18 (\text{hidrólisis de la lactona}) - 146 (\text{metilpentosa})]^-$ (100), 271 $[417 - 146 (\text{metilpentosa}) - \text{ácido jalapínico} - \text{H}]^-$ (25).

RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 1.50 (d, $J = 6.3$ Hz, Fuc-6), 3.80 (dq, $J = 6.3$ Hz, Fuc-5), 3.90* (Fuc-4), 4.19 (dd, $J = 9.3, 3.0$ Hz, Fuc-3), 4.50 (dd, $J = 8.0$ Hz, Fuc-2), 4.82 (d, $J = 7.9$ Hz, Fuc-1), 1.60 (d, $J = 6.1$, Ram-6), 4.66 (dd, $J = 9.8$ Hz, Ram-4), 4.98 (dq, $J = 6.0$, Ram-5), 5.22* (Ram-2), 5.64 (dd, $J = 2.7, 10$ Hz, Ram-3), 6.34 (d, $J = 1.3$, Ram-1), 1.56 (d, $J = 6.2$ Hz, Ram'-6), 4.23 (dd, $J = 9.2$, Ram'-4), 4.32 (dq, $J = 6.6$ Hz, Ram'-5),

4.56 (dd, $J = 3.4, 9.0$ Hz, Ram'-3), 5.58 (d, $J = 1.3$ Hz, Ram'-1), 6.00 (dd, $J = 3.3, 1.6$ Hz, Ram'-2), 1.38 (d, $J = 6.3$ Hz, Ram''-6), 4.32 (dq, $J = 6.6$ Hz, Ram''-5), 4.43 (dd, $J = 3.2, 10.0$ Hz, Ram''-3), 4.88* (Ram''-2), 5.72 (dd, $J = 9.3$ Hz, Ram''-4), 6.16 (d, $J = 1.7$ Hz, Ram''-1), 3.80* (Glu-5), 3.90* (Glu-2), 4.12* (Glu-3), 4.14 (dd, $J = 8.8$ Hz, Glu-4), 4.33 (dd, $J = 6.5$ Hz, Glu-6a), 4.44 (dd, $J = 3.2$ Hz, Glu-6b), 5.05 (d, $J = 7.6$ Hz, Glu-1), 0.90 (t, $J = 7.4$ Hz, Jal-16), 2.23 (ddd, $J = 2.8, 7.2, 14.6$ Hz, Jal-2a), 2.55 (ddd, $J = 3.2, 14.6$ Hz, Jal-2b), 3.88 (m, Jal-11), 0.83 (t, $J = 7.4$ Hz, mba-4), 1.10 (d, $J = 6.9$ Hz, mba-5), 2.44 (tq, $J = 6.9$ Hz, mba-2), 0.92 (t, $J = 7.4$, mba'-4), 1.18 (d, $J = 7.0$, mba'-5), 2.48 (tq, $J = 6.9$ Hz, mba'-2) (Resultados y discusión, sección 6.5.2, figura 37).

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 17.2 (Fuc-6), 71.3 (Fuc-5), 73.6 (Fuc-4), 73.6 (Fuc-2), 76.6 (Fuc-3), 101.5 (Fuc-1), 18.7 (Ram-6), 68.0 (Ram-5), 70.0 (Ram-2), 75.7 (Ram-4), 78.3 (Ram-3), 100.1 (Ram-1), 19.2 (Ram'-6), 68.1 (Ram'-5), 72.2 (Ram'-2), 78.8 (Ram'-4), 80.2 (Ram'-3), 99.1 (Ram'-1), 18.0 (Ram''-6), 68.1 (Ram''-5), 70.2 (Ram''-3), 72.4 (Ram''-2), 75.2 (Ram''-4), 103.4 (Ram''-1), 62.6 (Glu-6), 70.8 (Glu-4), 75.2 (Glu-2), 77.8 (Glu-3), 78.1 (Glu-5), 105.1 (Glu-1), 14.5 (Jal-16), 34.3 (Jal-2), 79.5 (Jal-11), 174.4 (Jal-1), 11.6 (mba-4), 16.8 (mba-5), 41.3 (mba-2), 176.1 (mba-1), 11.7 (mba'-4), 17.0 (mba'-5), 41.5 (mba'-2), 176.3 (mba'-1) [Espectro 7].

Estoloniferina I (4): sólido blanco; **p.f.** 156-161°C; $[\alpha]_D -77.7$ (c 0.1, MeOH); **EM-FAB (modo negativo) m/z (%):** 1151 $[\text{M}-\text{H}]^-$ (63) ($\text{C}_{56}\text{H}_{97}\text{O}_{24}$), 1067 $[\text{M}-\text{H}-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}(\text{mba}-\text{H})]^-$ (10), 921 $[1067-146(\text{metilpentosa})]^-$ (10), 545 $[921-2 \times 146(\text{metilpentosa})-\text{C}_5\text{H}_9\text{O}]^-$ (30), 417 $[545+18(\text{hidrólisis de la lactona})-146(\text{metilpentosa})]^-$ (100), 271 $[417-146(\text{metilpentosa})-\text{H}]^-$ (20) (Resultados y discusión, sección 6.5.5.1, figura 46).

RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 1.51 (d, $J = 6.4$ Hz, Fuc-6), 3.80 (dq, $J = 0.8, 6.4$ Hz, Fuc-5), 3.91 (dd, $J = 3.2$ Hz, Fuc-4), 4.18 (dd, $J = 9.4, 3.4$ Hz, Fuc-3), 4.52 (dd, $J = 7.8$ Hz, Fuc-2), 4.82 (d, $J = 6.0$ Hz, Fuc-1), 1.55 (d, $J = 6.2$, Ram-6), 4.64 (dd, $J = 9.8$ Hz, Ram-4), 5.00 (dq, $J = 6.0$, Ram-5), 5.30* (Ram-2), 5.60* (Ram-3), 6.33 (d, $J = 1.4$, Ram-1),

1.59 (d, J = 6.1 Hz, Ram'-6), 4.21 (dd, J = 9.4, Ram'-4), 4.32 (dq, J = 9.9, 6.3 Hz, Ram'-5), 4.52 (dd, J = 7.8 Hz, Ram'-3), 5.62* (Ram'-1), 5.78 (dd, J = 3.3 Hz, Ram'-2), 1.37 (d, J = 6.3 Hz, Ram''-6), 4.33* (Ram''-5), 4.42 (dd, J = 3.6, 8.0 Hz, Ram''-3), 4.67* (Ram''-2), 5.77 (dd, J = 3.3 Hz, Ram''-4), 5.85* (Ram''-1), 1.73 (d, J = 6.0 Hz, Ram'''-6), 4.25 (dd, J = 8.4 Hz, Ram'''-4), 4.27 (dq, J = 9.3, 5.9 Hz, Ram'''-5), 4.41 (dd, J = 3.6, 8.9 Hz, Ram'''-3), 4.78 (dd, J = 1.3, 3.2 Hz, Ram'''-2), 5.58* (Ram'''-1), 0.92 (t, J = 7.4 Hz, Jal-16), 2.22 (ddd, J = 2.6, 7.0, 15.0 Hz, Jal-2a), 2.77 (ddd, J = 2.4, 10.4, 15.0 Hz, Jal-2b), 3.85 (m, Jal-11), 0.87 (t, J = 7.4 Hz, mba-4), 1.12 (d, J = 7.0 Hz, mba-5), 2.38 (tq, J = 7.0 Hz, mba-2), 0.92 (t, J = 7.4 Hz, mba'-4), 1.19 (d, J = 7.0 Hz, mba'-5), 2.47 (tq, J = 7.0 Hz, mba'-2) (Resultados y discusión, sección 6.5.1, figura 34).

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 16.9 (Fuc-6), 71.5 (Fuc-5), 73.2 (Fuc-2), 73.3 (Fuc-4), 76.3 (Fuc-3), 101.3 (Fuc-1), 18.9 (Ram-6), 67.6 (Ram-5), 69.5 (Ram-2), 72.5 (Ram-4), 77.8 (Ram-3), 99.9 (Ram-1), 18.5 (Ram'-6), 67.9 (Ram'-5), 74.5 (Ram'-2), 79.3 (Ram'-3), 79.6 (Ram'-4), 98.6 (Ram'-1), 17.6 (Ram''-6), 67.9 (Ram''-5), 72.2 (Ram''-3), 72.4 (Ram''-4), 76.4 (Ram''-2), 103.6 (Ram''-1), 18.4 (Ram'''-6), 68.2 (Ram'''-5), 69.9 (Ram'''-3), 70.3 (Ram'''-4), 72.3 (Ram'''-2), 104.3 (Ram'''-1), 14.1 (Jal-16), 33.6 (Jal-2), 79.1 (Jal-11), 174.4 (Jal-1), 11.5 (mba-4), 16.6 (mba-5), 41.1 (mba-2), 175.1 (mba-1), 11.5 (mba'-4), 16.7 (mba'-5), 41.3 (mba'-2), 176.0 (mba'-1) [Espectro 8].

5.7 Preparación de derivados de la jalapina de *Ipomoea murucoides*

Las subfracciones H y J se acetilaron para obtener sus derivados peracetilados correspondientes (**H-Ac** y **J-Ac**) según la metodología descrita en la sección 5.4.2. Las pruebas preliminares para lograr la separación de estos derivados se efectuaron en columnas analíticas de fase reversa (C-18) y normal (gel de sílice, μ Porasil) con un sistema de detección de índice de refracción y flujo de 0.6 mL/min. El sistema cromatográfico adecuado consistió en una columna analítica C-18 (4.6 $\times$ 300 mm, 5 μ m); flujo: 0.6 mL/min; fase móvil MeOH (100%); volumen de inyección 10 μ L (1 mg/10 μ L).

Las condiciones instrumentales a nivel preparativo adecuadas fueron las siguientes: columna C-18 Symetry, (19 × 300 mm, 7 μm); fase móvil: MeOH (100%); flujo: 9.0 mL/min; detector: índice de refracción; concentración de la muestra: 10 mg/100 μL y volumen de inyección: 100 μL. De esta forma, se consiguió la purificación de 11 mg del derivado **H-Ac** (t_R = 14.74 min) y 28 mg del derivado **J-Ac** (t_R = 14.17 min).

H-Ac: sólido blanco; p.f. 98-105°C, RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 1.19 (d, J = 6.3 Hz, Fuc-6), 3.97 (q, J = 6.3 Hz, Fuc-5), 4.27* (Fuc-2), 4.89 (d, J = 7.5 Hz, Fuc-1), 5.57* (dd, J = 3.3 Hz, Fuc-3), 5.60* (dd, J = 3.0 Hz, Fuc-4), 1.45 (d, J = 6.0 Hz, Ram-6), 4.25* (Ram-4), 4.92* (Ram-5), 5.56* (Ram-1), 5.59* (dd, J = 1.8 Hz, Ram-2), 5.77* (Ram-3), 1.60 (d, J = 6.0 Hz, Ram'-6), 4.23* (Ram'-4), 4.34* (dq, J = 6.6 Hz, Ram'-5), 4.55 (dd, J = 2.7, 8.7 Hz, Ram'-3), 5.43* (Ram'-1), 5.47 (dd, J = 2.7 Hz, Ram'-2), 1.53 (d, J = 6.0 Hz, Ram''-6), 5.36* (Ram''-1), 5.66* (Ram''-5), 5.77 (dd, J = 1.5, 3.4 Hz, Ram''-2), 5.80 (dd, J = 3.3 Hz, Ram''-3), 4.23 (Ram''-4), 1.37 (d, J = 6.3 Hz, Ram'''-6), 3.95* (Ram'''-5), 4.41* (Ram'''-4), 5.65* (Ram'''-1), 5.78* (Ram'''-3), 5.81* (Ram'''-2), 0.86 (t, J = 6.6 Hz, Jal-16), 3.93 (m, Jal-11), 0.84 (t, J = 7.4 Hz, mba-4), 1.14 (d, J = 6.9 Hz, mba-5), 2.46* (dd, J = 6.3 Hz, mba-2), 0.97 (t, J = 7.4 Hz, mba'-4), 1.11 (d, J = 6.9 Hz, mba'-5), 2.41* (dd, J = 6.9 Hz, mba'-2) [Espectro 9].

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 16.9 (Fuc-6), 69.1 (Fuc-5), 69.9 (Fuc-4), 72.7 (Fuc-3), 77.9 (Fuc-2), 104.2 (Fuc-1), 18.0 (Ram-6), 69.9 (Ram-2), 70.5 (Ram-3), 80.0 (Ram-4), 98.4 (Ram-1), 80.0 (Ram-5), 19.4 (Ram'-6), 72.8 (Ram'-2), 77.9 (Ram'-3), 79.0 (Ram'-5), 79.9 (Ram'-4), 100.1 (Ram'-1), 19.1 (Ram''-6), 70.0 (Ram''-5), 70.5 (Ram''-2), 70.7 (Ram''-3), 79.0 (Ram''-4), 100.8 (Ram''-1), 18.0 (Ram'''-6), 68.5 (Ram'''-4), 69.1 (Ram'''-5), 70.7 (Ram'''-2), 72.7 (Ram'''-3), 100.2 (Ram'''-1), 14.7 (Jal-16), 83.2 (Jal-11), 172.3 (Jal-1), 12.1 (mba-4), 17.3 (mba-5), 41.8 (mba-2), 175.2 (mba-1), 12.3 (mba'-4), 17.3 (mba'-5), 41.8 (mba'-2), 175.7 (mba'-1) [Espectro 10].

J-Ac: p.f. 102-110°C: RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 1.20 (d, J = 6.4 Hz, Fuc-6), 4.21* (Fuc-5), 4.21* (dd, J = 7.6, 10.1 Hz, Fuc-2), 4.85 (d, J = 7.5 Hz, Fuc-1), 5.50* (dd, J

= 3.6 Hz, Fuc-3), 5.57 (dd, J = 3.6, 0.7 Hz, Fuc-4), 1.36 (d, J = 6.5 Hz, Ram-6), 4.33* (dd, J = 3.5 Hz, Ram-4), 5.62* (dd, J = 10 Hz, Ram-3), 5.72* (Ram-5), 5.81* (Ram-1), 5.93 (dd, J = 1.6, 3.5 Hz, Ram-2), 1.57 (d, J = 5.7 Hz, Ram'-6), 4.22* (dd, J = 10.1 Hz, Ram'-4), 4.71 (dd, J = 3.5, 8.5 Hz, Ram'-3), 5.41 (d, J = 1.8 Hz, Ram'-1), 5.49* (dd, J = 3.4 Hz, Ram'-2), 5.82* (Ram'-5), 1.54 (d, J = 6.1 Hz, Ram''-6), 4.12 (dd, J = 9.3, 9.4 Hz, Ram''-4), 4.29* (Ram''-5), 5.52* (Ram''-1), 5.57* (dd, J = 3.6, 0.7 Hz, Ram''-2), 5.68* (Ram''-3), 3.95* (Glu-5), 4.42 (dd, J = 2.4, 12.6 Hz, Glu-6a), 4.64 (dd, J = 3.4, 12.6 Hz, Glu-6b), 5.25 (d, J = 7.9 Hz, Glu-1), 5.33 (dd, J = 7.9, 9.6 Hz, Glu-2), 5.48* (dd, J = 9.7 Hz, Glu-4), 5.69* (dd, J = 9.4 Hz, Glu-3), 0.88 (t, J = 6.8 Hz, Jal-16), 2.31 (Jal-2a), 2.44* (Jal-2b), 3.90 (m, Jal-11), 0.86 (t, J = 7.4 Hz, mba-4), 1.15 (d, J = 7.0 Hz, mba-5), 2.47* (dd, J = 7.1 Hz, mba-2), 0.94 (t, J = 7.4 Hz, mba'-4), 1.08 (d, J = 7.0 Hz, mba'-5), 2.41* (dd, J = 6.9 Hz, mba'-2) [Espectro 11].

RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, TMS): δ 16.5 (Fuc-1), 71.0 (Fuc-4), 72.4 (Fuc-3), 77.0 (Fuc-2), 77.0 (Fuc-5), 103.7 (Fuc-1), 17.6 (Ram-6), 67.8 (Ram-4), 70.3 (Ram-5), 70.6 (Ram-2), 70.7 (Ram-3), 97.9 (Ram-1), 18.7 (Ram'-6), 69.4 (Ram'-5), 73.0 (Ram'-2), 77.2 (Ram'-3), 77.7 (Ram'-4), 100.4 (Ram'-1), 18.9 (Ram''-6), 68.7 (Ram''-5), 71.0 (Ram''-2), 73.2 (Ram''-3), 80.8 (Ram''-4), 98.2 (Ram''-1), 61.5 (Glu-6), 72.3 (Glu-2), 72.5 (Glu-5), 72.9 (Glu-4), 73.2 (Glu-3), 100.4 (Glu-1), 14.2 (Jal-16), 33.9 (Jal-2), 82.8 (Jal-11), 172.8 (Jal-1), 11.6 (mba-4), 16.8 (mba-5), 41.4 (mba-2), 175.5 (mba-1), 11.6 (mba'-4), 16.2 (mba'-5), 41.4 (mba'-2), 175.8 (mba'-1) [Espectro 12].

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La preparación del extracto clorofórmico de las flores de *Ipomoea murucoides* permitió la obtención de 59 g de jalapina. El total de la jalapina se sometió a un fraccionamiento primario en columna abierta para lograr la separación preliminar de los constituyentes presentes en el extracto en grupos de fracciones primarias que fueron reunidas de acuerdo a su homogeneidad cromatográfica. La elución se realizó con un sistema binario de CHCl_3 -MeOH mediante el incremento gradual de la polaridad. Se obtuvieron veintisiete fracciones, figura 24 (Parte experimental, sección 5.3.1) en orden creciente de polaridad (I-XXVII).

La fracción XX, siendo una de las mayoritarias, se sometió a un tratamiento alcalino con el fin de generar los ácidos glicosídicos que representarían cada uno de los núcleos oligosacáridos constitutivos de la fracción. Al término de la saponificación, el residuo glicosídico se acetiló y metiló. La purificación de los ácidos glicosídicos acetilados-metilados de *Ipomoea murucoides* se realizó mediante un análisis por CLAE, el empleo de esta técnica fue determinante para lograr la separación y la purificación de los constituyentes de la muestra.

6.1 Hidrólisis alcalina. Determinación de los ácidos grasos

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 25.

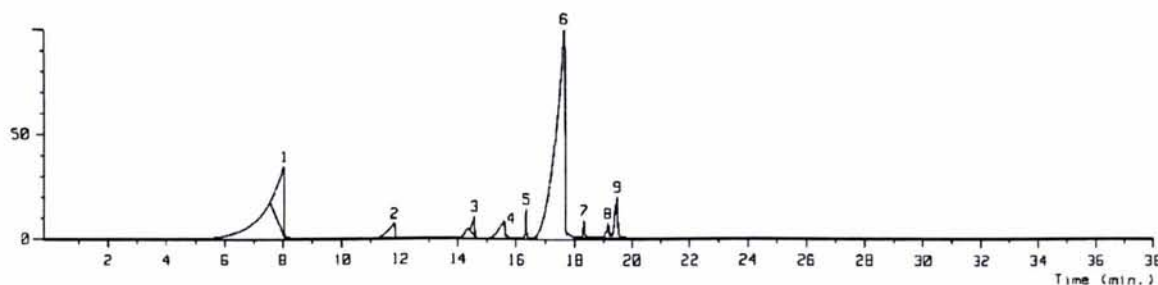


Figura 25. Cromatograma de gases obtenido para la fase etérea de la hidrólisis alcalina de la fracción primaria XX de la jalapina de *Ipomoea murucoides*.

Los resultados del análisis por espectrometría de masas de cada uno de los picos correspondientes se resumen en el **cuadro 1**; la identificación de los mismos se realizó mediante la comparación de los patrones de fragmentación observados para cada constituyente con los espectros generados por las muestras auténticas utilizadas como referencias y disponibles en un banco de datos. Estos ácidos se encuentran esterificando a los carbohidratos de la cadena oligosacárida y se liberan al hidrolizar sus enlaces tipo éster.

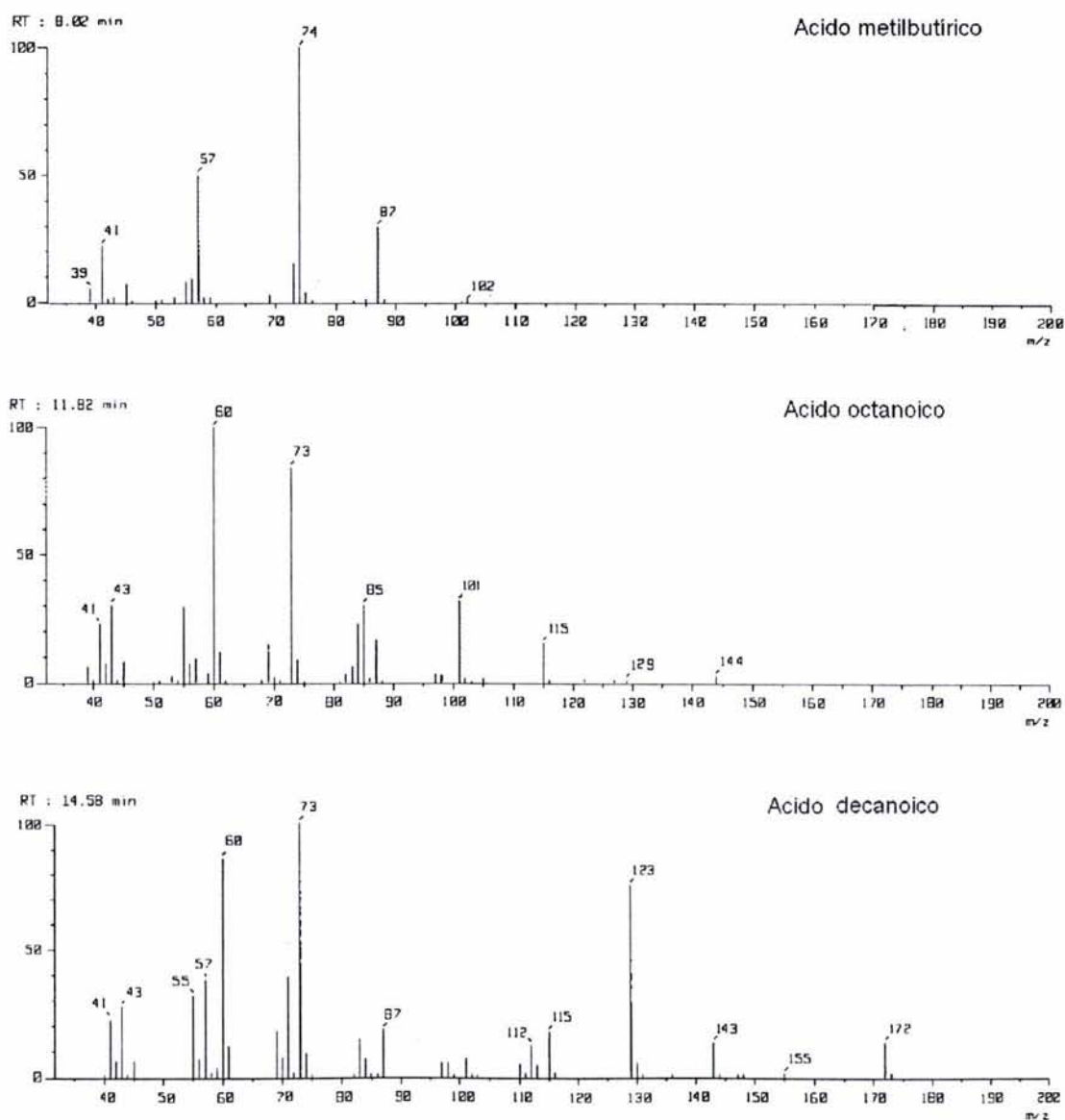


Figura 26. Espectros de masas para los ácidos grasos metilbutírico, octanoico y decanoico de la fase etérea de la hidrólisis alcalina.

t_R (min)	Fragmentos	Identificación
8.02	$[M]^+$ 102 (2), 87 (30), 74 (100), 57 (50), 41 (28), 39 (8)	Acido metilbutírico
11.82	$[M]^+$ 144 (5), 129 (2), 115 (18), 101 (32), 85 (32), 73 (85), 60 (100), 43 (35), 41 (20)	Acido octanoico
14.58	$[M]^+$ 172 (12), 155 (5), 143 (12), 129 (72), 115 (20), 112 (12), 87 (20), 73 (100), 60 (87), 57 (40), 55 (30), 43 (25), 41 (20)	Acido decanoico
17.64	$[M]^+$ 200 (40), 183 (5), 171 (20), 157 (43), 143 (12), 129 (50), 115 (20), 101 (15), 85 (30), 73 (100), 60 (78), 57 (40), 43 (32), 41 (25)	Acido dodecanoico

Cuadro 1. Análisis mediante CG-EM de la fase etérea obtenida de la hidrólisis alcalina

6.2 Separación de los ácidos glicosídicos acetilados–metilados mayoritarios mediante CLAE

La similitud estructural entre los constituyentes de las mezclas de glicoresinas constituye el principal obstáculo que ha impedido el empleo de las técnicas cromatográficas convencionales (cromatografía en columna abierta, cromatografía en capa fina preparativa, etc.) para lograr su completa purificación. El éxito para la resolución total de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas ha dependido únicamente del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

Con el propósito de lograr la purificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios presentes en la parte jalapina de *Ipomoea murucoides*, se requirió de la implementación de la técnica de CLAE a nivel analítico y preparativo. La primera permitió determinar las condiciones instrumentales adecuadas y la segunda, se utilizó con el fin de separar y purificar los derivados mayoritarios para su posterior análisis espectroscópico.

Se realizaron pruebas a nivel analítico de la mezcla de saponificación **XX-HAM** usando columnas de fase normal (gel de sílice) y de fase reversa utilizando como adsorbente dimetiloctadecilsilano (C-18), ya que el uso de éstas se ha descrito para la purificación de los ácidos glicosídicos resultantes del proceso de hidrólisis alcalina de las resinas.⁵¹

Debido a que la mejor resolución se obtuvo con la columna C-18, al utilizarse el sistema de elución binario CH₃CN-MeOH (95:5) a un flujo de 0.7 mL/min, se realizó el escalamiento de estas condiciones instrumentales analíticas a un nivel preparativo (Parte experimental, sección 5.5). La figura 27 ilustra el cromatograma obtenido a nivel preparativo.

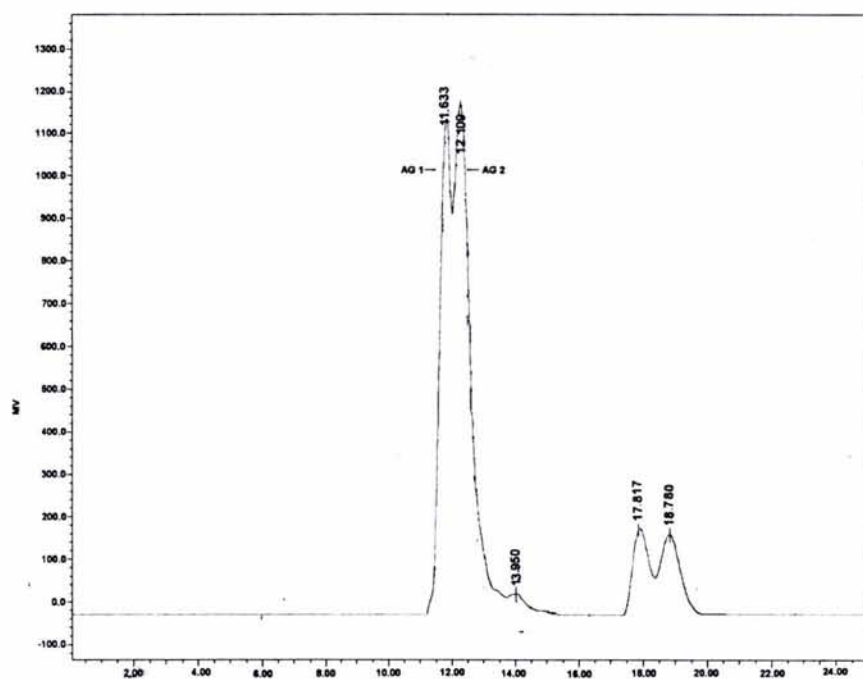


Figura 27. Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo por el producto **XX-HAM**.

Los compuestos mayoritarios **AG-1** ($t_R = 9.23$ min) y **AG-2** ($t_R = 9.54$ min), correspondieron a los ésteres metílicos de los ácidos glicosídicos mayoritarios previamente descritos para la jalapina de *Ipomoea pes-caprae*⁶³ e *Ipomoea intrapilosa*. Las estructuras de estos ácidos se comprobaron al realizar una coelución de los ácidos **AG-1** y **AG-2** con

muestras auténticas. Para garantizar la purificación de estos ácidos, los dos picos se sometieron, de manera independiente, a la técnica de corte de núcleo y reciclaje de muestra. La figura 28 muestra el cromatograma obtenido al cabo de una secuencia de ciclos a través de la misma columna. A partir del segundo ciclo, se inició el desdoblamiento del pico en reciclaje, al término del cuarto ciclo se procedió al corte de uno de ellos. Un total de ocho ciclos adicionales fueron suficientes para obtener la máxima pureza de la muestra problema.

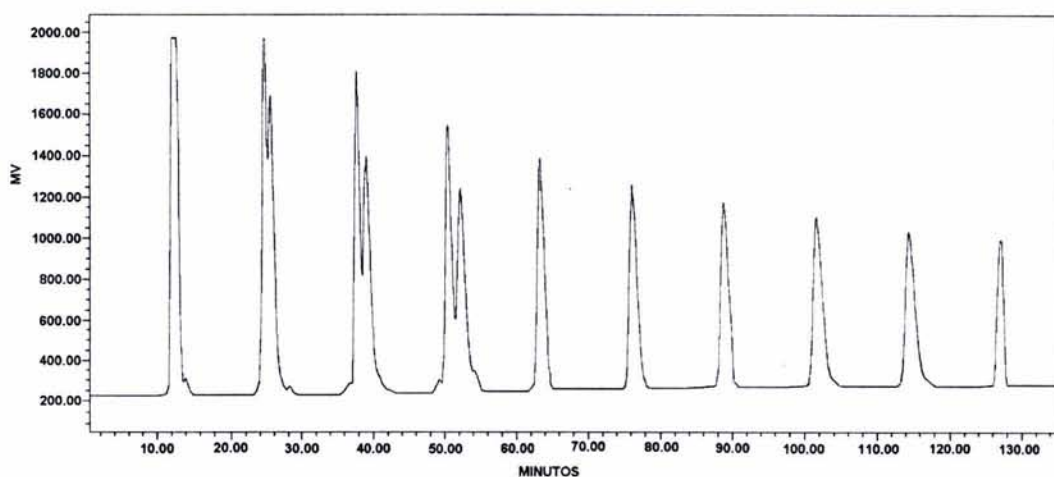


Figura 28. Cromatograma correspondiente a la purificación mediante CLAE del derivado peracetilado-metilado AG-1 en donde se ilustra el empleo de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra. Condiciones instrumentales: columna C-18 (19 × 300 mm, 7 μ m), fase móvil CH₃CN/H₂O 95:5.

6.2.1 Caracterización de los ácidos peracetilados-metilados AG-1 y AG-2

Los espectros unidimensionales de ¹H y ¹³C fueron el primer paso para obtener una información general acerca de las estructuras de los ácidos glicosídicos acetilados-metilados estudiados. Los desplazamientos químicos alrededor de 98-100 ppm en el espectro de ¹³C correspondientes a los carbonos anoméricos, asistidos con el experimento HMQC, permitieron establecer el número de unidades monosacáridas presentes en los núcleos [Espectros 2a y 4a]. Esta zona mostró tres señales de carbonos anoméricos que

interactuaban con cinco protones y, por lo tanto se postuló la presencia de un núcleo pentasacárido. Al comparar los espectros unidimensionales de ^1H y ^{13}C con los ácidos previamente descritos para la jalapina de *Ipomoea pes-caprae* e *Ipomoea intrapilosa*, se observaron señales diagnósticas o características como la señal que aparece alrededor de δ 61.2 en el espectro de ^{13}C , la cual corresponde al carbono del hidroximetileno de la glucosa, para el compuesto **AG-2**, señal no observada en el compuesto **AG-1**. Por lo tanto, se infirió que se trataba de dos ácidos glicosídicos con diferentes carbohidratos.

El análisis del espectro de RMN ^1H [Espectros **1a** y **3a**] asistido con el experimento HMQC reveló la presencia de cinco señales correspondientes a los protones anoméricos en la zona de 4.9 a 5.7 ppm, lo cual confirmó la presencia de cinco unidades monosacáridas en las moléculas, como se había propuesto con base en el número de señales observadas para los carbonos anoméricos. Las cuatro señales dobles presentes entre 1.2-1.7 ppm son características de los protones de los grupos metilos de 6-desoxihexosas. Esta observación confirmó que de los cinco monosacáridos presentes en **AG-2**, cuatro corresponden a metilpentosas (**cuadro 2**); sin embargo, para el otro compuesto el **AG-1** en la misma zona se observó la presencia de cinco señales dobles, indicando que los cinco monosacáridos presentes corresponden a metilpentosas (**cuadro 2**)

Derivado	Carbohidratos	^1H -1 (ppm)	^{13}C -1 (ppm)	^1H -6 (ppm)
AG-1	Fucosa	4.96 d (7.7)	99.7	1.21 (6.3)
	Ramnosa	5.65 sa*	99.1	1.32 (6.2)
	Ramnosa'	5.53 sa*	97.4	1.42 (6.2)
	Ramnosa''	5.35 sa	99.7	1.58 (5.8)
	Ramnosa'''	5.41 sa	99.1	1.66 (6.2)
AG-2	Fucosa	4.97 d (7.7)	99.8	1.22 (6.4)
	Ramnosa	5.48 sa*	97.8	1.67 (6.1)
	Ramnosa'	5.33 sa	100.0	1.56 (5.5)
	Ramnosa''	5.68 sa*	97.7	1.30 (6.2)
	Glucosa	5.20 d (7.8)	99.9	

*Señales sobrepuestas en el espectro. En las columnas ^1H -1 y ^1H -6 se presentan entre paréntesis la constante de acoplamiento en Hz.

Cuadro 2. Desplazamientos químicos (RMN ^1H y ^{13}C) para las señales anoméricas y los grupos metilo de los monosacáridos presentes en los ácidos glicosídicos acetilados-metilados mayoritarios de la porción jalapina de *Ipomoea murucoides*.

Con el auxilio de las técnicas espectroscópicas bidimensionales en la RMN (COSY y TOCSY), y al considerar que los núcleos están compuestos de cinco unidades monosacáridas, uno por cinco unidades de metilpentosas (**AG-1**) y el otro por cuatro unidades de metilpentosas y una hexosa (**AG-2**), se pudo resolver la asignación de las señales para los protones metinos entre 4.0-5.7 ppm. Esta zona presentó una gran complejidad producto de la sobreposición de las señales. También, se logró diferenciar entre las metilpentosas a través de los valores de las constantes de acoplamiento observados en las unidades monosacáridas.

La secuencia de glicosidación, en primer lugar se realizó considerando los desplazamientos químicos de las señales localizadas fácilmente en los experimentos COSY y TOCSY para las unidades de los monosacáridos. En segundo lugar, partiendo del conocimiento de que los grupos hidroxilos disponibles en las unidades de los monosacáridos se convirtieron en ésteres de acetato, entonces las señales cuyos desplazamientos químicos aparecieran a campos bajos por arriba de 5.3 ppm indicaban las respectivas posiciones de acetilación y, las que estuvieran por abajo correspondían a las posiciones anoméricas y de glicosidación de las metilpentosas. El efecto desprotector más fuerte del grupo acetato con respecto al efecto de los enlaces etéreos glicosídicos hizo posible la distinción de las posiciones que están glicosiladas, de aquellas acetiladas.

Finalmente, la técnica espectroscópica RMN bidimensional HMBC permitió la asignación de la secuencia de glicosidación en los dos ácidos mediante el estudio de los acoplamientos ^1H - ^{13}C a larga distancia (2,3J). La figura 29 ilustra los cuadros de conectividades entre los monosacáridos de **AG-1** y la figura 30 para los observados en el espectro de **AG-2**.

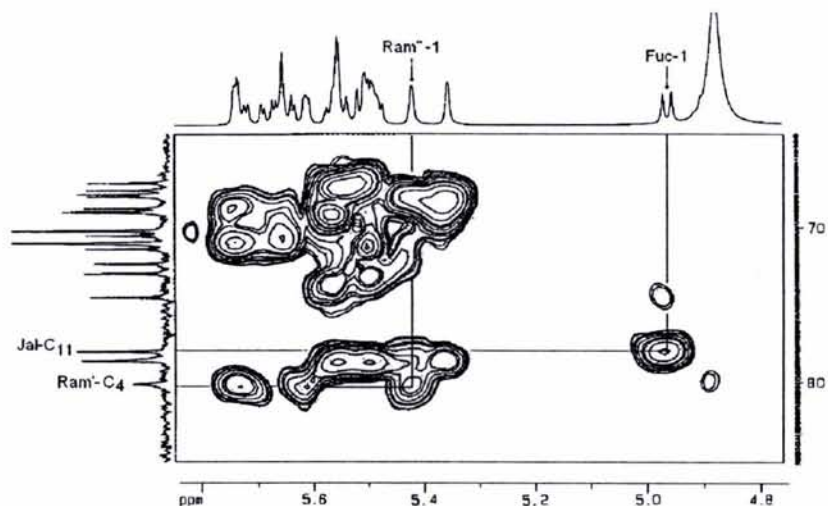


Figura 29. Sección del espectro HMBC del ácido glicosídico AG-1 en donde se muestra la correlación entre el H-1 de la fucosa y ramnosa'' con el C-11 de la aglicona y C-4 de la ramnosa', respectivamente.

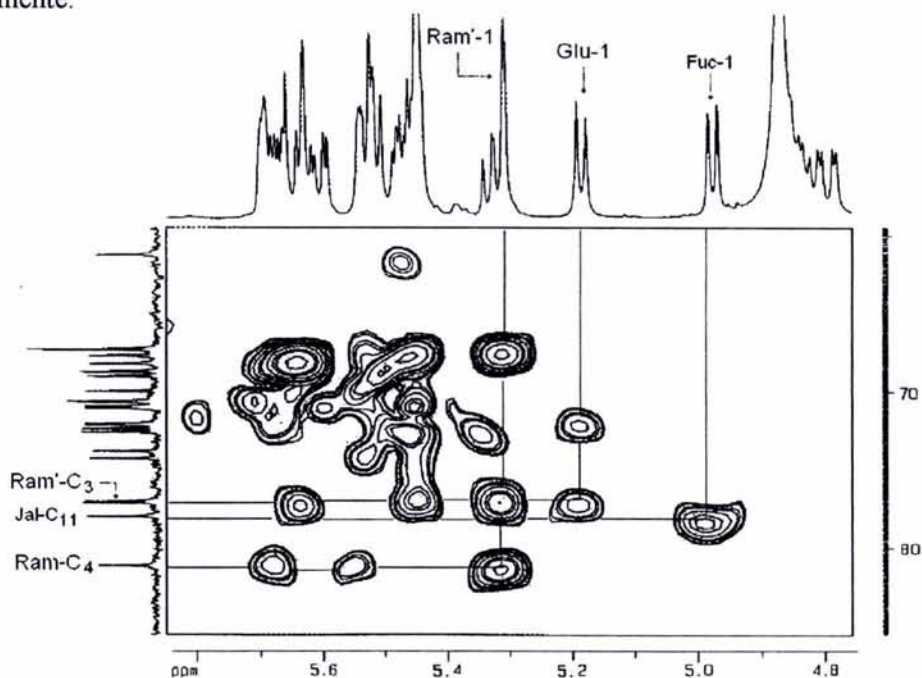


Figura 30. Sección del espectro HMBC del ácido glicosídico AG-2 en donde se muestra la correlación entre el H-1 de la fucosa, glucosa y ramnosa' con el C-11 de la aglicona, C-3 de las ramnosa' y C-4 de la ramnosa, respectivamente.

Los resultados anteriores permitieron identificar al ácido glicosídico **AG-1** como 11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)] α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico-

(ácido simónico B) y al compuesto **AG-2** como 11-O- β -D-glucopiranosil- (1 $\rightarrow$ 3)-O-[O- β -D-ramnopiranosil (1 $\rightarrow$ 4)] β -D-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico (ácido operculínico A). Las estructuras determinadas para los ácidos **AG-1** y **AG-2** (figura 31) representan los esqueletos básicos de los compuestos individuales aislados, faltando por determinar el número y la naturaleza de los grupos acilantes presentes en la cadena oligosacárida, así como los sitios de esterificación.

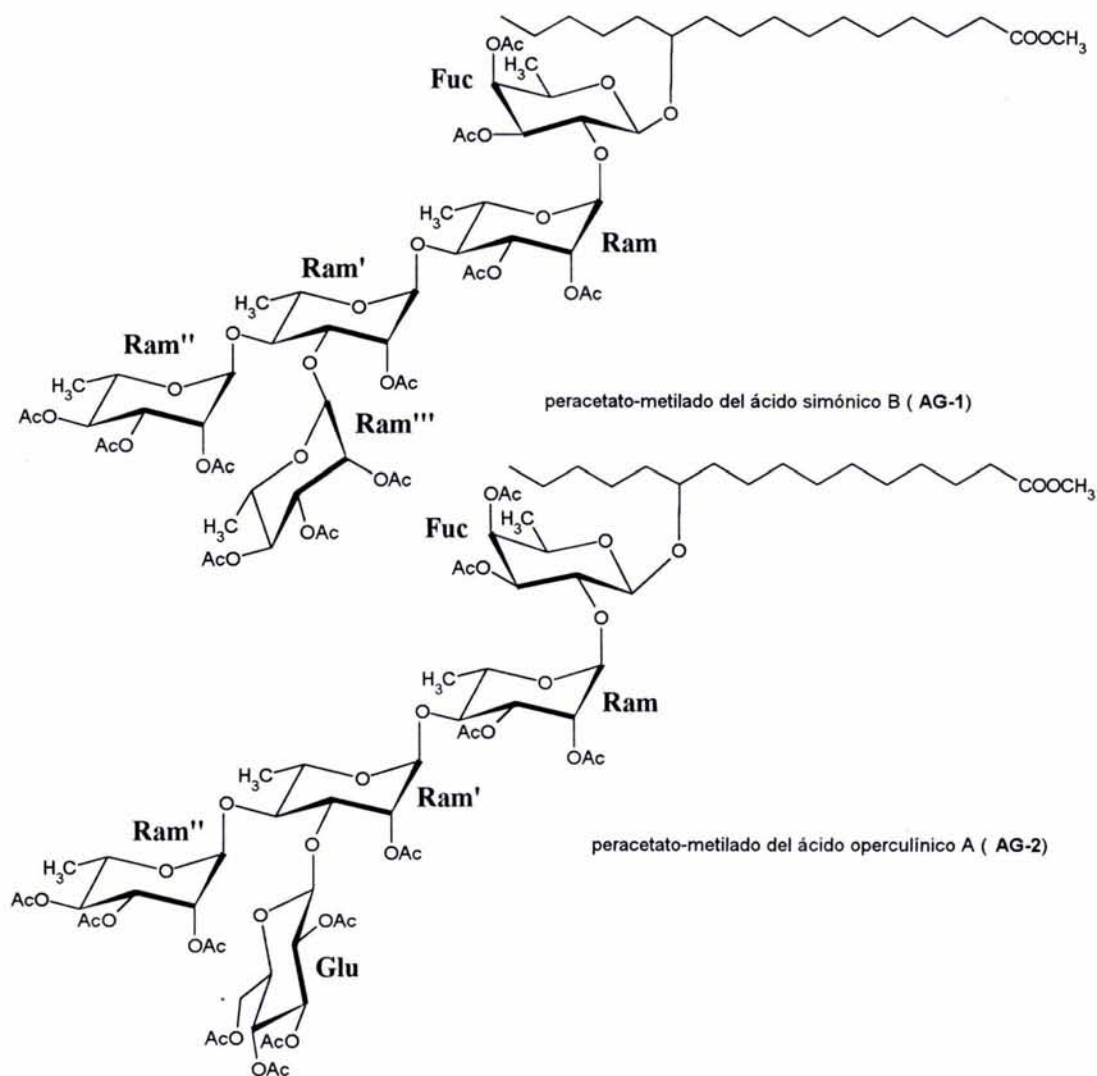


Figura 31. Estructuras de los ácidos glicosídicos acetilados-metilados de la fracción primaria **XX** de la porción jalapina de *Ipomoea murucoides*. Abreviaturas: Fuc = fucosa, Ram = ramnosa, Glu = glucosa.

6.3 Análisis mediante CLAE de la fracción primaria XX de la jalapina de *Ipomoea murucoides*

Una vez efectuado el análisis cromatográfico y la separación de los ácidos glicosídicos peracetilados-metilados obtenidos a partir de la saponificación, acetilación y metilación de la fracción primaria **XX**, se inició la búsqueda de las condiciones de separación y purificación en cromatografía líquida de alta eficiencia de los glicolípidos individuales constituyentes de la fracción en estudio.

Se realizaron pruebas preliminares para lograr la separación de los principios presentes en la fracción primaria **XX** en un sistema cromatográfico con detector de índice de refracción debido a que el análisis de los ácidos grasos mostró que la fracción en estudio no posee grupos cromóforos capaces de ser visibles en el detector de UV.

Se utilizaron columnas analíticas de fase reversa (C-18) y aminopropilmetilsilano (NH₂). El sistema cromatográfico adecuado consistió en una columna analítica C-18 (4.6 × 300 mm, 5 μm); flujo: 0.7 mL/min; fase móvil CH₃CN-MeOH (90:10); se realizó el escalamiento de estas condiciones instrumentales a un nivel preparativo (Parte experimental, sección 5.6). La fracción primaria **XX** se fraccionó en catorce subfracciones (A-N). La figura 32 ilustra el cromatograma obtenido a nivel preparativo.

El fraccionamiento de la fracción primaria **XX** (2.0 g) a nivel preparativo se efectuó varias veces hasta obtener cantidades suficientes de las subfracciones mayoritarias B ($t_R = 7.16$ min, 180 mg), H ($t_R = 24.35$ min, 300 mg) y J ($t_R = 30.09$ min, 352 mg), con el fin de reinyectarse independientemente para utilizar la técnica de reciclaje de muestra, y así poder purificar sus constituyentes.

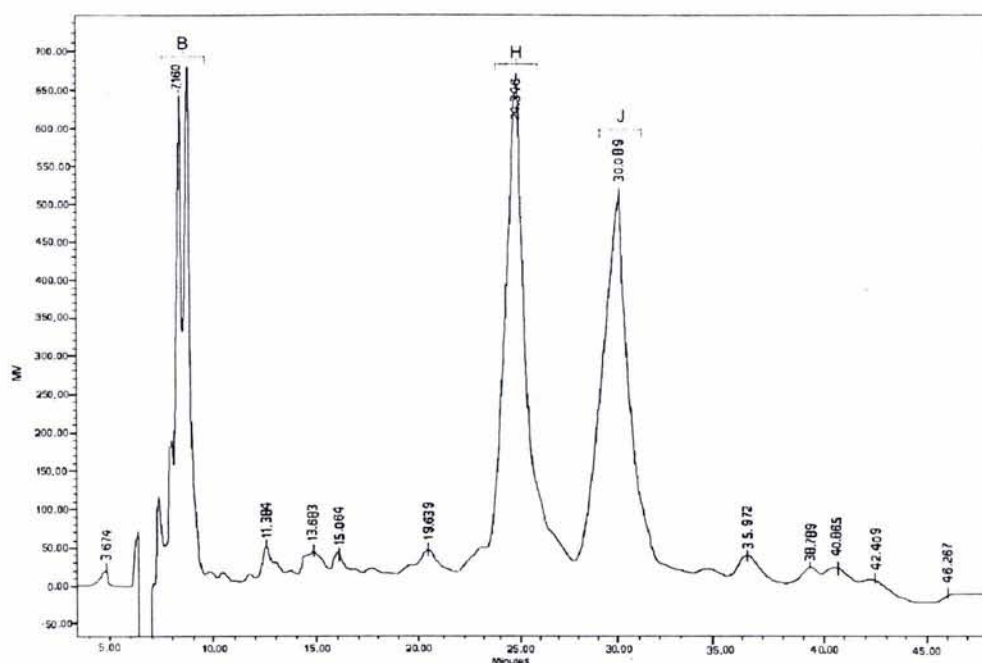


Figura 32. Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo para la fracción primaria XX.

6.4 Separación y purificación de los glicolípidos individuales de la fracción primaria XX de la jalapina de *Ipomoea murucoides*

La fracción primaria XX de la jalapina se fraccionó en una columna de alta presión considerando que las condiciones descritas anteriormente eran adecuadas para la separación de los glicolípidos mayoritarios presentes. Esta operación permitió la obtención de mezclas de menor complejidad que pudieran ser resueltas y purificadas mediante CLAE.

Considerando que se obtuvo una buena resolución en la separación de las subfracciones H y J, estas se reciclaron mediante la técnica de sobrecarga de columna y corte del núcleo permitiendo la purificación de los compuestos 1-2.

Para incrementar el tiempo de retención y mejorar la resolución de la subfracción B se hicieron pruebas preliminares en columnas analíticas de fase reversa (C-18 y NH₂) con un

sistema de detección de índice de refracción y un flujo de 0.7 mL/min. El sistema cromatográfico adecuado consistió en una columna analítica C-18 (4.6×300 mm, $5 \mu\text{m}$); flujo: 0.7 mL/min; fase móvil $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ (7:3); se realizó el escalamiento de estas condiciones instrumentales analíticas a un nivel preparativo (Parte experimental, sección 5.6). La figura 33 ilustra el cromatograma obtenido a nivel preparativo para la subfracción B, la cual se encuentra constituida por dos compuestos mayoritarios, B-5 ($t_R = 17.54$ min, 21 mg) y B-7 ($t_R = 26.86$ min, 25 mg). Cada uno de estos picos se cortaron y, posteriormente, fueron reciclados mediante la técnica de sobrecarga de columna. Este análisis de la subfracción B proporcionó los compuestos **3** (B-7) y **4** (B-5).

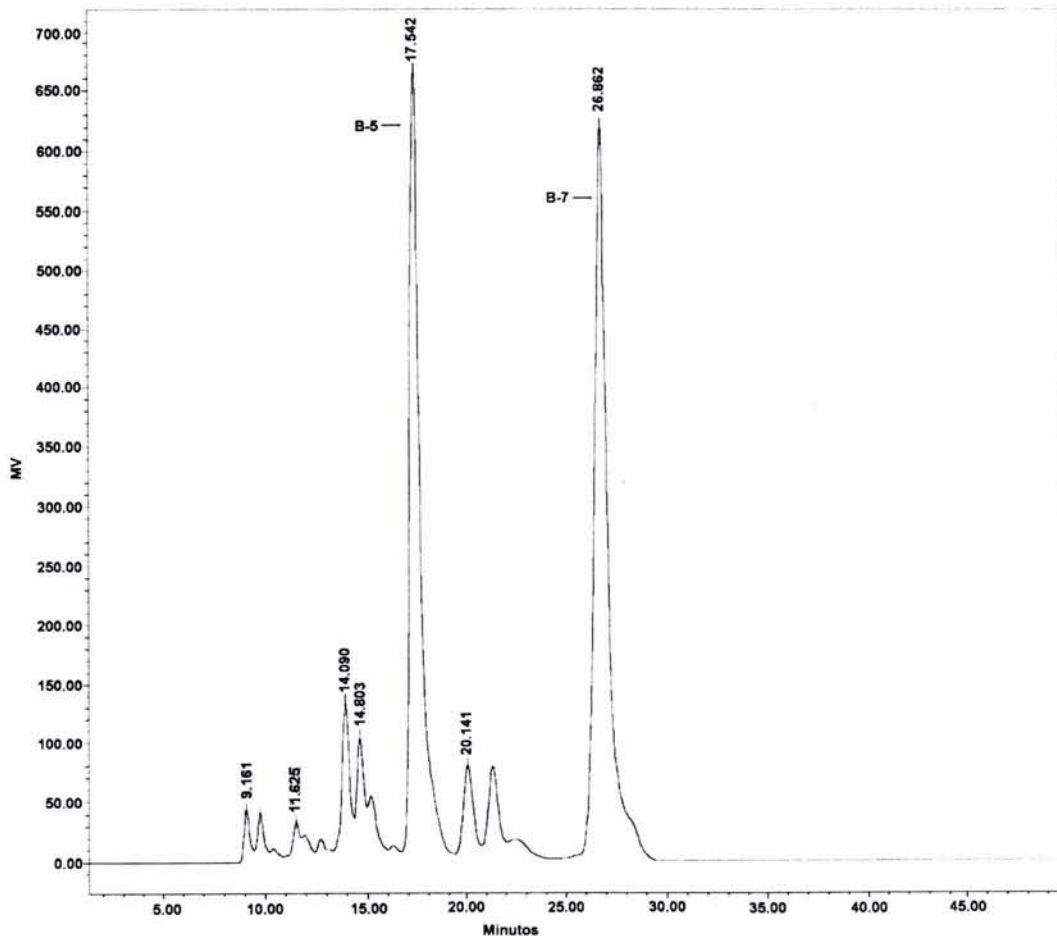


Figura 33. Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo para la subfracción B.

6.5 Caracterización de los glicolípidos de la jalapina de *Ipomoea murucoides*

La derivación de la fracción primaria **XX** permitió el aislamiento y la identificación de dos núcleos lipopolisacáridos constitutivos, el ácido simónico B (figura 21) y el ácido operculínico A (figura 6), por lo que la caracterización estructural de cada uno de los constituyentes individuales, se realizó mediante la comparación de sus respectivas constantes espectroscópicas con las descritas en la literatura.

De los cuatros compuestos aislados dos poseen el núcleo del ácido simónico B y los otros dos el del ácido operculínico A, estos presentan las mismas fragmentaciones en espectrometría de masas y prácticamente las mismas señales espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C . La diferenciación entre ellos radica en la posición de lactonización que se dedujo a partir del desplazamiento hacia campo bajo o alto de las señales para los protones H-2 y H-3 de la ramnosa interna (Ram) y se confirmó mediante el análisis de los espectros bidimensionales heteronucleares (HMBC) donde se corroboró las correlaciones con el carbonilo de la aglicona.

6.5.1 Asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C de los compuestos murucoidina I (1) y estoloniferina I (4)

Las constantes espectroscópicas (RMN ^1H) registradas para el compuesto B-5 demostraron que este producto correspondía a la estoloniferina I que previamente había sido aislada de la jalapina de *Ipomoea stolonifera*.⁴⁴ También, mediante la comparación de sus respectivas constantes espectroscópicas se determinó que la murucoidina I (subfracción H) y la estoloniferina I (subfracción B-5) poseen el núcleo del ácido simónico B (figura 21).

La asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C (Cuadro 3 y 4) en la murucoidina I (1) y estoloniferina I (4) se hicieron mediante técnicas bidimensionales homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HMQC).

Así, la murucoidina I (**1**) mostró en el espectro de RMN ^1H (figura **34**) las siguientes características en común con respecto a la estoloniferina I (**4**):

- a) Los dobletes entre 1.4-1.6 ppm son característicos de grupos metilos de 6-desoxihexosas, que confirman la presencia de cinco metilpentosas.
- b) Un par de señales entre 2.3-2.5 ppm demuestran la presencia de dos residuos del ácido metilbutírico (protón H-2).
- c) Los compuestos **1** y **4** presentaron una desprotección de las señales para los metinos en las posiciones C-2 y C-4 de las ramnosas Ram' y Ram'', respectivamente. Por lo tanto, los hidroxilos de estas posiciones deben encontrarse acilados.
- d) Un par de señales entre 2.2-2.9 ppm correspondientes a los dos protones no equivalentes del grupo metileno en posición alfa al grupo carboxilo de la aglicona. De esta manera, se evidenció la naturaleza macrolactónica para todos los compuestos.
- e) Por otra parte, mientras que los desplazamientos de los núcleos de ^1H y ^{13}C de la posición 3 de la ramnosa interna (Ram) resultan similares a los descritos para la estoloniferina I, en la murucoidina I estas señales son diferentes ya que la lactonización ocurre en la posición C-2 de la ramnosa (Ram). Esta propuesta se dedujo a partir del desplazamiento hacia campo bajo observado para H-2 ($\Delta\delta_{\text{H}}$ 0.6 ppm) de la ramnosa (Ram) con respecto a la misma señal de la estoloniferina I.

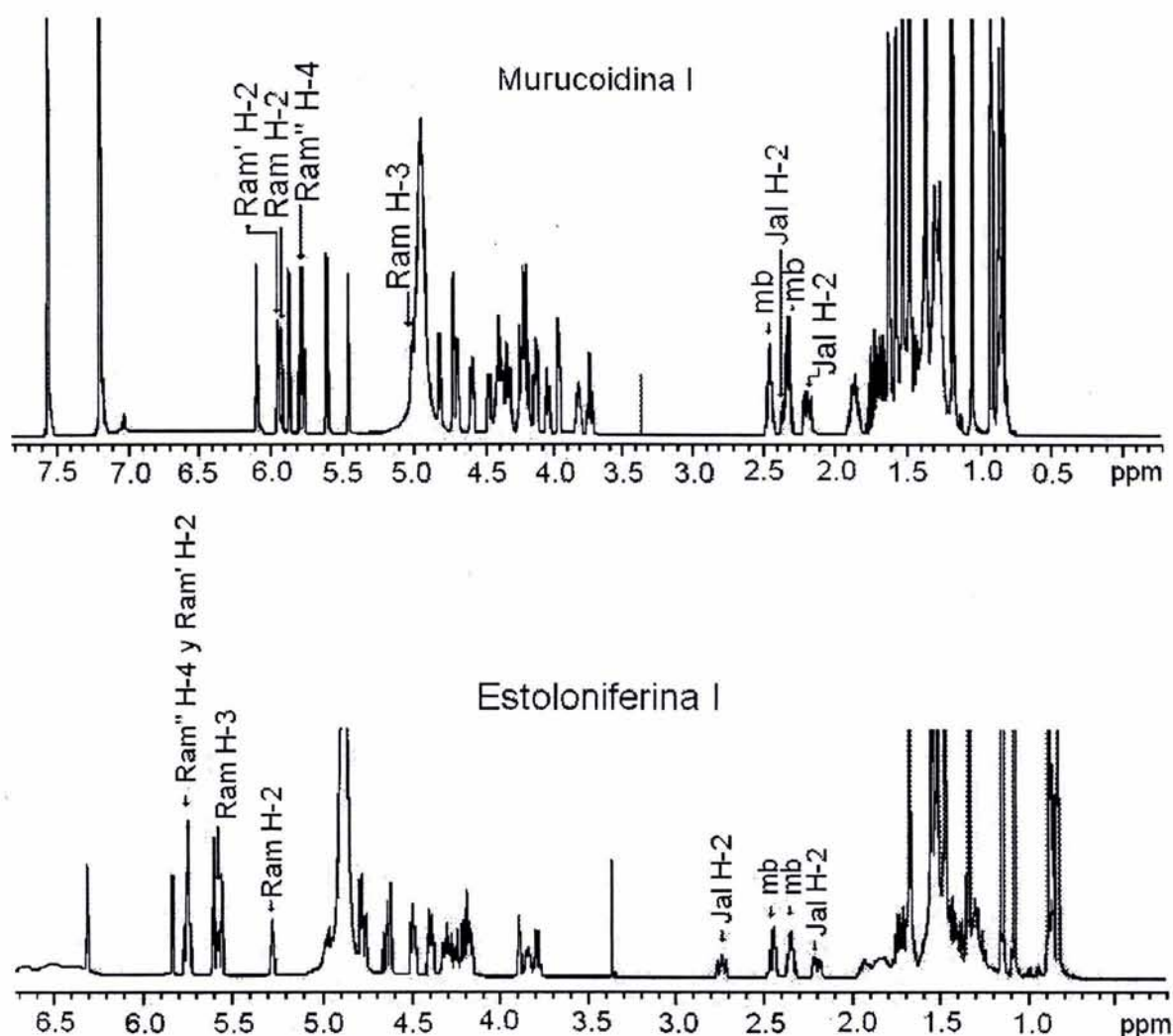


Figura 34. Espectros de RMN ¹H de los compuestos murucoidina I (1) y estoloniferina I (4) donde se indican las señales características de los ésteres y las desprotecciones de algunos metinos del núcleo oligosacárido por efecto de la lactonización o acilación.

El procedimiento de asignación de las señales de los compuestos se inició localizando en el espectro heteronuclear HMQC los carbonos anoméricos (desplazamientos químicos alrededor de 98-100 ppm) y sus correspondientes protones; posteriormente, con los espectros homonucleares COSY y TOCSY simultáneamente se asignaron las señales correspondientes a cada unidad sacárida del núcleo. Realizando los cuadros de conectividades en el experimento COSY se obtuvo la secuencia de conectividades $^3J_{H-H}$ para cada señal, como se ilustra en la figura 35 para la secuencia de los metinos de la ramnosa interna Ram' de la murucoidina I.

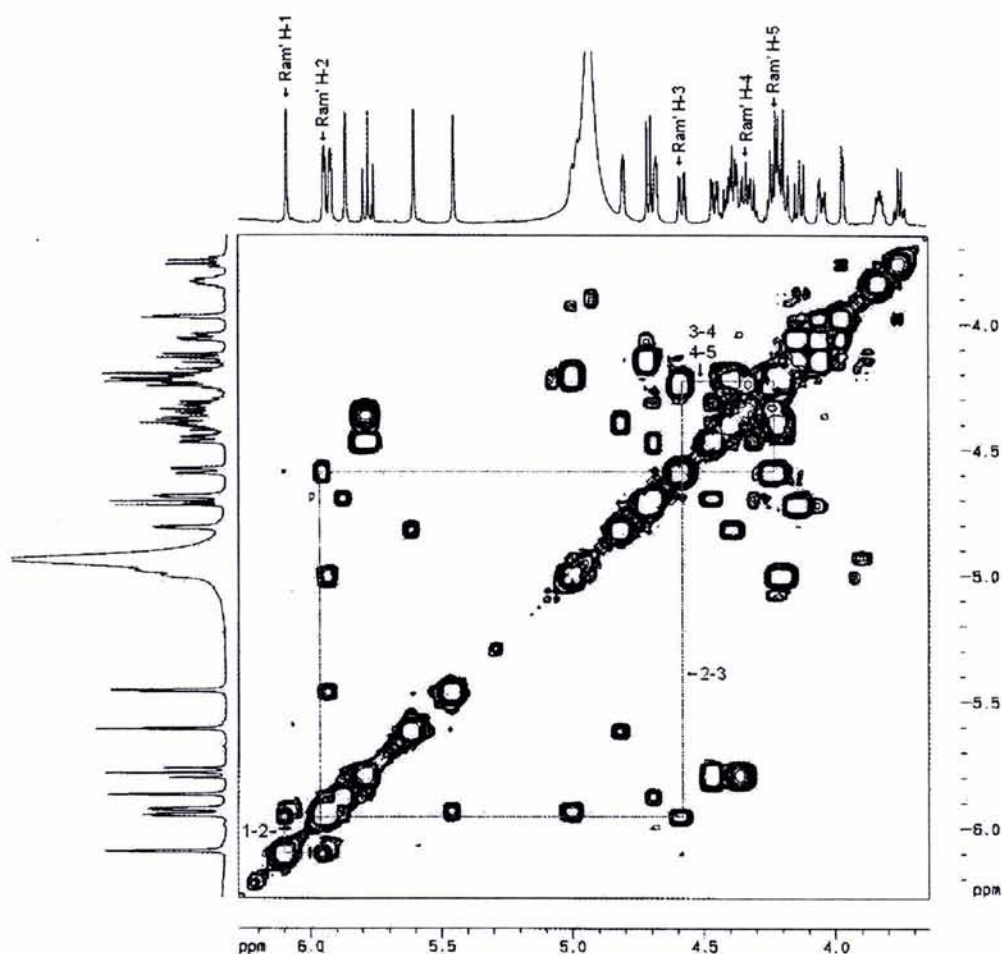


Figura 35. Sección de la porción oligosacárida del espectro COSY de la murucoidina I en donde se ilustran las conectividades para la ramnosa interna Ram'.

Del mismo modo, en la figura 36 se muestra la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la murucoidina I indicando las señales de la ramnosa interna Ram' y de la fucosa.

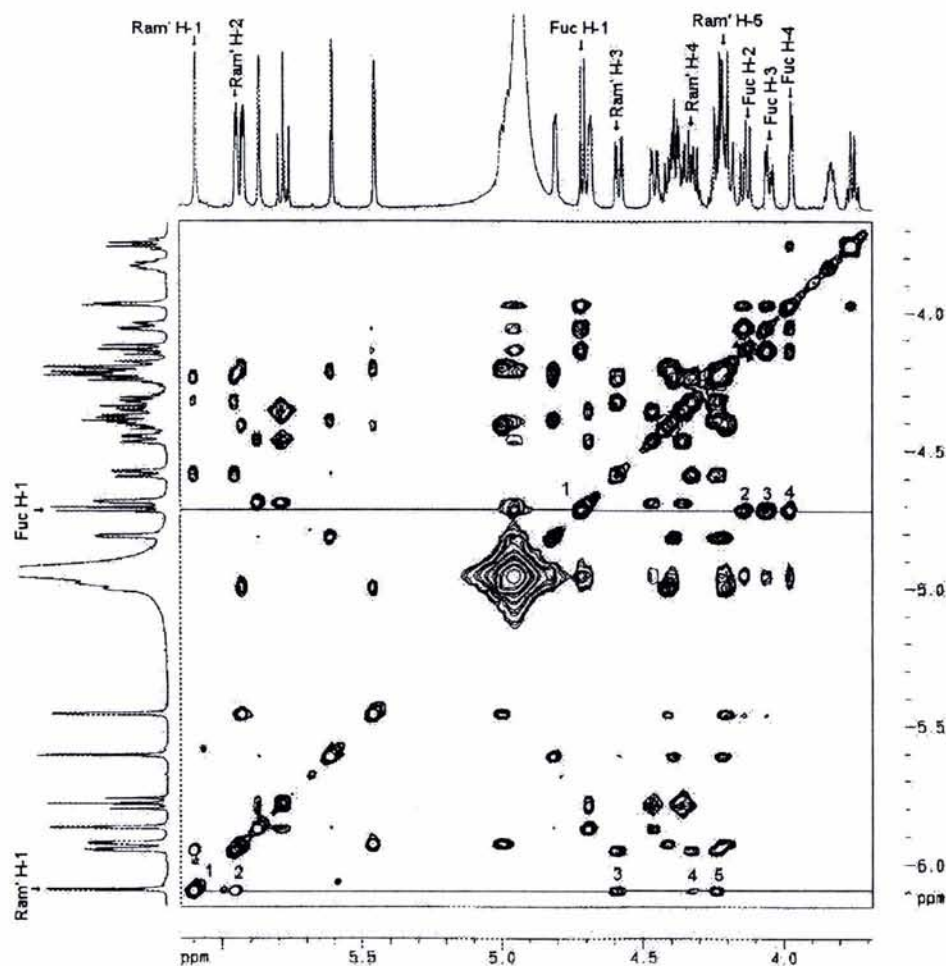


Figura 36. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la murucoidina I en donde se ilustran las señales de la ramnosa interna inferior Ram' y la fucosa.

Después de identificar y diferenciar las señales aportadas por los protones anómicos en la RMN ^1H por medio de los experimentos COSY y TOCSY, se dio seguimiento a la asignación de las señales de RMN ^{13}C mediante la técnica HMQC.

6.5.2 Asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C de murucoidina II (2) y III (3)

El análisis de la subfracción B permitió la purificación de la murucoidina III (B-7) y la fracción J proporcionó la murucoidina II. La asignación de las señales de RMN ^1H

(Cuadro 3) y de ^{13}C (Cuadro 4) de las murucoidinas II (2) y III (3) se realizó de la misma manera que en el caso de la murucoidina I y estoloniferina I, mediante el análisis de los espectros bidimensionales homonucleares ^1H - ^1H (COSY y TOCSY) y heteronucleares ^{13}C - ^1H (HMQC).

A continuación se presentan los resultados del análisis de los espectros de RMN ^1H (figura 37) y ^{13}C para las murucoidinas II (2) y III (3):

- a) Las constantes de acoplamiento ($^3J_{\text{H-H}}$) registradas para las murucoidinas II y III en las regiones de los protones anoméricos muestra dos valores grandes ($J = 7.6 \text{ Hz}$) y tres pequeñas ($J = 1.6 \text{ Hz}$) estos valores indicaron que se trata del núcleo oligosacárido del ácido operculínico A.^{42,43}
- b) Se observaron las señales que demuestran la presencia del residuo del metilbutirato, en especial el protón H-2 entre δ 2.3- 2.5.⁴⁴
- c) Los dobletes entre 1.4-1.6 ppm son característicos de grupos metilos de 6-desoxihexosas, que confirman la presencia de cuatro metilpentosas (figura 38).
- d) Los compuestos 2 y 3 presentaron una desprotección de señales para los metinos en las posiciones C-2 y C-4 de la ramnosas Ram' y Ram'', respectivamente. Por lo tanto, los hidroxilos de estas posiciones deben encontrarse acilados.
- e) Al igual que para la murucoidina I y estoloniferina I los desplazamientos de ^1H de los metinos de la posición C-3 y C-2 de la ramnosa interna superior son diferentes para la murucoidina II y III, ya que la lactonización ocurre en la posición C-2 para la murucoidina II y C-3 para la murucoidina III.

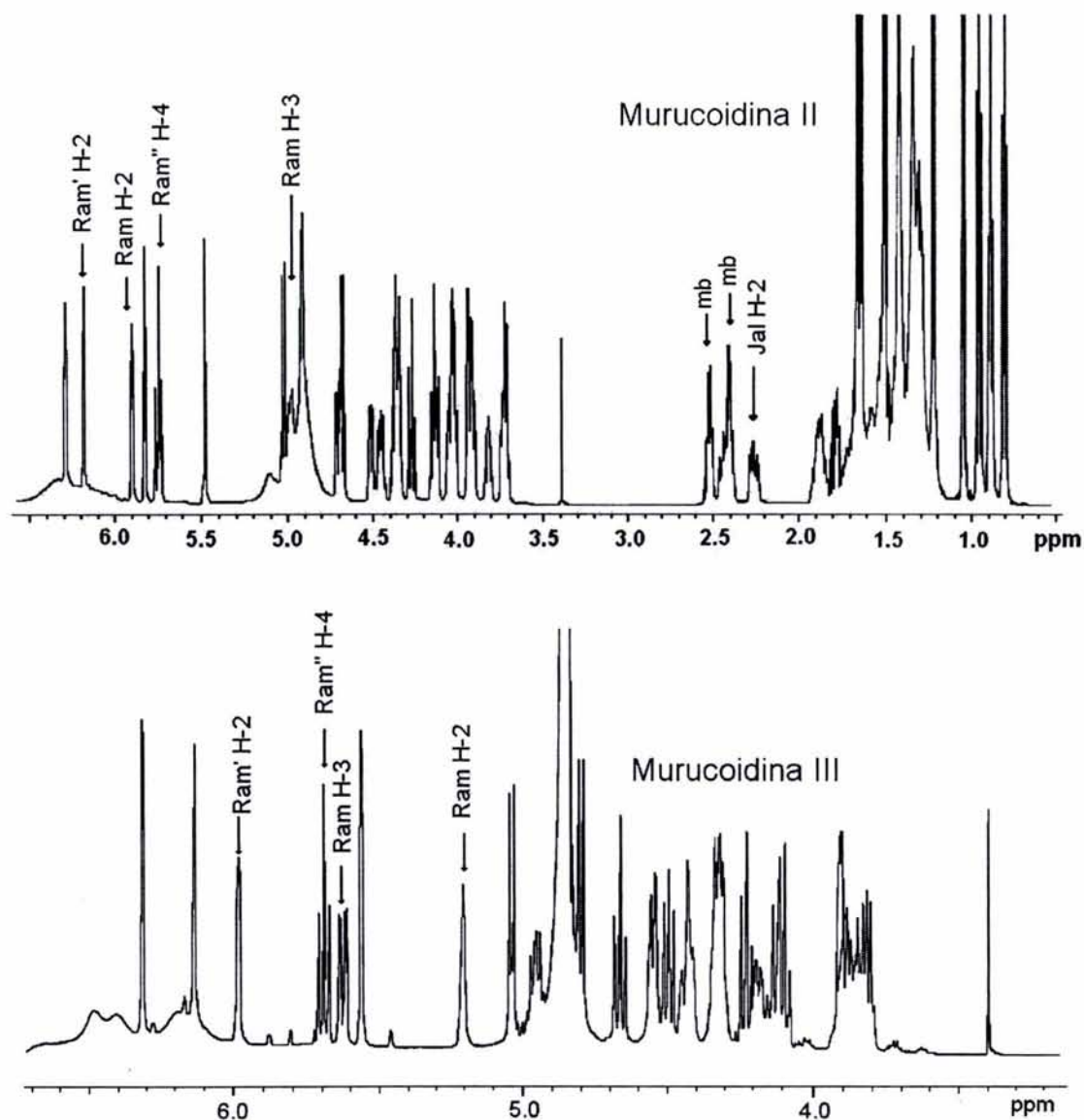


Figura 37. Espectros de RMN ^1H de los compuestos murucoidina II (2) y murucoidina III (3) donde se indican las señales de los esteres de acilación y las desprotecciones de algunos metinos por efecto de la lactonización o acilación.

- f) En el espectro de carbono ^{13}C [Espectro 9] aparece una señal a 62.6 ppm, la cual corresponde al carbono del grupo hidroximetileno de la glucosa.
- g) El espectro homonuclear TOCSY [Espectros 13 y 14] permitió la asignación inequívoca de cada una de las señales pertenecientes a las unidades monosacáridas individuales del núcleo oligosacárido.

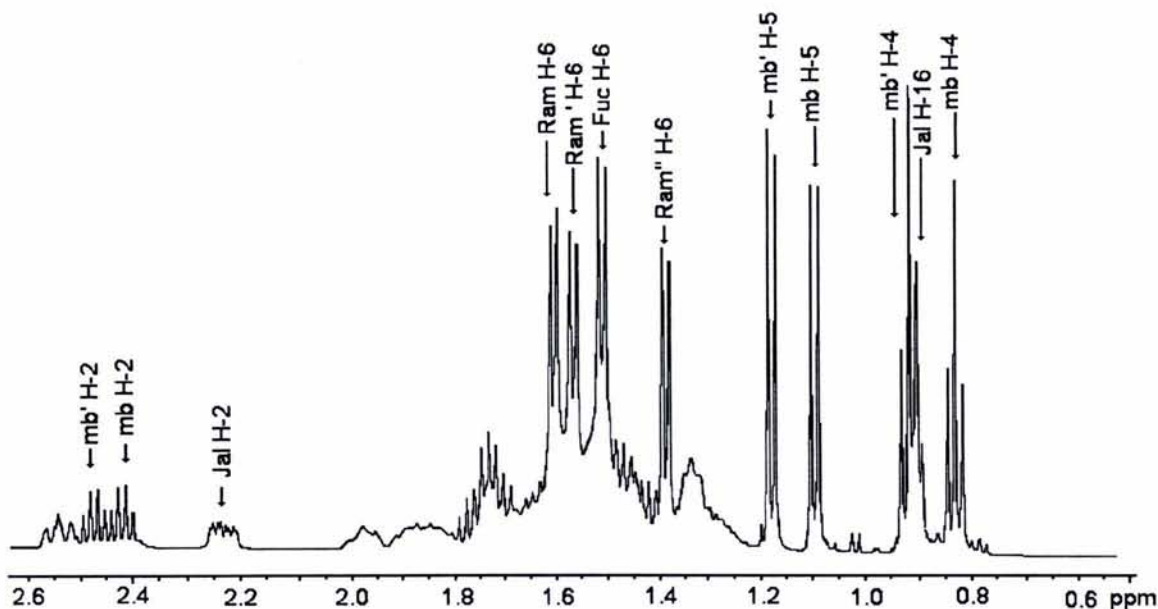


Figura 38. Ilustración de los dobletes entre 1.4-1.6 ppm característicos de los grupos metilos de 6-desoxihexosas que confirman la presencia de cuatro metilpentosas para la murucoidina III.

6.5.3 Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación para la murucoidina I y estoloniferina I

La confirmación de los sitios de lactonización con la aglicona y la localización de las dos posiciones de esterificación en el núcleo oligosacáridos para la murucoidina I (**1**) y la estoloniferina I (**4**) se hicieron mediante la secuencia de pulsos HMBC que permitió detectar las conectividades $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$).

- a) La figura 39 ilustra la asignación que se hizo para las resonancias del carbonilo de la aglicona (δ 173.1) y de los carbonilos de los dos grupos 2-metilbutanoilo (δ 175.5 y 176.3) en la murucoidina I a partir de sus acoplamientos $^2J_{\text{C-H}}$ con los hidrógenos del metileno de la aglicona (H-2, δ 2.21 y 2.37) y los protones H-2 de cada uno de los ésteres, es decir, la señal sextuplete para los dos grupos 2-metilbutanoílo entre δ 2.32 y 2.47.

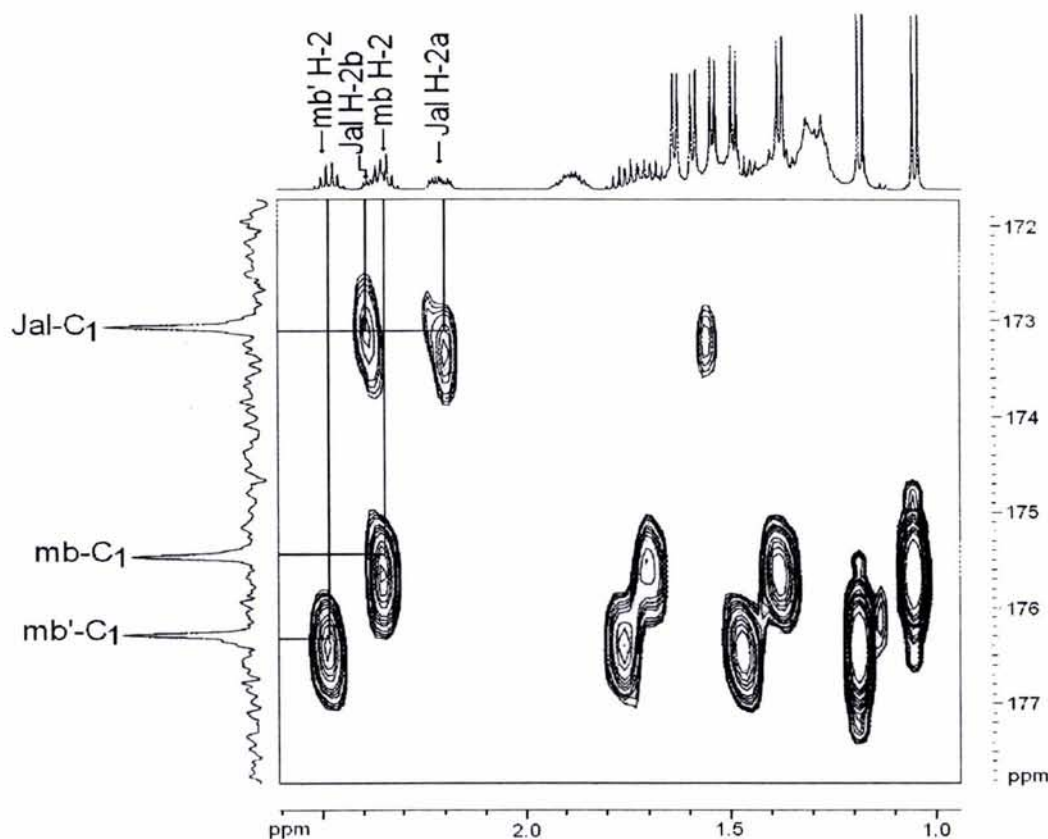


Figura 39. Sección del espectro HMBC de la murucoidina I donde se ilustran las conectividades entre los carbonos del carbonilo de cada uno de los ésteres (jal y mba) con los hidrógenos del metileno de la aglicona (H-2, δ 2.21 y 2.37) y los protones H-2 de cada uno de los ésteres.

- b) Los sitios de esterificación se dedujeron a partir de las correlaciones $^3J_{H-C}$ entre los carbonos del carbonilo de cada uno de los ésteres (jal y mba) con las señales protónicas geminales a estos grupos. La figura 40 ilustra estas conectividades para la murucoidina I (**1**) en donde la interacción $^3J_{H-C}$ entre el H-2 de la ramnosa interna (δ 5.92) con el C-1 de la aglicona (δ 173.1) permitió identificar el sitio de lactonización en la posición C-2 de la ramnosa (Ram), la segunda unidad sacárida, demostrando así que la lactonización efectivamente se encuentra en esta unidad de ramnosa. Al igual que se pudo observar las conectividades de los C-1 de los ésteres metilbutarilo (δ 175.5 y 176.3) con los hidrógenos de los metinos en las posiciones C-2 (δ 5.94) y C-4 (δ 5.78) de la ramnosas Ram' y Ram'', respectivamente.

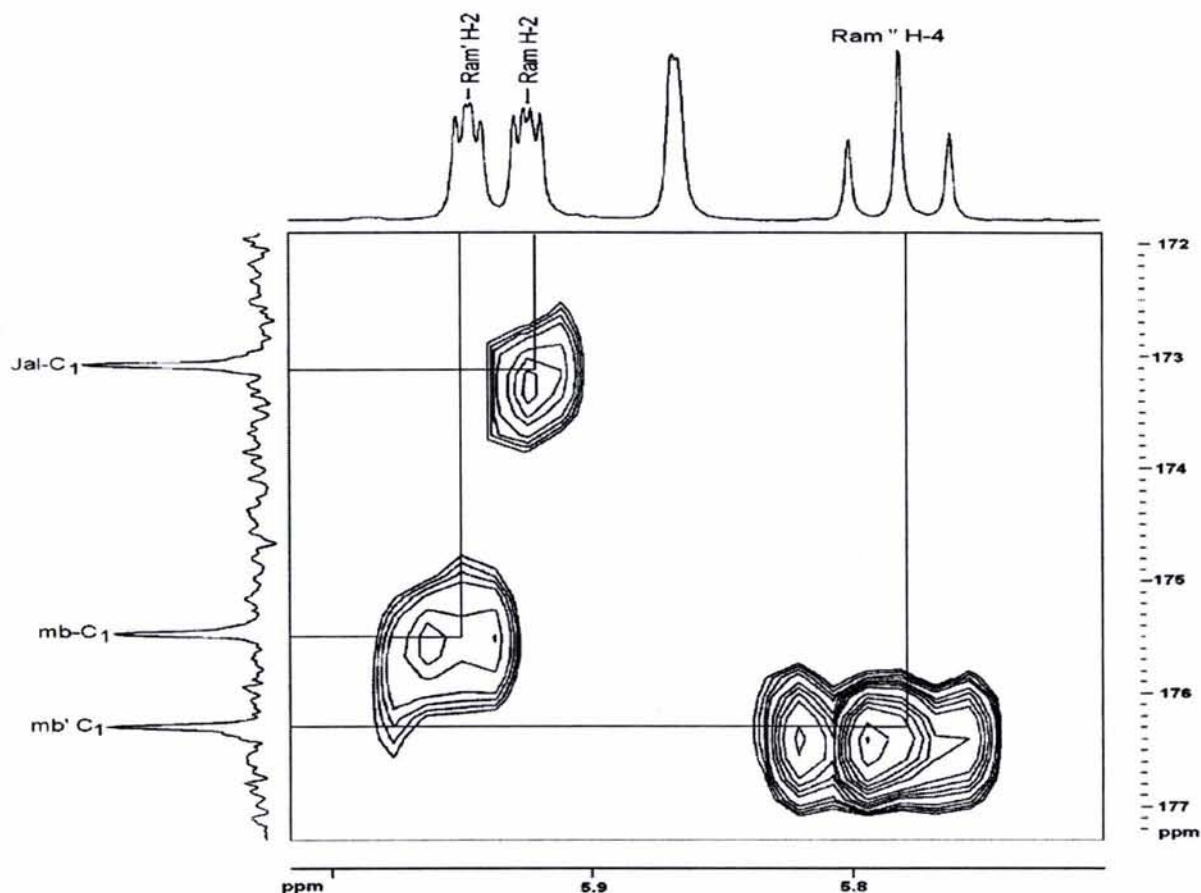


Figura 40. Sección del espectro HMBC de la murucoidina I donde se ilustran las conectividades entre los carbonos del carboxilo de cada uno de los ésteres (jal y mba) con las señales protónicas geminales a estos grupos.

- c) Posteriormente, se estableció la secuencia de glicosidación mediante las correlaciones ^1H - ^{13}C observadas en los espectros HMBC en la región oligosacárida entre los protones anómicos con los carbonos sacáridos vecinales. La figura 41 ilustra estas conectividades para la murucoidina I (**1**) en donde la interacción $^3J_{\text{H-C}}$ entre el H-1 de la fucosa con el C-11 de la aglicona, permitió identificar que la fucosa era la primera unidad sacárida. A fin de sustentar la estructura propuesta para la murucoidina I, se observaron las correlaciones entre cada protón anomérico con el carbono de la unidad sacárida vecinal que participa en el enlace glicosídico, permitiendo establecer la secuencia de glicosidación.

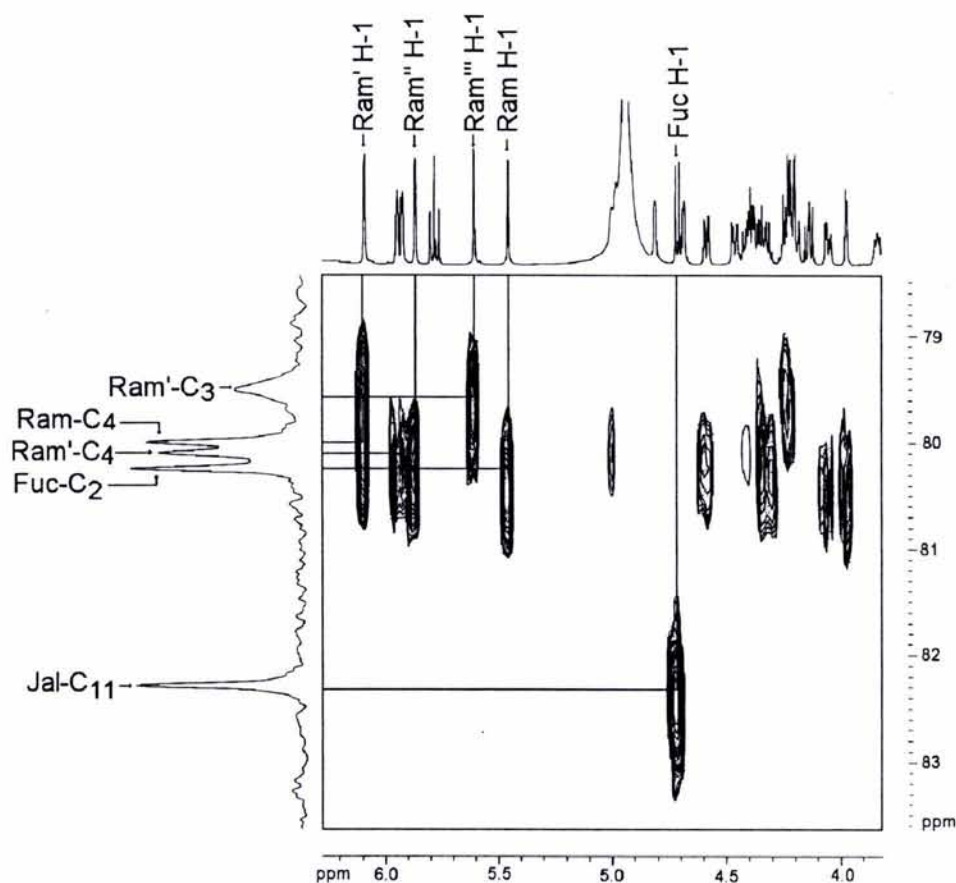


Figura 41. Sección de la región oligosacárida de la murucoidina I (**1**) del espectro HMBC donde se ilustran las conectividades entre los protones anómicos de cada unidad sacárida con el carbono de la unidad que participa en el enlace glicosídico ($^3J_{C-H}$).

6.5.4 Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación para la murucoidina II (**2**) y III (**3**)

La confirmación de los sitios de lactonización con la aglicona y la localización de las dos posiciones de esterificación en el núcleo oligosacárido para la murucoidina II y III se realizó del mismo modo que para la murucoidina I (**1**) y estoloniferina I (**4**), mediante la secuencia de pulsos HMBC que permitió detectar las conectividades ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{C-H}$).

- a) Los sitios de esterificación se dedujeron a partir de las correlaciones $^3J_{H-C}$ entre los carbonos C-1 del carbonilo de cada uno de los ésteres (jal y mba) con las señales protónicas geminales a estos grupos. La figura 42 ilustra estas conectividades para la murucoidina II (2) en donde la interacción $^3J_{H-C}$ entre el grupo metino H-2 de la ramnosa interna (δ 5.90) con el carbonilo C-1 de la aglicona (δ 173.1) permitió identificar el sitio de lactonización en la posición C-2 de la ramnosa (Ram), la segunda unidad sacárida.

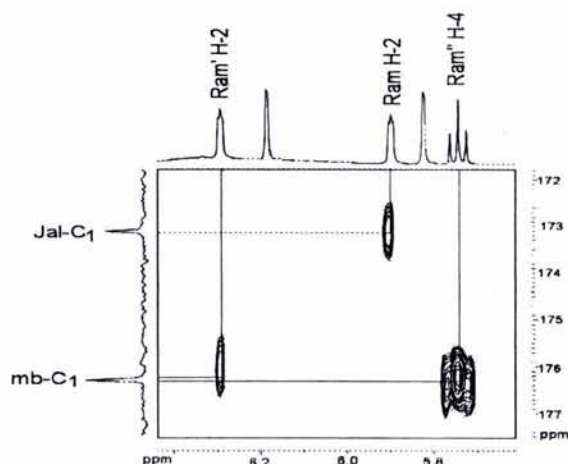


Figura 42. Sección de la región oligosacárida de la murucoidina II (2) del espectro HMBC donde se ilustran las conectividades entre los carbonos del carbonilo de cada uno de los ésteres (jal y mba) con las señales protónicas geminales a estos grupos.

- b) Posteriormente, se estableció la secuencia de glicosidación mediante las correlaciones $^1H-^{13}C$ observadas en los espectros HMBC en la región oligosacárida entre los protones anoméricos con los carbonos sacáridos vecinales. La figura 43 ilustra estas conectividades para la murucoidina II (2) en donde la interacción $^3J_{H-C}$ entre el H-1 de la fucosa con el C-11 de la aglicona, permitió identificar que la fucosa era la primera unidad sacárida. A fin de sustentar la estructura propuesta para la murucoidina II, se observaron las correlaciones entre cada protón anomérico con el carbono de la unidad sacárida vecinal que participa en el enlace glicosídico, permitiendo establecer la secuencia de glicosidación.

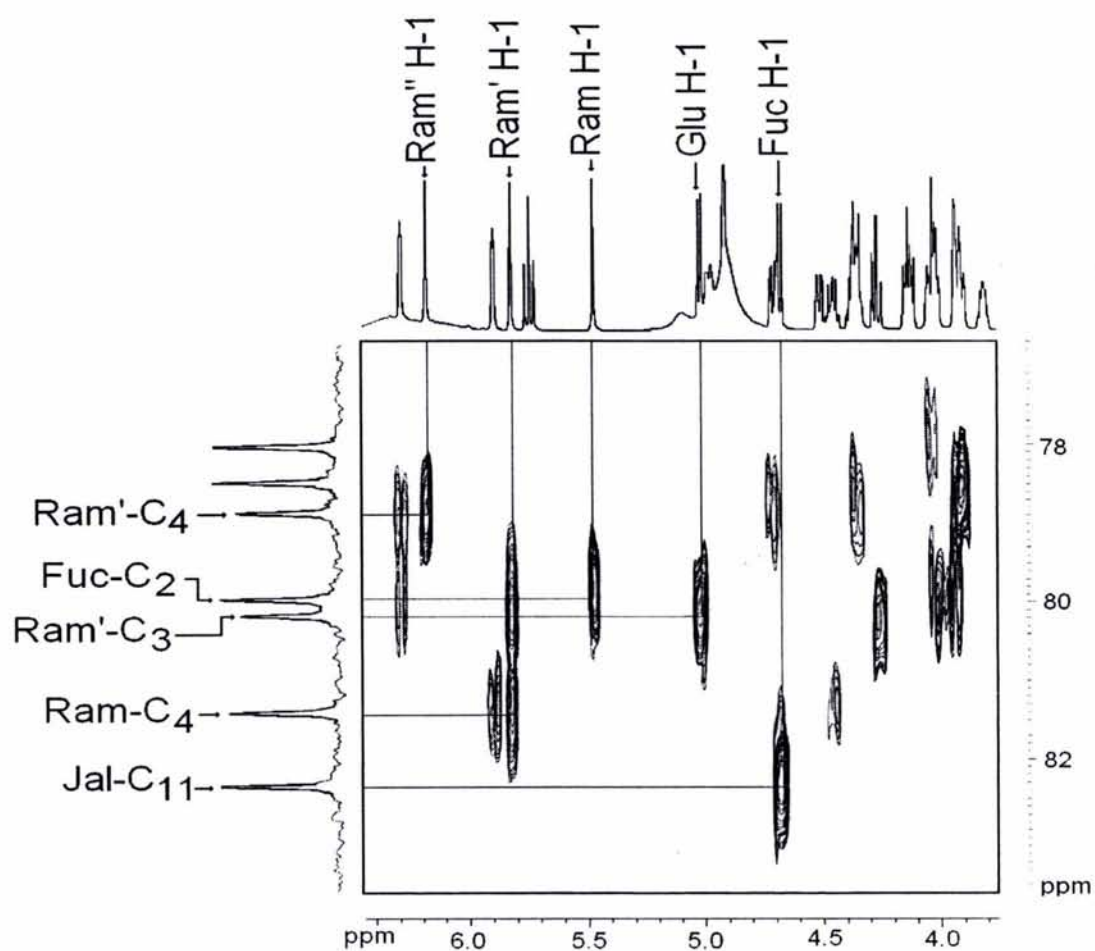


Figura 43. Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida de la murucoidina II (**2**) donde se ilustran las conectividades entre los protones anómicos de cada unidad sacárida con el carbono de la unidad sacárida que participa en el enlace glicosídico ($^3J_{C-H}$).

Cuadro 3. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H de las murucoidinas I-III (1-3) y estoloniferina I (4).

Protón	1	2	3	4
Fuc-1	4.70 d (7.4)	4.68 d (7.5)	4.82 d (7.9)	4.82 d (6.0)
2	4.14 dd (7.4, 9.5)	4.12 dd (7.6, 4.3)	4.50 dd (7.9)	4.52 dd (7.8)
3	4.04 dd (9.6, 3.5)	4.00 dd (3.0, 9.4)	4.19 dd (2.9, 9.3)	4.18 dd (9.4, 3.4)
4	3.96* dd (3.4)	3.93 dd (2.7)	3.90* dd	3.91 dd (3.2)
5	3.74 dq (0.7, 6.2)	3.72* dq (6.7)	3.80 dq (6.3)	3.80 dq (0.8, 6.4)
6	1.48 d (6.4)	1.48 d (6.4)	1.50 d (6.3)	1.51 d (6.4)
Ram-1	5.45 d (1.6)	5.48* sa	6.34 d (1.3)	6.33 d (1.4)
2	5.92 dd (1.9, 3.3)	5.90 dd (2.5)	5.22* dd	5.30* dd
3	4.98 dd (9.6)	4.97* dd	5.64 dd (2.7, 10)	5.60* dd
4	4.18 dd (9.5)	4.14 dd (9.4)	4.66 dd (9.8, 9.7)	4.64 dd (9.8)
5	4.40 dq (9.5, 6.2)	4.45 dq (6.2)	4.98 dq (6.0)	5.00 dq (6.0)
6	1.58 d (6.2)	1.62 d (6.1)	1.60 d (6.1)	1.55 d (6.2)
Ram'-1	6.08 d (1.7)	5.82 d (0.97)	5.58 d (1.3)	5.62* sa
2	5.94 dd (1.9, 3.0)	6.30 dd (2.7)	6.00 dd (1.6, 3.3)	5.78 dd (3.3)
3	4.58 dd (3.1, 9.3)	4.70 dd (3.2, 9.2)	4.56 dd (3.4, 9.0)	4.52 dd (7.8)
4	4.23 dd (9.4, 5.6)	4.27 dd (9.3, 9.4)	4.23 dd (9.2, 9.2)	4.21 dd (9.4)
5	4.32 dq (9.3)	4.36* dq (6.1)	4.32 dq (6.6)	4.32 (9.9, 6.3)
6	1.62 d (6.1)	1.64 d (6.2)	1.56 d (6.2)	1.59 d (6.1)
Ram''-1	5.86 d (1.0)	6.18 d (1.3)	6.16 d (1.7)	5.85* sa
2	4.68 dd (1.4, 3.0)	4.92* dd	4.88* dd	4.67* dd
3	4.45 dd (3.2, 9.6)	4.52 dd (3.3, 9.2)	4.43 dd (3.2, 10.1)	4.42 dd (3.6, 8.9)
4	5.78 dd (9.7, 9.7)	5.74 d (9.3, 9.4)	5.72 dd (9.3, 9.3)	5.77 dd (3.3)
5	4.35 dq (9.4)	4.36* dq (6.1)	4.32 dq (6.6)	4.33 dq
6	1.37 d (6.3)	1.40 d (6.2)	1.38 d (6.3)	1.37 d (6.3)
Ram'''-1	5.60 d (1.1)			5.58*
2	4.80 dd (1.9)			4.78 dd (1.3, 3.2)
3	4.38 dd (3.4)			4.41 dd (3.6, 8.9)
4	4.21 dd (9.3)			4.25 dd (8.4)
5	4.19 dq (9.4)			4.27 dq (9.3, 5.9)
6	1.53 d (5.8)			1.73 d (6.0)
Glu-1		5.02 d (7.7)	5.05 d (7.6)	
2		3.90 dd (3.1, 9.1)	3.90* dd	
3		4.04*	4.12*dd	
4		3.93*	4.14 dd (8.8)	
5		3.73* dd (6.7)	3.80* dd	
6a		4.01 dd (3.0, 6.6)	4.33 dd (6.5)	
6b		4.35* dd (3.9)	4.44 dd (3.2)	
Jla-2a	2.21 ddd (3.9, 8.2, 14.7)	2.25 ddd (3.8, 7.9, 14.6)	2.23 ddd (2.8, 7.2, 14.6)	2.22 ddd (2.6, 7.0, 15.0)
2b	2.37 ddd (3.9, 8.7, 14.2)	2.42* ddd (3.9, 14.8)	2.55 ddd (3.2, 14.6)	2.77 ddd (2.4, 10.4, 15.0)
11	3.83 m	3.81 m	3.88 m	3.85 m
16	0.85 t (7.0)	0.85 t (7.0)	0.90 t (7.4)	0.92 t (7.4)
mb-2	2.32 tq (7.1)	2.39* tq (6.9)	2.44 tq (6.9)	2.38 tq (7.0)
4	0.82 t (7.4)	0.77 t (7.4)	0.83 t (7.4)	0.87 t (7.4)
5	1.04 d (7.0)	1.01 d (7.0)	1.10 d (6.9)	1.12 d (7.0)
mb'-2	2.47 tq (7.0)	2.50 tq (6.9)	2.48 tq (6.9)	2.47 tq (7.0)
4	0.91 t (7.4)	0.92 t (7.4)	0.92 t (7.4)	0.92 t (7.4)
5	1.18 d (7.0)	1.19 d (7.0)	1.18 d (7.0)	1.19 d (7.0)

*Señales sobrepuestas. Entre paréntesis las constantes de acoplamiento en Hz.

Cuadro 4. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C de las murucoidinas I-III (1-3) y estoloniferina I (4).

Carbono	1	2	3	4
Fuc-1	104.2	104.3	101.5	101.3
2	80.2	80.0	73.6	73.2
3	73.4	73.4	76.6	76.3
4	73.3	72.9	73.6	73.3
5	70.8	70.8	71.3	71.5
6	17.3	17.3	17.2	16.9
Ram-1	98.7	98.5	100.1	99.9
2	73.9	73.6	70.0	69.5
3	69.9	69.4	78.3	77.8
4	79.9	81.4	75.7	72.5
5	72.5	68.9	68.0	67.6
6	19.4	19.1	18.7	18.9
Ram'-1	99.2	100.0	99.1	98.6
2	72.9	73.0	72.2	74.5
3	79.5	80.2	80.2	79.3
4	80.1	78.9	78.8	79.6
5	68.2	68.2	68.1	67.9
6	18.8	18.9	19.2	18.5
Ram''-1	103.8	103.3	103.4	103.6
2	72.7	72.5	72.4	76.4
3	70.2	70.3	70.2	72.2
4	74.7	75.2	75.2	72.4
5	68.5	68.4	68.1	67.9
6	17.8	18.0	18.0	17.6
Ram'''-1	104.8			104.3
2	72.5			72.3
3	68.6			69.9
4	73.4			70.3
5	70.5			68.2
6	18.5			18.4
Glu-1		105.5	105.1	
2		75.2	75.2	
3		78.5	77.8	
4		71.5	70.8	
5		78.0	78.1	
6		62.9	62.6	
Jla-1	173.1	173.1	174.4	174.4
2	34.3	34.2	34.3	33.6
11	82.3	82.3	79.5	79.1
16	14.3	14.3	14.5	14.1
mb-1	175.5	176.3	176.1	175.1
2	41.4	41.2	41.3	41.1
4	11.7	11.4	11.6	11.5
5	16.8	16.6	16.8	16.6
mb'-1	176.3	176.3	176.3	176.0
2	41.5	41.5	41.5	41.3
4	11.7	11.8	11.7	11.5
5	16.9	17.0	17.0	16.7

6.6 Análisis de los derivados peracetilados de las subfracciones H y J

El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C de los derivados peracetilados **H-Ac** y **J Ac** (Parte experimental, sección 5.7) que fueron preparados a partir de las subfracciones H y J, confirmó la secuencia de glicosidación y los sitios de esterificación.

La confirmación de los sitios de lactonización con la aglicona y la localización de las dos posiciones de esterificación en el núcleo oligosacárido se realizó del mismo modo que para los constituyentes naturales, mediante la secuencia de pulsos HMBC que permitió detectar las conectividades ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$).

En el análisis de los espectros HMBC de los derivados **H-Ac** y **J-Ac** se observaron algunas de las correlaciones $^3J_{\text{C-H}}$ que también se registraron para los compuestos **1** y **2**, como las correlaciones entre los carbonos carbonilo de cada uno de los ésteres (jal y mba) con las señales protónicas geminales a estos grupos. La interacción $^3J_{\text{H-C}}$ entre el H-1 de la fucosa con el C-11 de la aglicona, permitió identificar que la fucosa era la primera unidad sacárida. A fin de sustentar la estructura propuesta para los derivados que confirman la secuencia de glicosidación, se observaron las correlaciones entre cada protón anomérico con el carbono de la unidad sacárida vecinal que participa en el enlace glicosídico.

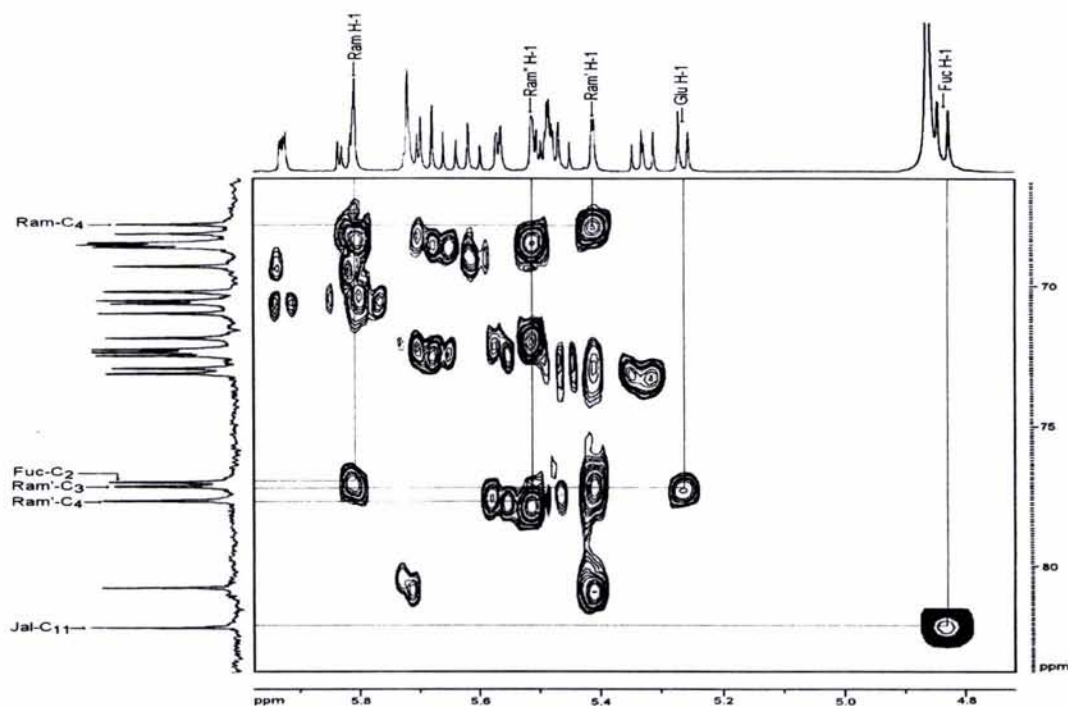


Figura 44. Sección del espectro HMBC de la región oligosacárida del derivado peracetilado **J-Ac** donde se ilustran las conectividades entre los protones anóméricos de cada unidad sacárida con el carbono de la unidad sacárida vecinal que participa en el enlace glicosídico ($^3J_{C-H}$).

6.7 Diferenciación de los glicolípidos mediante espectrometría de masas

La espectrometría de masas constituye una técnica esencial en la determinación estructural de los glicolípidos naturales, la técnica de bombardeo por átomos acelerados (EM-FAB) ha sido de una ayuda invaluable para el establecimiento de la estructura molecular de una gran variedad de polisacáridos al proporcionar los pesos moleculares a través de la detección de los iones quasi-moleculares $[M + H]^+$ o $[M - H]^-$ y los iones fragmentos que permiten establecer la secuencia de glicosidación.

La espectrometría de masas en la modalidad FAB (modo negativo) fue particularmente útil para determinar los pesos moleculares de los glicolípidos 1-4. En cada uno de los espectros se observaron los picos comunes provocados por las rupturas glicosídicas. La figura 45, ilustra el patrón de fragmentación característico que sufren estos compuestos, i.e. los iones de m/z 271, 417 y 545, este último fragmento que presenta una diferencia de 18 unidades de masa (H_2O) indica que la localización de la esterificación intramolecular en el núcleo oligosacárido se sitúa en la unidad de ramnosa interna Ram. Asimismo, al analizar las diferencias de peso que hay entre sus respectivos iones quasi-moleculares $[M - 1]$ pudimos establecer las unidades sacáridas esterificadas y su respectivo ácido sustituyente.

En este caso los cuatro compuestos presentan el ácido metilbutírico esterificando el oligosacárido por lo que el fragmento A de m/z 1067 y 1083 corresponden a la pérdida del residuo de 2-metilbutanoílo con una diferencia de 84 unidades con respecto al ion quasi-moleculares $[M - 1]$ de m/z 1151 y 1167, respectivamente.

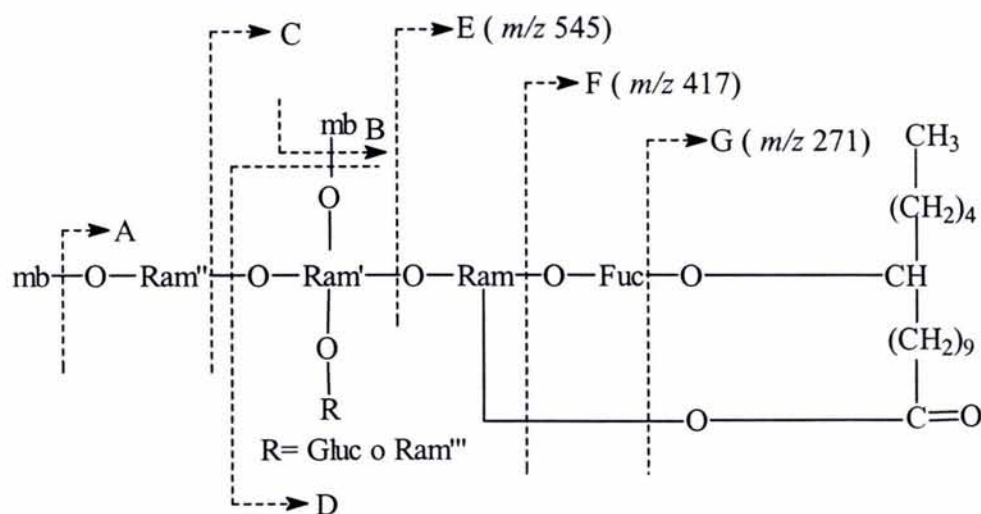


Figura 45. Patrón de fragmentación de los glicolípidos 1-4.

6.7.1 Espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo de la murucoidina I (1) y estoloniferina I (4)

El espectro de masas FAB (modo negativo) de la estoloniferina I permitió calcular la misma fórmula molecular reportada para este glicolípido ($C_{56}H_{96}O_{24}$), ya que mostró un mismo ion quasi-molecular de m/z 1151 $[M - H]^-$. También, se observaron los picos comunes de fragmentación provocados por las rupturas de los enlaces glicosídicos. La figura 46 muestra el espectro de masas FAB (modo negativo) de la estoloniferina I donde se ilustran las principales fragmentaciones que sufre la molécula y, de esta manera, se confirma la ubicación de los sitios de esterificación.

La murucoidina I (1) presentó un patrón de fragmentación análogo al descrito para la estoloniferina I (4) (Parte experimental, secciones 5.6.1 y 5.6.3), de tal suerte que las diferencias estructurales entre la estoloniferina I y murucoidina I deberían corresponder a las posiciones de esterificación para la aglicona.

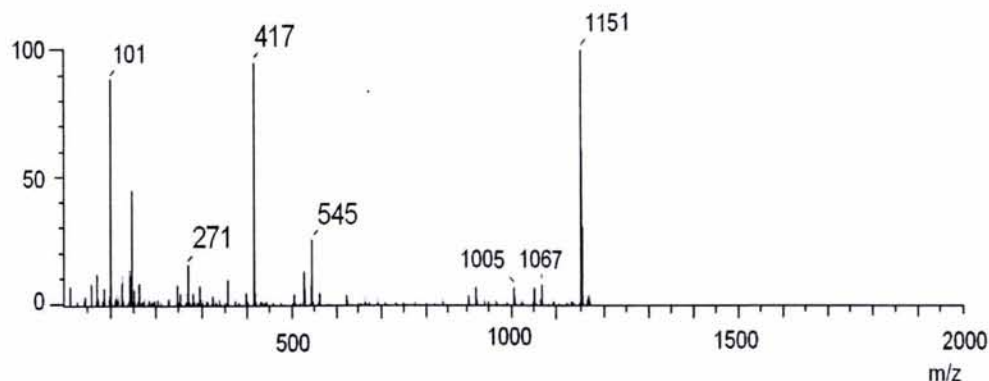


Figura 46. Espectro de masas modo FAB negativo para la estoloniferina I (4).

6.7.2 Espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo de la murucoidina II (2) y murucoidina III (3)

La espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo de la murucoidina II mostró un ion pseudomolecular $[M - H]^-$ de m/z 1167 (figura 47). Su fórmula molecular se estableció como $C_{56}H_{96}O_{25}$. También, se observaron los picos comunes de fragmentación provocados por las rupturas de los enlaces glicosídicos confirmando la ubicación de los sitios de esterificación.

La murucoidina II (2) presentó un patrón de fragmentación análogo al descrito para la murucoidina III (3) (Parte experimental, secciones 5.6.2 y 5.6.3), de tal suerte que las diferencias estructurales entre la murucoidina II y murucoidina III deberían corresponder a las posiciones de esterificación para la aglicona (jal).

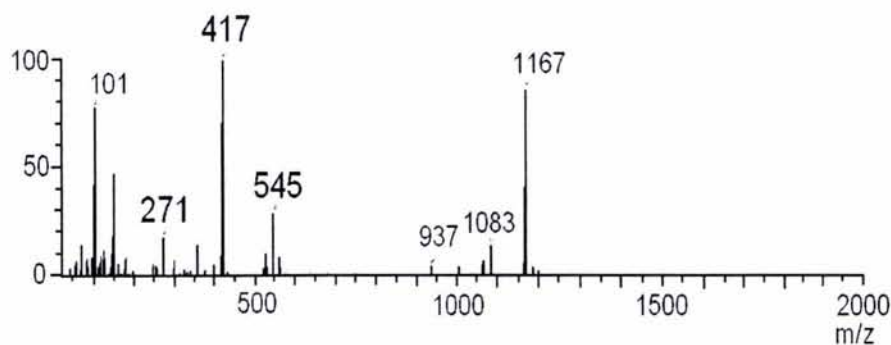


Figura 47. Espectro de masas modo FAB negativo para la murucoidina II (2).

El estudio detallado de los datos espectroscópicos y espectrométricos, permitió establecer las estructuras de los constituyentes aislados de la jalapina de *Ipomoea murucoides* como:

Murucoidina I (1): éster intramolecular 1,2''-11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[4-O-(2*S*)-2-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[2-O-(2*S*)-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico.

Murucoidina II (2): éster intramolecular 1,2''-11-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[4-O-(2*S*)-2-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[2-O-(2*S*)-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico.

Murucoidina III (3): éster intramolecular 1,3''-11-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[4-O-(2*S*)-2-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[2-O-(2*S*)-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico.

Estoloniferina I (4): éster intramolecular 1,3''-11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[4-O-(2*S*)-2-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O-[2-O-(2*S*)-metilbutiril]- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapínico.

En la figura 48 se ilustran las estructuras moleculares propuestas para los compuestos 1-4. Los cuatro glicolípidos mayoritarios obtenidos de la fracción primaria jalapina XX de las flores de *Ipomoea murucoides*, los compuestos 1-3 según la revisión bibliográfica realizada no han sido descritos en la literatura y la principal diferencia entre ellos es la posición del sitio de lactonización en el núcleo oligosacárido.

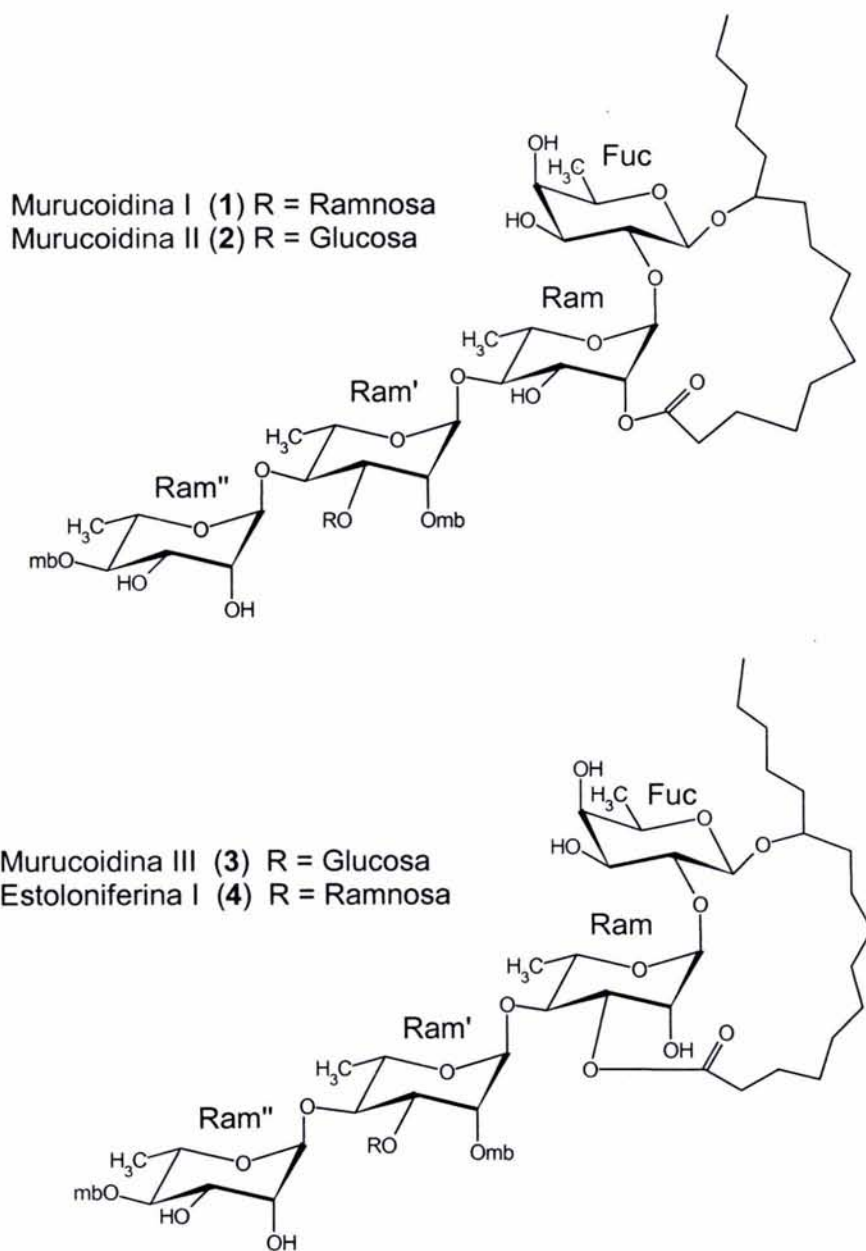


Figura 48. Estructuras moleculares de los cuatro glicolípidos mayoritarios aislados de la jalapina de la fracción primaria XX de *Ipomoea murucoides*. Ram = ramnosa, Fuc = fucosa y mb = (2*S*)-2-metilbutanoílo.

VII. CONCLUSIÓN

- a) La presente tesis constituye la primera investigación química del contenido de oligosacáridos de las resinas glicosídicas presentes en las flores de la especie *Ipomoea murucoides*.
- b) Con el trabajo experimental realizado se logró aislar e identificar dos núcleos pentasacáridos constitutivos de las resinas glicosídicas de esta especie arbórea, los cuales se caracterizaron como: 11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)] α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- α -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico (ácido simónico B) y 11-O- β -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O-[O- β -D-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)] β -D-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico (ácido operculínico A).
- c) De la jalapina de *Ipomoea murucoides* se obtuvieron cuatro glicolípidos de los cuales tres son novedosos, las murucoidinas I-III (1-3).
- d) Las murucoidinas I-III y la estoloniferina I son diastereoisómeros que sólo varían en el sitio de lactonización. Cabe mencionar que en los cuatro lipopolisacáridos, la acilación sucede en las posiciones C-2 y C-4 de las ramnosas Ram' y Ram'', respectivamente. Estas acilaciones corresponden al ácido metilbútrico.
- e) Se comprobó que *Ipomoea murucoides* contiene resinas glicosídicas con una posible aplicación terapéutica y agroquímica, como ya ha sido reportado para otros miembros de la familia de las convolvuláceas.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

1. Valdez Aguilar, R. Noroeste de México. *Herbolaria mexicana, Guía práctica-México desconocido* 4, pp. 26.
2. Emmart, E.W. (1940) *The Badianus Manuscript (Cosex Barberini, latin 241) Vatican Library. An Aztec Herbal of 1552*. The Johns Hopkins Press: Baltimore, 341 pp.
3. Pereda-Miranda, R., Bah, M. (2003) Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 111-131.
4. De la Cruz, M. (1552) *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*. Fondo de Cultura Económico-Instituto Mexicano del Seguro Social: México, 1991, edición en facsímile; F. 32 r.
5. Pereda-Miranda, R., Cardoso Taketa, A., Villatoro-Vera, R. (2003) *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. Alucinógenos Naturais: Etnobotânica e Psicofarmacologia, editora UFRGS, Porto Alegre, Brazil, pp. 919-958.
6. Bruneton, J. (1993) *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Medicinales*, Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp. 156-157.
7. Fürstner, A., Müller, T. (1999) Efficient total syntheses of resin glycosides and analogues by ring-closing olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* 121, 7814-7821.
8. Hernández-Carlos, B., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (1999) Orizabins V –VIII, tetrasaccharide glycolipids from the Mexican scammony root (*Ipomoea orizabensis*). *J. Nat. Prod.* 62, 1096-1100.
9. Ono, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1990) Resin glycosides VIII. Four new glycosidic acids D, E, F, and G, of the ether-soluble crude resin glycosides ("jalapin") from *rhizoma jalapae braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 38, 2650-2655.
10. Díaz, J. L. (1977) *Uso de las Plantas Medicinales de México*. Instituto Mexicano para el Estudio de las plantas Medicinales, A.C., México, pp. 66.
11. Reynolds, F.W., Yu, M., Enríquez, R.G., González, H., León, I., Magos, G., Villareal, M.L. (1995) Isolation and characterization of cytotoxic and antibacterial tetrasaccharide glycosides from *Ipomoea stans*. *J. Nat. Prod.* 58, 1730-1734.
12. Martínez, M. (1959) *Plantas Útiles de la Flora Mexicana*. Botas-México, pp. 276-279.

13. McDonald, A. (1991) Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Inst. Biol. Univ. Autón. México, Sec. Bot.* **62**, 65-82.
14. Martínez, M. (1987) *Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas*. Fondo de Cultura Económica. México.
15. 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.
16. Trease, G.E., Evans, W.C. (2002) *Pharmacognosy*. 15a. ed. WB Saunders, Edinburgo, p. 288.
17. Argueta, A. (1994) *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México, p. 659.
18. Stauffacher, D., Tschertter H., Hofmann, S. (1965) Isolierung von Ergosin and Ergosinin neben Agroclavin aus den Samen von *Ipomoea argyrophylla* Vatke (Convolvulaceae). *Hel. Chim. Acta* **48**, 1379-1380.
19. Chao, J-M., DerMarderosian, A.H. (1973) Identification of the ergoline alkaloids in the genus *Argyreia* and related genera and their chemotaxonomic implications in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* **12**, 2435-2440.
20. Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richter, A., Jenett-Siems, K., Dräger, B., Asano, N., Gupta, P., Correa, D.M., Eich, E. (1998) Distribution and Taxonomic significance of Calysregines in the Convolvulaceae. *Phytochemistry* **49**, 1989-1995.
21. Botz, L., Hahn, E., Szabo, L.G. (1991) Botanical identification of *Ipomoea tricolor* Cav. Seed samples from Hungary and layer chromatography examination of their hallucinogen ergot alkaloids. *Acta Bot. Hung.* **36**, 229-243.
22. Jenett-Siems, K., Kaloga, M., Eich, E. (1993) Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulaceae. *Phytochemistry* **34**, 437-440.
23. Jenett-Siems, K., Kaloga, M., Eich, E. (1994) Ergobalansine/ergobalansinine, a proline free peptide-type alkaloid of the fungal genus *Balansia* is a constituent of *Ipomoea piurensis*. *J. Nat. Prod.* **57**, 1304-1306.
24. Jenett-Siems, K., Kaloga, M., Eich, E. (1994) Hygrines and tropanes, alkaloids of considerable importance for the chemotaxonomy of the Convolvulaceae. *Eur. J. Pharm. Sci.* **2**, 122.
25. Henrici, A., Kaloga, M., Eich, E. (1994) Jacpaniculines, the first lignanamide alkaloids from the Convolvulaceae. *Phytochemistry* **37**, 1637.

-
26. Osuna, L., Ponce-Monter, H., Campos, G.M., Rojas, J., Meckes, M. (1996). Effect of *Ipomoea intrapilosa* methanol extract on the serotonergic response in rat uterus. *Phytotherapy Research*. **10**, 257-259.
 27. MacLeod, J. K., Ward, A., Oerlrichs, P. B. (1997) Structural investigation of resin glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *J. Nat. Prod.* **60**, 467-471.
 28. Alcántara Ramírez, S. (1980) Contenido de ácidos grasos entre semillas de *Ipomoea murucoides* (Familia Convolvulaceae) de diferentes localidades en la República Mexicana. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
 29. Bernabéu, S., Fernández de Caleyá, P. B., Burdel, H. M., Sanpedro, E. C., Engstrand, I. H., García, E. (2000) *El Aguila y El Nopal. La Expedición De Sessé y Mociño A Nueva España*. Editores Lunverg, Madrid, p. 35.
 30. Monroy-Ortíz, C, Castillo España, P. (2000) *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, 104-105.
 31. Miranda, F., Valdés, J. (1991) Comentarios Botánicos. En: *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis. Manuscrito Azteca de 1552*. De la Cruz, M. Según traducción latina de Badiano, J. Fondo de Cultura Económica. Instituto Mexicano del Seguro Social; México, p.110.
 32. Programa Panamericano de Defensa y Desarrollo de la Diversidad biológica, cultural y social (Prodiversitas). <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota65-1.htm>.
 33. Lozaya, X. (1999) Un paraíso de plantas medicinales. *Arqueología Mexicana* **39**, 14-21.
 34. Sarin, J.P.S., Hari, G.S., Nandu, K.M., Dhar, M.M. (1973) Ipolearósíde: A new glycoside from *Ipomoea leari*, with anti-cancer activity. *Phytochemistry* **12**, 2461-2468.
 35. Contreras, C. M., Chacón, L., Enríquez, R. G. (1996) Anticonvulsant properties of *Ipomoea stans*. *Phytomedicine* **3**, 41-44.
 36. Perusquía, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (1995) Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *J. Ethnopharm.* **46**, 63-69.
 37. Anaya, A. L., Calera, M.R., Mata, R., Pereda-Miranda, R. (1990) Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *J. Chem. Ecol.* **16**, 2145-2152.

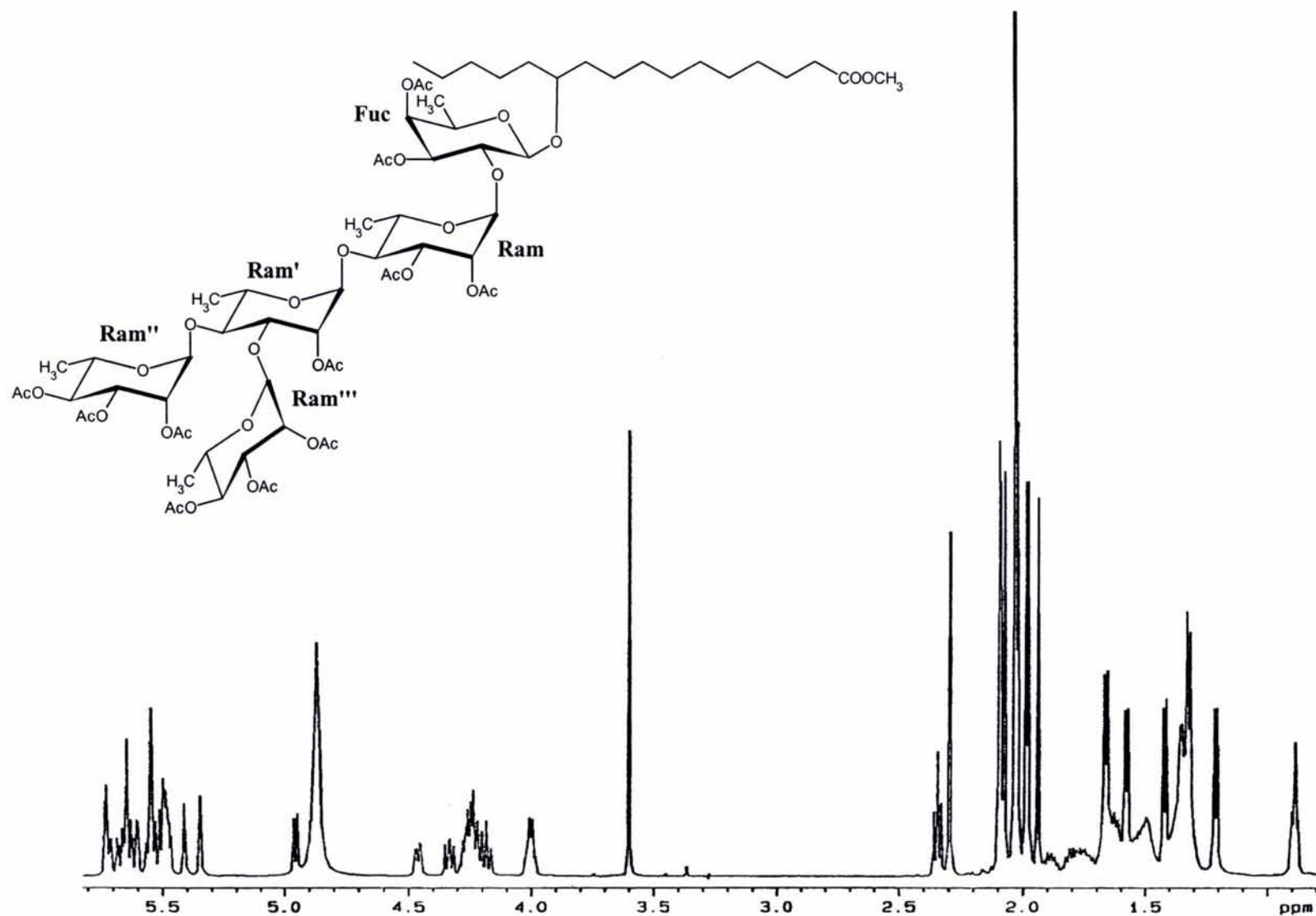
38. Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Winckramaratne, D. B.M., Pezuto, J. M., Kinhorn, A. D. (1993) Tricolorin A, major phytochrome inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582.
39. Bieber, L.W., Da Silva Filho, A. A., Correa-Lima, R.M.O., De Andrade-Chiappeta, A., Carnero Do Nascimento, S., De Souza, I. A., De Mello, J. F., Jürgen-Veith, H. (1986) Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *Phytochemistry* **25**, 1077-1081.
40. Achnine, L., Pereda-Miranda, R., Iglesias-Prieto, R., Moreno-Sanchez, R., Lotina-Hennsen, B. (1999) Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiol. Plantarum* **106**, 246-252.
41. Wagner, H., Schwarting, G. (1977) Struktur der microphyllinsäure aus dem harz von *Convolvulus microphyllus*. *Phytochemistry* **16**, 715-717.
42. Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1989) Operculin I and II, new ether soluble resin glycosides ("jalapin") with fatty acid ester groups from *Rhizoma jalapae braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 241-244.
43. Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1989) Resin Glycosides V. Identification and characterization of the component organic and glycoside acids of the ether-soluble crude resin glycosides ("jalapin") from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3209-3213.
44. Noda, N., Takahashi, T., Kawasaki, T., Miyahara, K., Yang, C.R. (1994) Stoloniferins I- VII, Resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* **36**, 365-371.
45. Ono, M., Kuwabata, K., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides XVI. Quamoclins I-IV, new ether-soluble resin glycosides (Jalapin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 2674-2680.
46. Noda, N., Tsuji, K., Miyahara, K., Yang, C-R. (1994) Resin Glycosides XXI. Tuguajalapins I-X, the resin glycosides having long-chain fatty acid groups from the root of *Merremia hungaiensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**, 2011-2016.
47. Kitagawa, Y., Baek, N.I., Ohashi, K., Sakagami, M., Yoshikawa, M., Shibuya, H. (1989) Mammosides B and H1, new ionophoric resin-glycosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an Indonesian folk medicine. *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 1131-1133.

48. Kitagawa, Y., Baek, N.I., Kawashima, K., Yokokawa, Y., Yoshikawa, M., Ohashi, K., Shibuya, H. (1996) Indonesian medicinal plants. XV. Chemical structures of five new resin-glycosides, merremosides a,b,c,d and e, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **44**, 1680-1692.
49. Kitagawa, Y., Baek, N.I., Yokokawa, Y., Yoshikawa, M., Ohashi, K., Shibuya, H. (1996) Indonesian medicinal plants. XVI. Chemical structures of four new resin-glycosides, merremosides f, g, h₁ and h₂, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **44**, 1693-1699.
50. Ono, M., Nishi, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1990) Resin Glycosides. IX. Operculins I, II, V, VII and VIII, new ether-soluble resin glycosides of *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (the Rotos of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, **38**, 2986-2991.
51. Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1991) Resin glycosides. XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII y XVIII, new ether-soluble resin glycosides of *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (root of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **39**, 2534-2539.
52. Ono, M., Fujimoto, K., Kawata, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992) Resin glycosides XIII. Operculins VI, XI, XII, XII, XIV and XV, the ether-soluble resin glycosides (Jalapin) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (root of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 1400-1403.
53. Noda, N., Takahashi, N., Miyahara, K., Yang, C.-R. (1998) Stoloniferins VIII-XII, resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* **48**, 837-841.
54. Kitagawa, I., Shibuya, H., Yokodawa, Y., Baek, N. I., Ohashi, K., Yoshikawa, M., Nitta, A., Wiriadinta, H. (1989) Structures of merremosides B and D, new antiserotonic resin-glycosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an Indonesian folk medicine. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1618-1621.
55. Kitagawa, I., Ohashi, K., Baek, N. I., Sakagami, M., Yoshikawa, M., Shibuya, H. (1997) Indonesian medicinal Plants. XIX: Chemical structures of four additional resin-glycosides, mammosides A, B, H₁ and H₂, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 786-794.
56. Ono, M., Honda, F., Karahashi, A., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1997) Resin glycosides. XXV. Multifidins I and II, new jalapins from the seed of *Quamoclit x multifida*. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1955-1960.
57. Ono, M., Nakagawa, K., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1993) Resin glycosides. XIX. Woodrosins I and II, ether-insoluble resin glycosides from the stems of *Ipomoea tuberosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1925-1932.

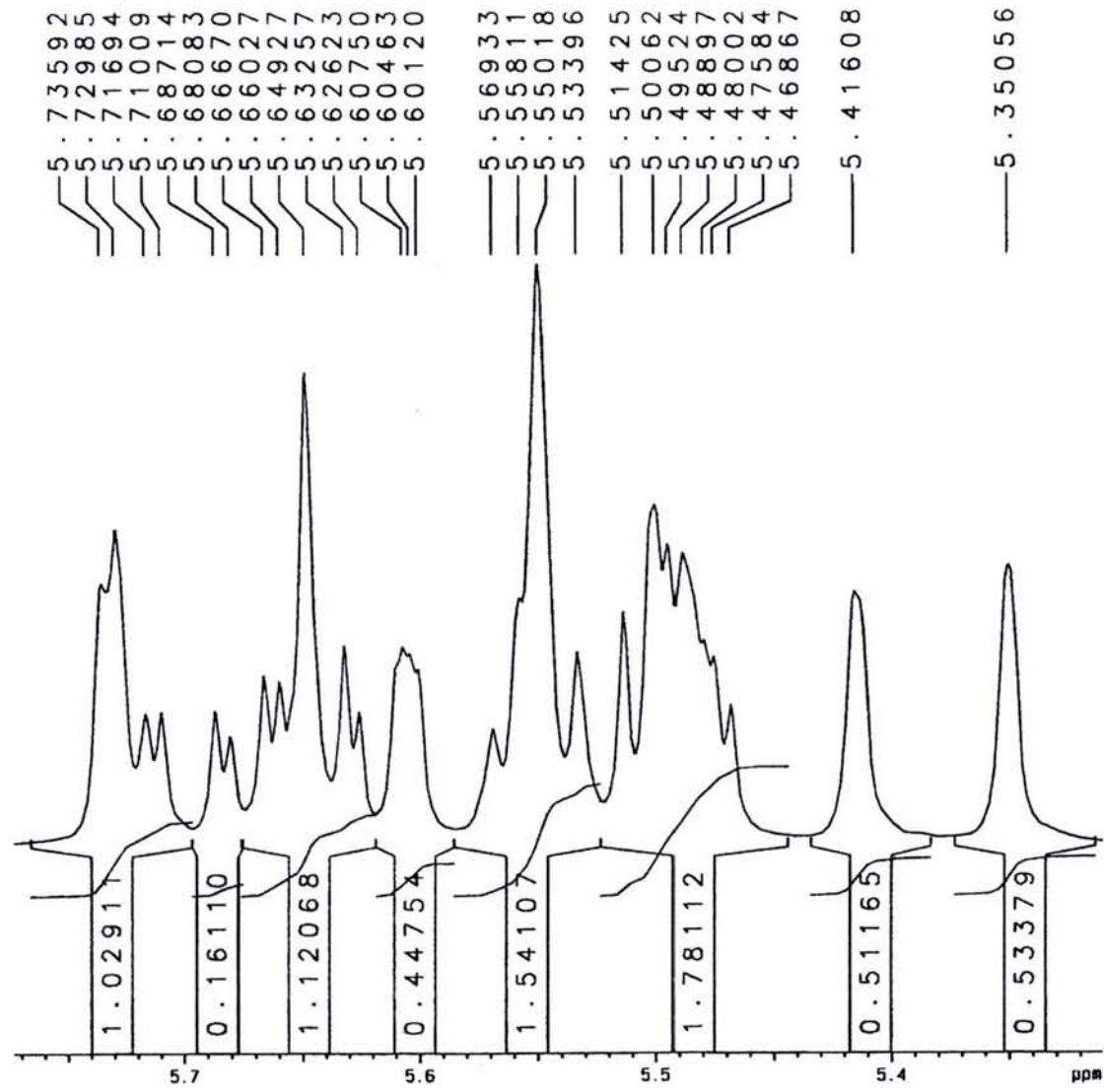
-
58. Ono, M., Noda, N., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1990) Resin glycosides VII. Reinvestigation of the component organic and glycosidic acids of pharbitin, the crude ether-insoluble resin glycoside ("Convolvulin") of *Pharbitis semen* (seeds of *Pharbitis nil*). *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1892-1897.
 59. Kawasaki, T., Okabe, H., Nakatsu, Y. (1971) Studies on resin glycosides. I. Reinvestigation of the components of pharbitin, a resin glycoside of the seeds of *Pharbitis nil* Choisy. *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 1144-1149.
 60. Okabe, H., Koshito, N., Tanaka, K., Kawasaki, T. (1971) Studies on resin glycosides. II. Unhomogeneity of "pharbitic acid" and partial structures of pharbitic acids C and D, the major constituents of "pharbitic acid". *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 2394-2403.
 61. Okabe, H., Kawasaki, T. (1972) Studies on resin glycosides. III. Complete structures of pharbitic acids C and D. *Chem. Pharm. Bull.* **20**, 514-520.
 62. Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992) Resin glycosides XV. Simonins I-V, ether-soluble resin glycosides (Jalapins) from the roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3163-3168.
 63. Escalante Sánchez, E. (2004) Aislamiento y caracterización estructural de cuatro lipopentasacáridos de *Ipomoea pes-caprae*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.

IX. APENDICE

ESPECTROS

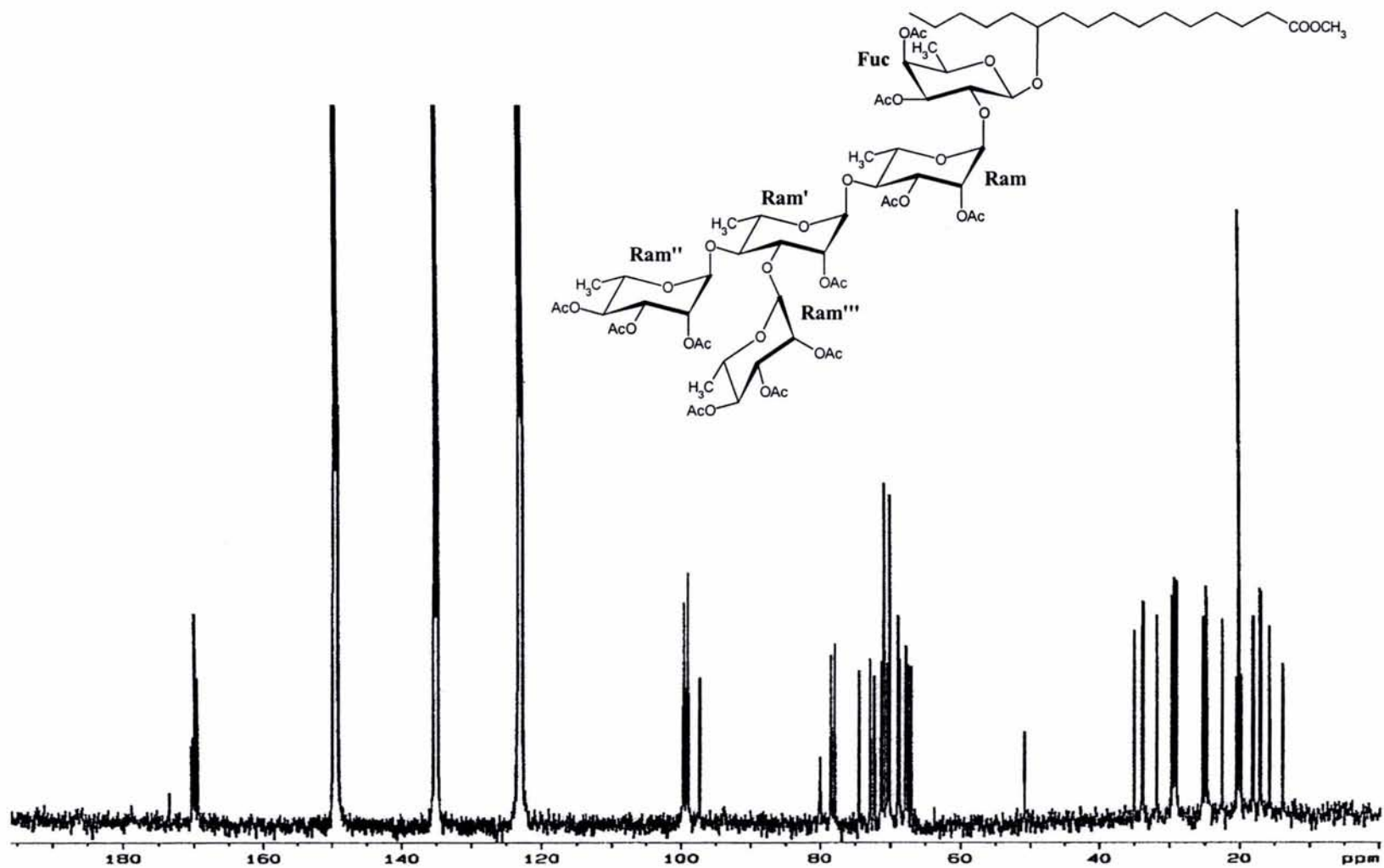


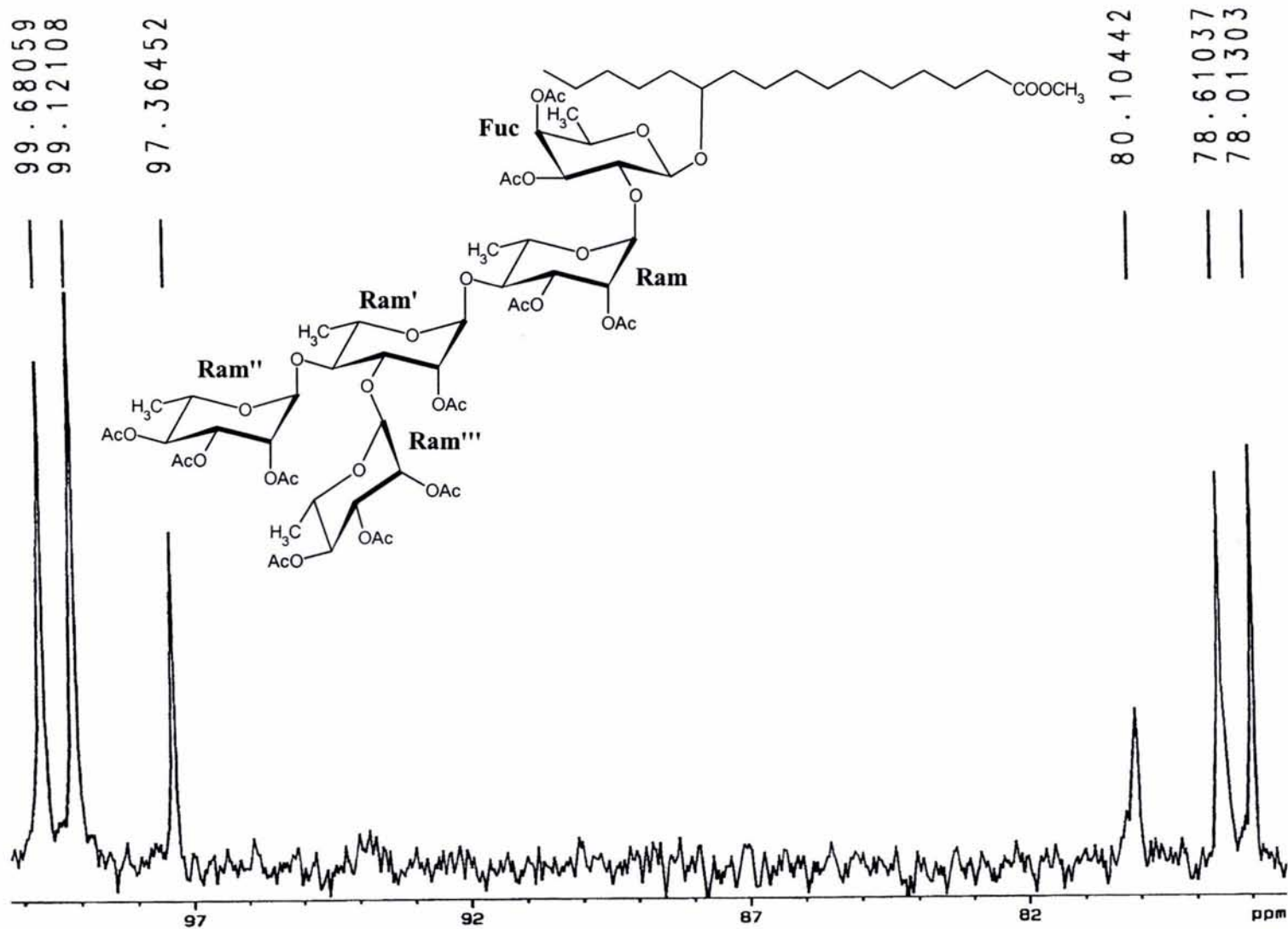
Espectro 1. RMN ^1H del compuesto AG-1



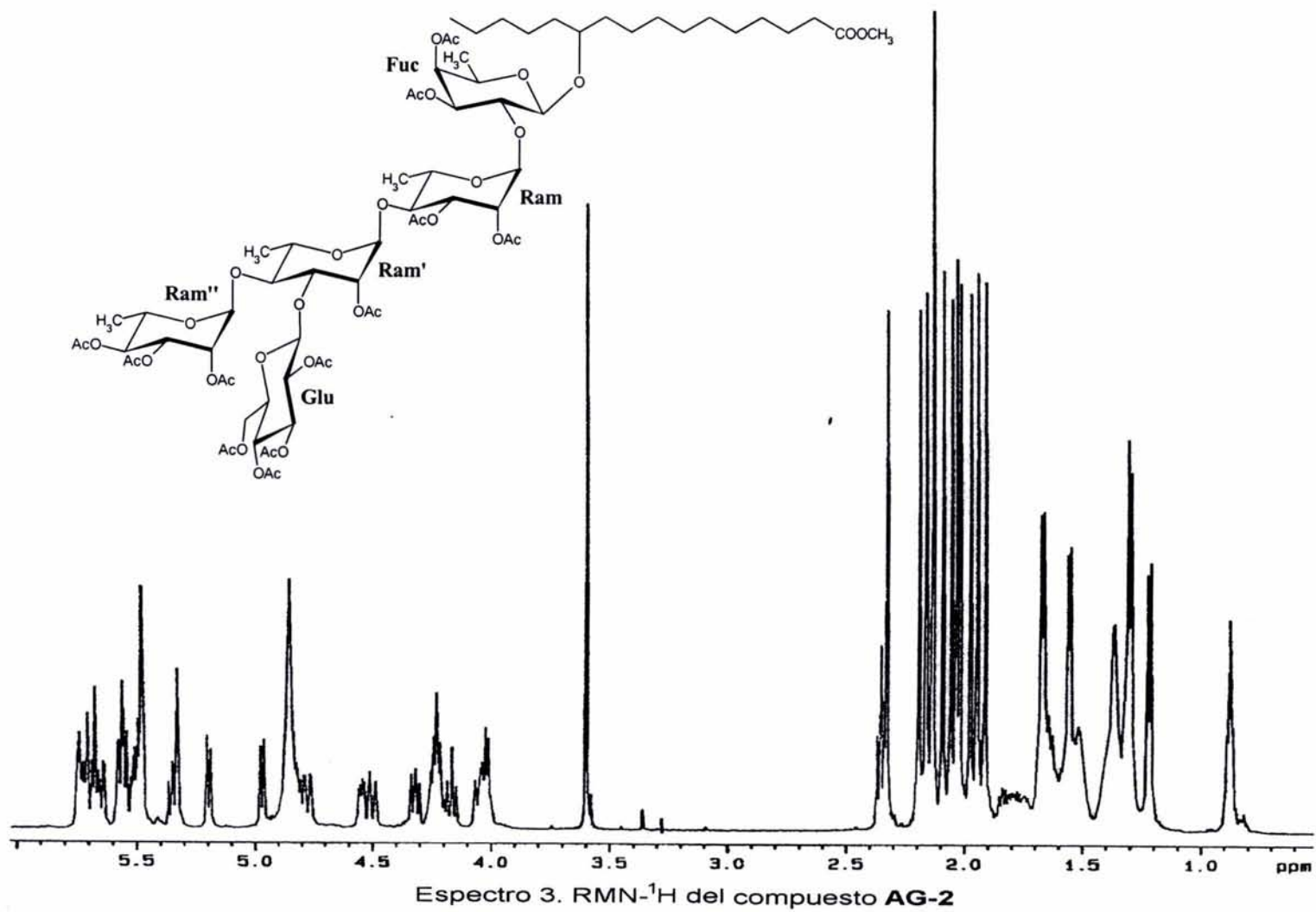
Espectro 1a. Sección de protones anoméricos del compuesto AG-1

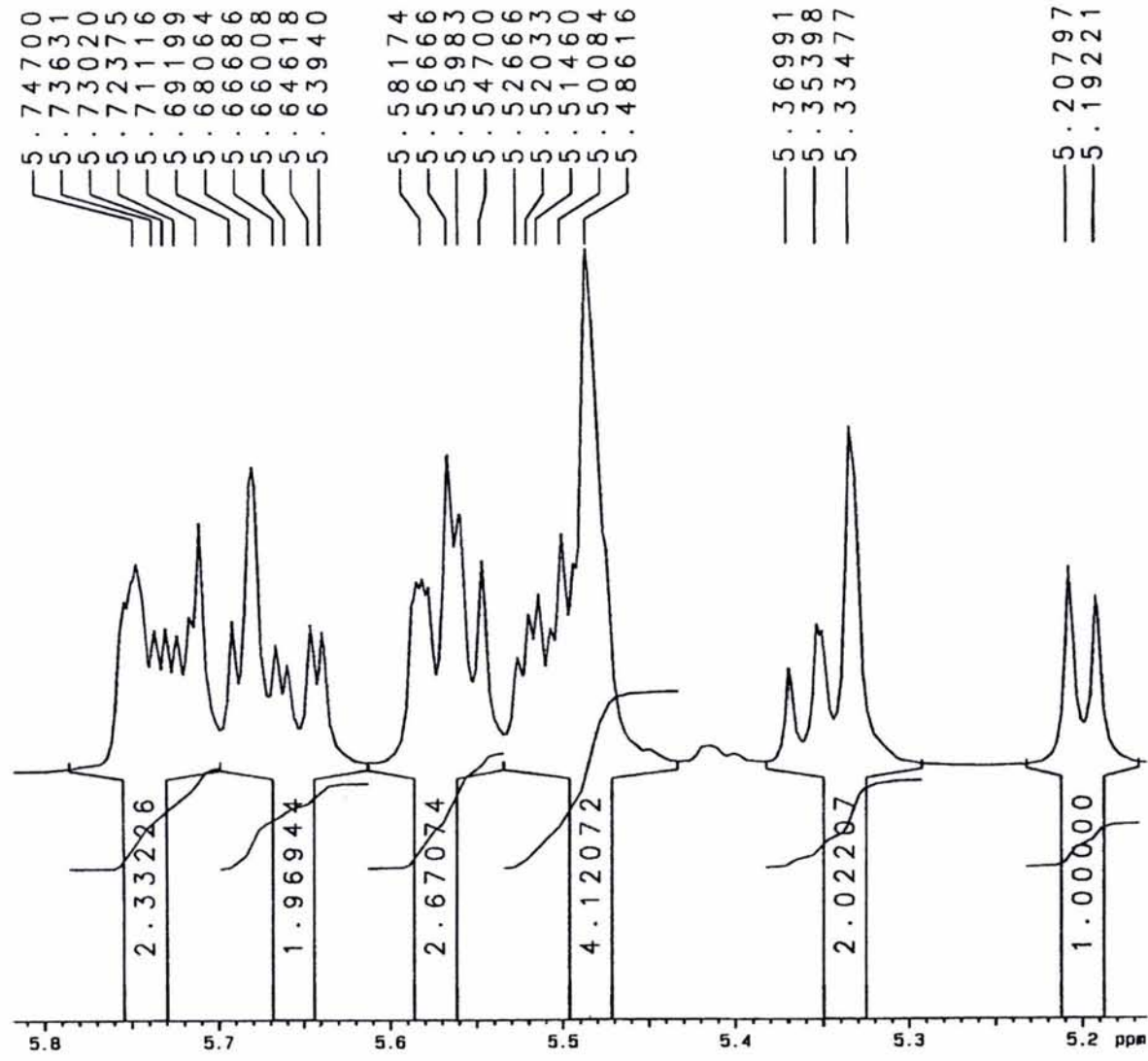


Espectro 2. RMN- ^{13}C del compuesto AG-1

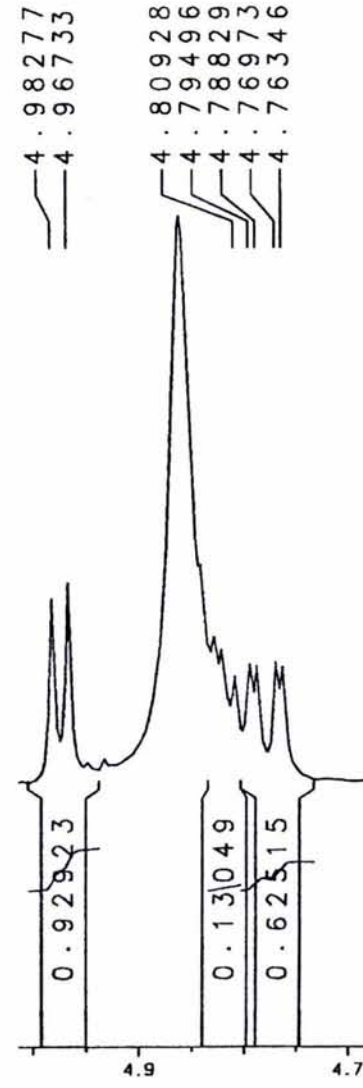


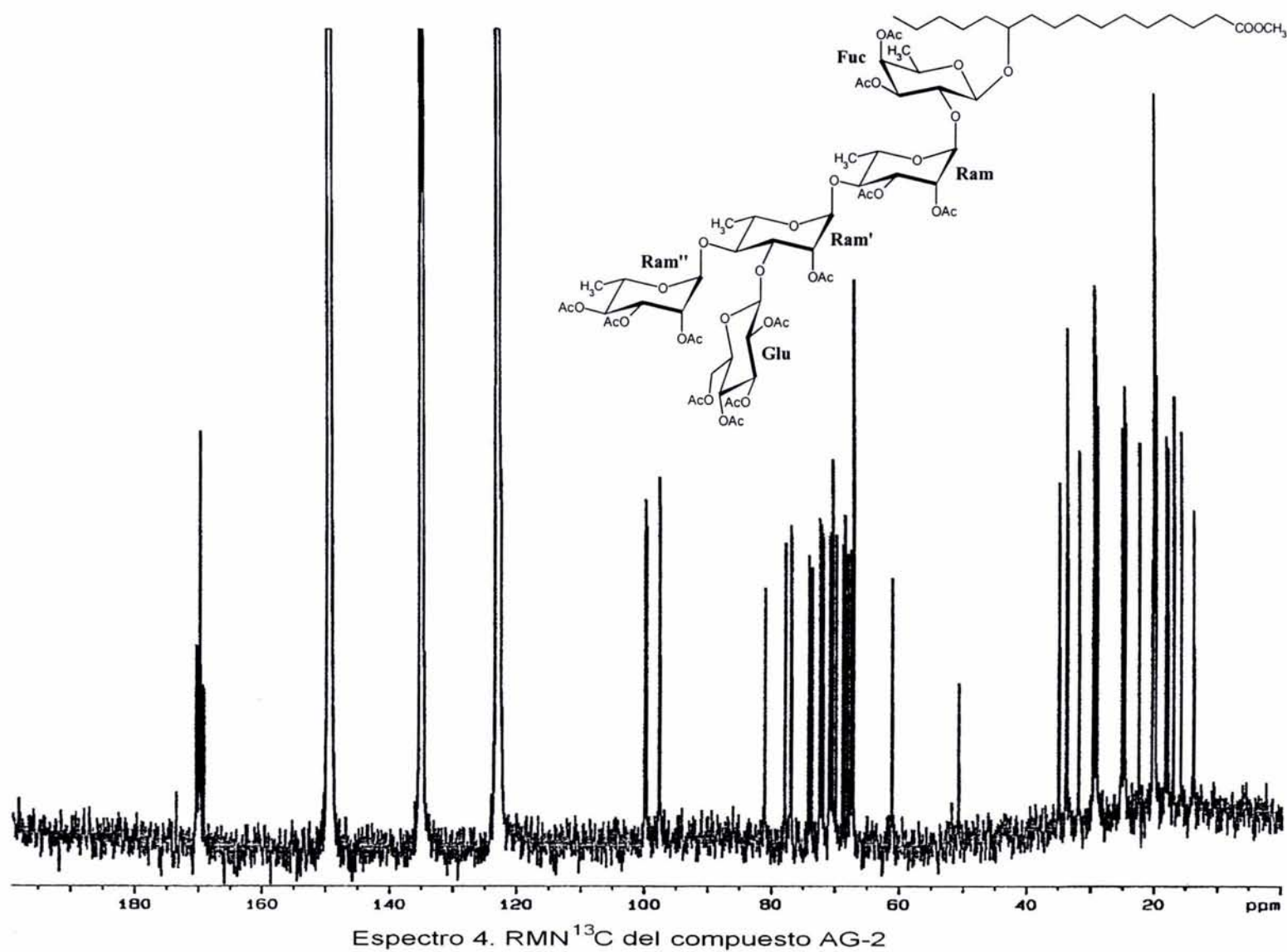
Espectro 2a. Sección de carbonos anoméricos del compuesto **AG-1**

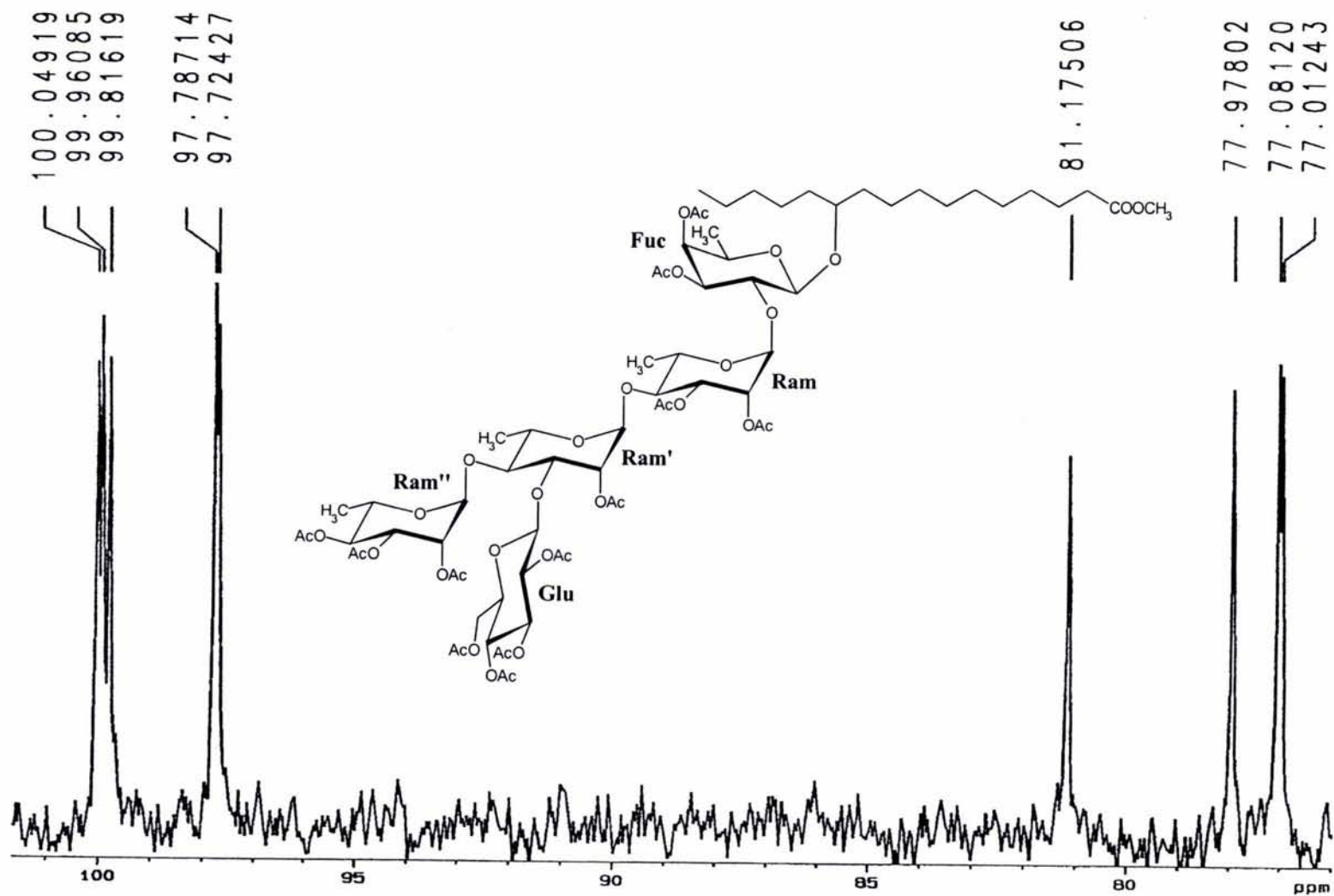




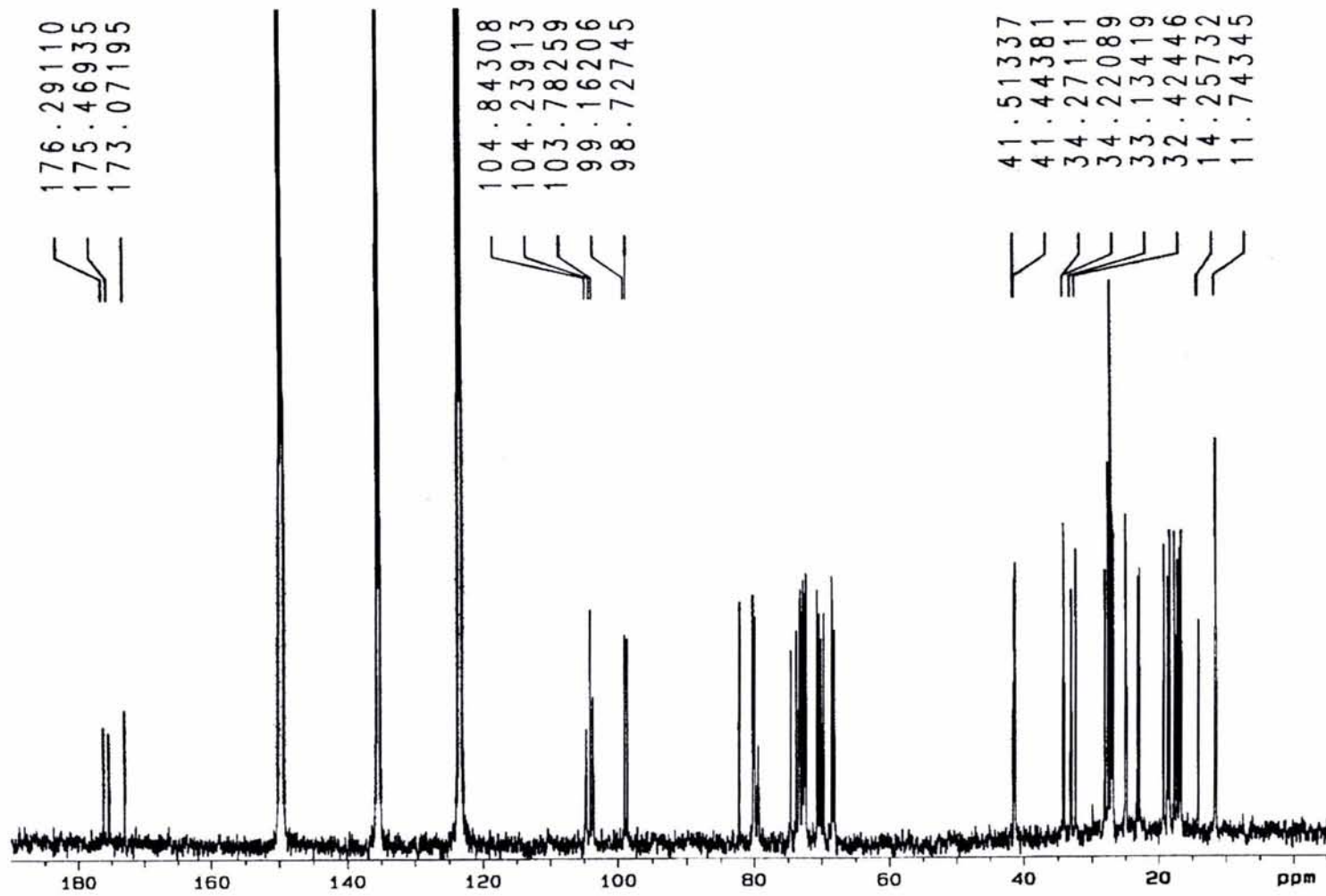
Espectro3a. Sección de protones anoméricos del compuesto AG-2



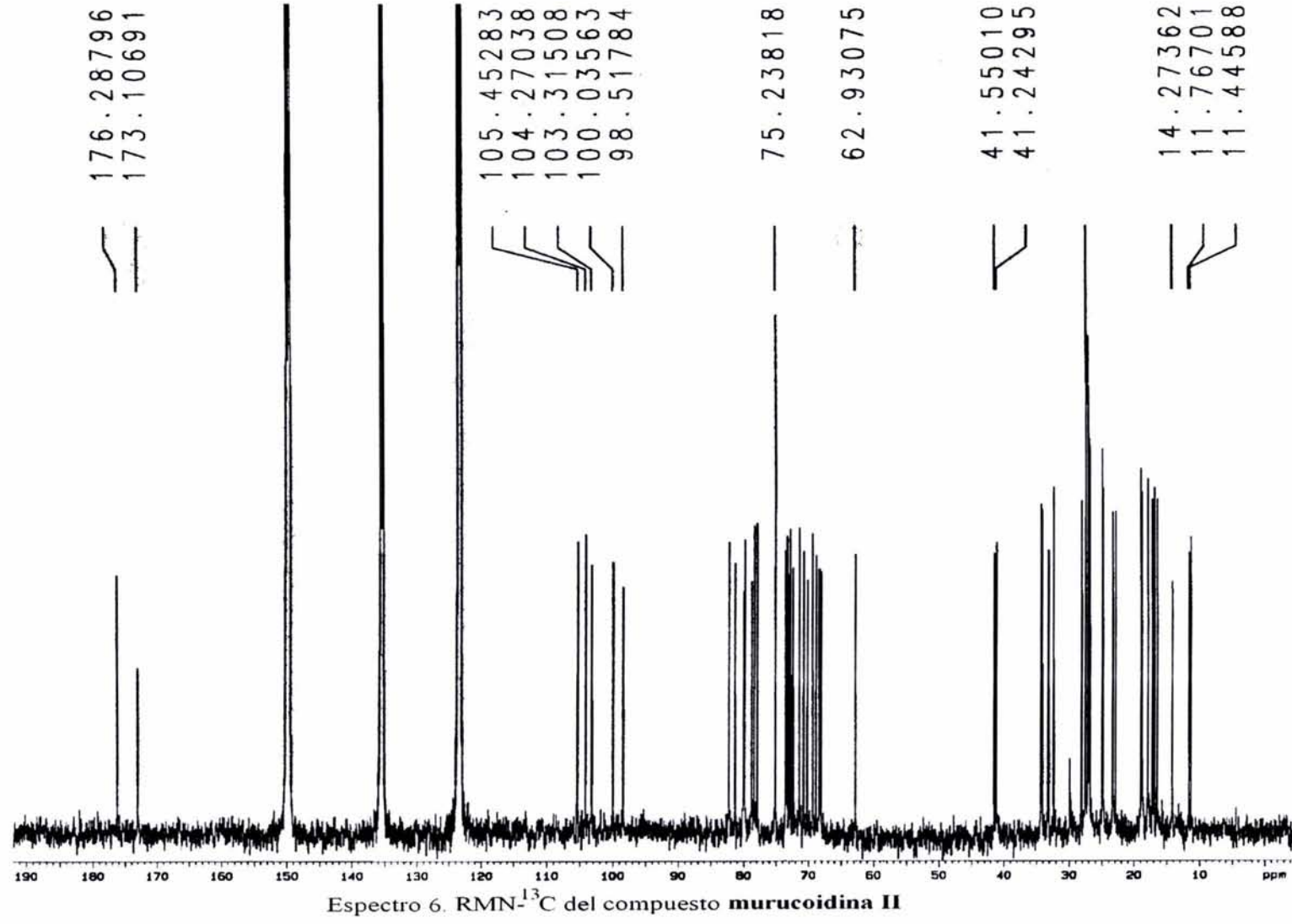


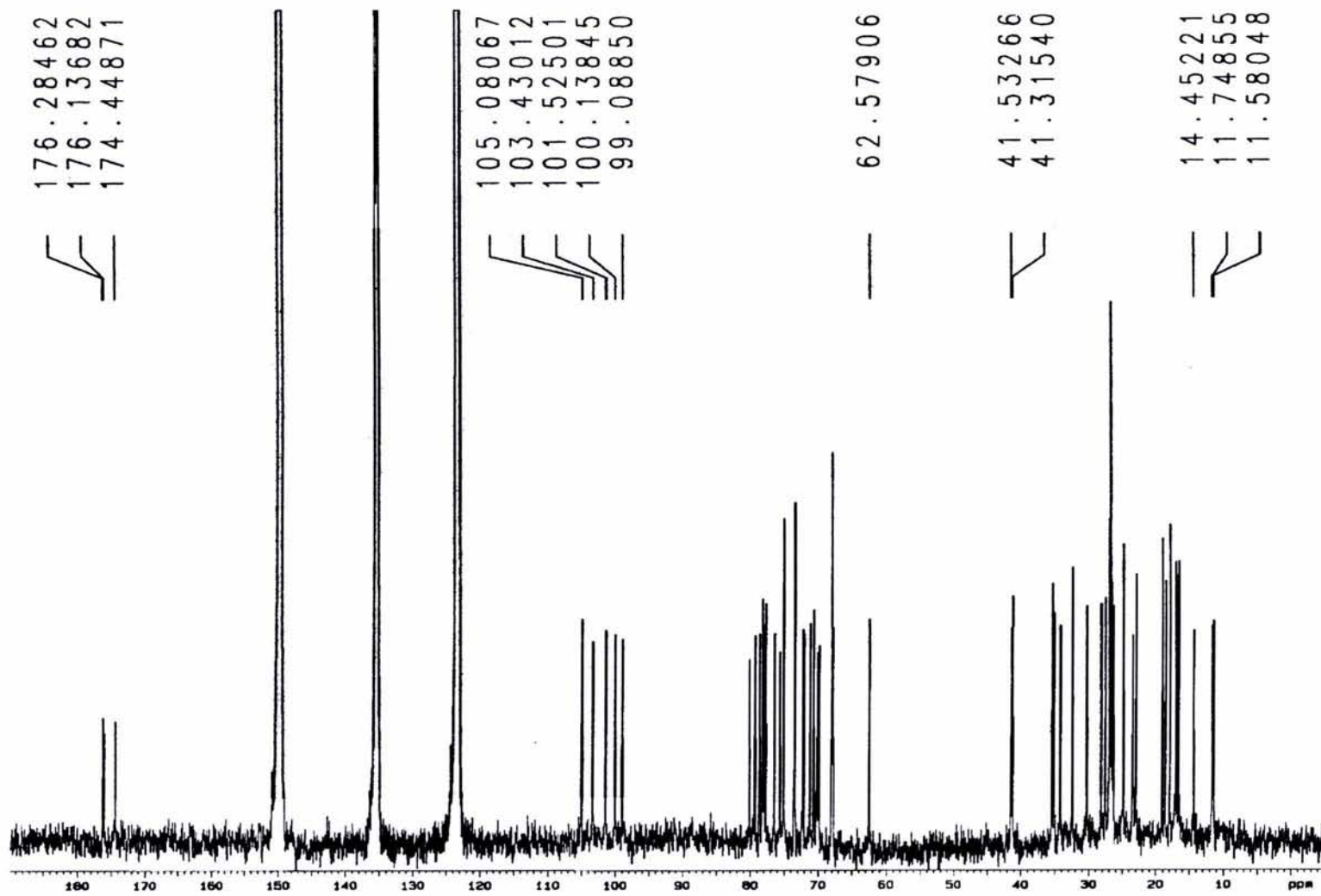


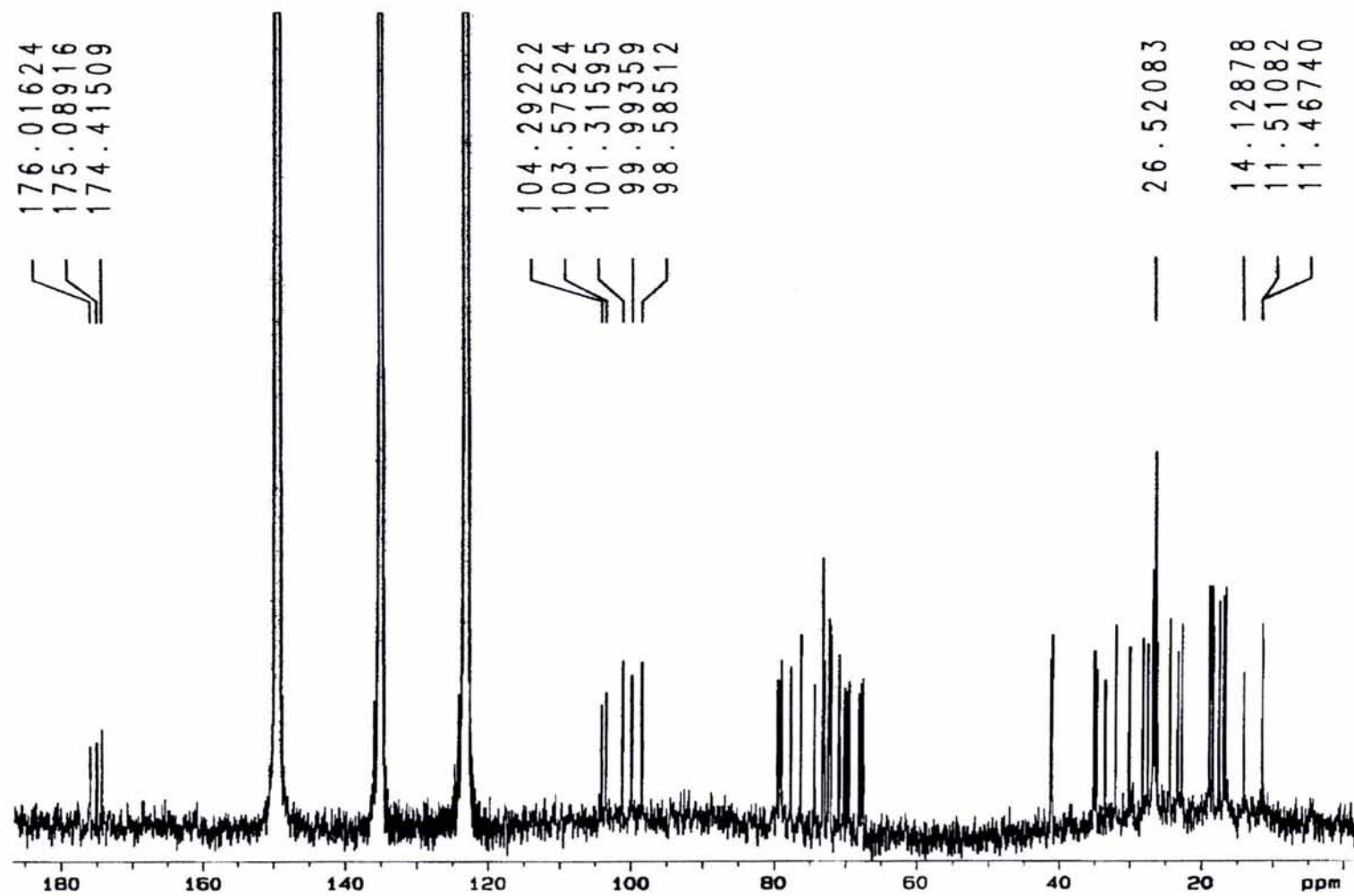
Espectro 4a. Sección de carbonos anoméricos del compuesto AG-2



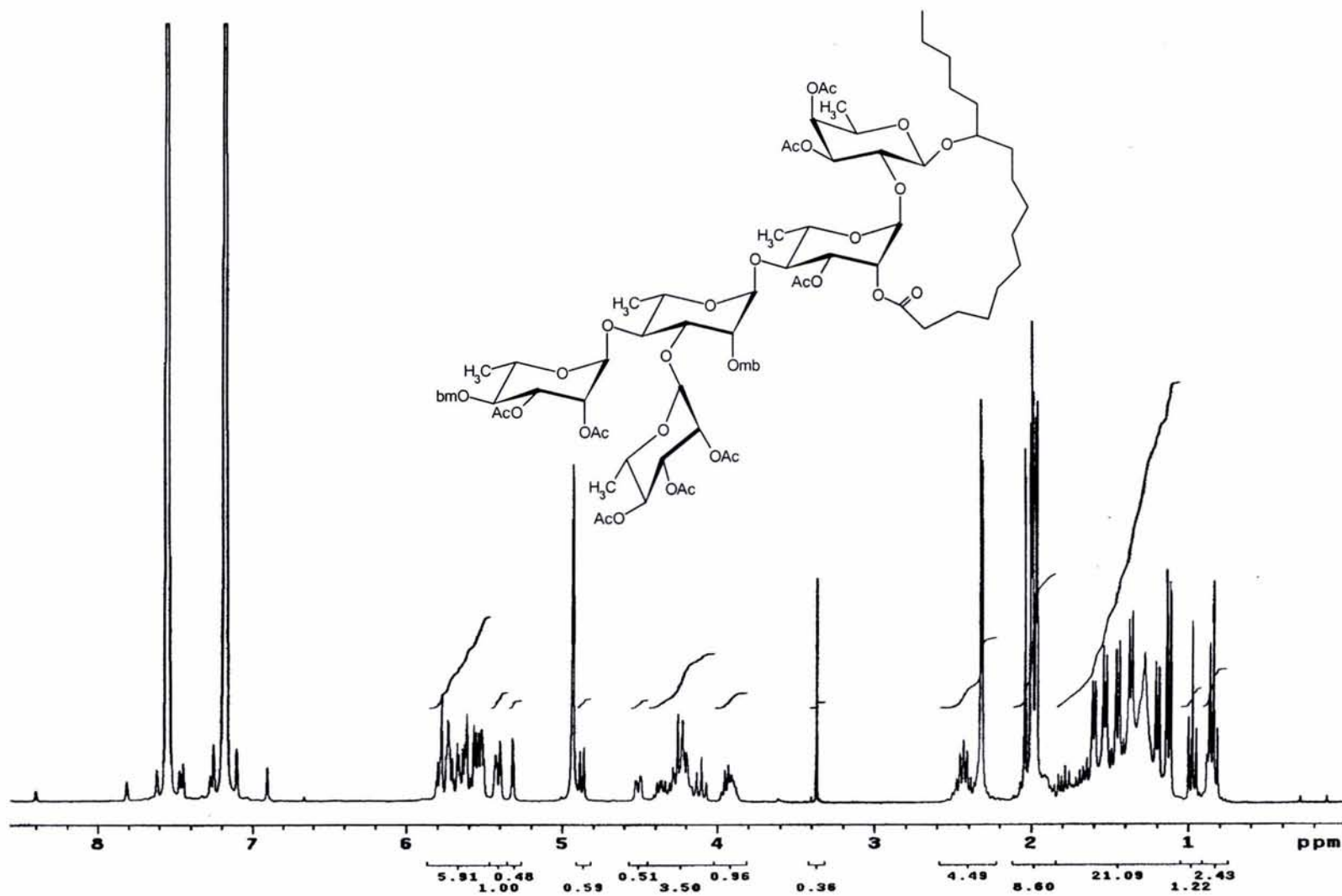
Espectro 5. RMN- ^{13}C del compuesto **murucoidina I**

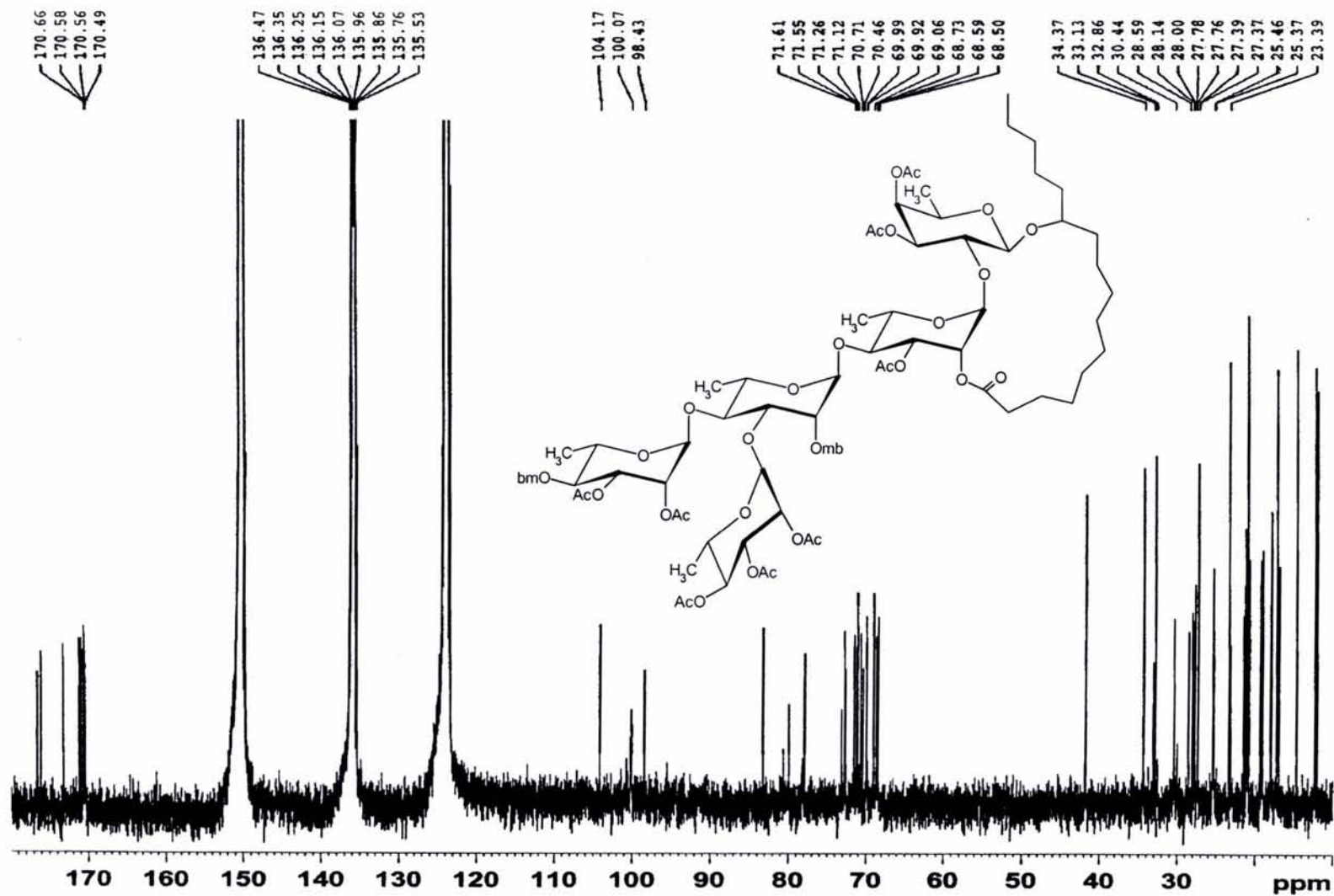




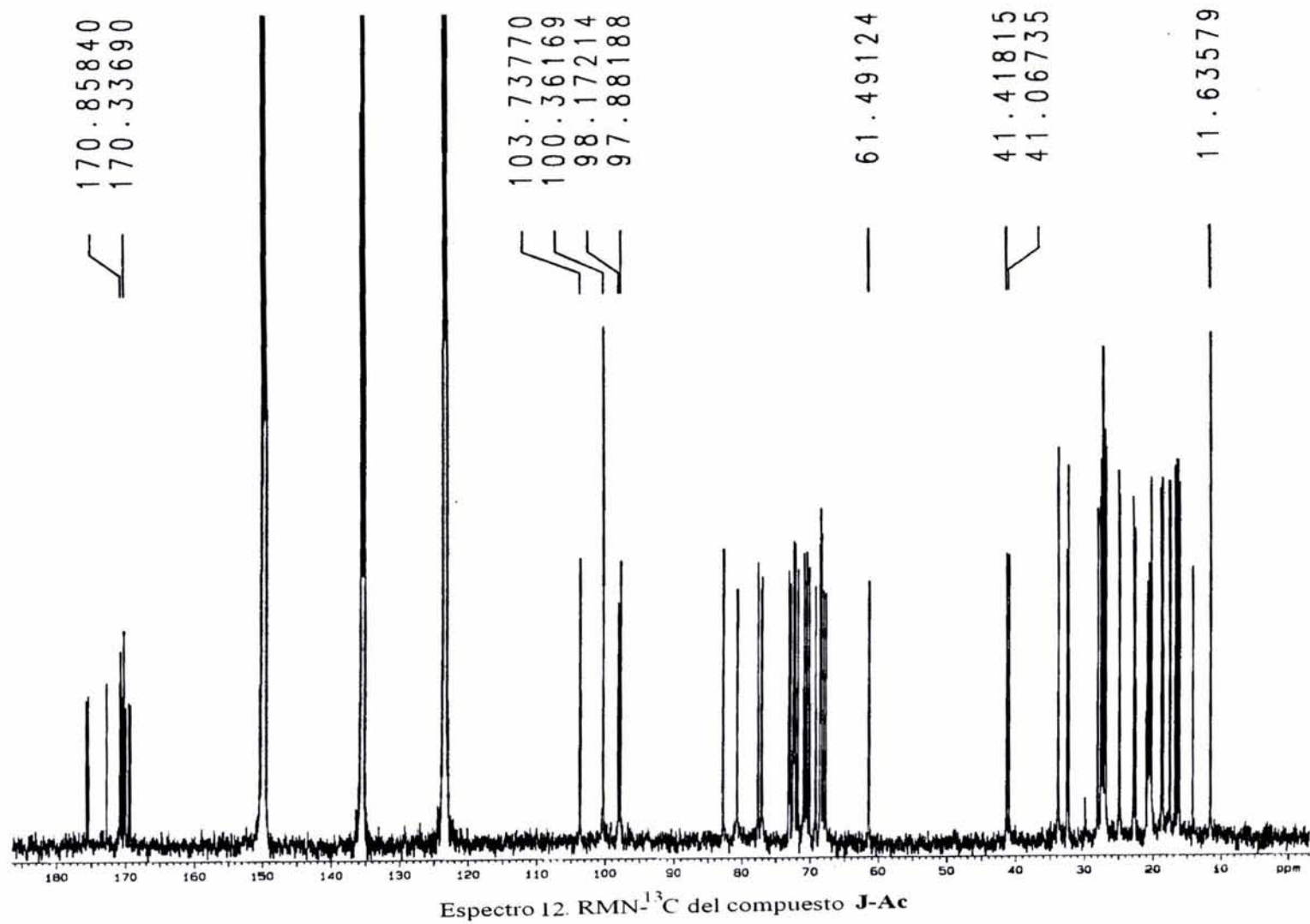


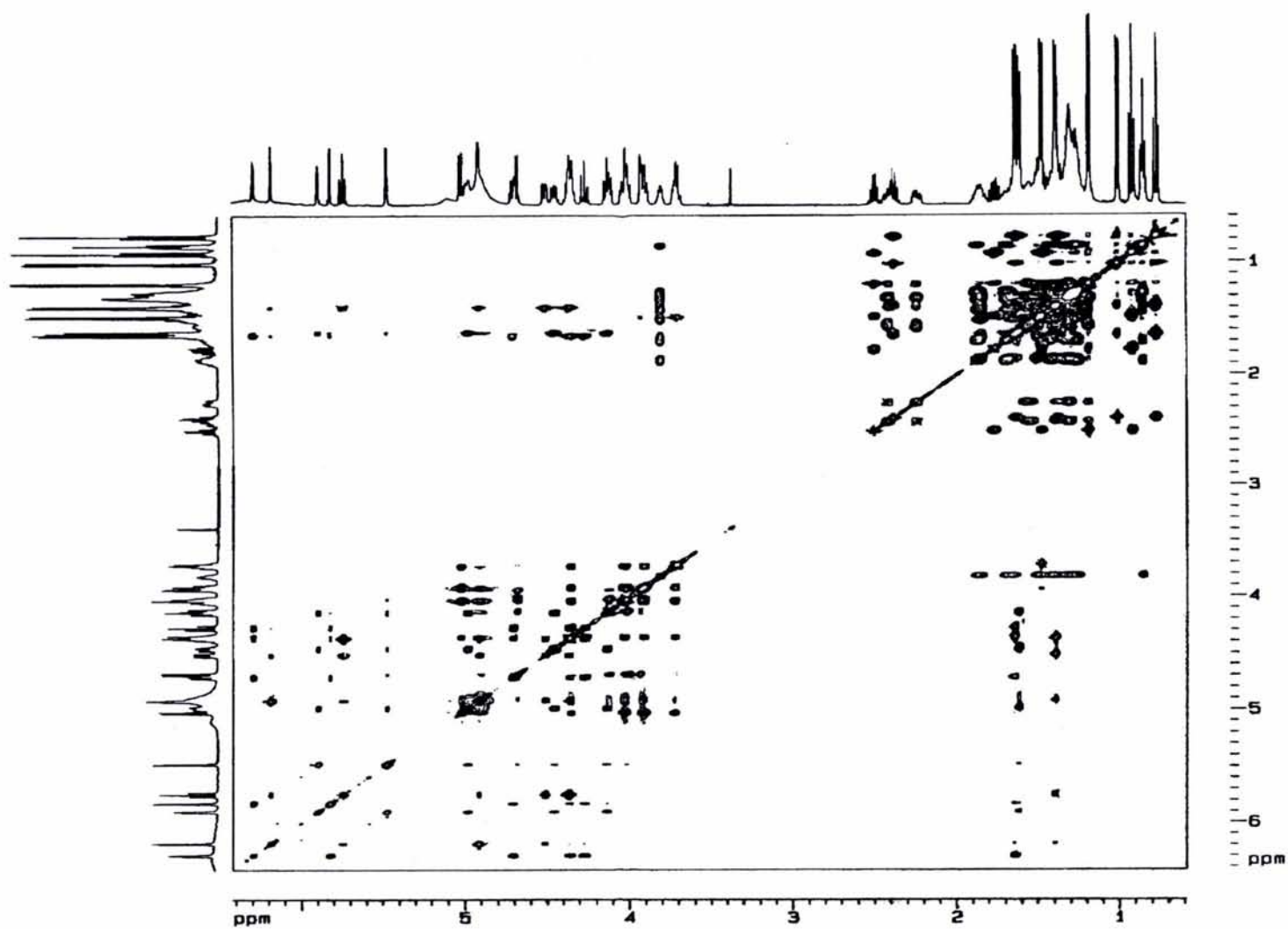
Espectro 8. RMN- ^{13}C del compuesto **estoloniferina I**

Espectro 9. RMN- ^1H del compuesto **H-Ac**

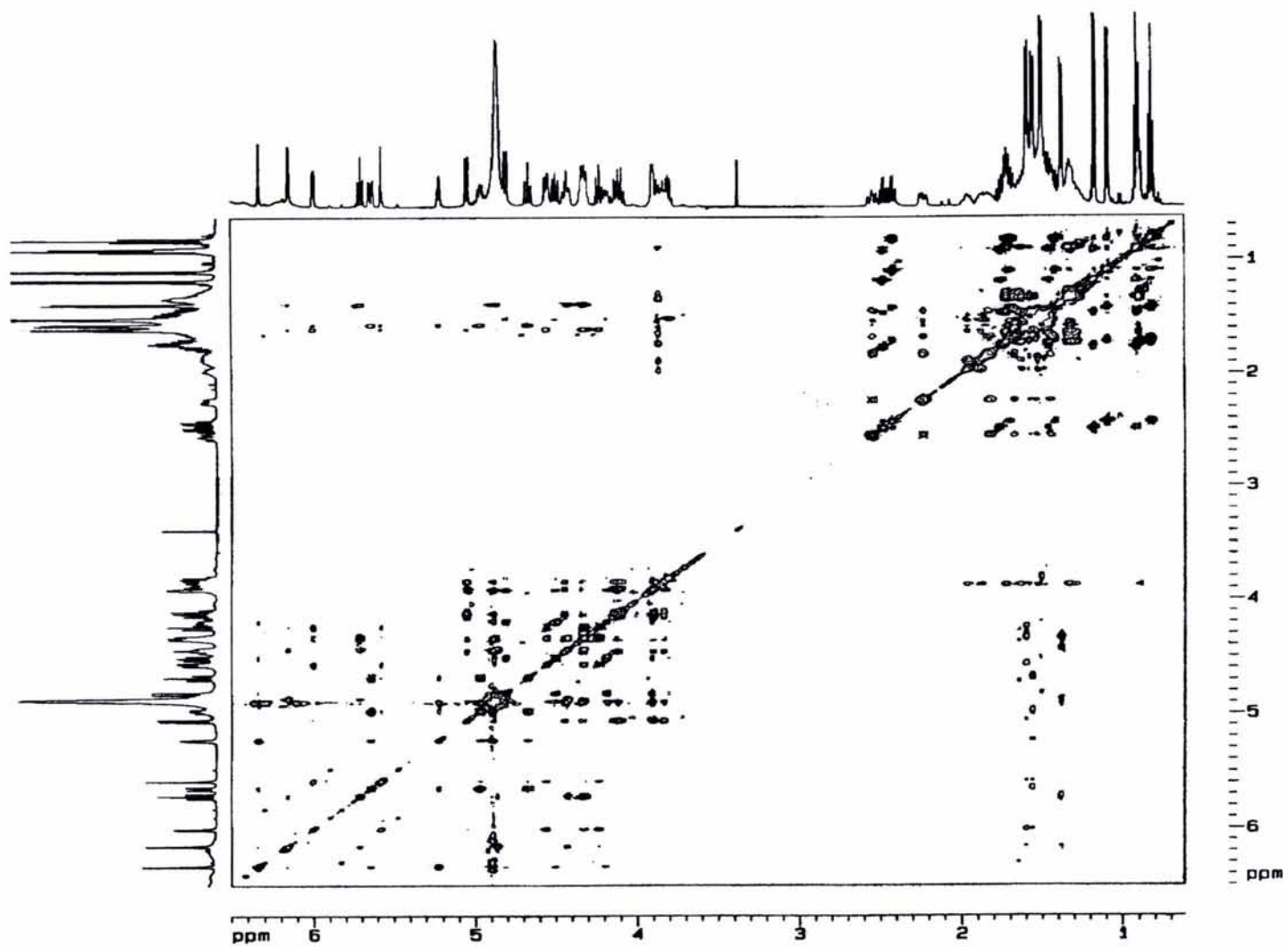
Espectro 10. RMN- ^{13}C del compuesto **H-Ac**







Espectro 13. RMN bidimensional TOCSY del compuesto **murucoidina II**



Espectro 14. RMN bidimensional TOCSY del compuesto **murucoidina III**