



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

**“Caracterización de la estructura química
del núcleo glicosídico de las resinas de
Ipomoea wolcottiana”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

ISRAEL AMBROSIO GARDUÑO.



MÉXICO, D.F.

2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

Presidente	Dra. Isabel Aguilar Laurents.
Vocal	Dr. Rogelio G. Pereda Miranda.
Secretario	M. en C. Georgina Duarte Lisci.
Primer suplente	Dra. Rachel Mata Essayag.
Segundo suplente	Dr. Fausto Rivero Cruz.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.

Supervisora técnica:

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano.

Sustentante:

Israel Ambrosio Garduño.

Quiero extender mis agradecimientos a:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de Febrero de 2006–Febrero de 2007 a través del proyecto 45861 Q.
- M. en C. Atilano Gutiérrez de la Universidad Autónoma Metropolitana por la determinación de los espectros de RMN.
- M. en C. Georgina Duarte y Margarita Guzmán de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de los espectros de masas.
- Q.F.B. Marisela Gutiérrez de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de las rotaciones ópticas.

En especial a:

- Dr. Rogelio Pereda Miranda: Tuve mucha suerte al haber encontrado a un asesor como usted, simplemente por ser un gran ser humano y un excelente profesor. Mil gracias doctor por haberme brindado la oportunidad de trabajar en su laboratorio.
- Dra. Mabel Fragoso Serrano: No pude haber tenido mejor Supervisora Técnica que tu Mabel, Muchas gracias por tu paciencia, apoyo y asesoría para que este trabajo pudiera impregnarse en papel.
- M en C. Lilia Chérigo: Muchas gracias pequeña Lilia, créeme que tu presencia en este trabajo fue esencial. No dejare de agradecerte todo lo que has hecho por mi para que este trabajo resultara lo mejor posible.
- Dr. Euclides Ávila Chávez: Eres una de las personas que mas he admirado en mi vida, por ser un amigo y un profesor de primer nivel. Muchas gracias por todo.
- A todos mis compañeros del laboratorio 123: Berenice, Gabriela, Mónica, Nadia, Carolina, Erik, Francisco, Daniel y Edgar por haber formado ese gran equipo de trabajo con el cual toda la estancia en el laboratorio fue mucho mas divertida.

A mis padres:

No hay manera de agradecer todo lo que han hecho por mí, solo quiero hacerles saber que gracias a la inyección de fortaleza mental que me han dado, he llegado hasta aquí y que este triunfo no solo es mío sino también de ustedes, los magníficos seres humanos que me dieron la vida. Gracias. Los amo.

A mis hermanos:

Cassandra, Berenice y Ulises, ustedes han sido las personas que me enriquecen como persona día con día, no hay mejor bendición que contar con ustedes como parte de esta gran familia.

A mis Tíos:

A mi tío Nicolás y mi tía Gloria, gracias por su apoyo durante todo este tiempo, además de darme auténticas lecciones de vida que me han hecho ser mejor persona.

A mis Amigos:

Fanny, Martha, Paola y Mauricio, son las personas más especiales que he conocido en la Universidad, soy afortunado al contar con una amistad como la suya, los admiro como las excelentes personas que son, me encantaría seguir contando con ustedes por mucho tiempo.

A Bety, Mayra, Bere Ayala, Toño, Omar Zúñiga, Omar Piña y Daniel quienes compartieron gran parte de la carrera conmigo haciendo de esto una experiencia basta en buenos compañeros y muy divertida.

A mi amiguísima Nayeli, por compartir todos estos años de amistad los malos y buenos momentos de nuestras vidas.

ÍNDICE

1. Introducción	Error! Bookmark not defined.	
2. Antecedentes	Error! Bookmark not defined.	
2.1 ANTECEDENTES DE LA FAMILIA CONVULVACEAE		ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.		
2.2 CARACTERÍSTICAS DEL GÉNERO <i>IPOMOEA</i>		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
2.3 ANTECEDENTES BOTÁNICOS Y ETNOBOTÁNICOS DE <i>IPOMOEA WOLCOTTIANA</i>		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
2.4 METABOLITOS BIOACTIVOS DEL GÉNERO <i>IPOMOEA</i>		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
2.5 ESTUDIOS FITOQUÍMICOS Y FARMACOLÓGICOS DE LAS RESINAS GLICOSÍDICAS		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
3. Justificación	Error! Bookmark not defined.	
4. Objetivos	Error! Bookmark not defined.	
4.1 OBJETIVO GENERAL		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5. Parte Experimental	Error! Bookmark not defined.	
5.1 DETERMINACIÓN DE CONSTANTES FÍSICAS		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
5.2 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
5.3 MATERIAL VEGETAL		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
5.3.1 OBTENCIÓN DE LAS RESINAS GLICOSIDICAS		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
5.4 OBTENCIÓN DE DERIVADOS A PARTIR DE LA JALAPINA		ERROR!
BOOKMARK NOT DEFINED.		
5.4.1 HIDRÓLISIS ALCALINA		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.4.2 REACCIÓN DE ACETILACIÓN		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.4.3 REACCIÓN DE ALQUILACIÓN CON DIAZOMETANO		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
5.4.4 GENERACIÓN DEL REACTIVO		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.4.5 REACCIÓN DE ALQUILACIÓN		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
5.5 SEPARACIÓN DE LOS DERIVADOS MEDIANTE CLAE		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
6. Resultados y Discusión	Error! Bookmark not defined.	
6.1 DETERMINACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
6.2 SEPARACION DEL ACIDO GLICOSÍDICO ACETILADO-METILADO MAYORITARIO MEDIANTE CLAE		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
6.3 ESPECTROMETRÍA DE MASAS		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		
6.4 CARACTERIZACIÓN DEL NÚCLEO GLICOSÍDICO DE <i>IPOMOEA WOLCOTTIANA</i>		ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.
BOOKMARK NOT DEFINED.		

6.4.1 ASIGNACIÓN DE SEÑALES DE RMN ^1H Y ^{13}C **ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.**

6.4.2 SECUENCIA DE GLICOSIDACIÓN Y POSICIONES DE ESTERIFICACIÓN
ERROR! BOOKMARK NOT DEFINED.

7. Conclusiones **Error! Bookmark not defined.**

8. REFERENCIAS **Error! Bookmark not defined.**

LISTA DE CUADROS

Cuadro		Pág.
1	Análisis mediante CG-EM de la fase etérea.	24
2	Desplazamientos químicos en la RMN ^1H del éster metílico del ácido operculínico A con diferentes grados de acetilación (500 MHz).	34
3	Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C del éster metílico del ácido operculínico A con diferentes grados de acetilación (125.7 MHz).	35

LISTA DE FIGURAS

Figura	Contenido	Pág.
1	Árbol de <i>Ipomoea wolcottiana</i> _____	5
2	Flores de <i>Ipomoea wolcottiana</i> _____	6
3	Distribución en Veracruz de <i>Ipomoea wolcottiana</i> _____	7
4	Tricolorina A, componente mayoritario de <i>Ipomoea tricolor</i> _____	9
5	Estructura de la simonina I encontrada en <i>Ipomoea batatas</i> _____	10
6	Glicolípidos presentes en <i>Ipomoea muricata</i> _____	11
7	Glicolípidos de <i>Ipomoea stans</i> _____	12
8	Ácido operculínico A de <i>Ipomoea murucoides</i> _____	13
9	Ácido simónico B de <i>Ipomoea murucoides</i> _____	14
10	Pescaprosido A. Núcleo glicosídico de <i>Ipomoea pes-caprae</i> _____	15
11	Cromatograma en capa fina de las fracciones ricas en oligosacáridos_____	20
12	Cromatograma de gases obtenido para la fase etérea_____	24
13	Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo_____	25
14	Purificación del compuesto 3 utilizando la técnica de reciclaje_____	26
15	Espectros de masas para los ácidos grasos esterificantes_____	27
16	Espectro de RMN ¹ H del compuesto 3 _____	28
17	Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 3 _____	28
18	Ampliación del espectro HSQC del compuesto 3 _____	29
19	Ampliación del espectro COSY del compuesto 3 _____	30
20	Ampliación del espectro homonuclear TOCSY del compuesto 3 _____	31
21	Ampliación del espectro HMBC del compuesto 3 _____	32
22	Estructuras moleculares de los derivados parcialmente acetilados y el peracetato-metilado de <i>Ipomoea wolcottiana</i> _____	37

Abreviatura	Significado
α	Rotación observada en el polarímetro.
δ	Desplazamiento químico.
COSY	Correlation Spectroscopy.
CHCl ₃	Cloroformo.
CHCN ₃	Acetonitrilo.
m	Metros.
g	Gramo.
mg	Miligramo.
FAB	Fast Atom Bombardment.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy.
Hz	Hertz.
J	Constante de acoplamiento.
AcOEt	Acetato de Etilo
MeOH	Metanol.
min	Minutos
ppm	Partes por millón.
NaHCO ₃	Bicarbonato de Sodio
MHz	Mega hertz
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica.
T.R.	Tiempo de Retención.
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy.

1. Introducción

Desde la época prehispánica, las plantas medicinales mexicanas se han utilizado de manera tradicional en nuestro país, además de que constituyen un importante acervo cultural que nuestros antepasados nos legaron. El conocimiento y el uso de la herbolaria nacional proviene desde dicha época, en donde surgieron las culturas mesoamericanas más importantes; en dichas regiones sobrevivieron fuentes autóctonas sobre el conocimiento de su botánica medicinal: códices, pinturas murales y la tradición oral. En la actualidad, se cuenta con los valiosos testimonios de los grupos étnicos que aún existentes en nuestro territorio que han preservado numerosas costumbres terapéuticas y ritos herbolarios.

La flora mexicana se caracteriza por una gran diversidad. En la actualidad la herbolaria tradicional ha ido cobrando importancia debido a que este tipo de medicina popular representa una fuente potencial alternativa de materias primas para la elaboración de medicamentos semisintéticos y fitomedicamentos. Prueba de ello es la creciente demanda de productos vegetales que se utilizan en la industria farmacéutica para la elaboración y búsqueda de nuevos y eficientes principios activos (Cox, 1994).

Una de las familias que se encuentra mejor representada en la etnobotánica mexicana es la de las Convolvuláceas y esto se debe a que contiene diferentes propiedades medicinales; como purgantes y agentes antisépticos. También, esta familia se destaca por sus propiedades alucinógenas que la colocaron como los narcóticos de mayor importancia en los rituales religiosos de los pueblos mesoamericanos (Oliveira, *et al.*, 2003). Destacan por sus propiedades medicinales los géneros *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Exogonium* y *Operculata*.

Cabe mencionar que dentro de la comunidad científica enfocada en el área médica, el género *Ipomoea* ha despertado un gran interés, debido a que este grupo de plantas cuenta con una extraordinaria pluralidad de actividades, por ejemplo, actividad antimicrobiana en el caso de *Ipomoea tricolor* (Pereda-Miranda, *et al.*, 1993),

antiepilépticas y anticancerígenas en el caso de *Ipomoea stans* (Díaz, 1997; Enríquez, *et al.*, 1992), y en especial purgativas por parte de *Ipomoea purga*, *Ipomoea orizabensis*, *Ipomoea batatas* e *Ipomoea jalapa* entre otras (Pereda-Miranda, *et al.*, 2006).

Los constituyentes mayoritarios responsables de una gran parte de las actividades farmacológicas de dicho género son las resinas glicosídicas contenidas en diferentes partes de la planta (Pereda-Miranda y Bah, 2003). Este amplio espectro de actividades biológicas de las resinas glicosídicas las han convertido en compuestos químicos de gran interés para su estudio farmacológico. Sin embargo, por su gran complejidad estructural esto no se ha logrado de manera significativa ya que los procesos para la separación y la purificación de estos principios de alto peso molecular sólo se han aplicado a aquellos que muestran propiedades anfipáticas y son solubles en disolventes orgánicos polares próticos, e.g. MeOH (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

2. Antecedentes

2.1 Antecedentes de la familia *Convolvulaceae*

La familia de las Convolvuláceas se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios en todo el mundo. Dicha familia se encuentra constituida por plantas herbáceas y leñosas, con tallos rastreros, en su mayoría son enredaderas con hojas alternas y simples; flores muy grandes y vistosas, su cáliz constituido por cinco sépalos libres y una corola con cinco pétalos fusionados formando un claro embudo. En el mundo se estiman alrededor de 55 géneros y 1650 especies. Los géneros más representativos son *Ipomoea* con 500 especies, *Convolvulus* con 250 especies y *Cuscuta* con 170 especies. En México dentro de esta familia se han reportado 15 géneros y aproximadamente 217 especies (MacDonald A, 1991).

La mayoría de los estudios de tipo farmacológico y químico, sobre la familia Convolvulácea se centran en el género *Ipomoea*. Por mucho tiempo, este género también ha sido de gran importancia económica por su aplicación en diferentes ámbitos, por ejemplo, el alimenticio (*Ipomoea batatas*), el ornamental (*Ipomoea canea* e *Ipomoea alba*) y el medicinal (*Ipomoea purga*, *Ipomoea stans* e *Ipomoea murucoides*), entre otros. Las semillas de *Ipomoea violacea* es utilizada en el estado de Oaxaca como uno de los principales alucinógenos tanto en los rituales mágico-religiosos de adivinación como en las “limpias” curativas (Shultes y Hoffman, 1982).

Una de las características predominantes de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas, las cuales se encuentran ubicadas en diferentes tejidos de la planta. Dichas resinas son las responsables de ciertas propiedades biológicas de las plantas de esta familia.(Bruneton, 1993).

2.2 Características del género *Ipomoea*

En México, el género *Ipomoea* es uno de los mayoritarios con un grado de endemismo de aproximadamente el 65%. Gran parte de las plantas del género *Ipomoea* son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros, algunas otras como *Ipomoea murucoides* e *Ipomoea intrapilosa* (cazahuate) poseen la característica particular de ser arbóreas y de tener madera suave con la capacidad de crecer hasta 9 metros de altura; las especies *Ipomoea phillomega* e *Ipomoea santillan* son lianas que alcanzan alturas de hasta 15 metros. Otras especies como *Ipomoea stans*, *Ipomoea duranguensis* e *Ipomoea sescossiana* son arbustos perennes, leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1 metro (Argueta, 1994).

Entre los principales usos destacan sus propiedades purgativas, siendo el principal representante *Ipomoea purga* (la raíz de jalapa). En el centro de México la especie *Ipomoea stans* (tumbavaqueros) se usa como catártico y junto con *Ipomoea orizabensis* (raíz de escamonia mexicana o falsa jalapa), constituyen un adulterante de la raíz de jalapa (Pereda-Miranda, *et al.* 2006). Otras especies que comparten dicha propiedad son *Ipomoea batatas* (el camote) e *Ipomoea simulans*. La especie *Ipomoea intrapilosa* tiene la propiedad de tener un efecto analgésico ya que contiene alcaloides del tipo ergolina, compuestos que en general son propios de las Convolvuláceas.

Ipomoea murucoides es un árbol nativo de México que crece en las zonas tropicales formando parte de matorrales áridos abiertos. Es importante mencionar que esta especie también se le conoce como: cazahuate, cazahuate negro, micaquáhuatl, ozote, palo blanco, palo santo, siete pellejos, palo flojo y palo muerto (Monroy-Ortiz y Castillo, 2000).

2.3 Antecedentes botánicos y etnobotánicos de *Ipomoea wolcottiana*

Actualmente no se reporta en la literatura estudios sobre la composición química de las resinas glicosídicas de *Ipomoea wolcottiana*, sólo existen algunas publicaciones que hablan sobre el contenido de ácidos grasos en las semillas, utilizados como marcadores taxonómicos entre diferentes especies de Convolvuláceas (Parra V., Bullock S H., 1998).

Ipomoea wolcottiana es nativa de México, crece en zonas tropicales formando parte de la vegetación secundaria de las selvas bajas caducifolias. Es un árbol que llega a medir hasta 12 m de altura, con el tronco generalmente robusto y torcido, con numerosas ramas ascendentes y horizontales y con una copa redondeada, de madera suave produciendo mucho látex (**Figura 1**). Sus hojas son simples, deciduas, pecioladas. Flores en fascículos en las axilas de hojas caídas, sépalos color crema verdoso, corola blanca con la garganta morada, estambres pardos amarillentos (**Figura 2**). Entre los nombres más comunes encontramos: cazahuate, palo muerto y patancan. Florece de Octubre a Marzo (MacDonald, 1994).



Figura 1. Árbol de Ipomoea wolcottiana.



Figura 2. Flores de Ipomoea wolcottiana.

Antiguamente se usaba el agua teñida con esta planta, como medicamento contra afecciones renales y vesicales, pero en la actualidad se emplea solamente como diurético. Los campesinos utilizan un trozo de madera en el agua que beben las aves de corral, creyendo que las protege ante enfermedades, además de que sirve para curar al ganado cuando se enferma.

Ipomoea wolcottiana se encuentra distribuida en el centro y sur de México, desde los estados de Michoacán, Hidalgo Morelos, Guerrero, Puebla, Veracruz, Oaxaca y Chiapas hasta Guatemala.

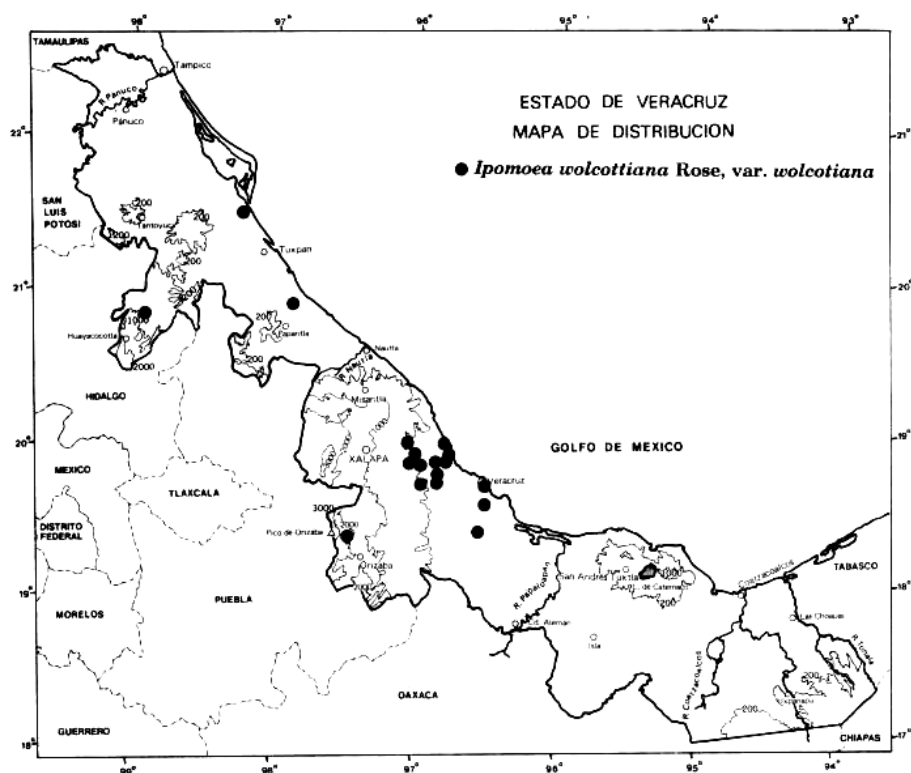


Figura 3. Distribución en Veracruz de *Ipomoea wolcottiana*.

2.4 Metabolitos bioactivos del género *Ipomoea*

Los primeros estudios en donde se relacionó a las resinas glicosídicas con alguna actividad biológica fueron cuando se aisló de la especie *Ipomoea leari* un glósido llamado “ipolearósido” el cual demostró la propiedad de ser anticancerígeno. En el caso de *Ipomoea stans* sus resinas presentaron la propiedad de ser anticonvulsivas, citotóxicas y con efectos vasoactivos. En el caso de la especie *Ipomoea bahiensis*, ésta presentó propiedades antimicrobianas y anticancerígenas (Sarin, 1973).

Las resinas glicosídicas encontradas en el género *Ipomoea*, se caracterizan estructuralmente por poseer un núcleo oligosacárido (acilado en la mayoría de los casos) y un ácido graso con una cadena de 14 ó 16 átomos de carbono que se encuentra

mono (convolvulínico: 11-OH-C₁₄; ácido jalapinólico: 11-OH-C₁₆), di (ácido iprónico: 3,11-di-OH-C₁₄; ácido operculínico: 3,12-di-OH-C₁₆), o trihidroxilada (ácido brasiliólico: tri-OH-C₁₄) que forma un éster macrocíclico mediante una lactonización intramolecular con el núcleo oligosacárido. En la mayoría de los estudios de actividad biológica se ha encontrado que la lactona macrocíclica constituye una característica estructural muy importante para la actividad de estos compuestos, ya que al hidrolizarse, la actividad biológica disminuye considerablemente o a veces llega a desaparecer (Pereda-Miranda y Bah, 2003). Las unidades de azúcar generalmente son: glucosa, ramnosa, fucosa y quinovosa; el número de unidades monosacáridas oscila de tres a seis. Entre los residuos ácidos que acilan el núcleo oligosacárido se encuentran los ácidos acético, isobutírico, 2-metilbutírico, *n*-isovalérico, tíglico, hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico.

La complejidad de las resinas glicosídicas se reduce a la similitud estructural entre sus integrantes individuales ya que representan primordialmente mezcla de diastereoisómeros que implican diferentes sitios de esterificación y lactonización del núcleo oligosacárido. Por lo tanto, dicha complejidad representa la mayor dificultad para la purificación de sus constituyentes individuales y su completa caracterización.

2.5 Estudios fitoquímicos y farmacológicos de las resinas glicosídicas

Dos grandes grupos han sido identificados dentro de las resinas glicosídicas a partir de los primeros estudios que se realizaron para su caracterización estructural. A la fracción del crudo resinoso soluble en éter o cloroformo se le nombró jalapina y a la fracción del crudo resinoso insoluble en estos disolventes se le denominó convolvulina.

Los estudios fitoquímicos preliminares se concentraron en la caracterización de los productos de hidrólisis básica y ácida, en particular de la jalapina, con ayuda de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, en su modalidad de impacto electrónico (Bah, 1997). En la actualidad, la caracterización estructural de los constituyentes individuales se obtiene gracias al empleo de las técnicas

ya mencionadas pero en alta resolución además de utilizar técnicas bidimensionales de RMN y FAB negativo (Fast Atom Bombardment) (Pereda-Miranda

y Bah, 2003). La técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución ha permitido el aislamiento de los constituyentes individuales de las resinas de las convolvuláceas y, en

la mayoría de los casos, constituye el paso final de purificación, de esta manera se consigue una clara y óptima división de cada constituyente en un alto grado de pureza (Decosterd, *et al.*, 1987).

Estudios más recientes encaminados a la purificación de resinas glicosídicas se ejemplifican con los compuestos llamados tricolorinas A-E, aislados de *Ipomoea tricolor*: Estos constituyentes se purificaron mediante el empleo de la técnica de reciclaje (Bah y Pereda-Miranda, 1996; Pereda-Miranda, *et al.*, 1993). El núcleo liposacárido de la tricolorina A (**Figura 4**) se caracterizó como el 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido jalapινόlico. En cuanto a las propiedades biológicas de este compuesto se han reportado diversas actividades, por ejemplo; antimicrobianas, citotóxicas, fitoinhedoras (Pereda-Miranda, *et al.*, 1993), uterotónicas (Rangel-Cordero, 1995) y, también, se describió como un agente modulador de la actividad enzimática de la proteína cinasa C (Pereda-Miranda, 1995)

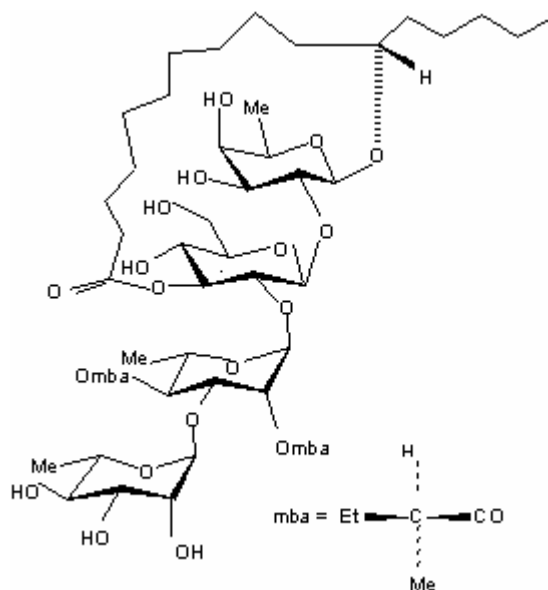


Figura 4. Tricolorina A, componente mayoritario de *Ipomoea tricolor*.

Los siguientes ejemplos ilustran la gran diversidad química que pueden presentar las resinas glicosídicas. Los tubérculos de *Ipomoea batatas* además de ser utilizados 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 (Noda, *et al.*, 1992). En *Ipomoea batatas* se han aislado 5 glicorresinas (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 de la porción de la aglicona con el ácido *trans*cinámico (Noda, *et al.*, 1992). La simonina I (**Figura 5**) se caracterizó como el ester intramolecular 1,2''-{11-O-(2-O-*trans*cinámico)-[(4-O-*n*-decanoil)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-(2-O-*n*-decanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido} del ácido jalapínico.

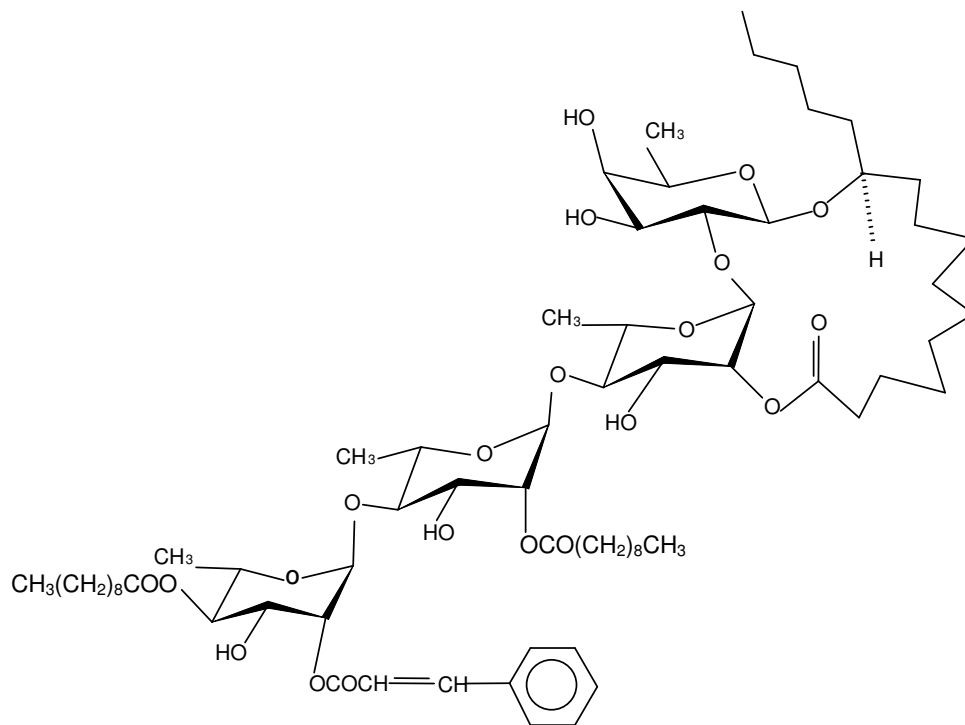
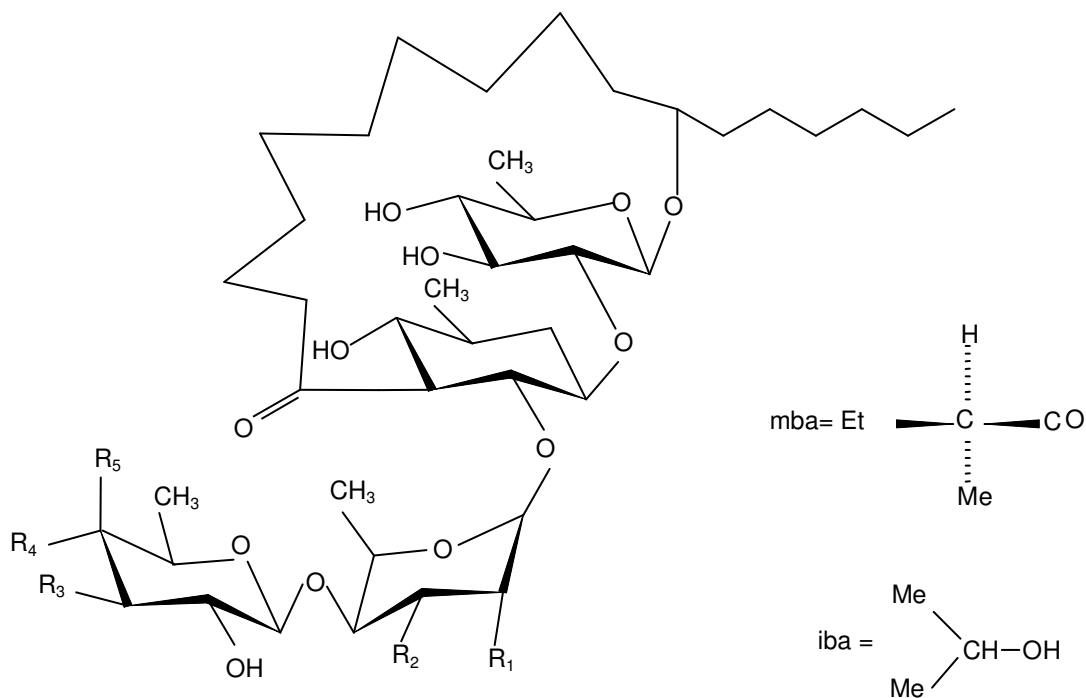


Figura 5. Estructura de la simonina I encontrada en *Ipomoea batatas*.

Las raíces de *Ipomoea operculata* (Massateru, *et al.*, 1992) y las semillas de *Ipomoea muricata* presentan como constituyentes mayoritarios de los núcleos oligosacáridos de sus resinas a los ácidos glicosídicos, muricatina A y muricatina B, identificados como el 11-*O*-β-L-fucopiranosil-(1→4)-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-β-D-quinovopiranosido del ácido 11*R*-jalapínolico y el 11-*O*-β-L-quinovopiranosil-(1→4)-*O*-α-L-ramnipiranosil-(1→2)-*O*-β-D-quinovopirano-sil-

(1→2)-β-D-quinovopiranosido del ácido 11*R*-jalapínolico, respectivamente (Noda, *et al.*, 1988a). También se describieron seis glicósidos, denominados muricatinas I-VI (**Figura 6**), las cuales están presentes en las semillas de *Ipomoea muricata*, siendo todos tetrasacáridos del ácido jalapínolico difiriendo en las posiciones de acilación del núcleo oligosacárido constitutivo (Noda, *et al.*, 1988b). Dichas semillas son usadas como laxantes y carminativos en la medicina tradicional de la India (Noda, *et al.*, 1988a). Cabe mencionar que las raíces de *Ipomoea operculata* debido a su efecto purgante moderado, sustituyeron a la raíz de jalapa en Europa (Chérigo *et al.*, 2006)

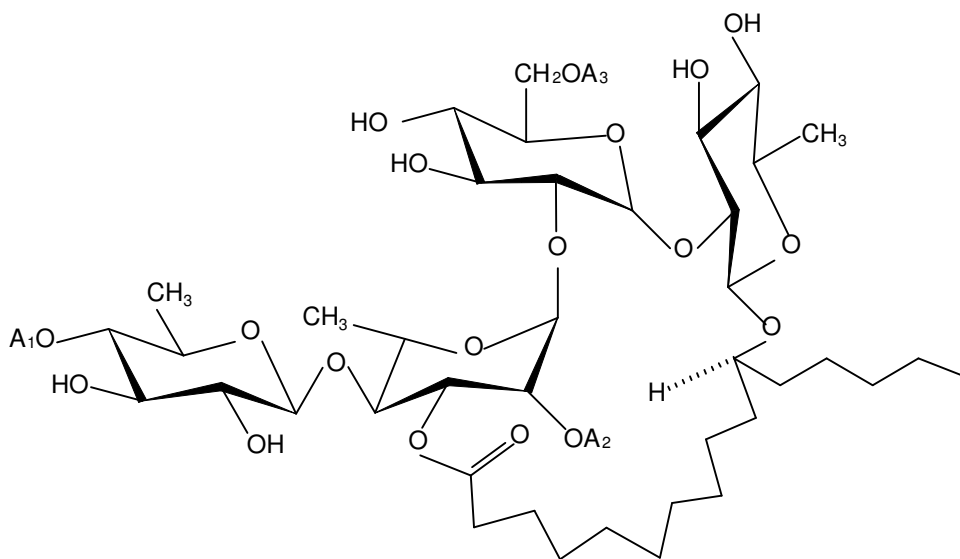


	R₁	R₂	R₃	R₄	R₅
I	-mba	OH	-OH	H	mba
II	-mba	-OH	-OH	-H	-iba
III	-OH	-mba	-OH	-H	mba
IV	mba	OH	-OH	-H	OH
V	mba	-OH	-OH	-OH	-H

Figura 6. Glicolípidos presentes en *Ipomoea muricata*

Ipomoea stans, también conocida como “tumbavaqueros”, se utiliza dentro de la medicina tradicional mexicana para el tratamiento de la epilepsia (Díaz, 1977). Estudios fitoquímicos de la jalapina de dicha planta permitieron la identificación de cuatro glicolípidos (1-4) (**Figura 7**). Ensayos biológicos realizados a la fracción glicosídica

mayoritaria de esta planta presentaron actividades citotóxicas sobre líneas celulares derivadas de carcinoma nasofaríngeo (KB), colon y cérvix, además de una poderosa actividad antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus* y *Bacillus subtilis* (Reynolds, *et al.*, 1995). El extracto acuoso de esta planta a su vez mostró un efecto vasodilatador (Perusquia, *et al.*, 1995).



	A ₁	A ₂	A ₃
1.	A ₂	2-metilbutanoil	3-hidroxi-2-metilbutanoilo
2.	A ₂	2-metilpropanoil	3-hidroxi-2-metilbutanoilo
3.	2-metilpropanoilo	2-metilbutanoilo	3-hidroxi-2-metilbutanoilo
4.	2-metilbutanoilo	3-metilbutanoilo	3-hidroxi-2-metilbutanoilo

Figura 7. Glicolípidos de *Ipomoea stans*.

Las pruebas experimentales indican que la actividad antitumoral está condicionada a la macrolactona presente en las moléculas intactas; la ausencia de ella provoca la pérdida de la actividad biológica (Lothar, *et al.*, 1986). Estos resultados son congruentes con la observación de este fenómeno durante la saponificación de las resinas de *Ipomoea tricolor* e *Ipomoea purga*, ya que los ácidos glicosídicos resultantes se encuentran desprovistos tanto de sus propiedades purgantes como de su potencial citotóxico (Pereda-Miranda, 1995).

En el caso de la especie *Ipomoea murucoides* se han caracterizado dos núcleos pentasacáridos pertenecientes a las resinas glicosídicas obtenidas del extracto clorofórmico, los cuales se nombraron 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 (11S)-hidroxihexadecanóico (ácido simónico B) (**Figura 9**) y 11 - O - β - D - glucopiranosil - (1 \rightarrow 3) - O - [O - β - L - ramnopiranosil - (1 \rightarrow 4)] β -D-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)- hidroxihexadecanóico (ácido operculínico A) (**Figura 8**). De la jalapina, se obtuvieron cinco glicolípidos de los cuales cuatro fueron novedosos, las murucoidinas 1-4. El último compuesto de esta serie resultó ser citotóxica contra células de cáncer de laringe (DE₅₀ 4 μ g/mL) (Chérigo y Pereda-Miranda, 2005)

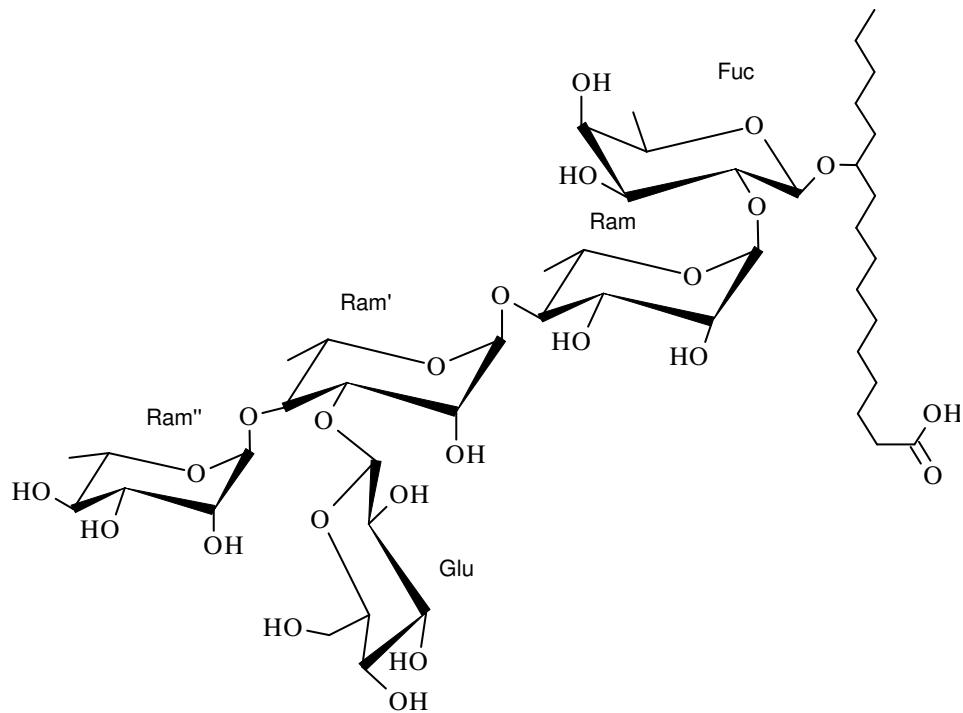


Figura 8. Ácido operculínico A de *Ipomoea murucoides*.

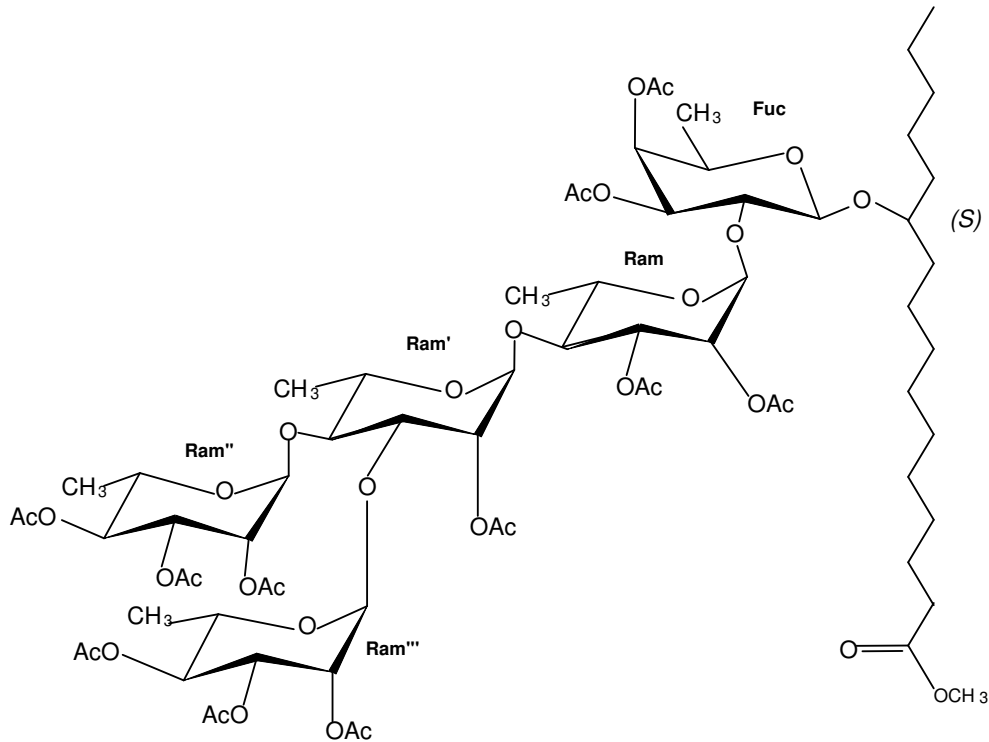


Figura 9. Ácido simónico B de *Ipomoea murucoides*.

Otros géneros de la familia *Convolvulaceae* con propiedades medicinales, también deben a sus resinas glicosídicas estas bondades (Pereda y Bah, 2003). Así, por ejemplo, se ha demostrado que los constituyentes de *Merremia mammosa* tienen una capacidad ionofórica en células de eritrocitos humanos, debido a las características anfipáticas de sus resinas (Kitagawa, *et al.*, 1989) La especie *Ipomoea pes-caprae* es una planta que se ha utilizado en la medicina tradicional desde tiempos inmemorables y conocida en México como “riñonina” debido a que se utiliza para el tratamiento del “mal de orín” e infecciones de los riñones. Los aborígenes de Australia aún siguen colocando las hojas calientes, directamente en heridas, infecciones de la piel, picaduras de peces venenosos, mantarraya e insectos. Decocciones de la planta se han utilizado para el tratamiento de la fatiga, la tensión arterial, la artritis y el reumatismo. Las infusiones de la planta son usadas para el tratamiento de la hipertensión y la escrófula. El estudio de *Ipomoea pes-caprae* permitió la caracterización de seis glicósidos lipofílicos, de los cuales cinco son nuevos pentasacáridos del ácido jalapínico (pescaprósido A y pescapreínas I-IV) (Pereda-Miranda, *et al.*, 2005).

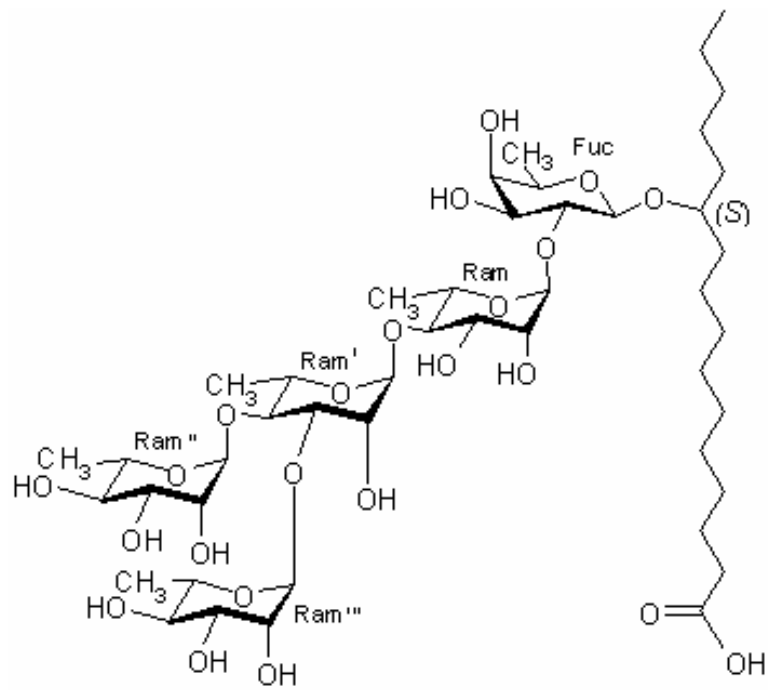


Figura 10. Pescaprosido A. Núcleo glicosídico de *Ipomoea pes-caprae*.

3. Justificación

Debido a que las resinas glicosídicas del genero *Ipomoea* poseen poderosas actividades biológicas, entre las que destacan sus propiedades citotóxicas, fitoinhedoras y antimicrobianas, las cuales pueden llegar a tener alguna aplicación terapéutica, el presente trabajo plantea el aislamiento y la caracterización del núcleo glicosídico de las resinas glicosídicas de la especie *Ipomoea wolcottiana*, ya que dicha especie carece de estudios previos sobre la composición química de sus resinas. De tal manera que se pretende trabajar con el extracto clorofórmico de la planta y purificar la mezcla de resinas glicosídicas para someterla a reacciones de derivatización para obtener el núcleo oligosacárido constitutivo mayoritario y caracterizarlo por medio de métodos espectroscópicos y espectrométricos de alta resolución como son la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

El objetivo general de esta investigación es el aislamiento y la caracterización de la composición química del núcleo glicosídico mayoritario de las resinas glicosídicas de *Ipomoea wolcottiana*, el cual se obtendrá a partir de la jalapina (porción soluble en éter o cloroformo de las resinas glicosídicas).

4.2 Objetivos específicos

- Obtención del extracto clorofórmico a partir de las flores de *Ipomoea wolcottiana*.
- Fraccionamiento por cromatografía en columna del extracto clorofórmico.
- Hidrólisis alcalina de las fracciones seleccionadas.
- Establecimiento de las condiciones instrumentales analíticas y preparativas para la purificación del núcleo glicosídico mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAE).
- Elucidación estructural del ácido glicosídico por medio de estudios espectrométricos y espectroscópicos.

3. Parte Experimental

5.1 Determinación de constantes físicas

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y de carbono-13 (^{13}C) se generaron en equipos Bruker DMX-500, operando a una frecuencia de 500MHz 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 JEOL SX102A utilizando metanol como disolvente, utilizando el impacto electrónico como método de ionización de la muestra problema.

5.2 Métodos cromatográficos

Los procedimientos cromatográficos empleados en la presente investigación consistieron en la aplicación de la cromatografía en columna abierta para lograr el fraccionamiento del extracto clorofórmico (jalapina) de *Ipomoea wolcottiana*. Se utilizó gel de sílice 60 Merck F₅₄ 0.063-0.200 mm.

El análisis de la homogeneidad cromatográfica del fraccionamiento primario y el seguimiento de las reacciones efectuadas, se llevó a cabo mediante cromatografía en capa fina (CCF). Se utilizaron cromatoplasmas (5×10 cm; 5×2.5 cm) recubiertas de gel de sílice F₂₅₄ Merck. Las placas soportaron un rociado homogéneo con un agente cromógeno (mezcla H_2SO_4 -sulfato sérico) y se calentaron sobre una parrilla a una temperatura aproximada de 80° C.

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

Columna analítica Symmetry de fase reversa C-18 (4.6×300 mm, 5 μm)

Columna analítica amino μ BondapakTM (NH₂, Aminopropilmetilsilano (3.9 × 300 mm, 10 μ m)

Columna preparativa Symmetry C-18 (19 × 300 mm, 7 μ m).

Se utilizó un equipo Waters (Millipore Corp., Waters chromatography Division, Milford, MA, USA) constituido por una bomba (Waters 600) adaptada con una válvula de reciclaje de muestra y, un detector de índice de refracción (Waters 410), integrados a un equipo de computo (Pentium 4/Dell). El control del equipo, la adquisición de datos, el proceso y el manejo de la información cromatográfica se hicieron a través del software Empower 1.

5.3 Material vegetal

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

5.3.1 Obtención de las resinas glicosídicas

El material vegetal seco y pulverizado se sometió a una extracción con cloroformo mediante un proceso de maceración en periodos de tres días durante tres semanas. Una vez concluido el tiempo de extracción, la solución se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvo un total de 100.44 g de extracto.

El fraccionamiento primario del extracto clorofórmico se realizó mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. La elución se inició con cloroformo, incrementándose gradualmente la polaridad (5 % MeOH en eluatos de 1 litro), terminando con metanol. Se obtuvieron 51 fracciones primarias, que fueron comparadas por CCF para reunir las semejantes y obtener 11 subfracciones. La **Figura 11** presenta el cromatograma en capa fina de estas fracciones y se resaltan la fracciones seleccionadas

para su estudio al ser comparadas con una referencia de resinas glicosídicas obtenida de *Ipomoea murucoides* (Chérigo *et al.*, 2006).

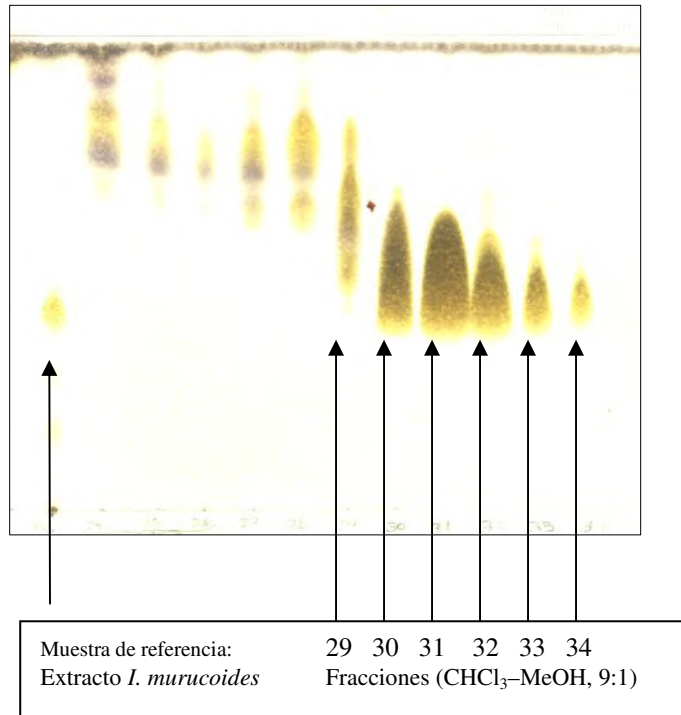


Figura 11. Cromatograma en capa fina de las fracciones ricas en oligosacáridos.

5.4 Obtención de derivados a partir de la jalapina

5.4.1 Hidrólisis alcalina

Se tomó una alícuota equivalente a 354 mg de las fracciones seleccionadas (29-34) y se agregaron 7 mL de solución acuosa de KOH al 5 %. La mezcla de reacción se dejó a reflujo a 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 CH₂Cl₂ (3 × 10 mL). La fase orgánica proporcionó una mezcla de ácidos grasos, la cual se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La fracción 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 241 mg del ácido glicosídico.

5.4.2 Reacción de Acetilación

El producto hidrolizado 241 mg se disolvió en 4 mL de piridina y 7 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 48 horas. Posteriormente, se adicionaron 8 mL de H₂O y se efectuaron tres extracciones sucesivas, utilizando en cada una de ellas volúmenes de 10 mL de AcOEt. 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 (3 × 10 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Esta reacción produjo 297.8 mg de producto acetilado.

5.4.3 Reacción de alquilación con diazometano

El producto de la reacción de acetilación fue sometido a una reacción de alquilación con diazometano para obtener el derivado metilado.

5.4.4 Generación del reactivo

Una solución de KOH (2 g en 3.3 mL de agua), 4 mL de EtOH y 18 mL de éter, se hizo reaccionar con N-metil-N-nitroso-O-toluensulfonamida (2.0 g) en 10 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 del éter en baño de hielo.

5.4.5 Reacción de alquilación

Se adicionó un exceso de solución etérea de diazometano a la mezcla acetilada 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 178.3 mg del producto de alquilación.

5.5 Separación de los derivados mediante CLAE

Se realizaron pruebas a nivel analítico de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados–metilados utilizando una columna de fase reversa C-18 (dimetiloctadecilsilano) ya que esta columna se ha descrito para la separación y purificación de los derivados lipofílicos de los ácidos glicosídicos (Chérigo y Pereda-Miranda., 2006). El sistema binario formado por CH₃CN–H₂O (60:40) con flujo de 0.5 mL/min fue el mejor para la resolución total de los constituyentes presentes en la muestra que se analizó. Una vez encontradas las condiciones a nivel analítico para la resolución de la muestra problema, se procedió a extrapolar estas condiciones a un nivel preparativo para lograr el aislamiento y la purificación de los constituyentes de la muestra.

Las condiciones a nivel preparativo fueron las siguientes:

Columna fase reversa Symmetry C-18 (7 μm; 19 × 300 mm); fase móvil CH₃CN – H₂O (3:2); flujo de 9 mL/min; detector de índice de refracción (sensibilidad de 256 RIU); concentración de la muestra 50 mg/500 μL; volumen de inyección, 500 μL.

La muestra problema Iw-AM se resolvió en 5 diferentes constituyentes, cuyos tiempos de retención fueron los siguientes: **Iw-1** (t_R = 6.83 min), **Iw-2** (t_R = 10.15 min), **Iw-3**(t_R = 14.6 min), **Iw-4** (t_R = 16.7 min) y **Iw-5** (t_R = 24.55 min). El cromatograma obtenido en estas condiciones se muestra en la **Figura 12** (ver Resultados y Discusión, sección 6.3)

Se decidió purificar sólo los componentes mayoritarios de la mezcla mediante el empleo de las técnicas de corte y reciclaje de la muestra para obtener una mayor separación y pureza de los compuestos. Se eligieron los siguientes picos: **Iw-1**(t_R = 6.83 min), **Iw-2** (t_R = 10.15 min) y **Iw-3** (t_R = 24.55 min). Las condiciones descritas anteriormente permitieron la purificación de 1.7 mg, 6.4 mg y 11.2 mg, respectivamente de los componentes reciclados

3. Resultados y Discusión

La preparación del extracto clorofórmico de las flores de *Ipomoea wolcottiana* permitió la obtención de 100.44 g de la jalapina. Este crudo se sometió a un fraccionamiento primario por medio de cromatografía 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 monitoreada por cromatografía en capa fina. La elución se llevó a cabo con un sistema binario de CHCl₃-MeOH mediante el incremento gradual de la polaridad, dando como resultado la obtención de 51 fracciones.

Las fracciones 29-34 se sometieron a un tratamiento alcalino con el objetivo de generar el ácido glicosídico mayoritario el cual estará representado por el núcleo oligosacárido constitutivo de estas fracciones. Al término de la saponificación, el residuo glicosídico se acetiló y metiló. La purificación del ácido glicosídico acetilado y metilado de *Ipomoea wolcottiana* se realizó mediante un análisis de cromatografía de líquidos de alta eficiencia, el empleo de esta técnica fue determinante para lograr la separación y la purificación de los constituyentes de la muestra derivatizada ya que su alta lipofilidad permitió el empleo de una fase reversa C-18.

6.1 Determinación de 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 12**. 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 diversas posiciones del núcleo oligosacárido y se liberan al hidrolizar sus enlaces tipo éster.

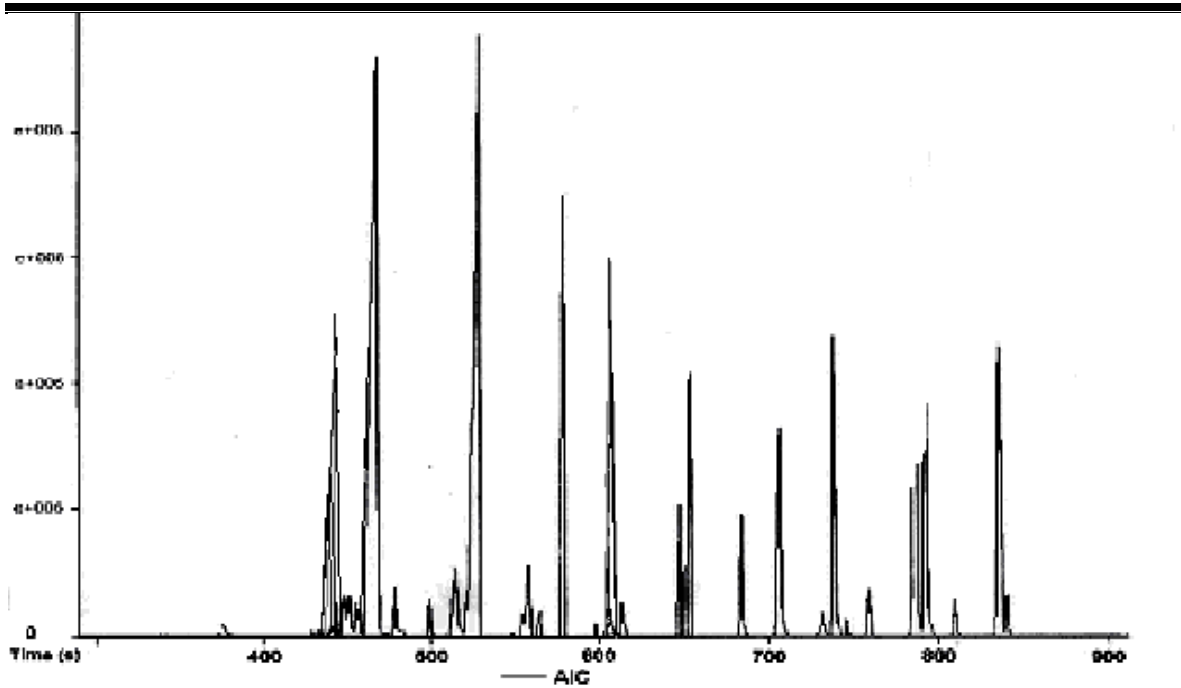


Figura 12. Cromatograma de gases obtenido para la fase etérea.

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

T.R.(s)	Fragmentos	Identificación
468	[M] ⁺ 115(2), 101(12), 87(8), 73(25), 60(100), 55(25), 45(25).	Ácido hexanoico
444.2	[M] ⁺ 144(5), 129(2), 115(18), 101(32), 85(32), 73(85), 60(100), 43(35), 41(20).	Ácido octanoico
528.8	[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).	Ácido decanoico
603.8	[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).	Ácido dodecanoico

6.2 Separación del ácido glicosídico acetilado-metilado mayoritario mediante CLAE

Debido a la similitud estructural entre los constituyentes de las mezclas de las resinas glicosídicas, el empleo de los métodos convencionales de cromatografía, como la

cromatografía en columna abierta, en capa fina preparativa, etc., no representan una buena alternativa para su separación, por este motivo el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia ha sido la elección adecuada para la resolución total de los constituyentes de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Con base en lo anterior, se requirió un diseño experimental para la implementación de la técnica CLAE tanto a nivel analítico como preparativo. Con la primera se obtuvieron las condiciones instrumentales adecuadas y la segunda se utilizó con el fin de separar y purificar los derivados preparados a partir de la mezcla de oligosacáridos naturales.

A nivel analítico se realizaron pruebas al producto acetilado-metilado usando columnas de fase reversa utilizando como adsorbente dimetiloctadecilsilano (C-18). (Chérigo y Pereda-Miranda., 2006).

A partir de que la mejor resolución se obtuvo con la columna Symmetry C-18, al utilizarse un sistema de elución binario de CH₃CN-MeOH (3:2) con un flujo de 0.5 mL/min, se realizó el escalamiento de estas condiciones instrumentales analíticas a un nivel preparativo. La **Figura 13** muestra el cromatograma a nivel preparativo.

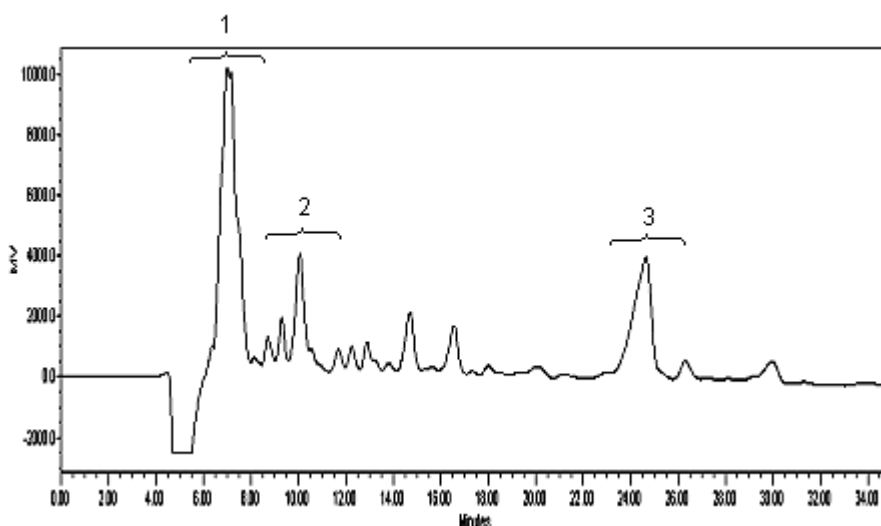


Figura 13. Cromatograma generado mediante CLAE a nivel preparativo.

Los picos **1**, **2** y **3** fueron seleccionados para su purificación debido a su rendimiento. Por tal motivo, dicha fracción se reinyectó y por medio de la técnica de corte y reciclaje se logró incrementar su pureza, siendo el compuesto **3**, el constituyente mayoritario. La **Figura 14** muestra el cromatograma obtenido de la purificación del

compuesto **3** por medio de la técnica de reciclaje, en la cual se reinyectó el compuesto hasta 9 ocasiones con el fin de obtener un pico simétrico que nos indicara el mayor grado de pureza del compuesto.

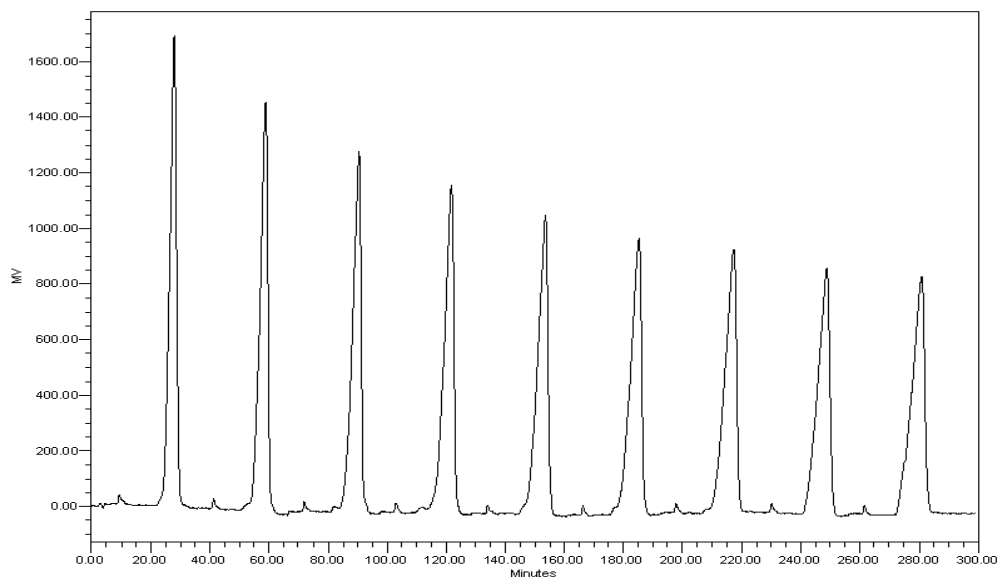


Figura 14. Purificación del compuesto 3 utilizando la técnica de reciclaje.

6.3 Espectrometría de masas

La fase orgánica obtenida de la reacción hidrólisis alcalina se analizó mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y se obtuvieron los siguientes espectros de los diferentes ácidos grasos contenidos en la molécula, los cuales fueron detectados después del análisis del cromatograma de la **Figura 12** previamente obtenido.

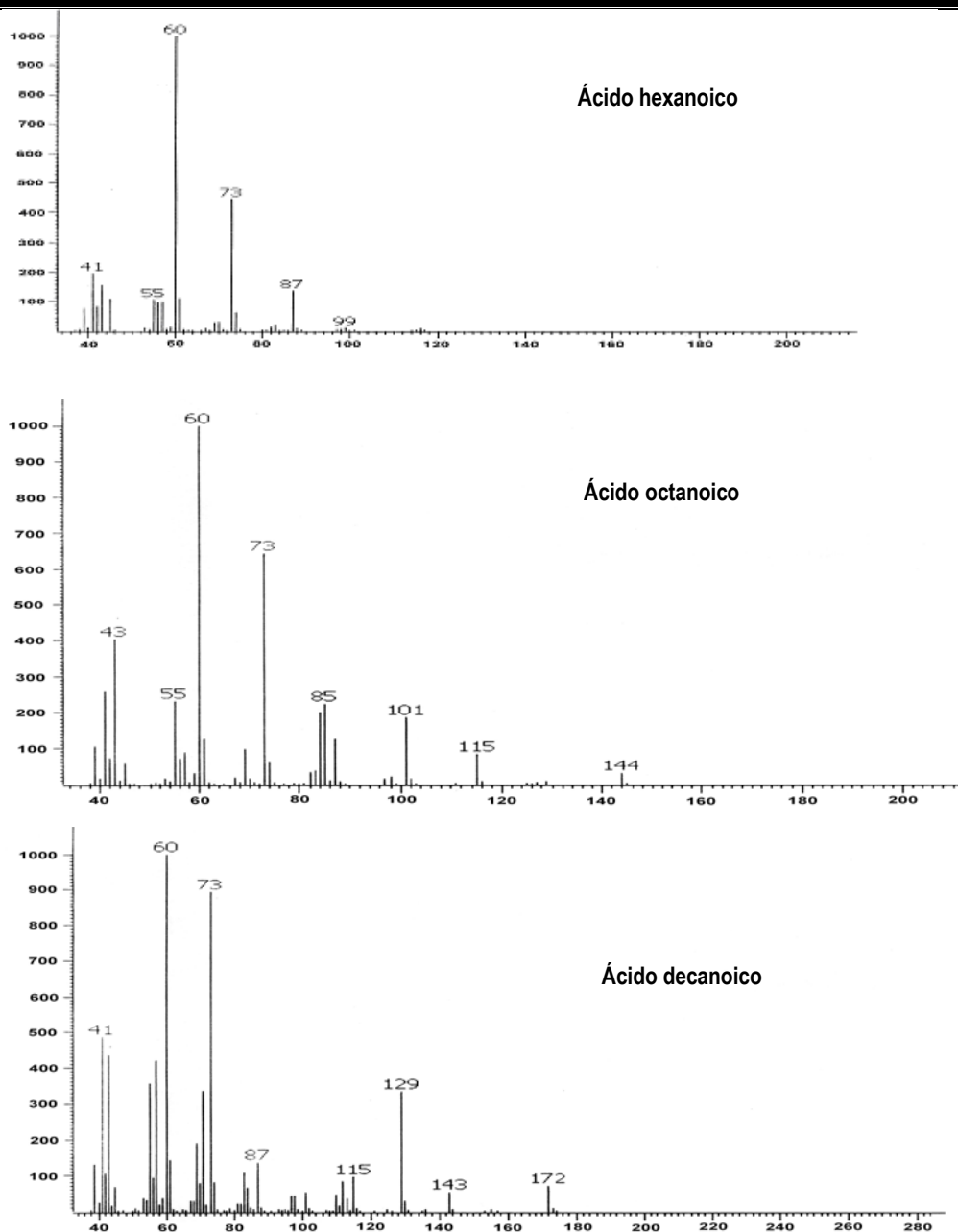


Figura 15. Espectros de masas para los ácidos grasos esterificantes.

6.4 Caracterización del núcleo glicosídico de *Ipomoea wolcottiana*

6.4.1 Asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C

La asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C enumeradas en el cuadro 2 se realizaron a través de los espectros unidimensionales de ^1H (Figura 16) y ^{13}C (Figura 17). Además, el empleo de los espectros bidimensionales homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HSQC) permitió la asignación de cada una de las señales (Duus *et al.*, 2000, Escalante-Sánchez, *et al.*, 2004)

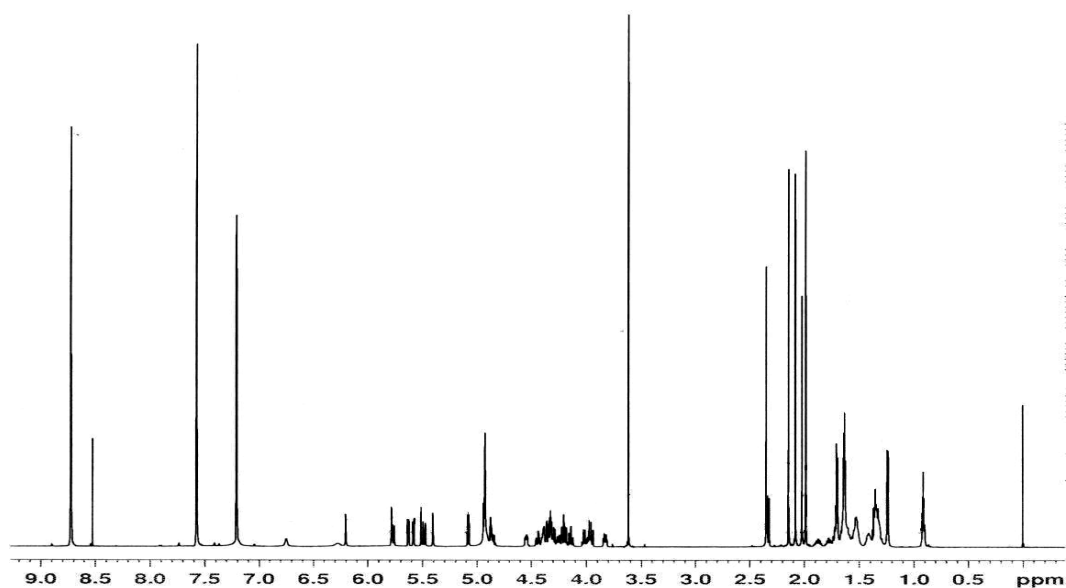


Figura 16. Espectro de RMN ^1H del compuesto 3.

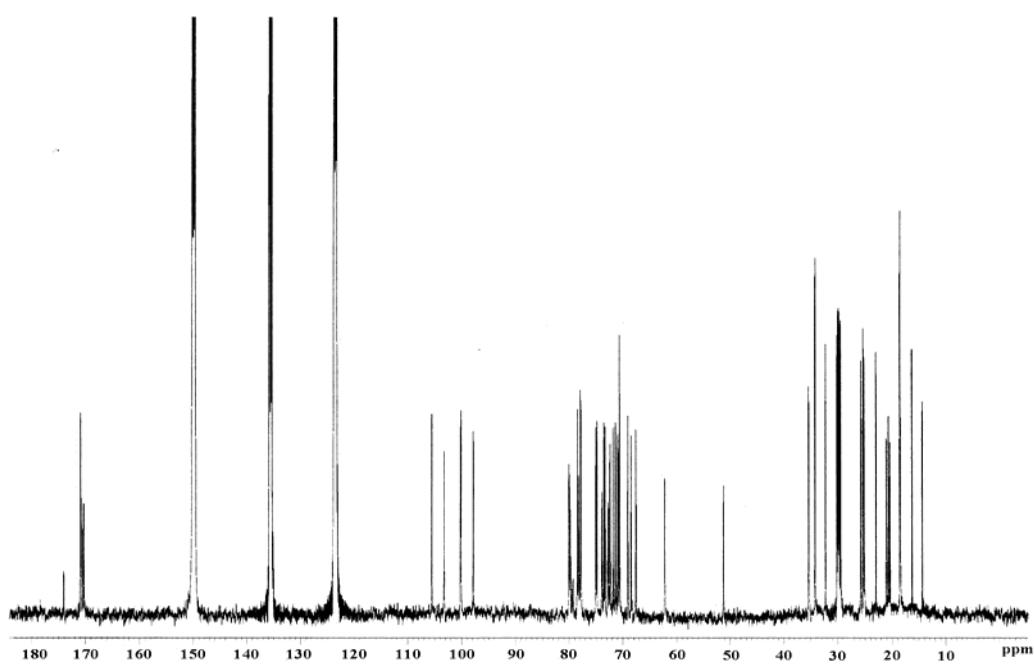


Figura 17. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto 3.

En primer lugar, se localizaron en el espectro de ^{13}C los carbonos anoméricos, caracterizados por tener desplazamientos químicos entre 98 – 105 ppm. Posteriormente, en el espectro heteronuclear HSQC (**Figura 18**) se localizaron sus correspondientes protones, cuyas resonancias se centran en el rango entre 4.5 – 6.5 ppm (Agrawal, 1992; Pereda-

Miranda y Bah, 2003). Al conocer el número de carbonos y protones anoméricos se elucidó que el núcleo glicosídico estaba constituido por una cadena pentasacárida.

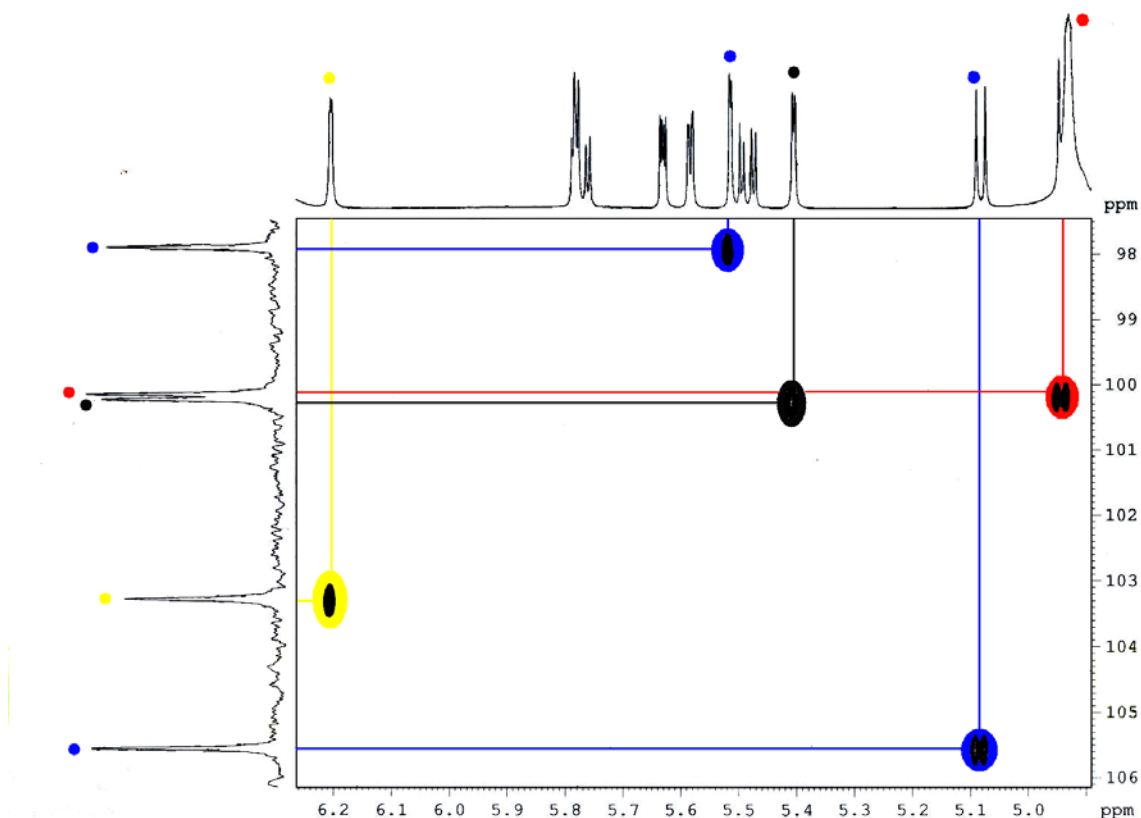


Figura 18. Ampliación del espectro HSQC del compuesto **3** (naranja = fucosa, ramnosa = morado, ramnosa' = negro, ramnosa'' = amarillo, glucosa = azul).

El siguiente paso consistió en asignar las señales protónicas para cada monosacárido del núcleo glicosídico con base en los espectros homonucleares COSY (**Figura 19**) y TOCSY (**Figura 20**) para definir la secuencia de interacciones vecinales espín-espín (J_{H-H}) de cada unidad sacárida. Con el espectro TOCSY se pueden observar las interacciones tanto vecinales (observables en el COSY) como aquellas a larga distancia en cada unidad monosacárida.

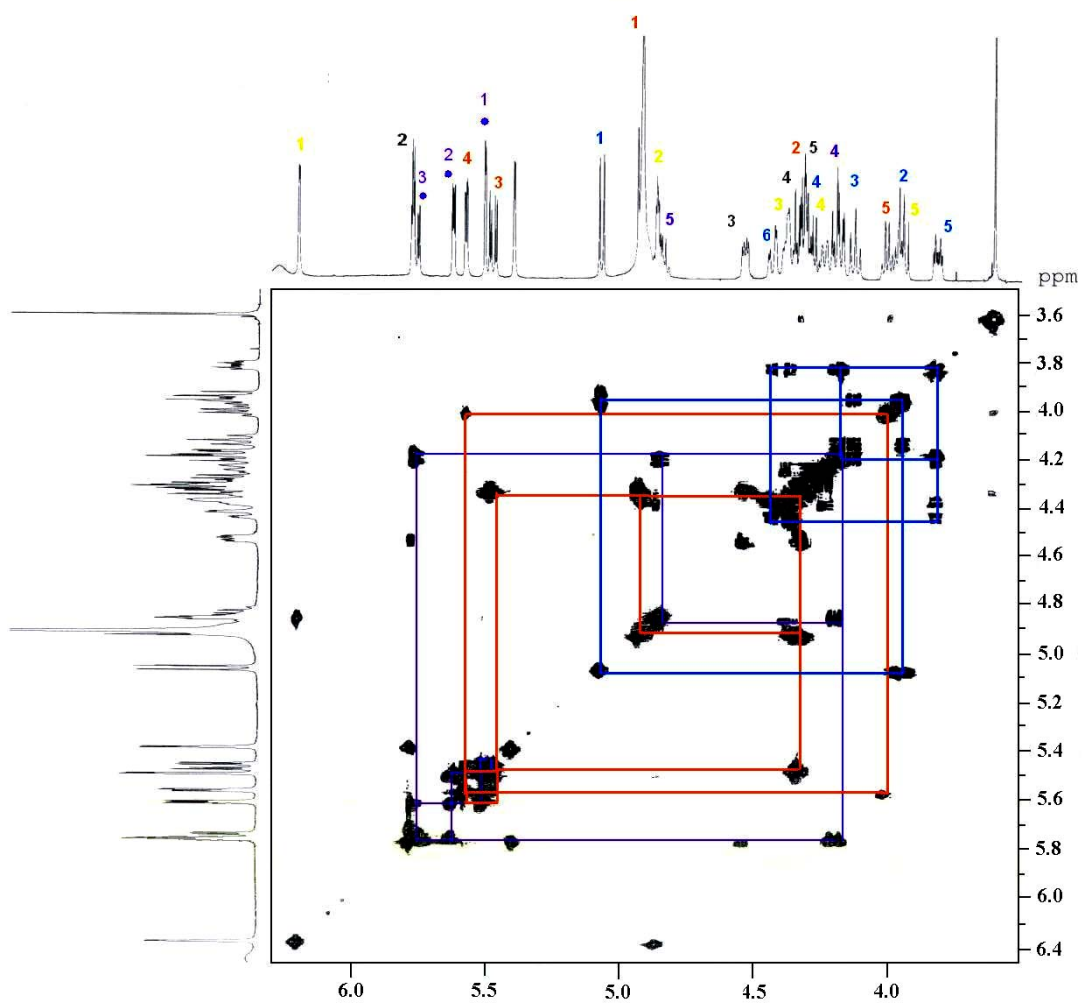


Figura 19. Ampliación del espectro COSY del compuesto **3** (naranja = fucosa, ramnosa = morado, ramnosa' = negro, ramnosa'' = amarillo, glucosa = azul).

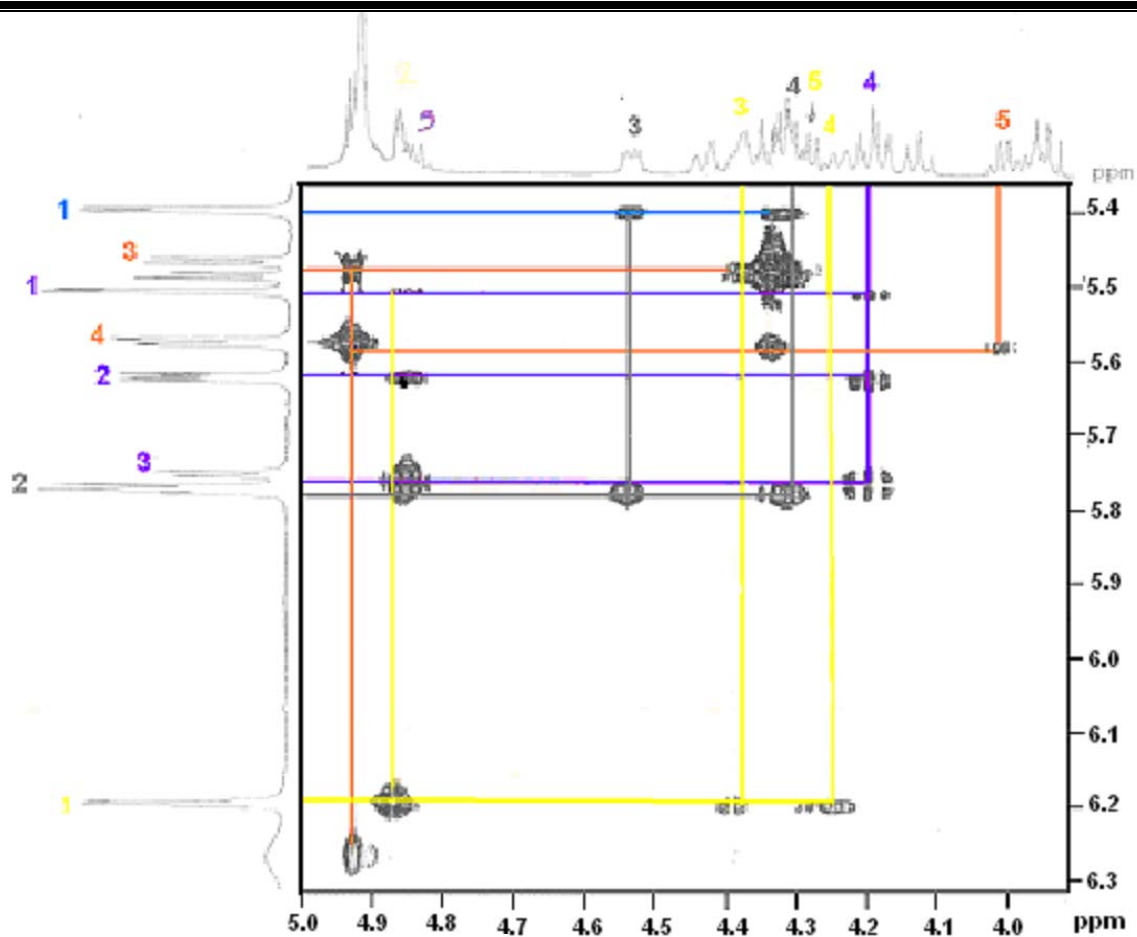


Figura 20. Ampliación del espectro homonuclear TOCSY del compuesto **3**. (naranja = fucosa, ramnosa = morado, ramnosa' = gris, ramnosa'' = amarillo y glucosa = azul).

6.4.2 Secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación

Mediante la secuencia de pulsos HMBC (**Figura 21**) se logró localizar las posiciones de glicosidación y la posición de lactonización con la aglicona. Por lo tanto, este experimento permite detectar las conectividades $^1\text{H}-^{13}\text{C}$ a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$) (Pereda-Miranda y Bah, 2003). El análisis de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del derivado mayoritario acetilado-metilado (**3**) confirmó la secuencia de glicosidación y la posición de los sitios de esterificación. El espectro heteronuclear del compuesto acetilado-metilado (**3**) permitió un análisis de las correlaciones $^3J_{\text{C-H}}$: la interacción entre H -1 de la fucosa con el C-11 de la aglicona permitió identificar que dicho monosacárido es la primer unidad de la cadena oligosacárida. Para poder confirmar la estructura química propuesta del compuesto **3** fue necesario analizar las correlaciones entre cada protón anomérico con el carbono de la unidad sacárida vecinal que forma parte del enlace glicosídico con ayuda del espectro HMBC (**Figura 21**).

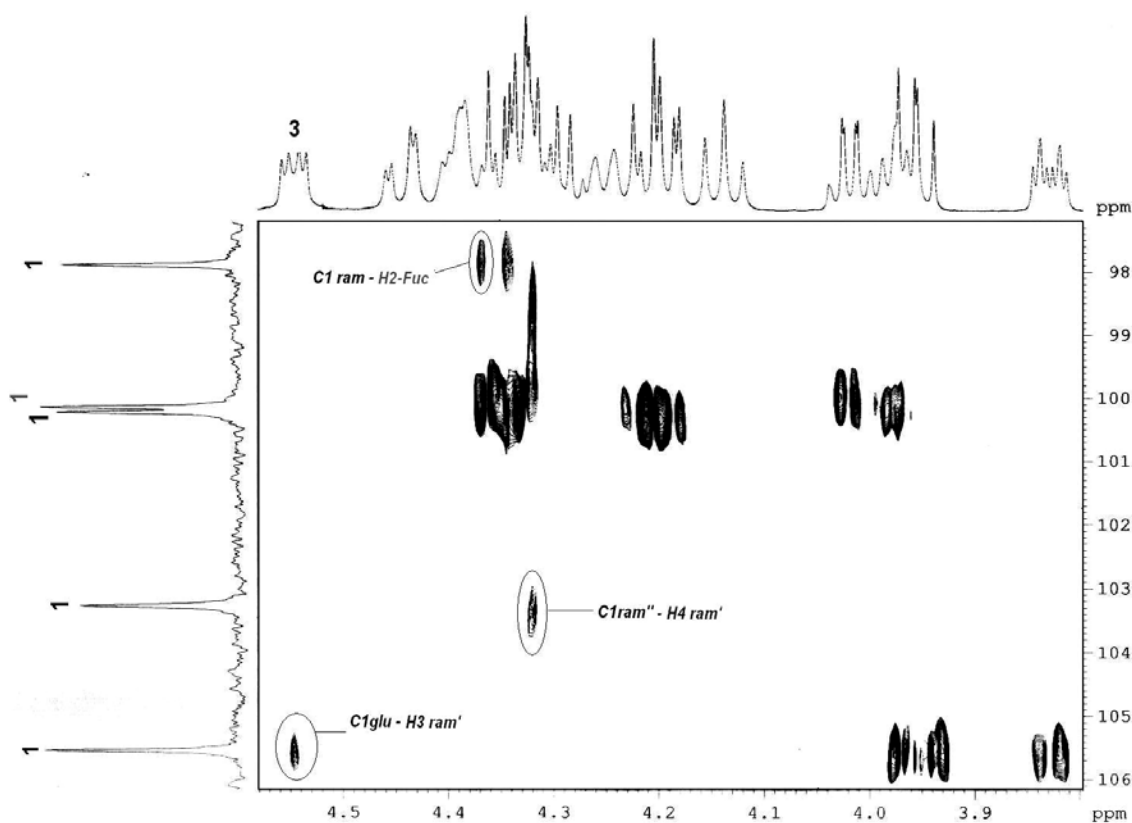


Figura 21. Ampliación del espectro HMBC del compuesto **3**.

Con base en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C del éster metílico del ácido operculínico previamente descritos en la literatura (Noda *et al.*, 1992) y una vez registrados los desplazamientos químicos en los cuadros 2 y 3, se determinó que los compuestos **1-3** corresponden a derivados parcialmente acetilados. Estos derivados permitieron confirmar la secuencia de glicosidación del núcleo oligosacárido, dando como resultado que el compuesto **4** corresponde al peracetato metilado del ácido operculínico A. La acetilación parcial se debió a un agotamiento del agente alquilante y, probablemente, a la necesidad de incrementar el tiempo de reacción.

Cuadro 2. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H del éster metílico del ácido operculínico A con diferentes grados de acetilación (500 MHz)^a

protón ^b	1	2	3	4	
fuc-1	4.79 d (7.5)	4.86 (8)	4.94 d (8.0)	4.97 d (7.7)	
2	4.49 dd (9.5, 8.0)	4.38 dd (10.5, 8.0)	4.36 dd (10.0, 8.0)	4.23 m	
3	4.13 m	5.95 dd (10.5, 3.5)	5.48 dd (10.0, 3.5)	5.51 m	
4	3.93 m	5.53 dd (3.5, 1.0)	5.58 dd (3.5, 1.0)	5.56 m	
5	3.80 dd (6.5, 1.0)	3.96 m	4.02 dq (6.5, 1.0)	4.03 m	
6	1.52 d (6.5)	1.24 d (6)	1.24 d (6.0)	1.22 d (6.0)	
ram-1	6.24 s	5.83 d (2.0)	5.51 d (1.5)	5.48 sa	
2	4.94 m	5.16 sa	5.63 dd (3.2, 2.0)	5.56 m	
3	4.61 (9.0, 3.5)	4.71 dd (8.5, 3.0)	5.77 dd (10.0, 3.5)	5.73 m	
4	4.22 dd (9.5, 9.5)	4.22 dd (9.5, 9.5)	4.21 dd (9.5, 9.5)	4.17 dd (9.7, 9.7)	
5	4.87 dq (9.5, 6.0)	4.40 dq (9.0, 6.0)	4.86 dq (9.5, 6.0)	4.85 sa	
6	1.56 d (6.0)	1.60 d (6.0)	1.69 d (6.5)	1.67 d (6.1)	
ram'-1	5.76 d (1.5)	5.58 d (1.5)	5.40 d (2.0)	5.33 sa	
2	6.31 dd (3.0, 2.0)	4.42 m	5.78 dd (3.5, 2.0)	5.51 m	
3	4.81 dd (9.5, 3.0)	4.38 m	4.53 dd (8.5, 3.5)	4.55 dd (7.4, 3.5)	
4	4.34 dd (9.5, 9.5)	4.20 m	4.33 dd (9.0, 9.0)	5.51 m	
5	4.40 dq (9.5, 6.0)	4.76 dq (9.5, 6.5)	4.32 dq (9.0, 6.0)	4.23 m	
6	1.62 d (6.0)	1.70 d (6.5)	1.63 d (6.0)	1.30 d (6.2)	
ram''-1	6.24 s	6.20 d (1.0)	6.20 d (1.5)	5.68 sa	
2	4.65 sa	4.86 m	4.88 dd (3.5, 2.0)	5.73 m	
3	4.40 d (9.5)	4.42 m	4.39 dd (9.0, 3.5)	5.65 dd (10.3, 3.4)	
4	4.24 m	4.49 dd (9.0, 9.0)	4.24 dd (9.0, 9.0)	5.56 m	
5	4.33 dq (9.5, 6.0)	4.29 dd (9.5, 6.5)	4.29 dd (9.0, 6.0)	4.23 m	
6	1.64 (6.0)	1.57 d (6.5)	1.64 d (6.0)	1.30 d (6.2)	
glu-1	5.16 d (8.0)	5.22 d (7.5)	5.07 d (8.0)	5.20 d (7.8)	
2	4.00 dd (9.5, 8.0)	3.94 dd (8.5, 7.0)	3.96 dd (9.0, 7.5)	5.35 d (7.9)	
3	3.93 m	4.16 dd (9.0, 8.5)	4.14 dd (9.0, 9.0)	5.73 m	
4	4.13 m	4.22 dd (9.5, 9.5)	4.20 dd (9.0, 9.0)	5.51 m	
5	4.03 ddd (10.0, 3.5, 3.5)	4.07 dd (9.5, 2.5)	3.83 ddd (9.5, 3.5, 3.5)	4.03 m	
6a	4.24 m	4.26 m	4.37 dd (12.0, 3.0)	4.50 d (12.2)	
6b	4.52 m	4.52 dd (13.5, 2.5)	4.45 dd (12.0, 2.5)	4.78 dd (12.3, 3.1)	
jal-2	2.33 t (7.5)	2.33 t (7.5)	2.34 t (7.5)	2.36 t (7.5)	
11	3.93 m	3.96 m	3.97 m	4.03 m	
16	0.92 t (6.5)	0.90 t (7.0)	0.91 t (6.5)	0.88 t (6.4)	
OCH ₃	3.66 s	3.62 s	3.62 s	3.60 s	
OAc	1.95 s	1.88 s	2.35 s	2.33 s	2.20 s
		1.96 s	2.14 s	2.17 s	2.14 s
			2.08 s	2.14 s	2.10 s
			2.02 s	2.06 s	2.04 s
			1.99 s	2.02 s	1.98 s
				1.95 s	1.92 s

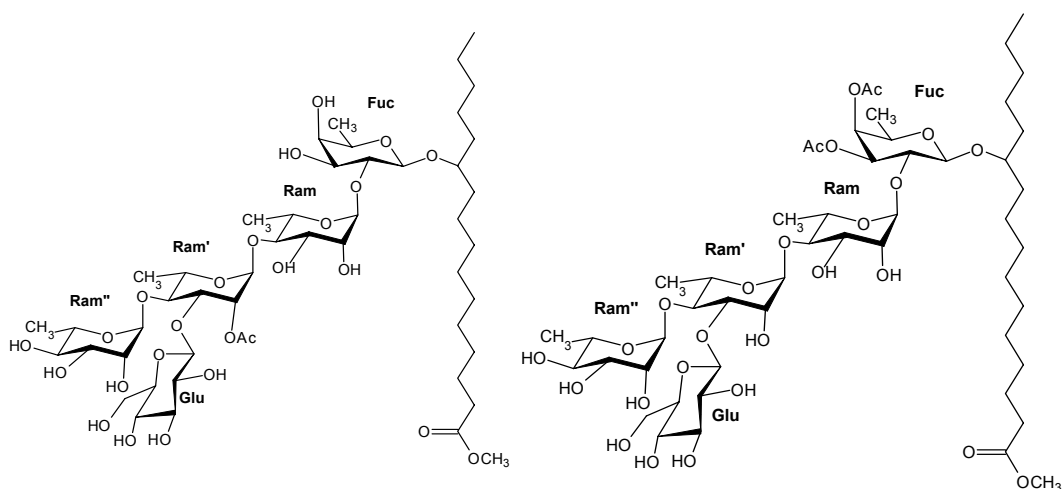
^aDatos registrados en C₅D₅N. Desplazamientos químicos (δ) en ppm en relación a TMS. Las constantes de acoplamiento (J) entre paréntesis en Hz. (*) indica sobreposición de señales. Las asignaciones se basaron en experimentos ^1H - ^1H COSY y TOCSY. Los patrones de spines acoplados se asignaron como sigue: s = singulete, d = doblete, t = triplete, m = multiplete, dq = doblete cuarteteado ^bAbreviaciones: fuc = fucosa; ram = ramnosa; glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanoil.

Cuadro 3. Desplazamientos químicos en la RMN ^{13}C del éster metílico del ácido operculínico A con diferentes grados de acetilación (125.7 MHz)^a

Carbón ^b	1	2	3	4	
fuc-1	101.2	100.7	100.2	99.8	
2	75.1	72.8	77.9	77.1	
3	76.6	75.3	74.9	68.2	
4	73.8	71.4	71.4	74.3	
5	71.2	69.0	69.1	67.9	
6	17.2	16.3	16.3	16.8	
ram-1	101.4	103.6	97.9	97.8	
2	72.5	72.3	71.0	69.9	
3	72.2	82.6	71.9	72.4	
4	82.1	78.5	80.1	81.2	
5	67.3	68.6	67.6	67.3	
6	18.7	18.7	18.5	18.2	
ram'-1	99.7	102	100.2	100.0	
2	73.8	72.5	73.3	72.0	
3	80.4	72.8	80.0	77.0	
4	78.2	73.9	73.6	72.0	
5	68.4	68.3	68.5	81.2	
6	18.8	18.7	25.4	18.5	
ram''-1	103.4	103.1	103.3	97.7	
2	72.6	72.6	72.4	72.6	
3	72.7	72.7	72.8	69.0	
4	74.0	78.6	73.9	70.9	
5	70.6	70.5	70.7	67.3	
6	18.5	18.4	18.5	17.5	
glu-1	105.8	105.5	105.6	99.9	
2	75.2	75.1	75.1	72.0	
3	78.5	78.6	78.3	74.3	
4	78.5	81.9	70.7	68.3	
5	71.3	71.4	77.9	67.9	
6	62.9	63.0	62.2	61.3	
jal-2	34.2	34.2	34.2	34.0	
11	78.5	78.7	78.5	77.9	
16	14.4	14.4	14.4	14.0	
COOCH ₃	51.2	51.3	51.3	50.8	
COOCH ₃	174.0	174.1	174.0	173.5	
COCH ₃	170.7	170.9	170.9	170.4	170.3
		170.1	170.9	170.2	170.2
			170.8	170.1	170.0
			170.4	169.8	169.8
			170.3	169.8	169.7
				169.3	169.2
COCH ₃	21.1	20.4	21.1	20.5	20.3
		20.5	21.0	20.3	20.2
			20.7	20.2	20.1
			20.7	20.1	20.0
			20.4	18.3	18.0
				17.1	15.9

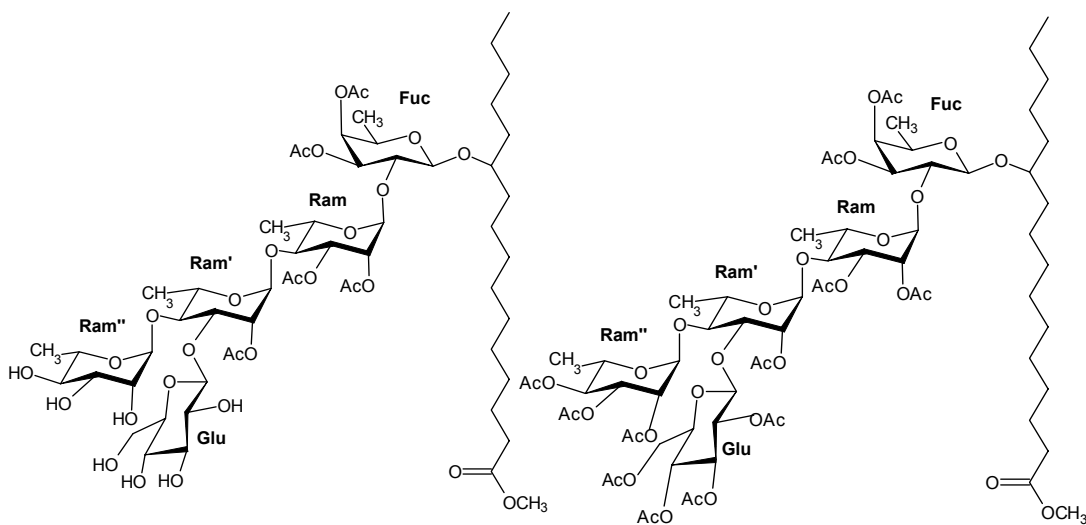
^aDatos registrados en C₅D₅N. Desplazamientos químicos (δ) en ppm en relación a TMS. Las asignaciones se basaron en experimentos HMQC y HMBC. ^bAbreviaciones: fuc = fucosa; ram = ramnosa; glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanoil.

En la **Figura 22** se ilustran las estructuras moleculares de los derivados parcialmente acetilados (**1–3**) y el peracetato (**4**) obtenidos de secuencia de reacción que incluyó la saponificación (hidrólisis básica), la acetilación y la metilación de las resinas glicosídicas de las flores de *Ipomoea wolcottiana*.



Derivado 1 (Acetilado en Ramnosa')
Fucosa)

Derivado 2 (Acetilado en



Derivado 3 (Acetilado en Fucosa, Ramnosa
y Ramnosa')

Derivado 4 (Peracetato-metilado)

Figura 22. Estructuras moleculares de los derivados parcialmente acetilados y el peracetato-metilado de *Ipomoea wolcottiana*

7. Conclusiones

- a) En la presente investigación se realizó por primera vez el estudio de las resinas glicosídicas de las hojas de *Ipomoea wolcottiana*.
- b) Por medio de la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia se logró aislar y purificar la mezcla de oligosacáridos constitutiva de las resinas glicosídicas de dicha especie.
- c) El empleo de la derivatización química permite la simplificación de estas mezclas complejas de resinas glicosídicas para la caracterización de la composición química del núcleo oligosacárido mayoritario.
- d) El empleo de técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-CG) permitió la caracterización y la identificación del núcleo pentasacárido presente en esta resinas como el ácido operculínico A: 11-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-[O- β -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)] β -D-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-hidroxihexadecanóico.

8. REFERENCIAS

- ✦ Agrawal, P. (1992) NMR Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry* **31**, 3307–3330.
- ✦ Argueta, A. (1994) Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México, p. 288.
- ✦ Bah, M. (1997). Aplicación de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (FAB) de alta resolución en la elucidación estructural de las Tricolorinas A-J, oligosacáridos aislados de las resinas de *Ipomoea tricolor* (*Convolvulaceae*). Tesis Doctoral. Facultad de Química. UNAM, México.
- ✦ Bah, M.; Pereda-Miranda, R. (1999) High Resolution NMR Investigation of Tricolorins A-G, Phytogrowth-Inhibitor Oligosaccharides from *Ipomoea tricolor* (*Convolvulaceae*).
- ✦ Bruneton, J. (1993) *Pharmacognosie. Phytochimie. Plantes Medicinales*, Technique et documentation-Lavoisier, Paris, pp 156-157.
- ✦ Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R. (2006) Resin Glycoside from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J.Nat. Prod.* **69**, 595-599.
- ✦ Cox, P. A. (1994) The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations. En: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons, Gran Bretaña, pp. 25-41.
- ✦ Décostered, L. A., Dorzas, A. C. y Hostettman K (1987) Application of semi-preparative high-performance liquid chromatography to difficult natural product separations. *J. Chromatography* **406**, 367-373.
- ✦ Díaz, J. L. (1977). Uso de las plantas medicinales de México. Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales, A.C., México, p.66.

-
- ✦ Duus, J. O.; Gotfredsen, C. H.; Bock, K. (2000) Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. *Chem. Rev.* **100**, 4589-4614.

 - ✦ Escalante Sánchez, E. (2005) Aislamiento y caracterización estructural de cuatro lipopentosasacáridos de *Ipomoea pes-caprea*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM., México.

 - ✦ Kitagawa, I.; Ohashi, K.; Baek, N. I.; Sakagami, M.; Yshikawa; 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.

 - ✦ Lothar, W.; Alves Da Silva, A.; Correa, R.; Andrade, A., Carneiro, S.; De Souza, I.; De Mello, J. y Jürgen H. (1986). Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Ipomoea bahiensis*, *Phytochemistry* **25** (5), 1077-1081.

 - ✦ MacDonald, A. (1994) *Convolvulaceae II*. University of California, Instituto de Ecología de Veracruz, México. p. 131-133.

 - ✦ Monroy-Ortiz, C; Castillo-España, P. (2000) Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, 104-105.

 - ✦ MacLeod, J. K.; Ward, A.; Oerlrichs, P. B. Structural investigation of resin glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *J. Nat. Prod.* **60**, 467-471.

 - ✦ Massateru, O.; Fujimoto, K.; Kawata, M.; Fukunaga, T.; Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides. XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the ether-soluble resin glycosides (jalapin) from rhizome *jalapae braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3163-3168.

 - ✦ Noda, N.; Yoda, S.; Kawasaki, T. y 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.

-
- ◆ Ono, M.; Kawasaki, T. y Miyahara (1989) Resin Glycosides V. Identification and characterization of the component organic and glycoside acids of the ether-soluble crude resin glycosides (“jalapín”) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3209-3213.

 - ◆ Parra V., Bullock S H. (1998) Factors limiting fecundity of the tropical tree *Ipomoea wolcottiana* (*Convolvulaceae*) in a Mexican tropical dry forest. *J. Trop. Ecol.* **14**, 615–627.

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

 - ◆ Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive Natural Products from traditionally used Mexican Plants. En: *Phytochemistry of medicinal plants*. J.T. Arnason, R. Mata y J. T. Romeo (Eds.) Plenum press, Nueva York, pp. 83-112.

 - ◆ Pereda-Miranda, R.; Cardoso Taketa, A. T.; Villatoro-Vera R. A. (2003) Farmacognosia da planta ao Medicamento. Alucinógenos Naturais: Etnobotânica e Psicofarmacologia, editora UFRGS, Porto Alegre, Brazil, **36**, pp.919-953.

 - ◆ Pereda-Miranda, R. y Bah, M. (2003) Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 111-131.

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

 - ◆ Rangel-Cordero, A. (1995) Efecto de la tricolorina A sobre la contractilidad del útero grávido de la rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, 56 pp.

 - ◆ Schultes, R. E. y Hofmann, A. (1982) Plantas de los Dioses. Orígenes del uso de los alucinógenos. Fondo de Cultura Económica. México, p.46