



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

RESINAS GLICOSÍDICAS DE LA PLANTA MEDICINAL *IPOMOEA PES-CAPRAE*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. F. B. CAROLINA ESCOBEDO MARTINEZ



TUTOR: ROGELIO PEREDA MIRANDA

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. María Cristina Pérez Amador
Primer Vocal	Dra. Martha Eugenia Albores Velasco
Segundo Vocal	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Tercer Vocal	Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas
Secretario	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Primer Suplemente	Dra. María Luisa Villarreal Ortega
Segundo Suplente	Dra. María Isabel Aguilar Laurents

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor	Dr. Rogelio Pereda Miranda
--------	----------------------------

Sustentante	Q. F. B. Carolina Escobedo Martínez
-------------	-------------------------------------

AGRADECIMIENTOS

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

- Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN208307).
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (4586IQ y Beca escolar).
- Dirección General de Estudios de Posgrado (Beca escolar).
- Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del instituto de Biología de la UNAM quien hizo la identificación de la muestra vegetal de *Ipomoea pes-caprae* (Bahía de Chamela, Jalisco).
- En el registro de los espectros de RMN: M. en C. Atilano Gutiérrez Carrillo de la Universidad Autónoma Metropolitana; M. en C. Rosa Isela del Villar de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI).
- M. en C. Georgina Duarte Lisci y Q. F. B. Margarita Guzmán Villanueva de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) por el registro de los espectros de masas EI-MS y FAB-MS alta y baja resolución.
- Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV) por la asistencia brindada en la determinación de las rotaciones ópticas de los compuestos aislados.
- Q. F. B. Marisela Gutierrez de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química UNAM por el registro de las rotaciones ópticas.

- Dra. Clara Mabel Fragoso Serrano del departamento de Farmacia por las evaluaciones de la actividad citotóxica de los glicolípidos mayoritarios de *Ipomoea pes-caprae*.
- De manera especial al Dr. Rogelio Pereda Miranda por la confianza brindada para desarrollar este proyecto de tesis y haberme permitido ser parte de su grupo de investigación.

Con cariño para mis padres Mario e Irene

A la familia Vega Morales por todo el apoyo que me brindaron

Indice	Página
Lista de cuadros.....	i
Lista de figuras.....	ii
Lista de abreviaturas.....	vii
I. INTRODUCCION	1
II. ANTECEDENTES	3
2.1. LA FAMILIA CONVULVULÁCEAE Y EL GÉNERO IPOMOEAE.	3
2.2. LAS RESINAS GLICOSÍDICAS EN LA FAMILIA CONVULVULACEAE	6
2.2.1. Elucidación estructural	11
2.2.1.1. Métodos químicos de degradación	11
2.2.1.2. Métodos espectroscópicos	13
2.3. DIVERSIDAD ESTRUCTURAL	14
2.3.1. Lipopentasacáridos y ácidos glicosídicos de la familia Convolvulaceae	14
2.3.1.1. Resinas glicosídicas de Merremia mammosa	17
2.3.1.2. Resinas glicosídicas de Quamoclit multifida	20
2.3.1.3. Resina glicosídica de Convolvulus microphyllus	21
2.3.1.4. Resinas glicosídicas de Ipomoea tuberosa	22
2.3.1.5. Resinas glicosídicas de Pharbitis nil	24
2.3.1.6. Resinas glicosídicas de Ipomoea batatas	25
2.3.1.7. Resinas glicosídicas de Ipomoea stolonifera	26
2.3.1.8. Resinas glicosídicas de Ipomoea leptophylla	28
2.3.1.9. Resinas glicosídicas de Ipomoea murucoides	29
2.3.1.10. Resinas glicosídicas de Ipomoea arborescens	32
2.3.2. Acidos glicosídicos tetrasacáridos de la familia Convolvulaceae	33
2.3.3. Componentes de la convolvulina de Cuscuta chinensis	36
2.3.4. La especie Ipomoea pes-caprae	37
III. JUSTIFICACION	44
IV. OBJETIVOS	45
4.1 OBJETIVOS GENERALES	45
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	45
V. PARTE EXPERIMENTAL	46
5.1. MÉTODOS	46
5.1.1. Métodos cromatográficos	46
5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas	46
5.2. MATERIAL VEGETAL	47
5.2.1. Preparación del extracto del material vegetal de Ipomea pes-caprae	47
5.3. FRACCIONAMIENTO PRIMARIO	48
5.3.1. Fraccionamiento preliminar: primera colecta.	48
5.3.1.1. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FIV	49

5.3.1.2. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FV	50
5.3.2. Fraccionamiento preliminar: segunda colecta.	50
5.3.3. Fraccionamiento preliminar: material comercial.	51
5.4. PREPARACIÓN DE DERIVADOS	54
5.4.1. Hidrólisis alcalina	54
5.4.2. Reacción de acetilación	54
5.4.3. Reacción de alquilación con diazometano	55
5.4.4. Preparación del diazometano	55
5.4.5. Reacción de alquilación	55
5.4.6. Hidrólisis ácida	55
5.4.7. Análisis de la mezcla de carbohidratos	56
5.5. PURIFICACIÓN DEL COMPUESTO ACETILADO-METILADO MEDIANTE CLAE	57
5.6. PURIFICACIÓN DE GLICOLÍPIDOS INDIVIDUALES	58
5.6.1. Condiciones cromatográficas	59
5.6.1.1 Preparación de la fase móvil	59
5.6.1.2. Preparación de las muestras	59
5.6.1.3. Condiciones instrumentales: nivel analítico	60
5.6.1.4. Condiciones instrumentales: nivel preparativo	60
5.6.2. Obtención del pescaprosido A y de las pescapreínas I, V, y VI	61
5.6.3. Obtención de la estoloniferina III y de las pescapreínas II, III, IV, VIII y IX	63
5.6.4. Obtención del pescaprosido B y de la pescapreína VII	65
5.6.5. Obtención de las pescapreínas X, XI y XII	68
VI. RESULTADOS Y DISCUSION	71
6.1. EXTRACCIÓN Y FRACCIONAMIENTO	71
6.2. HIDRÓLISIS ÁCIDA	73
6.2.1. Identificación de carbohidratos por RMN	74
6.3. HIDRÓLISIS ALCALINA. DETERMINACIÓN DE LOS ÁCIDOS GRASOS ESTERIFICADOS.	76
6.4. DERIVADO ACETILADO-METILADO. ANÁLISIS Y PURIFICACIÓN MEDIANTE HPLC	79
6.5. PURIFICACIÓN DE LOS GLICOLÍPIDOS INDIVIDUALES: PRIMERA COLECTA.	80
6.5.1. Obtención del Pescaprosido A y de la Pescapreína I	81
6.5.2. Obtención de las Pescapreínas V y VI	85
6.5.3. Obtención de la Estoloniferina III y de las Pescapreínas II, III, IV, VIII y IX	86
6.6. PURIFICACIÓN DE LOS GLICOLÍPIDOS INDIVIDUALES: SEGUNDA COLECTA.	91
6.6.1. Obtención del Pescaprosido B	91
6.6.2. Obtención de la Pescapreína VII	95
6.7. PURIFICACIÓN DE LOS GLICOLÍPIDOS INDIVIDUALES: MATERIAL COMERCIAL.	98
6.7.1. Verificación de los oligosacáridos mayoritarios presentes en el extracto hexánico	98
6.7.2. Obtención de las Pescapreínas X, XI y XII	103

6.8. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO GLICOSÍDICO	108
6.9. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LAS PESCAPREÍNAS I-XII Y DE LOS PESCAPRÓSIDO A Y B	118
6.9.1 Asignación de señales de RMN 1H y 13C	121
6.9.2 Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación	149
6.9.3 Diferenciación de las Pescapreínas y de los Pescaprósidos mediante Espectrometría de Masas	153
VII . C O N C L U S I O N E S	165
VIII . B I B L I O G R A F I A	174

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1.	Principales productos de la hidrólisis de las resinas glicosídicas.	12
Cuadro 2.	Fraccionamiento preliminar del extracto hexánico de la primer colecta.	49
Cuadro 3.	Fraccionamiento preliminar del extracto hexánico de la segunda colecta.	51
Cuadro 4.	Fraccionamiento primario del extracto hexánico de la riñonina comercial.	52
Cuadro 5.	Análisis mediante CG-EM de la fase orgánica obtenida de la hidrólisis ácida de FV.	77
Cuadro 6.	Rendimiento de la fracción IpIVb.	82
Cuadro 7.	Rendimiento de la fracción IpIVb12-6.	83
Cuadro 8.	Rendimiento de la fracción IpVI.	92
Cuadro 9.	Rendimiento de la fracción 2Hex.IpVI-3.	92
Cuadro 10.	Rendimiento de la fracción 2Hex.IpVI-3-6.	93
Cuadro 11.	Rendimiento de la fracción 2Hex.IpVI-1.	95
Cuadro 12.	Rendimiento de la fracción 2Hex.IpVI-1h.	97
Cuadro 13.	Rendimiento del fraccionamiento primario del extracto 3Hex.Ip (muestra comercial).	99
Cuadro 14.	Rendimiento del fraccionamiento primario del extracto 3Hex.IpXI (extracto comercial).	104
Cuadro 15.	Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C del ácido glicosídico peracetilado y metilado FV-SAM.	112
Cuadro 16.	Datos RMN ^1H de la estoloniferina III y pescapreínas I – IV.	143
Cuadro 17.	Datos RMN ^{13}C de la estoloniferina III y pescapreínas I – IV.	144
Cuadro 18.	Datos RMN ^1H de las pescapreínas V – IX.	145
Cuadro 19.	Datos RMN ^{13}C de las pescapreínas V – IX.	146
Cuadro 20.	Datos RMN ^1H de las pescapreínas X – XII y de los pescaprosidos A y B.	147
Cuadro 21.	Datos RMN ^{13}C de las pescapreínas X – XII y de los pescaprosido A y B.	148

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Fotografía del manto de la virgen. La enredadera <i>Ipomoea violacea</i> es una planta silvestre común en los pastizales del estado de Morelos y sus semillas (“ololiuqui”) se empleaban como intoxicante en la época prehispánica pues contiene alcaloides psicoactivos	5
Figura 2.	Orizabinas I-IV aisladas de <i>Ipomoea orizabensis</i>	8
Figura 3.	Estructura hipotética de las resinas glicosídicas de <i>Exogonium purga</i> Benth (<i>Ipomoea purga</i>) de acuerdo con Mannich y Schuman (1938).	10
Figura 4.	Estructuras de los ácidos operculínicos A (1), B (2), D (3) y G (4)	16
Figura 5.	Estructuras de los ácidos simónicos A ($R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=CH_2OH$) y B ($R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=CH_3$).	16
Figura 6.	Estructuras de los merremósidos f ($R_1= (2S)$ -2- metilbutanoilo, $R_2=$ isobutanoilo) y g ($R_1= R_2=$ isobutanoilo).	18
Figura 7.	Estructura de los merremósidos h_1 ($R=$ 2-metilbutanoilo) y h_2 ($R=$ isobutanoilo)	19
Figura 8.	Estructura de los mamósido H_1 ($R_1= (2S)$ -2-metilbutanoilo, $R_2=$ isobutanoilo) y Mamósido H_2 ($R_1= R_2=$ isobutanoilo)	19
Figura 9.	Estructuras de las quamoclinas I ($R_1=H$, $R_2=C_2H_5$), III ($R_1=R_2=H$) y IV ($R_1=R_2=C_2H_5$).	20
Figura 10.	Estructura de las multifidinas I ($R=H$) y II ($R=C_2H_5$)	21
Figura 11.	Estructura del ácido microfílico	22
Figura 12.	Estructura de las woodrosinas I (1) y II (2)	23
Figura 13.	Estructura del ácido woodrosínico A	23
Figura 14.	Estructura del ácido farbítico C	24
Figura 15.	Estructuras de las simoninas II-V (1-4)	25
Figura 16.	Estructuras de las estoloniferinas I-III (1-3) y IV	26
Figura 17.	Estructuras de las estoloniferinas V (1); VI (2), VII (3), VIII (4), IX (5) y X (6)	27
Figura 18.	Estructuras de las leptofilinas A (1) y B (2)	28
Figura 19.	Estructuras de las murucinas 1-5	29
Figura 20.	Estructuras de las murucoidina I-III (1-3)	30
Figura 21.	Estructura de la murucoidina IV (arriba) y V (abajo)	31
Figura 22.	Estructuras de las arboresinas 1-6 y las murucinas 6-9 (7-10)	32
Figura 23.	Estructuras de los ácidos operculínicos C (1), E (2) y F (3)	33
Figura 24.	Estructura del merremósido i	34
Figura 25.	Estructura del ácido escamónico A	35
Figura 26.	Estructuras de los ácidos tricolórico A ($R_1=OH$; $R_2=H$) y B ($R_1=H$; $R_2=OH$)	36
Figura 27.	Estructuras de los ácidos cuscúuticos A ($R=H$; $R_1=CH_2OH$), B ($R=R_1=H$), C ($R=H$; $R_1=CH_3$), y D ($R=C_2H_5$; $R_1=CH_2OH$)	37
Figura 28.	Flor de la riñonina (<i>Ipomoea pes-caprae</i>)	38

Figura 29.	Droga cruda de la planta medicinal riñonina (<i>Ipomoea pes-caprae</i>)	39
Figura 30.	<i>Ipomoea pes-caprae</i> a lo largo de las dunas del Pacífico en la Bahía de Chamela, Jalisco	40
Figura 31.	<i>Ipomoea pes-caprae</i> a lo largo de las playas del Golfo de México en la playa de Chachalacas, municipio de Ursulo Galván, Veracruz	41
Figura 32.	Riñonina de venta en expendios de plantas medicinales en el centro de la Ciudad de México, DF	42
Figura 33.	Cromatograma en capa fina de las fracciones primarias 2Hex.Ip I-VIII provenientes de la segunda colecta	72
Figura 34.	Cromatograma en capa final de las fracciones primarias 2Hex. IpI-VIII proveniente de la segunda colecta	73
Figura 35.	Espectro de RMN ¹ H del estándar de ramnosa (superior). Espectro de RMN ¹ H de la mezcla de monosacáridos (inferior)	74
Figura 36.	Expansión de región centrada en 3-4 ppm del espectro de la muestra estándar de ramnosa (izquierda). Misma región para el espectro de la mezcla de hidrólisis (derecha)	75
Figura 37.	Cromatograma de gases obtenido para la fase orgánica de la hidrólisis alcalina	76
Figura 38.	Espectros de masas para los ácidos grasos liberados	78
Figura 39.	Perfil cromatográfico obtenido de la fracción IpIVb	81
Figura 40.	Fraccionamiento y reciclaje del pico mayoritario de la fracción IpIVb12-6	83
Figura 41.	Purificación del pico IpIVb12-6-1 mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna	84
Figura 42.	Perfil cromatográfico bajo condiciones preparativas de la fracción IpIVb3	85
Figura 43.	Purificación del pico IpIVb3-2	86
Figura 44.	Cromatograma de líquidos de la fracción primaria FV a una escala preparativa.	87
Figura 45.	Cromatograma de líquidos de la subfracción B . Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la estoloniferina III .	88
Figura 46.	Cromatograma de líquidos de la subfracción D . Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la pescapreína II .	88
Figura 47.	Cromatograma de líquidos de la subfracción G . Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la pescapreína III . volumen de inyección de la muestra: 500 µl (30 mg/ml).	89
Figura 48.	Cromatograma de líquidos de la subfracción H . Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la pescapreína IV .	89
Figura 49.	Cromatograma de líquidos de la subfracción C . Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la pescapreína VIII .	90

Figura 50.	Cromatograma de líquidos de la subfracción E . Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la pescapreína IX .	90
Figura 51.	Perfil cromatográfico obtenido de la fracción 2Hex.lpVI	91
Figura 52.	Fraccionamiento en cromatografía líquida de alta eficiencia y reciclaje del pico asignado con la clave 2Hex.lpVI-3-6e de la planta <i>Ipomoea pes-caprae</i>	93
Figura 53.	Purificación del pico 2Hex.lpVI-3-6d mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna	94
Figura 54.	Perfil cromatográfico de la fracción 2Hex.lpVI	95
Figura 55.	Fraccionamiento de la subfracción 2Hex.lpVI-1h y reciclaje del pico asignado con la clave 2Hex.lpVI-1h	96
Figura 56.	Reciclaje del pico asignado con la clave 2Hex.lpVI-1h5	97
Figura 57.	Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.lpVII	100
Figura 58.	Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.lpVIII	101
Figura 59.	Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.lpXI	101
Figura 60.	Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.lpX.	102
Figura 61.	Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.lpXI	103
Figura 62.	Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.lpXII	103
Figura 63.	Purificación del pico 3Hex.lpXI-1b	105
Figura 64.	Purificación del pico 3Hex.lpXI-1b	106
Figura 65.	Purificación del pico 3Hex.lpXI-3a y rasurado de los picos 3Hex.lpXI-3b y 3Hex.lpXI-3c	106
Figura 66.	Purificación del pico 3Hex.lpXI-4	107
Figura 67.	Espectro de RMN ¹ H del derivado peracetilado-metilado FV-SAM	108
Figura 68.	Espectro de RMN ¹³ C del derivado peracetilado-metilado FV-SAM	109
Figura 69.	Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida del ácido glicosídico B	110
Figura 70.	Sección del espectro TOCSY para la porción oligosacárida del ácido glicosídico	111
Figura 71.	Propuestas estructurales para cada una de las tres metilpentosas del núcleo oligosacárido	114
Figura 72.	Sección del espectro HMBC y conectividades heteronucleares ³ J _{C-H} observadas en el éster metílico del ácido glicosídico peracetilado FV-SAM	115
Figura 73.	Sección del espectro HMBC del éster metílico del ácido glicosídico peracetilado FV-SAM en donde se muestra la correación entre el C-1 de la fucosa con el H-11 del residuo de jalapinolato (aglicona)	116
Figura 74.	Estructura del derivado FV-SAM	117
Figura 75.	Estructura de las pescapreínas I–IX y XII	118
Figura 76.	Estructura de la pescapreína X y XI	119
Figura 77.	Estructura de los pescaprosidos A y B	120

Figura 78.	Espectros de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la estoloniferina III y las pescapreínas I–IV	122
Figura 79.	Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la estoloniferina III y las pescapreínas I–IV	123
Figura 80.	Espectros de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas V–IX	124
Figura 81.	Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas V–IX	125
Figura 82.	Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas X–XII y de los pescaprósidos A y B	126
Figura 83.	Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas X–XII y de los pescaprósido A y B	127
Figura 84.	Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida de la pescapreína I	129
Figura 85.	Sección del espectro TOCSY para la porción oligosacárida de la Pescapreína I	130
Figura 86.	Sección adicional del espectro TOCSY para la porción oligosacárida de la pescapreína I	131
Figura 87.	Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida de la pescapreína X	132
Figura 88.	Sección adicional del espectro COSY para la porción oligosacárida de la Pescapreína X	133
Figura 89.	Sección del espectro TOCSY para la asignación de los metilos de los 6-deoxiazucares de la pescapreína X	134
Figura 90.	Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida de la pescapreína XI	135
Figura 91.	Sección adicional del espectro TOCSY para la porción oligosacárida de la pescapreína XI	136
Figura 92.	Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la pescapreína VII	137
Figura 93.	Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la pescapreína VII.	138
Figura 94.	Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la pescapreína X	13
Figura 95.	Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la pescapreína XI	139
Figura 96.	Sección del espectro HMQC del glicolípido pescapreína II	140
Figura 97.	Sección del espectro HMQC del glicolípido pescapreína VII	141
Figura 98.	Sección del espectro HMBC de la estoloniferina III	142
Figura 99.	Sección del espectro HMBC del pescaprósido A	149
Figura 100.	Sección del espectro HMBC de la pescapreína V	150
Figura 101.	Sección del espectro HMBC de la pescapreína X	150
Figura 102.	Sección del espectro HMBC de la pescapreína XI	151
Figura 103.	Sección adicional del espectro HMBC de la pescapreína XI	151
Figura 104.	Sección del espectro HMBC de la estoloniferina III para la determinación de los sitios de acilación	152

Figura 105.	Patrón de fragmentación para la serie de las pescapreínas	153
Figura 106.	Espectro de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína VIII	156
Figura 107.	Espectros de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína II	157
Figura 108.	Espectro de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína V	159
Figura 109.	Espectro de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína VI	160
Figura 110.	Espectro de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína X	161
Figura 111.	Espectro de masas FAB (modo negativo) de la pescapreína XI	162
Figura 112.	Espectro de masas FAB (modo negativo) del pescaprósido A	163
Figura 113.	Espectro de masas FAB (modo negativo) del pescaprósido B	164

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
α	Rotación óptica
cm	Centímetro
J	Constante de acoplamiento
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CHCl ₃	Cloroformo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficacia
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
COSY	Correlación homonuclear
δ	Desplazamiento químico
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble de doble de doble
eV	Electrón volts
°C	Grados centígrados
FAB ⁻	Bombardeo rápido de átomos modalidad negativa
g	Gramo
Hz	Hertz
[M-1] ⁻	Ión pseudomolecular
Kg	Kilogramo

L	Litro
MHz	Megahertz
MeOH	Metanol
Min	Minutos
mg	Miligramos
μL	Microlitros
μm	Micrometros
p.f.	Punto de fusión
p.p.m.	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	Singulete ancho
t	Triplete

I. INTRODUCCION

El presente proyecto contempló el aislamiento de los principios activos de naturaleza oligosacárida a partir de la planta medicinal mexicana *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. perteneciente a la familia de las convolvuláceas. Esta planta corresponde a las dunas costeras, se conoce en la medicina tradicional mexicana con el nombre de riñonina y se utiliza en forma de infusiones para el tratamiento de trastornos e infecciones renales (“mal de orín”), así como para el tratamiento de dolores musculares.

Una de las características anatómicas más sobresalientes de la familia de las convolvuláceas es la presencia de hileras de células secretoras de resinas glicosídicas en los tejidos vegetales. Estas resinas representan un complejo de glicolípidos de alto peso molecular entre 500 y 2000, o más (Escalante-Sánchez, *et al.*, 2007). Estos constituyentes, junto con los alcaloides del ergot, representan los principios biodinámicos de las especies medicinales de las convolvuláceas (Pereda-Miranda, 1995).

Los glicolípidos característicos del género *Ipomoea* (Convolvulaceae) constituyen una serie de oligosacáridos que tienen la particularidad de ser moléculas anfipáticas por la presencia simultánea en su estructura de un núcleo oligosacárido hidrofílico y una porción hidrofóbica constituida por la aglicona que está representada por un ácido graso hidroxilado, el ácido jalapínico (ácido 11S-hidroxihexadecanoico). La aglicona establece un éster cíclico intramolecular mediante la formación de una lactona entre su grupo carboxílico y uno de los grupos hidroxilo del núcleo oligosacárido. Se ha postulado que estos glicolípidos

desempeñan un papel importante en la ecología química de las convolvuláceas (Pereda-Miranda y Bah, 2003), ya que un gran número de sus actividades biológicas pueden explicarse como un resultado de su posible acción ionofórica, e.g. la citotoxicidad, misma que provocaría perturbaciones en las membranas celulares (Pereda-Miranda y Bah, 2003) de las células blanco. La presencia de la estructura macrocíclica constituye un requisito esencial para la actividad biológica (Rencusori *et al.*, 2004). Evidentemente, esta característica estructural deberá conferir propiedades estereoquímicas claves para el papel bioquímico que desempeñan estos glicolípidos en la medición del amplio espectro de actividades biológicas demostradas por las resinas glicosídicas de las convolvuláceas, e.g. la actividad citotóxica ($CE_{50} < 4 \mu\text{g/ml}$), las propiedades moduladoras de la actividad enzimática de la proteína cinasa C ($CI_{50} = 40\text{--}100 \mu\text{g/ml}$) y de la (1,3)- β -glucan sintasa ($CI_{50} 0.06\text{--}0.18 \mu\text{g/ml}$), esta última de utilidad para el desarrollo de agentes antifúngicos selectivos (Castelli *et al.*, 2004), y la fitotoxicidad (Achnine *et al.*, 2004), entre otras. Sin embargo, la naturaleza química y la complejidad estructural de las resinas glicosídicas ha constituido un obstáculo que ha dificultado durante mucho tiempo el aislamiento de sus constituyentes individuales y, por lo tanto, la caracterización de su estructura molecular. El éxito en la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas ha dependido exclusivamente del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficacia (CLAE)

ABSTRACT

Ipomoea pes-caprae (beach morning-glory; “riñonina” for the herbal drug in Mexico) is prescribed by traditional healers to moderate “heat” in an infected kidney. is used in infusions for urinary or kidney complaints, hypertension, scrofula, and in decoctions to treat functional digestive disorders, internal pain, colic, lumbago, arthritis, rheumatism, dysentery, and inflammatory conditions. This herbal drug is called “riñonina” in Mexico reflecting the belief of traditional healers that it moderates the “heat” in an infected kidney. The dried whole plant is found readily in herbal markets and stores throughout the country.

The hexane-soluble extract from the aerial parts of this plant, through preparative-scale recycling HPLC, yielded 14 new lipophilic oligosaccharides of jalapinolic acid: pescaprosides A and B, and pescapreins I-XII. The previously known stoloniferin III was also identified. Saponification of the crude resin glycoside mixture yielded simonic acid B as the major glycosidic acid component whereas the esterifying residues of the natural oligosaccharides composed five fatty acids: 2-methylpropanoic, 2-methylbutyric, *n*-hexanoic, *n*-decanoic, and *n*-dodecanoic acids.

Pescaproside A, an acylated glycosidic acid methyl ester, is related structurally to the product obtained from the macrolactone hydrolysis of pescapreins I-IV. Pescaproside B, an acylated glycosidic acid methyl ester, is structurally related to pescaprein III. This type of non-macrocyclic resin glycoside has only been identified in two other plant species apart from that used in the present investigation. The first of these yielded cuscutic acids A-D isolated from the seeds of *Cuscuta chinensis*, a member of the Convolvulaceae family. The second yielded cryptophilic acids A-C from the aerial parts of *Scrophularia cryptophila*, a species taxonomically unrelated to Convolvulaceae but belonging instead to the Scrophulariaceae. Pescapreins V and VI are diastereoisomeric tetraglycosidic lactones of operculinic acid C. Both of these compounds contain (2*S*)-methylbutyric and *n*-dodecanoic acids as their esterifying residues. Pescapreins VII and IX are pentasaccharides that contain a *n*-decanoyl group as their esterifying fatty acid residue instead of the *n*-dodecanoyl found in pescapreins I and IV. Pescaprein VIII

represents an isomer of pescaprein II containing a *n*-dodecanoyl unit as the esterifying residue at position C-4 of the third rhamnose moiety and a 2-methylpropanoyl at C-2 of the second rhamnose. Pescaprein XI is a new pentasaccharide containing xylose. High-field NMR spectroscopy and FAB mass spectrometry were used to characterize all new isolated compounds. The results of the present investigation suggest that convolvulaceous plants may have the ability to synthesize an array of amphipatic oligosaccharides from such simple building blocks as sugars and fatty acids. The highly elaborated chemical diversity of this plant family, as this study illustrates, may confer selective biological properties for which these species have long been used in traditional agriculture and medicinal practices.

RESUMEN

Ipomoea pes-caprae (beach morning-glory o conocida en Mexico “riñonina”) es prescrita por los curanderos tradicionales para regular el “calor” en un riñón infectado. Se utilizada en forma de infusiones para afecciones de vías urinarias o del riñón, hipertensión, escrófula y en forma de decocciones para tratar desordenes funcionales digestivos, dolor interno, cólico, lumbago, artritis, reumatismo, disentería, y estados inflamatorios. Esta planta medicinal es llamada comúnmente en México “riñonina” en consideración a la creencia de los curanderos tradicionales que regula el “calor” en un riñón infectado. La planta entera y seca, lista para ser utilizada se encuentra en mercado de hierbas y por todos los expendios de productos naturista de la ciudad.

El extracto soluble hexánico proveniente de las partes aéreas de esta planta y a través de Cromatografía Líquida de alta eficacia (CLAE) a nivel preparativo mediante técnicas de reciclaje, proporcionó 14 nuevos oligosacáridos lipofílicos del ácido jalapinólico: pescaprósidos A y B, y pescapreínas I-XII, así como la ya conocida estoloniferina III fue también identificada. La saponificación de la mezcla cruda de resinas glicosídicas proporcionó el ácido simónico B como el ácido glicosídico mayoritario mientras que los residuos de esterificación de los oligosacáridos naturales estuvieron compuestos por cinco ácidos grasos: 2-metilpropanoico, ácidos 2 metilbutírico, *n*-hexanoico, *n*-decanoico, y *n*-dodecanoico.

El pescaprósido A, el éster metílico de un ácido glicosídico acilado, está relacionado estructuralmente al producto obtenido de la hidrólisis de la macroláctona de las pescapreína I-IV. Pescaprósido B, éster metílico de un ácido glicosídico acilado está estructuralmente relacionado a la pescapreína III. Este tipo de resinas glicosídicas no macrocíclicas ha sido identificada solamente en otras dos especies de plantas aparte de las que se presentan en esta investigación. La primera de éstas proporcionó los ácidos cuscúticos A-D aislados de las semillas de *Cuscuta chinensis*, un miembro de la familia de las convolvuláceas. La segunda proporcionó los ácidos criptofílicos A-C proveniente de las partes aéreas de *Scrophularia crythophila*, una especie taxonomicamente no relacionada a las

convolvuláceas, sino perteneciente a las Escrofulariáceas. Las pescapreína V y VI son lactonas tetraglicosídicas diastereoisoméricas del ácido operculínico C. Ambos de estos compuestos contienen los ácidos (2S)-metilbutírico y *n*-dodecanoico como sus residuos de esterificación. Las pescapreínas VII y IX son pentasacáridos que contienen un grupo *n*-decanoilo como sus residuos de ácidos grasos de esterificación en vez del *n*-dodecanoilo encontrado en las pescapreína I y IV. La pescapreína VIII representa un isómero de la pescapreína II conteniendo una unidad de *n*-dodecanoilo como residuo de esterificación en la posición C-4 de la tercera unidad de ramnosa y un residuo 2-metilpropanoilo en el C-2 de la segunda ramnosa. La pescapreína XI es un nuevo pentasacárido que contiene xilosa.

Se utilizó la espectroscopia de RMN a campos altos y espectrometría de masas (FAB, modo negativo) para caracterizar todos los compuestos aislados. Los resultados de la presente investigación sugieren que las plantas de la familia de las convolvuláceas quizá tienen la habilidad de sintetizar un arreglo de oligosacáridos anfipáticos partiendo de simples bloques de construcción como los azúcares y los ácidos grasos. La diversidad química altamente elaborada de esta familia de plantas, así como este estudio ilustra, puede decidir propiedades biológicas selectivas para lo cual estas especies ha sido utilizadas a lo largo en la agricultura y practicas medicinales tradicionales.

II . ANTECEDENTES

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

El nombre de los miembros de esta familia (Convolvulaceae) deriva del Latín *convolvere* que significa entrelazarse y se refiere a su crecimiento en forma de enredaderas entrelazadas que se sujetan alrededor de un soporte. Una de las características anatómicas más notables de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas presentes en sus tejidos foliares así como en sus raíces. Estas glicorresinas destacan por su familia acción purgante y que caracteriza a todas las especies utilizadas en la medicina tradicional de todas las regiones tropicales y templadas del mundo. Muchas de ellas forman parte de numerosas farmacopeas, e.g., los miembros de los géneros *Convolvulus*, *Exogonium*, *Ipomoea*, *Merremia* y *Operculina*. (Pereda-Miranda y Bah, 2003; Escalante-Sánchez, et al., 2007).

La familia de las convolvuláceas se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, siendo especialmente abundante en las zonas tropicales de Asia y América, particularmente en regiones que presentan temporadas de estiaje. En el mundo se estiman alrededor de 55 géneros y 1650 especies, los géneros más representativos son *Convolvulus* (250 especies), *Ipomoea* (500 especies) y *Cuscuta* (170 especies). Dentro de las angiospermas, la familia Convolvulaceae representa unas de las más grandes y diversas de México, reportándose 15 géneros y aproximadamente 217 especies, siendo el género *Ipomoea* uno de los mayoritarios con un grado de endemismo aproximadamente del 65 %, es decir, 104 especies están presentes en México de 160 especies del género (McDonald,

1991). La distribución de estas especies en el país muestra que el grado de endemismo del género *Ipomoea* está concentrado en las regiones subtropicales de la costa del pacífico, mientras que en el golfo de México sólo hay dos especies endémicas, *I. eximia* e *I. purga* en el estado de Veracruz, mientras que en una área de igual dimensión que abarca del estado de Jalisco al estado de Oaxaca existen por lo menos 20 especies endémicas (McDonald, 1991). Cabe mencionar que a nivel subgenérico existen complejos de especies que pueden ser caracterizadas por preferencias de hábitat. Por ejemplo, las especies de la serie *Tyrianthinae* están mejor representadas en las praderas y desiertos del Centro y Norte de México.

La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* no presentan una variedad importante en su morfología, siendo que la mayoría de éstas son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Existen unas cuantas especies como *I. phillomega* e *I. santillanii* que se presentan como lianas tropicales y alcanzan alturas de hasta 15 metros. Otras especies como *I. imperata* e *I. pes-caprae* crecen a iguales longitudes pero han perdido su capacidad de enroscarse creciendo de manera tendida para formar cubiertas extensas sobre dunas en arenas costeras. Otras especies de las zonas áridas (*I. stans*, *I. duranguensis* e *I. sescossiana*) forman arbustos perennes leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1.0 metro. Las especies *Ipomoea arborescens* (León, et al. 2006) e *Ipomoea murucoides* (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006; León, et al. 2006) (los “cazahuates”) crecen en forma de árboles de madera suave y alcanzan de 3 a 9 metros de altura.

Las flores del grupo son típicamente conocidas por su aspecto tubular y sus colores brillantes, generalmente con duración efímera y limitándose a las horas matinales. Este grupo de plantas representa uno de los elementos más conspicuos de la flora mexicana, por ejemplo, en el estado de Morelos los cazahuates y los quiebraplatos (figura 1) constituyen las especies dominantes de las selvas bajas ó bosques tropicales caducifolios y de los bosques espinosos.



Figura1. Fotografía del manto de la virgen. La enredadera *Ipomoea violacea* es una planta silvestre común en los pastizales del estado de Morelos y sus semillas (“ololiuqui”) se empleaban como intoxicante en la época prehispánica pues contiene alcaloides psicoactivos.

2.2. Las resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae

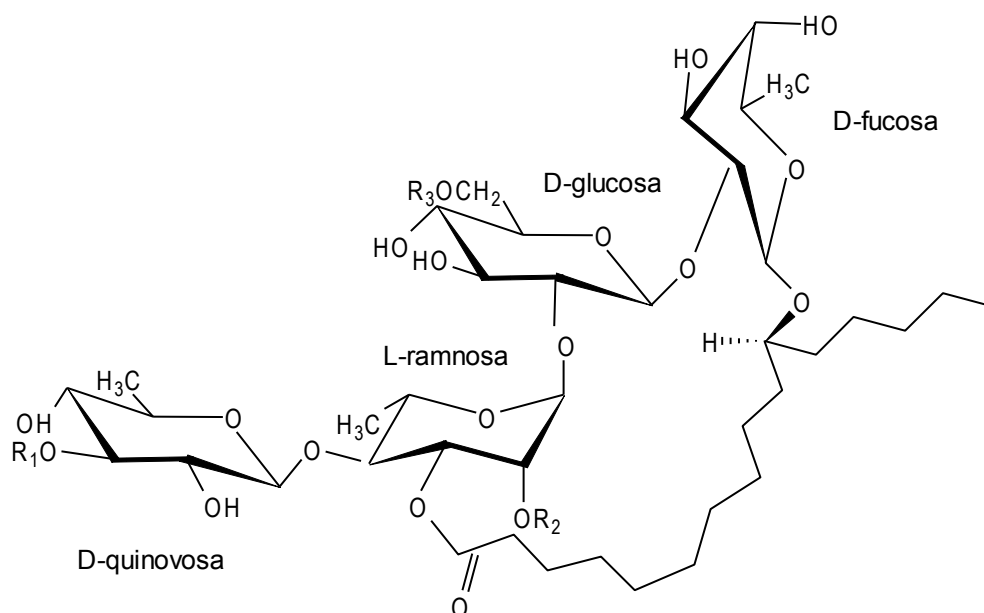
Las resinas glicosídicas son derivados de ácidos grasos con cadenas de catorce y dieciséis carbonos que pueden estar monohidroxilados o dihidroxilados. Ellos son parte de una gran familia de sustancias conocidas como glicolípidos o lipopentasacáridos (Pereda-Miranda y Bah, 2003). Es bien conocido y documentado el uso de estas plantas como alimento y como agentes terapéuticos en la medicina tradicional de numerosos pueblos. Uno de los ejemplos más ilustrativos es la existencia de actividad alucinógena para los miembros del género *Ipomoea*, la cual se debe a la presencia de alcaloides similares a los del cornezuelo del trigo, compuestos característicos de la familia de las convolvuláceas (Stauffacher *et al.*, 1965; Chao y DerMaderosian 1973; Schimming *et al.*, 1998; Botz *et al.*, 1990-1991; Jenett-Siems *et al.*, 1993; 1994a; 1994b; Henrici *et al.*, 1994). Otros ejemplos de la actividad biológica de los alcaloides presentes en las convolvuláceas son la intoxicación de ciertos animales con *I. parasitica* (Amor-Prats y Harbone, 1993) o la actividad analgésica de *I. intrapilosa* (Osuna *et al.*, 1996). En el caso de la actividad alelopática de *I. tricolor* (Anaya *et al.*, 1995), se demostró que los compuestos responsables son las resinas glicosídicas presentes en la raíz y las partes aéreas (Pereda-Miranda *et al.*, 1993; 1995). En *I. stans* las resinas glicosídicas han demostrado propiedades anticonvulsivas (Contreras *et al.*, 1996), citotóxicas (Reynolds *et al.*, 1995) y efectos vasoactivos (Perusquía *et al.*, 1995). Otros ejemplos son los resultados de la evaluación de actividad inmunomoduladora de *Ipomoea carnea* que sugieren que a dosis bajas los extractos inducen un incremento en la actividad fagocitaria

de los macrófagos peritoneales (Hueza *et al.*, 2003). Entre algunos estudios biodirigidos realizados sobre algunas especies del género *Ipomoea* se encuentra la actividad mostrada *in vitro* contra *Mycobacterium tuberculosis* del extracto soluble orgánico de las partes aéreas de *Ipomoea leptophylla* (Barnes, 2003). Por otro lado, estudios con infusiones de *Ipomoea aquatica* demostraron que ejerce un efecto hipoglicémico (Sugandhika *et al.*, 2000).

Uno de los primeros estudios que mostró la relación entre los glicolípidos con su acción biológica es el efectuado en las partes aéreas de *I. leari* donde se aisló un glicósido denominado "Ipolearósido". Este glicolípido demostró poseer actividad anticancerígena (Sarin *et al.*, 1973). Otro ejemplo es el estudio de la actividad anticancerígena y antimicrobiana en *Staphylococcus aureus*, *Neurospora crassa* y *Streptococcus faecalis* de las resinas glicosídicas de *Ipomoea bahiensis* (Bieber *et al.*, 1986). Sin embargo, en los estudios más antiguos de esta clase de oligosacáridos, que datan del principio del siglo pasado hasta los primeros años de la década de los ochenta, no se logró determinar la estructura intacta de los glicolípidos responsables de tales efectos biológicos ya que la elucidación estructural dependía exclusivamente del estudio de los productos de hidrólisis básica o ácida de tales resinas (Wagner, 1973). El aislamiento y la caracterización estructural de los glicolípidos en su forma natural se inició a partir de la utilización de las técnicas analíticas de alta resolución, tanto para su purificación mediante la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) como para su elucidación estructural a través de los métodos espectrométricos (FAB-MS o SIMS-MS) (Costello, 1997; Baldwin, 1995, Wolfender *et al.*, 1992) y

espectroscópicos (RMN) (Agrawal, 1992; Agrawal y Pathak, 1996; Duus *et al.*, 2000).

Así, los primeros glicolípidos aislados y caracterizados íntegramente fueron aquellos que constituyen la serie de las orizabinas I-IV (figura 2) por el grupo de Noda y colaboradores (1987), quienes demostraron que los constituyentes de las resinas glicosídicas son liposacáridos cuya aglicona es el ácido jalapínico (11-OH-C₁₆) para la mayoría de los compuestos estudiados.



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

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

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

La naturaleza química anfipática y la complejidad estructural de las resinas glicosídicas ha constituido un obstáculo que ha dificultado durante mucho tiempo el aislamiento de sus constituyentes individuales y, por lo tanto, la caracterización de su estructura molecular. Entre los métodos comunes de separación que se han empleado para tratar de resolver las mezclas complejas de oligosacáridos que conforman las resinas de las convolvuláceas se cuenta con los procedimientos de partición líquido-líquido y las técnicas cromatográficas en capa fina y columna. De las particiones, en un principio sólo se obtuvieron dos categorías de resinas, la fracción poco polar y soluble en cloroformo o éter denominada “jalapina” y la insoluble en estos disolventes llamada “convolvulina”, de acuerdo a la clasificación de Mayer (Ono, 1989b). En el caso de la cromatografía en capa fina hay pocos reportes sobre el aislamiento de glicolípidos utilizando CCF de gel de sílice, ya que el uso exclusivo de esta técnica no es la más conveniente cuando se persigue la purificación de los constituyentes individuales de estas complejas mezclas.

En la actualidad, la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) ha permitido una separación y purificación exitosa de los glicolípidos individuales durante las últimas dos décadas. Precisamente, con el uso de una columna de fase normal y utilizando la técnica CLAE se logró la purificación de las cuatro primeras orizabinas. La caracterización estructural de estas cuatro resinas glicosídicas permitió retomar la hipótesis sustentada por Mannich y Schumann (1938) que propone una estructura polimérica para este tipo de compuestos (Figura 3) como se ha confirmado con el aislamiento de las batatinas del camote

(*Ipomoea batatas*), dímeros de pentasacáridos poliacilados (Escalante-Sánchez et al., 2006).

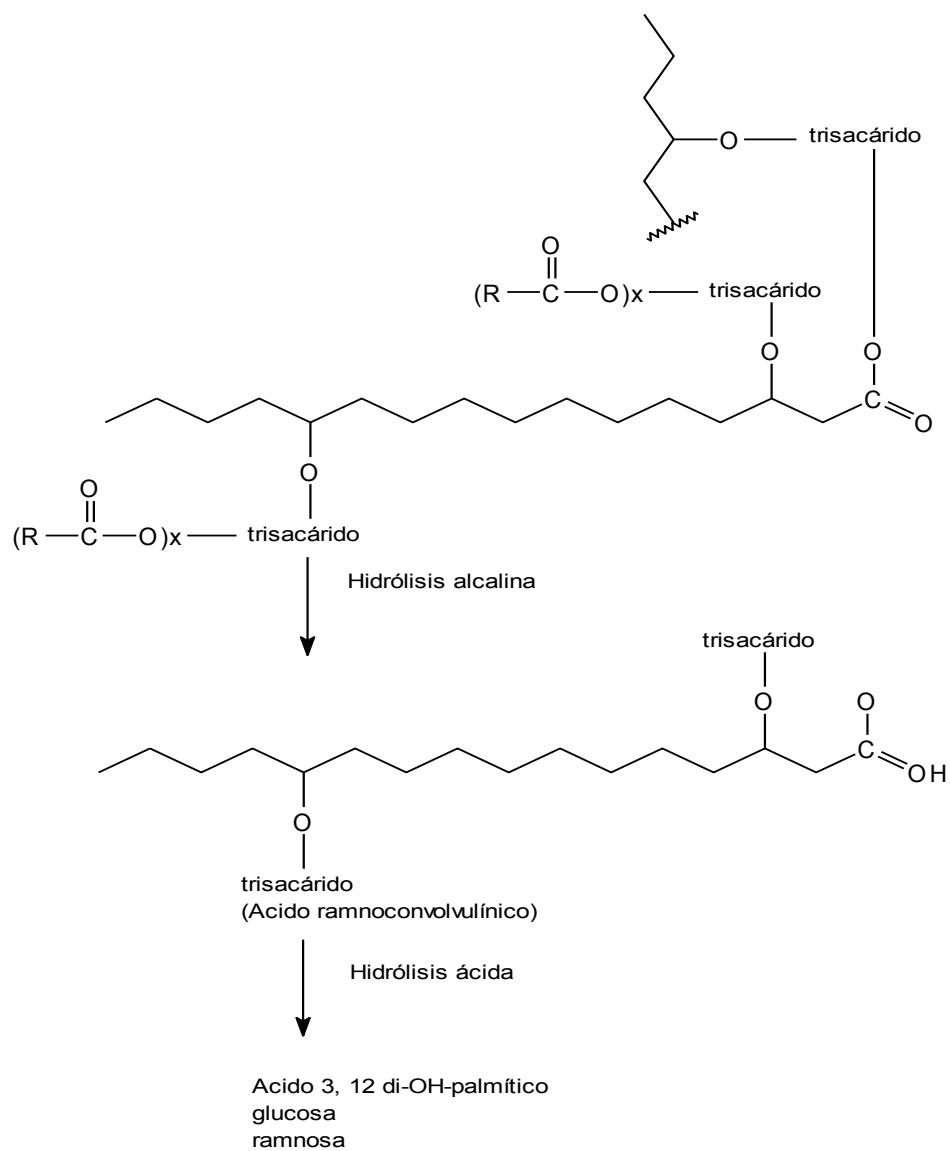


Figura 3. Estructura hipotética de las resinas glicosídicas de *Exogonium purga* Benth (*Ipomoea purga*) de acuerdo con Mannich y Schuman (1938).

2.2.1. Elucidación estructural

Actualmente, técnicas analíticas instrumentales, como la resonancia magnética nuclear, se utilizan para la elucidación estructural de las resinas glicosídicas y, por lo tanto, el establecimiento de sus estructuras ya no depende exclusivamente de métodos degradativos. Los principales enfoques utilizados para la caracterización estructural de estos complejos productos naturales incluyen la combinación de reacciones químicas de degradación y el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución. Estos enfoques se han aplicado de manera independiente y en forma exitosa en muy pocos trabajos (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

2.2.1.1. Métodos químicos de degradación

Los métodos de degradación básicamente consisten en la hidrólisis de la posible mezcla de polímeros mediante reacciones químicas simples como la saponificación para obtener moléculas manejables y disminuir la complejidad de las mezclas originales. Esta aproximación se desarrolló como un resultado de las dificultades encontradas en los intentos realizados para lograr el aislamiento de los constituyentes intactos de las resinas glicosídicas. A través de reacciones de saponificación del material crudo se liberan los ácidos grasos que esterifican al núcleo oligosacárido (ver cuadro 1). Esta reacción también rompe la unión de la lactona macrocíclica y los enlace tipo éster que formarían los polímeros (Bah y Pereda-Miranda, 1997) para así dar origen a una mezcla de ácidos glicosídicos que, en la mayoría de los casos, constituye un solo oligosacárido mayoritario. Los

ácidos grasos libres o en forma de sus correspondientes ésteres de metilo o etilo se analizan mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS). Posteriormente, se caracterizan a través de la comparación de sus tiempos de retención respectivos y los patrones de fragmentación del espectro de masas con aquellos registrados para muestras auténticas que se utilizan como controles de referencia. (Pereda-Miranda, *et al.*, 2006b)

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

Ácidos volátiles	Ácidos grasos hidroxilados	Azúcares
Ácido acético	7-OH-C ₁₀	D-glucosa
Ácido propiónico	11-OH-C ₁₄ (Ac. Convolvulínico)	L-ramnosa
Ácido isobutírico	11-OH-C ₁₆ (Ac. Jalapínico)	D-fucosa
Ácido α -metil- β -hidroxibutírico	3,12-di-OH-C ₁₆ (Ac. Operculónico)	D-quinovosa
Ácido α -metilbutírico	3-11-di-OH-C ₁₄ (Ac. Ipurónico)	D-xilosa
Ácido <i>n</i> -isovalérico	Tri-OH-C ₁₄ (Ac. Brasiliólico)	
Ácido tíglico		
Ácido cinámico		

La hidrólisis ácida del ácido glicosídico libera la aglicona correspondiente, describiéndose en la mayoría de los casos ácidos grasos hidroxilados de catorce o dieciséis carbonos, así como las unidades de monosacáridos que constituyen al núcleo oliosacárido. El análisis directo de impacto electrónico acoplado a espectrometría de masas (EI-MS) de la aglicona, o GC-EIMS de su éster metílico y/o derivados trimetilsililados permite la determinación del tamaño de la cadena (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002). Las unidades de azúcar se convierten a derivados volátiles mediante tratamiento con clorotrimetilsilano y entonces son analizados por CG-MS. La silación de los grupos hidróxilo seguido de la mercaptalación de grupos aldehídos ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{SH}/\text{F}_3\text{CCOOH}$) también se

recomienda para evitar la detección de dos (formas piranósidas isoméricas α y β) o tres picos (forma lineal) de cada unidad producidas por la anomerización normal de los azúcares durante la hidrólisis ácida (Pereda-Miranda, 1994). Otro método para detectar los monosacáridos liberados es mediante CLAE, utilizando una columna de fase reversa para el análisis de carbohidratos (Blanken *et al.*, 1985; Boesrma *et al.*, 1981; Chaplian y Kennedy, 1986; Nikolov *et al.*, 1985; Yang *et al.*, 1981).

También es imprescindible establecer el número y la posición relativa de las uniones glicosídicas. La permetilación de los ácidos glicosídicos seguida por la hidrólisis ácida de los derivados permetilados, y completado con la reducción de la piranosa y la acetilación es el enfoque químico que se utiliza (MacLeod, *et al.*, 1997) El proceso de reducción conduce a la abertura de las formas piranosas existentes generando hidroxilación en las posiciones de los C-1 y C-5. Los grupos acilo en las otras posiciones diferentes al C-5 indican uniones glicosídicas con otras unidades de azúcar, pero no la posición exacta de cada uno en particular dentro del núcleo oligosacárido.

2.2.1.2. Métodos espectroscópicos

La elucidación estructural completa de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas se logra fácilmente mediante el uso combinado de la espectrometría de masas de alta resolución y la espectroscopía de resonancia magnética nuclear. El análisis estructural de las resinas glicosídicas inicia con el registro de FAB-MS de los ácidos glicosídicos que proporciona información

relacionada con la secuencia de glicosidación, aunque este método no distingue la naturaleza de los azúcares, ya que puede ser una de las posibles formas isoméricas de las metilpentosas (fucosa, quinovosa y ramnosa) o algunas de las hexosas (glucosa, galactosa y manosa). Esta técnica no proporciona el sitio exacto de glicosilación o de acilación de la unidad sacárida.

La identificación de los elementos estructurales de los carbohidratos constitutivos del núcleo oligosacárido se obtiene del registro del espectro de ^1H en piridina- d_5 , en el cual la región de desplazamientos químicos alrededor de 4.4-5.5 correspondiente a los protones anoméricos permite hacer una estimación del número de residuos monosacáridos diferentes (Duus *et al.*, 2000; Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Técnicas homonucleares de resonancia magnética nuclear en dos dimensiones como DQF-COSY y TOCSY permiten la asignación de los valores de desplazamiento químico para todos los protones dentro de cada unidad monosacárida, permitiendo la identificación de la naturaleza de cada una de ellas. Experimentos en dos dimensiones más sensibles de acoplamiento ^{13}C - ^1H , utilizando las técnicas HSQC o HMQC, permiten la asignación de los carbonos. Finalmente, las conectividades interglicosídicas se establecen con las correlaciones heteronucleares a larga distancia mediante estudios de HMBC ($^{2,3}J_{\text{CH}}$) (Duus *et al.*, 2000; Pereda-Miranda y Bah, 2003).

2.3. Diversidad estructural

2.3.1. Lipopentasacáridos y ácidos glicosídicos de la familia Convolvulaceae

En la literatura se describen una gran cantidad y variedad de núcleos pentasacáridos presentes en diversas especies de convolvuláceas. En *Ipomoea operculata*, los ácidos operculínicos A, B, D y G (figura. 4), ácidos glicosídicos pentasacáridos, fueron aislados mediante la hidrólisis alcalina de la resina glicosídica soluble en éter. Sin embargo, en un estudio previo de *Ipomoea operculata*, los ácidos operculínicos A y B fueron generados como productos de la hidrólisis básica de las operculinas I-V, VII-X y XIII-XVIII (Ono, *et al.*, 1989a; 1989b, 1990b; 1990c, 1991; 1992a); además, esta metodología permitió la caracterización de los residuos acilantes del núcleo oligosacárido como los ácidos acético, tíglico, *n*-valérico, isovalérico, verifcar propiónico y (2*S*)-2-metilbutírico. Del mismo modo, el ácido operculínico A se describió en las estoloniferinas IV-VII (Noda *et al.*, 1994a) de la especie *Ipomoea stolonifera* y en las cuamoclinas I-IV de la especie *Quamoclit pennata* (Ono *et al.*, 1992b).

Los ácidos simónicos A y B (figura 5) están presentes en las simoninas II y III-V respectivamente, todas ellas obtenidas a partir de la fracción de la jalapina extraída de la raíz de *Ipomoea batatas* (Noda *et al.*, 1992a), cuya saponificación también generó restos de ácido (2*S*)-2-metilbutírico, *n*-octanoico, y *n*-decanoico. El ácido simónico B también se encuentra como uno de los núcleos oligosacáridos constitutivos de las estoloniferinas I-III de *Ipomoea stolonifera* (Noda *et al.*, 1994a). Los ácidos grasos liberados en la saponificación de las estoloniferinas fueron (2*S*)-2-metilbutanoico, isobutanoico, *n*-hexanoico, *n*-octanoico y *n*-decanoico.

La diversidad estructural de los glicolípidos en las diferentes especies de convolvuláceas hace que no sea posible establecer una correlación de tipo

quimiosistemático. Sin embargo, al analizar los núcleos oligosacáridos mayoritarios en cada planta, se puede concluir que el ácido operculínico A caracteriza a *Ipomoea operculata* y a las especies del género *Merremia*, e.g., *Merremia hungaiensis* (Noda *et al.*, 1994b) y *Merremia mammosa* (Kitakawa *et al.*, 1989).

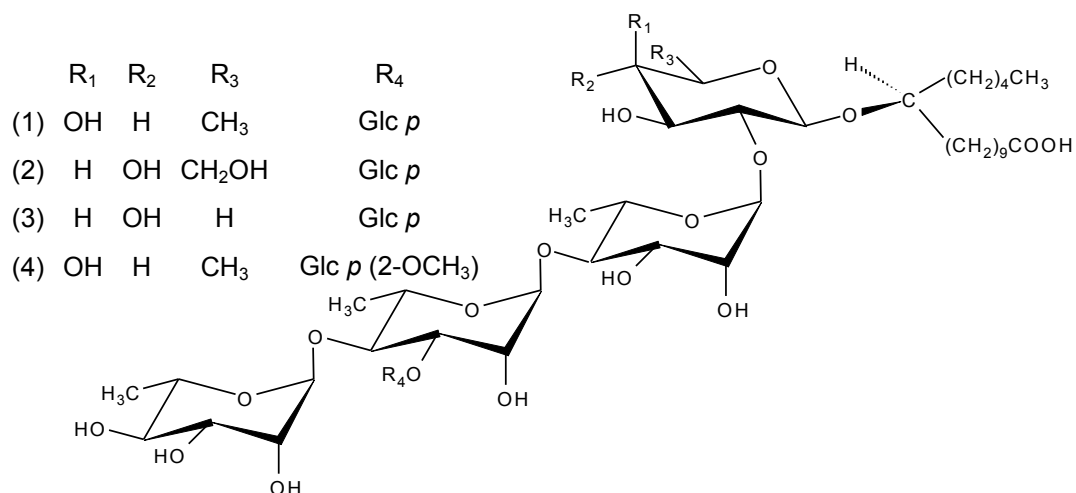


Figura 4. Estructuras de los ácidos operculínicos A (1), B (2), D (3) y G (4)

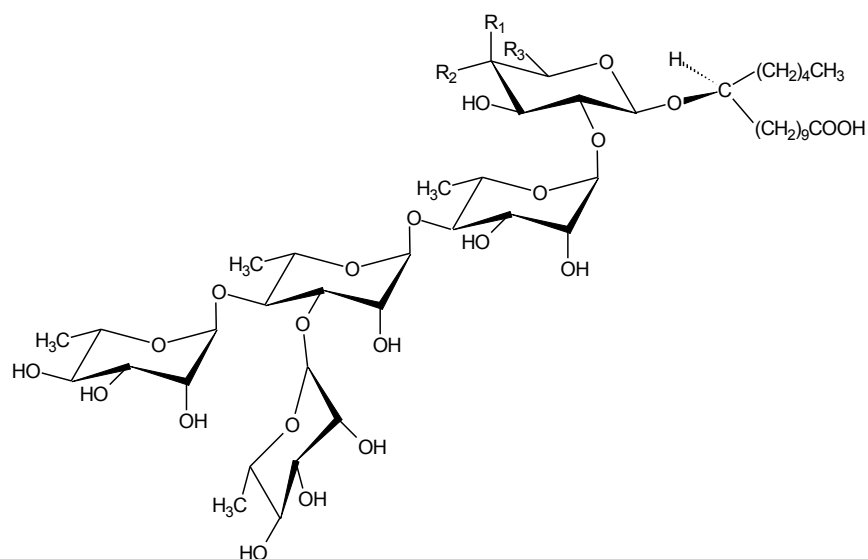


Figura 5. Estructuras de los ácidos simónicos A ($R_1=H$, $R_2=OH$, $R_3=CH_2OH$) y B ($R_1=OH$, $R_2=H$, $R_3=CH_3$).

La saponificación de las tuguajalpinas I-X, resinas glicosídicas obtenidas de la jalapina extraída de la raíz de *Merremia hungaiensis*, generó al ácido operculínico A y como restos de acilación a ácidos grasos saturados de cadena larga que no habían sido descritos con anterioridad en ninguna especie de la familia convolvulaceae como los ácidos palmítico, esteárico y araquidónico (Noda *et al.*, 1994b).

2.3.1.1. Resinas glicosídicas de *Merremia mammosa*

Los tubérculos de *Merremia mammosa* se han estudiado desde 1988 por el grupo de Kitawaga, logrando hasta este momento la caracterización química de trece resinas glicosídicas (**merremósidos: a, b, c, d, e, f, g, h₁, h₂ y mamósidos A, B, H₁ y H₂**) obtenidas a partir del extracto clorofórmico del tubérculo fresco (Kitagawa, 1988; 1989; 1996a; 1996b, 1997). Las primeras publicaciones de este grupo describieron la interesante actividad ionofórica de los compuestos presentes en estas resinas y, recientemente, la existencia de otras cuatro resinas, los mamósidos A, B, H₁ y H₂ (Kitagawa *et al.*, 1997).

Sin embargo, la elucidación estructural de estos compuestos se efectuó recientemente (Kitakawa *et al.*, 1997), a partir de lo cual se elucidó un núcleo pentasacárido novedoso presente en los merremósidos f, g (figura 6), h₁ y h₂ (figura 7) mientras que los mamósidos H₁ y H₂ (figura 8) poseen el núcleo pentasacárido ya conocido que es el ácido operculínico A. Las técnicas de análisis principales que fueron aplicadas para la elucidación estructural de los glicolípidos incluyeron la espectrometría de masas FAB, su variante SIMS, el

análisis de los productos de degradación mediante CG-MS y la síntesis de uno de los ácidos glicosídicos (mamósido I) a partir del (11S)-jalipinolato de metilo. La secuencia de glicosidación en los compuestos se estableció a través de la metilación del ácido glicosídico respectivo seguida de la metanólisis para formar los monosacáridos metilados en las posiciones hidroxílicas libres. Es importante mencionar que aún cuando en la actualidad existe metodología en la RMN para lograr la elucidación estructural de estos glicolípidos, esta investigación se basó exclusivamente en los métodos degradativos tradicionales y de síntesis.

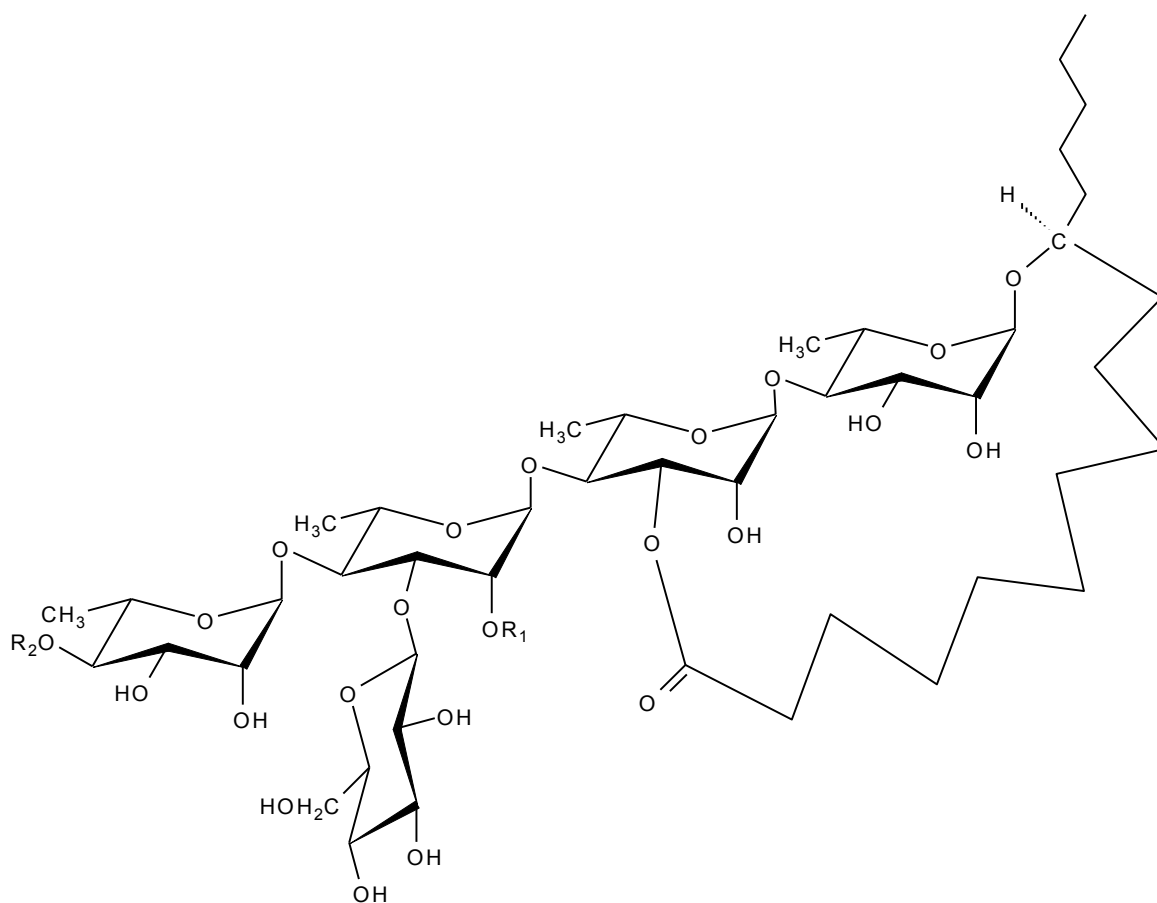


Figura 6. Estructuras de los merremósidos f ($R_1 = (2S)$ -2- metilbutanoilo, $R_2 =$ isobutanoilo) y g ($R_1 = R_2 =$ isobutanoilo).

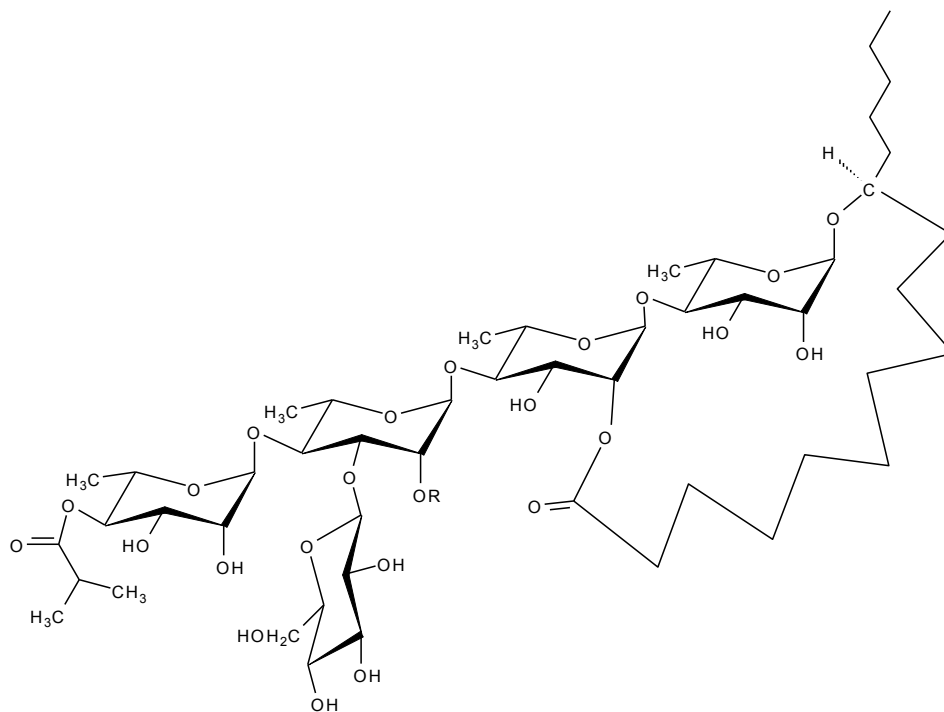


Figura 7. Estructura de los merremósidos h_1 ($R=$ 2-metilbutanoilo) y h_2 ($R=$ isobutanoilo)

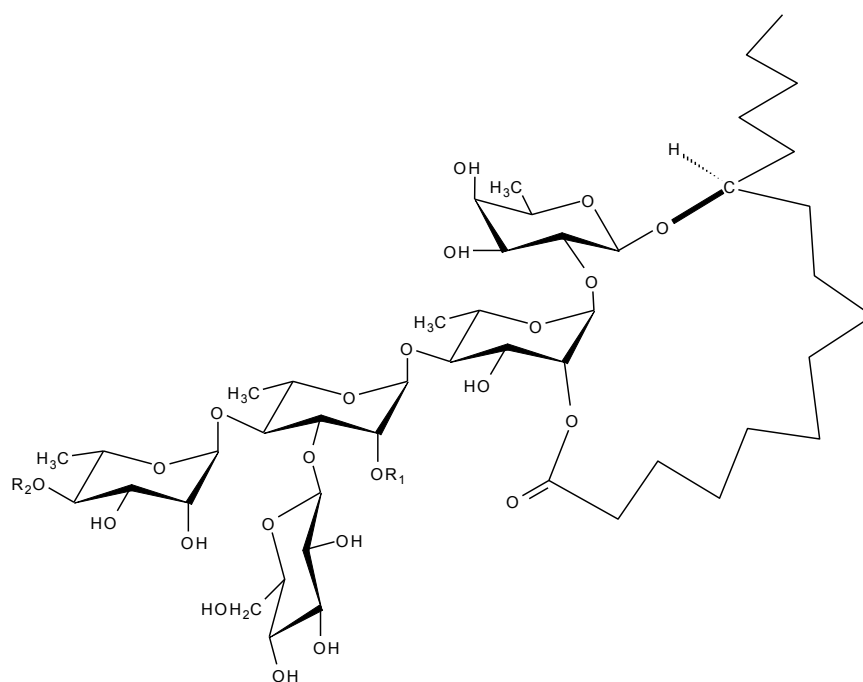


Figura 8. Estructura de los mamósidos H_1 ($R_1=$ (2S)-2-metilbutanoilo, $R_2=$ isobutanoilo) y Mamósido H_2 ($R_1= R_2=$ isobutanoilo)

2.3.1.2. Resinas glicosídicas de *Quamoclit multifida*

De la jalapina de las semillas de *Quamoclit multifida*, planta de ornato que es un híbrido de *Quamoclit pennata* (*Ipomoea quamoclit*) y *Q. Coccinea* (*Ipomoea hederifolia*), se obtuvieron las **multifidinas I y II** (figura 10) junto con las **quamoclinas I-IV** previamente aisladas de *Quamoclit pennata* (figura 9) (Ono *et al.*, 1992b). Las quamoclinas I y IV presentaron como núcleo oligosacárido al ácido operculínico A y las quamoclinas II y III al ácido quamoclínico A (figura 9). En el caso de la estructura de la quamoclina II difiere de la III en la presencia del ácido *n*-dodecanoico como residuo acilante. A partir de estos oligosacáridos se obtuvieron los productos de degradación básica, entre los que se identificaron los ácidos: ácido 2-metilbutírico, *n*-decanoico y *n*-dodecanoico, así como los ácidos glicosídicos quamoclínico A, un glicósido del ácido convolvulinólico (Noda *et al.*, 1994b; Ono *et al.*, 1992b), y operculínico A (Ono *et al.*, 1989b; Ono *et al.*, 1992a).

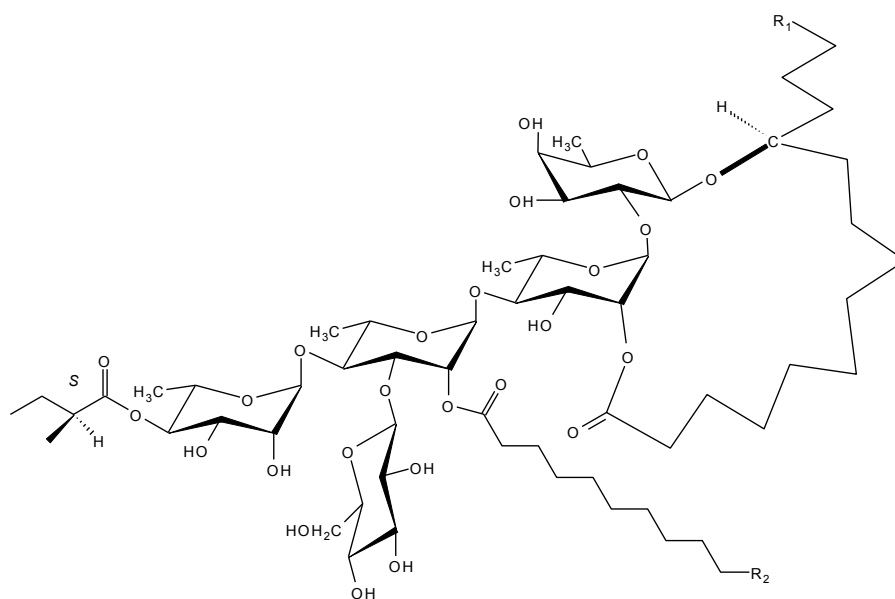


Figura 9. Estructuras de las quamoclinas I ($R_1=H$, $R_2=C_2H_5$), III ($R_1=R_2=H$) y IV ($R_1=R_2=C_2H_5$).

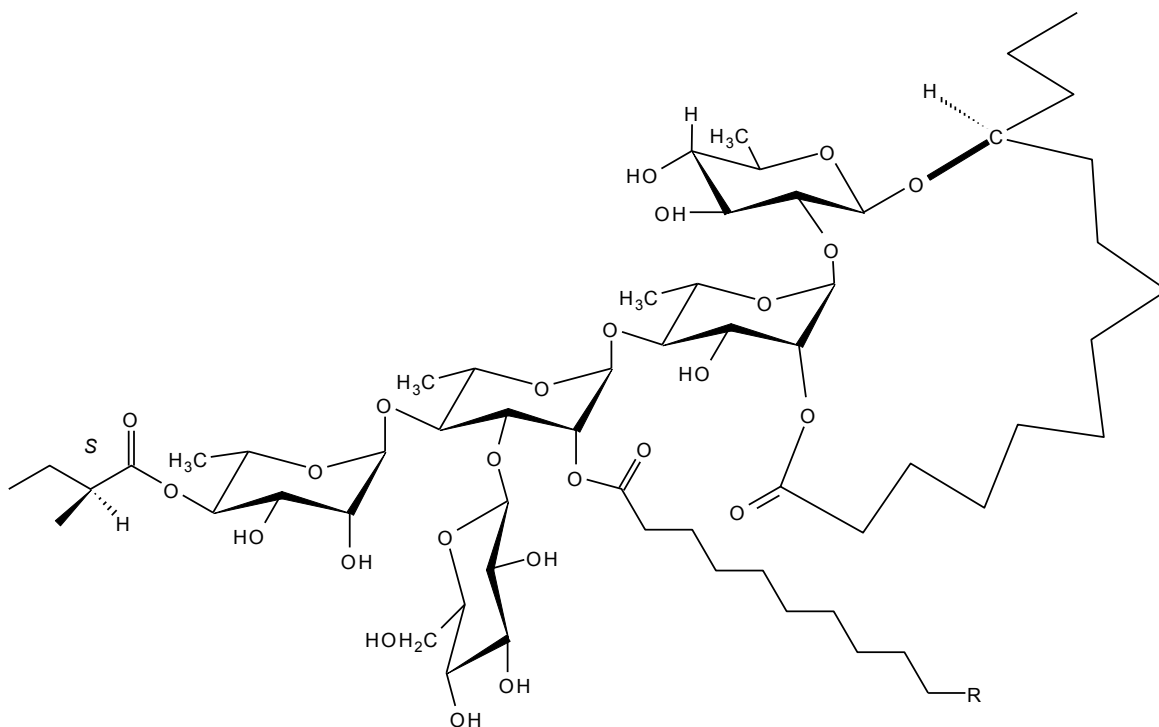


Figura 10. Estructura de las multifidinas I (R=H) y II (R=C₂H₅)

2.3.1.3. Resina glicosídica de *Convolvulus microphyllus*

Hildebert Wagner y Gerald Schwarting describieron en 1997 la estructura de un nuevo pentasacárido (figura 11) obtenido a partir de la saponificación de la jalapina de *Convolvulus microphyllus* por medio de la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de los azúcares derivados de la hidrólisis ácida del glicósido (Wagner y Schwarting, 1997).

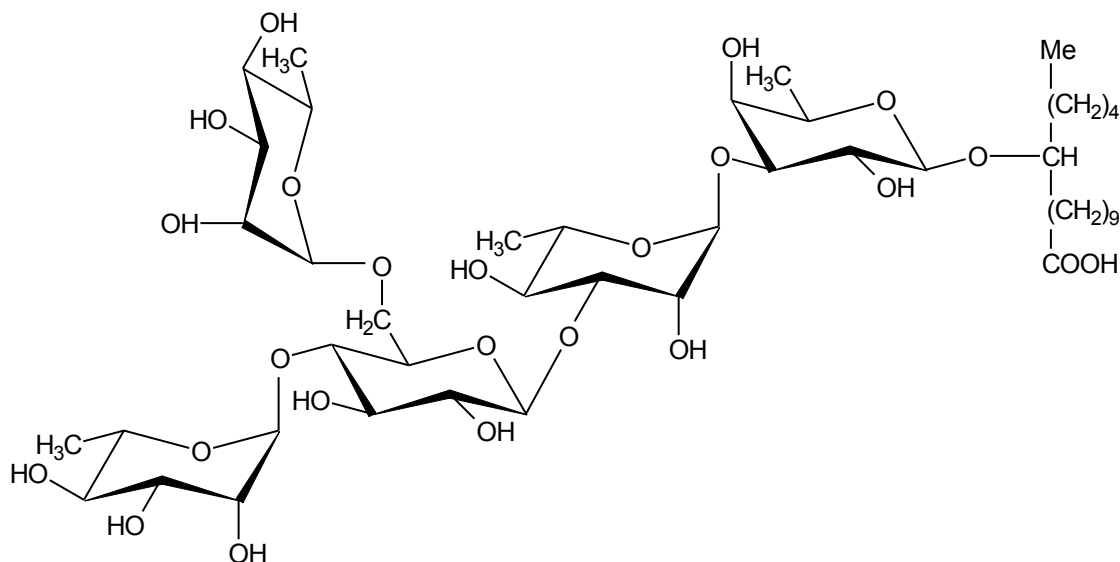


Figura 11 Estructura del ácido microfílico

2.3.1.4. Resinas glicosídicas de *Ipomoea tuberosa*

Dos nuevas resinas glicosídicas llamadas **woodrosinas I y II** fueron aisladas de la fase insoluble en éter (convolvulina) extraída de los tallos de *Ipomoea tuberosa* L. (figura 12) La hidrólisis alcalina de ambas woodrosinas proporcionó ácido (2S)-2-metilbutanóico y el glicósido pentasacárido nombrado como ácido woodrosinico A (figura 13). La hidrólisis ácida de este último resultó en una mezcla del ácido jalapinólico y de los azúcares monosacáridos ramnosa y glucosa. Las estructuras de los glicolípidos individuales se determinaron a partir de datos químicos y espectroscópicos como la espectroscopía de RMN y espectrometría de masas (Ono *et al.*, 1993b).

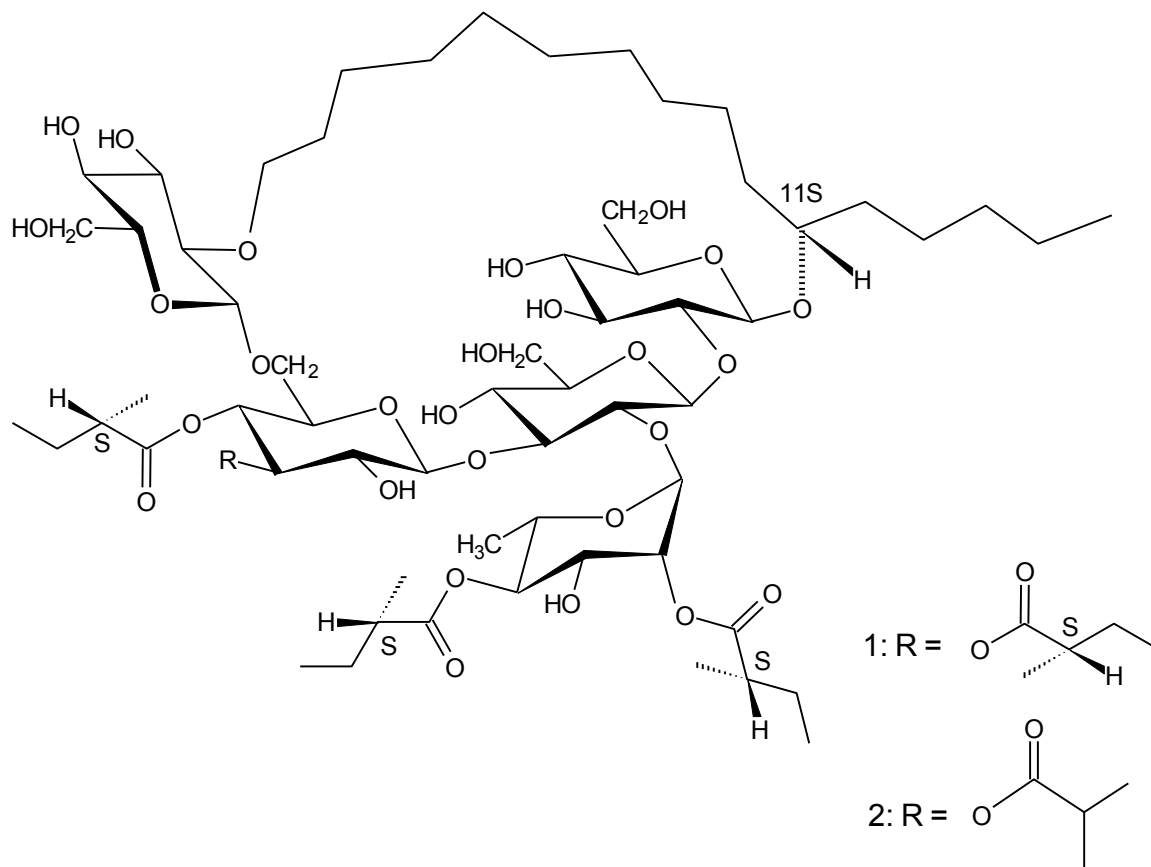


Figura 12. Estructura de las woodrosinas I (1) y II (2)

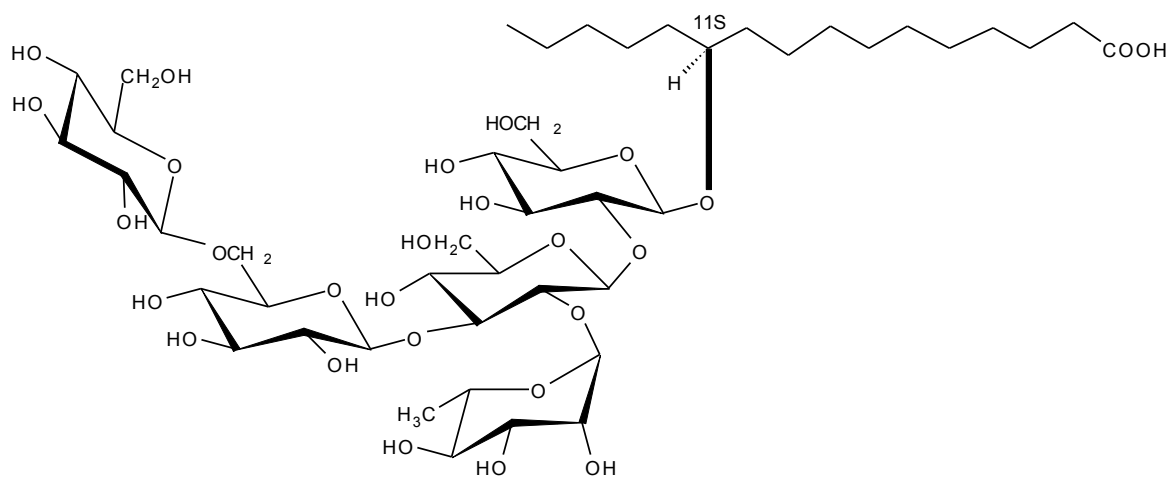


Figura 13. Estructura del ácido woodrosínico A

2.3.1.5. Resinas glicosídicas de *Pharbitis nil*

Las semillas de *Pharbitis nil* constituyen un remedio herbolario con un efecto purgante y sus resinas glicosídicas representan un ejemplo típico de una “convolvulina” de acuerdo a la clasificación de Mayer, i.e., porción polar de la resina insoluble en éter (Ono *et al.*, 1989b). La hidrólisis alcalina de esta fracción proporcionó tres ácidos orgánicos; (2*S*)-2-metilbutanoico, (2*R*, 3*R*) nílico y tíglico. También, se obtuvo un nuevo glicósido nombrado como ácido farbítico B, junto con los dos ya conocidos, los ácidos farbíticos C (figura 14) y D. El ácido C es un núcleo pentasacárido, en tanto que el B y el D presentan un núcleo hexasacárido (Ono *et al.*, 1990b).

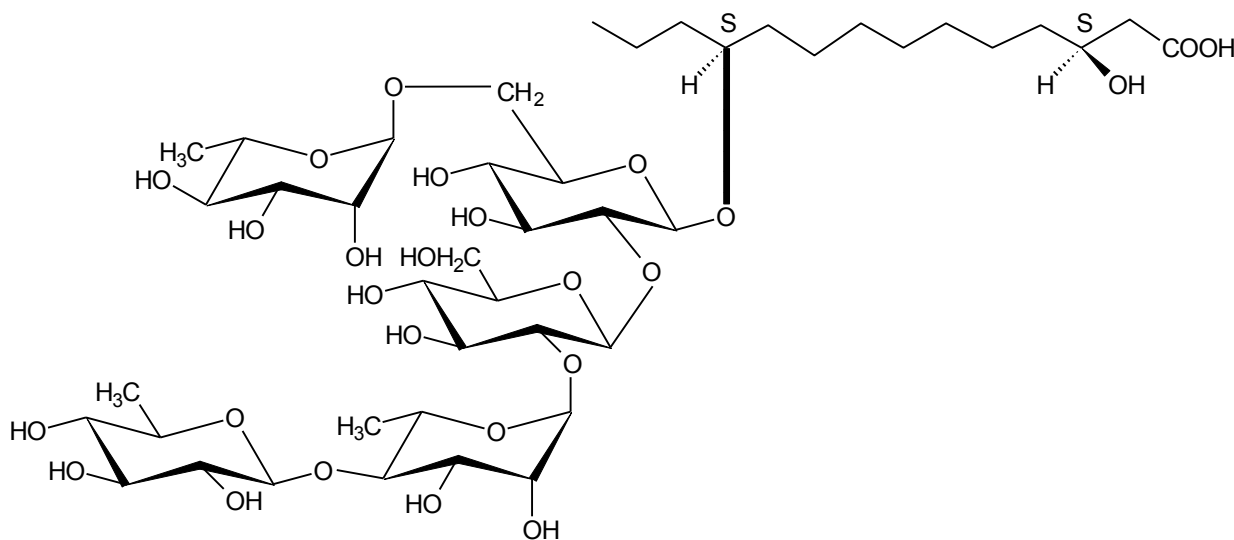


Figura 14. Estructura del ácido farbítico C

2.3.1.6. Resinas glicosídicas de *Ipomoea batatas*

Las raíces de *Ipomoea batatas* se utilizan como alimento y como parte de la medicina tradicional de numerosos países. En 1974, se describió que las raíces y hojas de esta planta fueron efectivas contra la leucemia, la anemia, la hipertensión, la diabetes y las hemorragias. Por lo que fueron estudiadas las raíces de esta planta y se aisló de la parte soluble en éter (jalapina) cinco resinas glicosídicas, nombradas como las **simoninas I-V** (figura 15), sus estructuras fueron obtenidas a partir de reacciones químicas degradativas y datos espectroscópicos. Cabe señalar que la simonina I fue el primer ejemplo de una resina glicosídica sustituida con un ácido aromático, el ácido cinámico (Noda *et al.*, 1992a).

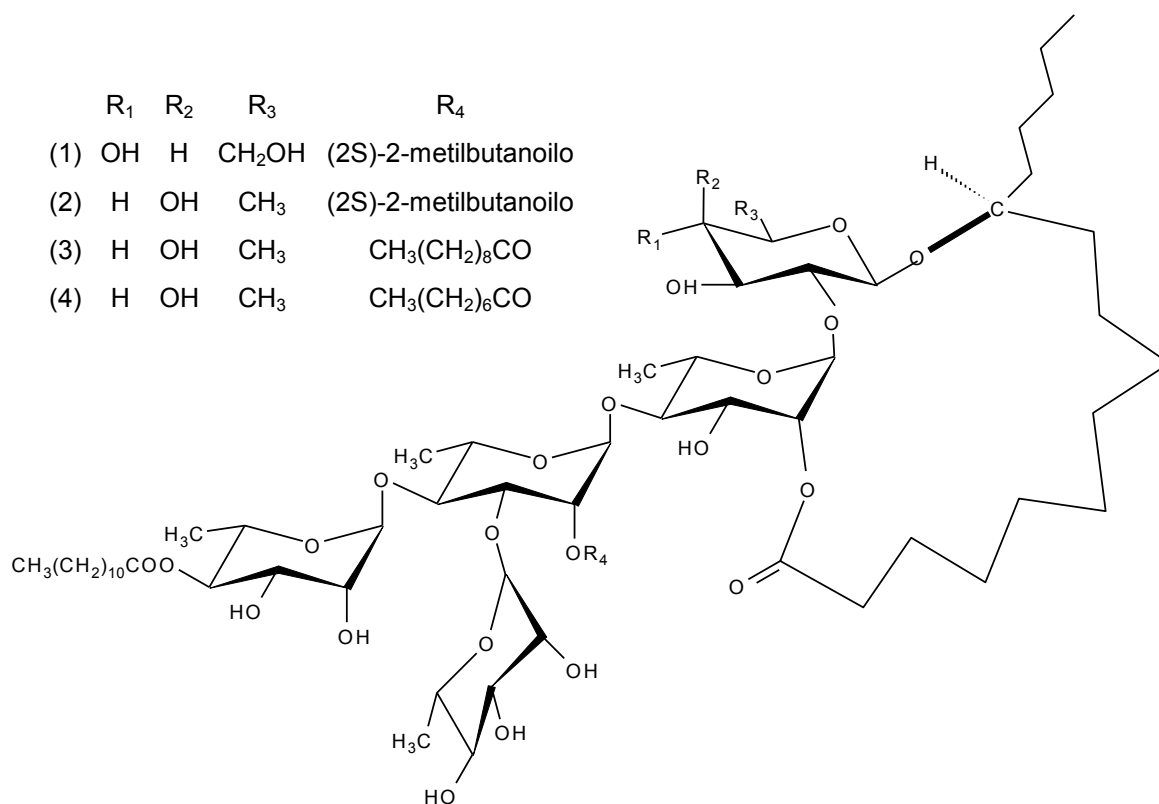


Figura 15. Estructuras de las simoninas II-V (1-4).

2.3.1.7. Resinas glicosídicas de *Ipomoea stolonifera*

De la planta rastrera *Ipomoea stolonifera*, una enredadera que crece en las dunas costeras, fueron aislados diez pentasacáridos, nombrados como las **estoloniferinas** (figura 16 y 17); así como 2 tetrasacáridos, nombrados como las estoloniferina XI y XII. La hidrólisis alcalina de los tetrasacáridos proporcionó al ácido operculínico C (Noda *et al.*, 1994a. 1998).

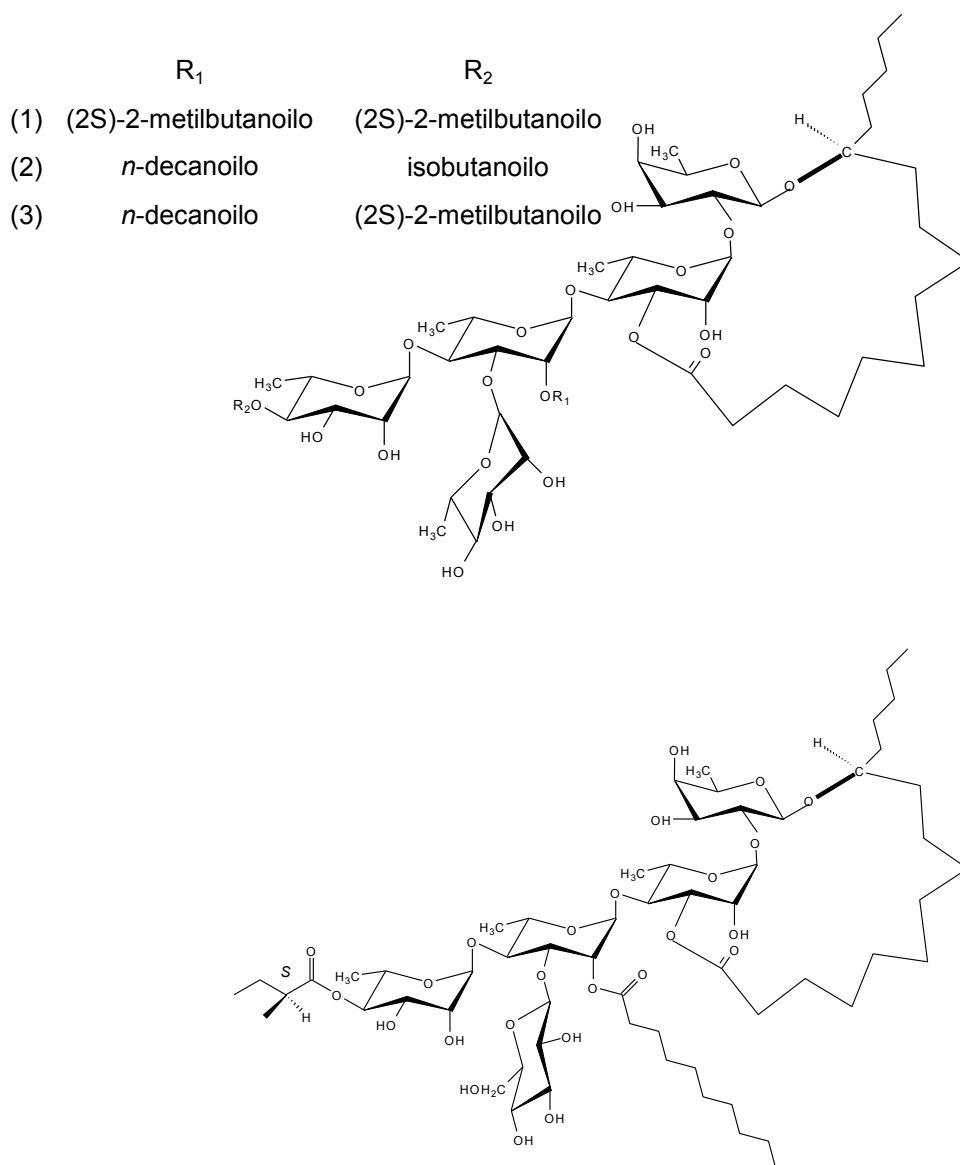


Figura 16. Estructuras de las estoloniferinas I-III (1-3) y IV

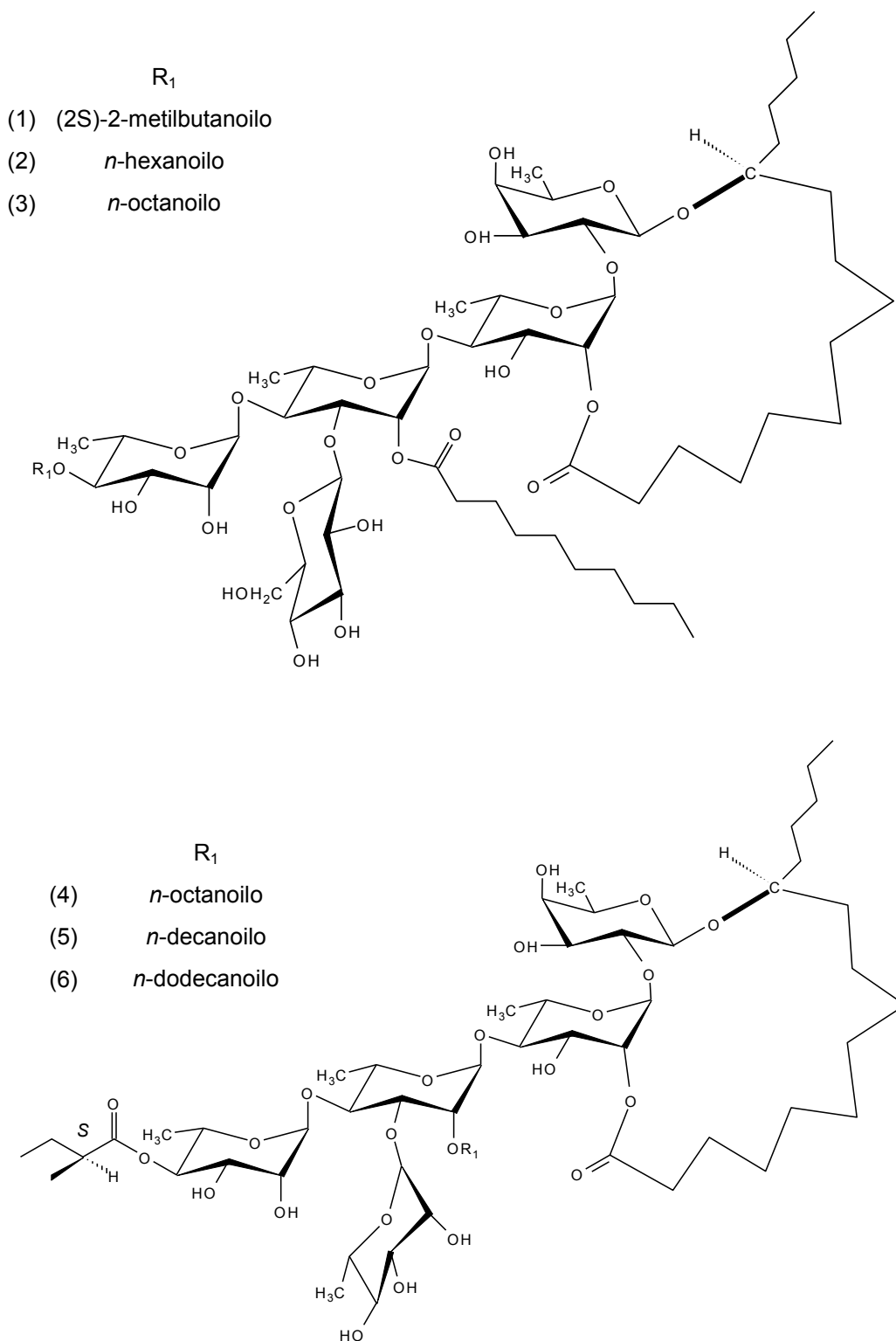


Figura 17. Estructuras de las estoloniferinas V (1); VI (2), VII (3), VIII (4), IX (5) y X (6)

2.3.1.8. Resinas glicosídicas de *Ipomoea leptophylla*

El extracto soluble orgánico de las hojas de la planta *Ipomoea leptophylla* nativa del norte de América mostró actividad *in vitro* contra *M. tuberculosis*. El fraccionamiento biodirigido del extracto metanólico-clorofórmico resultó en el aislamiento e identificación de dos nuevas resinas glicosídicas, llamadas **leptofilina A y B** (figura 18). La hidrólisis básica de estos glicósidos permitió la generación del ácido operculínico A como el ácido glicosídico, así como la liberación de los residuos acilantes que correspondieron a los ácidos cinámico, propanoico y laúrico. La elucidación de las estructuras completas se logró a través de derivatizaciones, espectroscopía unidimensional y bidimensional (TOCSY, ROESY, HSQC HMBC) y experimentos de espectrometría de masas (Barnes *et al.*, 2003).

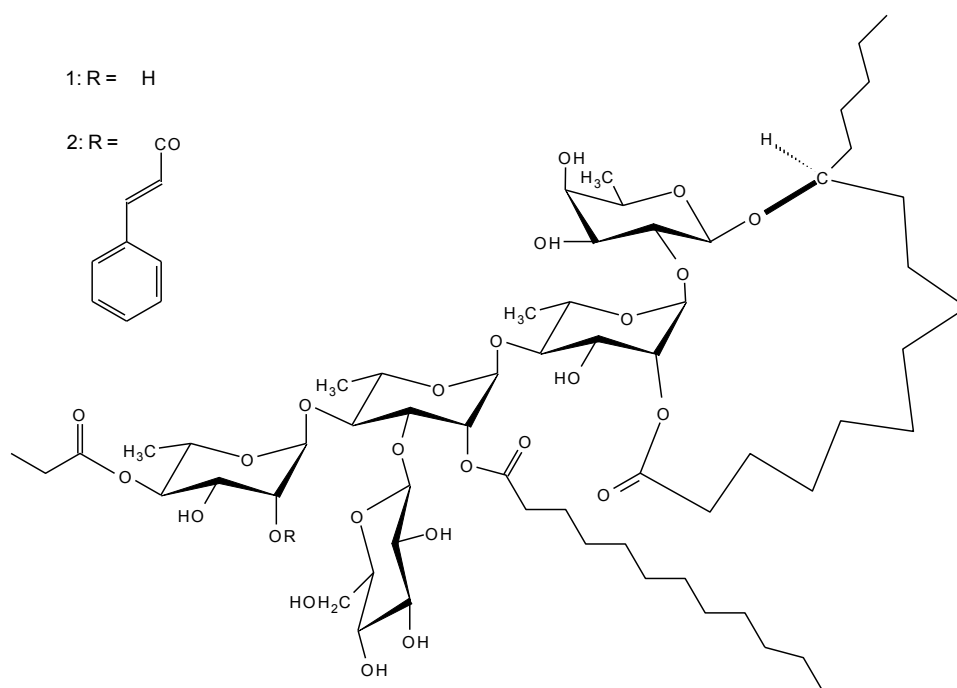


Figura 18. Estructuras de las leptofilinas A (1) y B (2)

2.3.1.9. Resinas glicosídicas de *Ipomoea murucoides*

Ipomoea murucoides es un árbol de flores blancas que crece en el sureste y centro de México. Esta especie es conocida en varios estados de México como “cazahuate”. Algunas comunidades usan el humo de los árboles quemados como repelente contra mosquitos. Infusiones acuosas de las hojas, corteza y flores son utilizadas como un antiinflamatorio y contra picaduras de alacranes. Pérez Amador y colaboradores (1992) ya había detectado la presencia de resinas glicosídicas en las semillas y hojas. Estudios del contenido de las resinas glicosídicas presentes en las raíces dieron como resultado el aislamiento y la caracterización de cinco pentasacáridos del ácido jalapínico, llamados **muricinas I – 5** (figura 19) (León *et al.*, 2005).

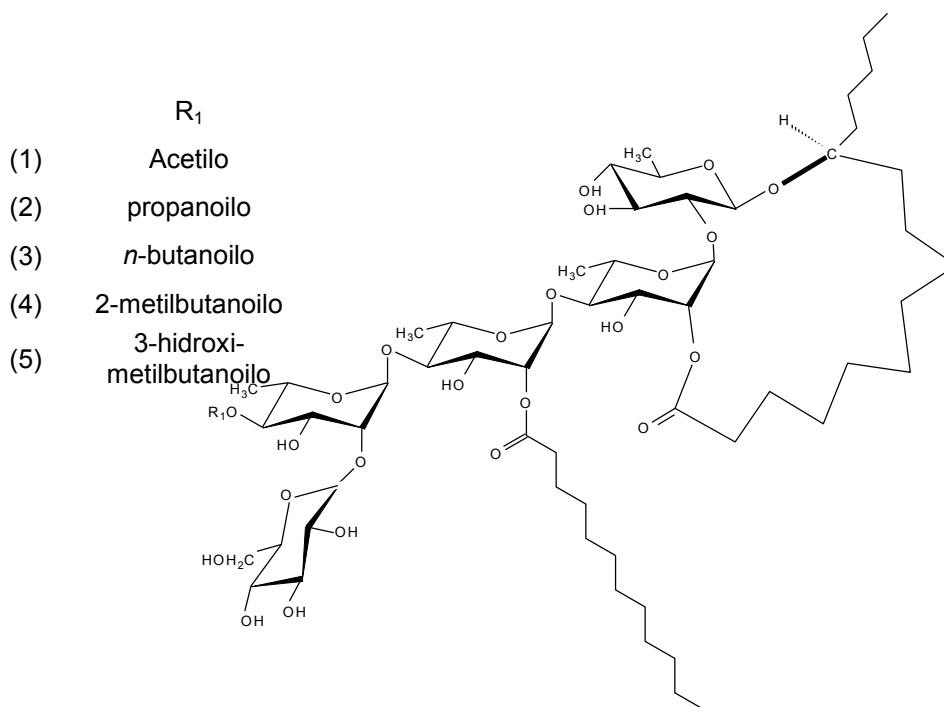


Figura 19. Estructuras de las murucinas 1-5

El estudio del extracto clorofórmico de las flores del cacahuate de morelos (*Ipomoea murucoides*) a través de cromatografía líquida de alta eficacia proporcionó las **murucoidinas I-V** (figuras 20 y 21), pentasacáridos del ácido jalapínico. La saponificación del extracto proporcionó dos ácidos glicosídicos ya conocidos, los ácidos simónico B y el ácido operculínico A, sus residuos de esterificación estuvieron compuestos por ácidos grasos de cadena corta, como el ácido 2-metilpropanoico y el ácido (2S)-metilbutírico. Todos los compuestos fueron caracterizados a través de espectroscopía de resonancia magnética nuclear (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006).

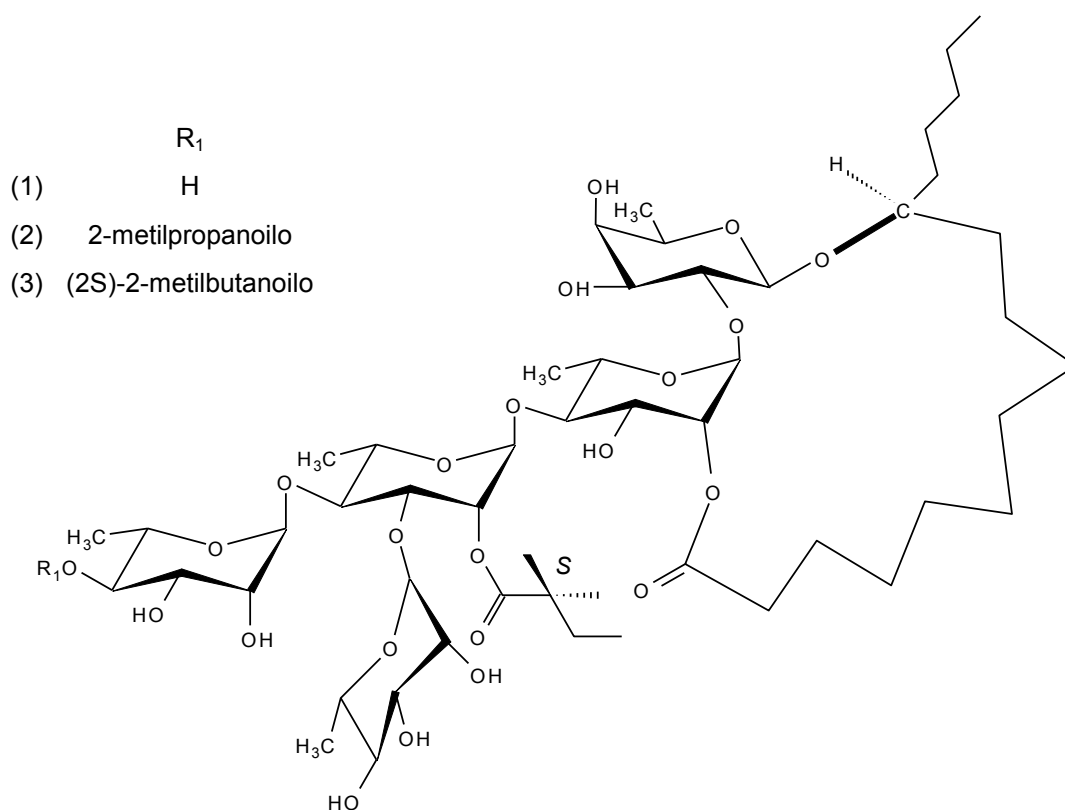


Figura 20. Estructuras de las murucoidina I-III (1-3)



Figura 21. Estructura de la murucoidina IV (arriba) y V (abajo)

2.3.1.10. Resinas glicosídicas de *Ipomoea arborescens*

Ipomoea arborescens es un árbol que florece y fructifica entre noviembre y abril. Algunas comunidades del sur de México usan infusiones acuosas de la corteza junto con otras hierbas para prevenir la caída del cabello así como para el tratamiento del dolor de estomago de la misma forma que todas las especies de cacahuates, e.g., *Ipomoea murucoides*, *Ipomoea intrapilosa* e *Ipomoea wolcottiana* (Bah et al., 2007). En un estudio reciente se aislaron y caracterizaron diez pentasacáridos del ácido jalapínico, llamados **arborescinas 1–6** y **murucinas 6–9** (figura 22) (León et al., 2006).

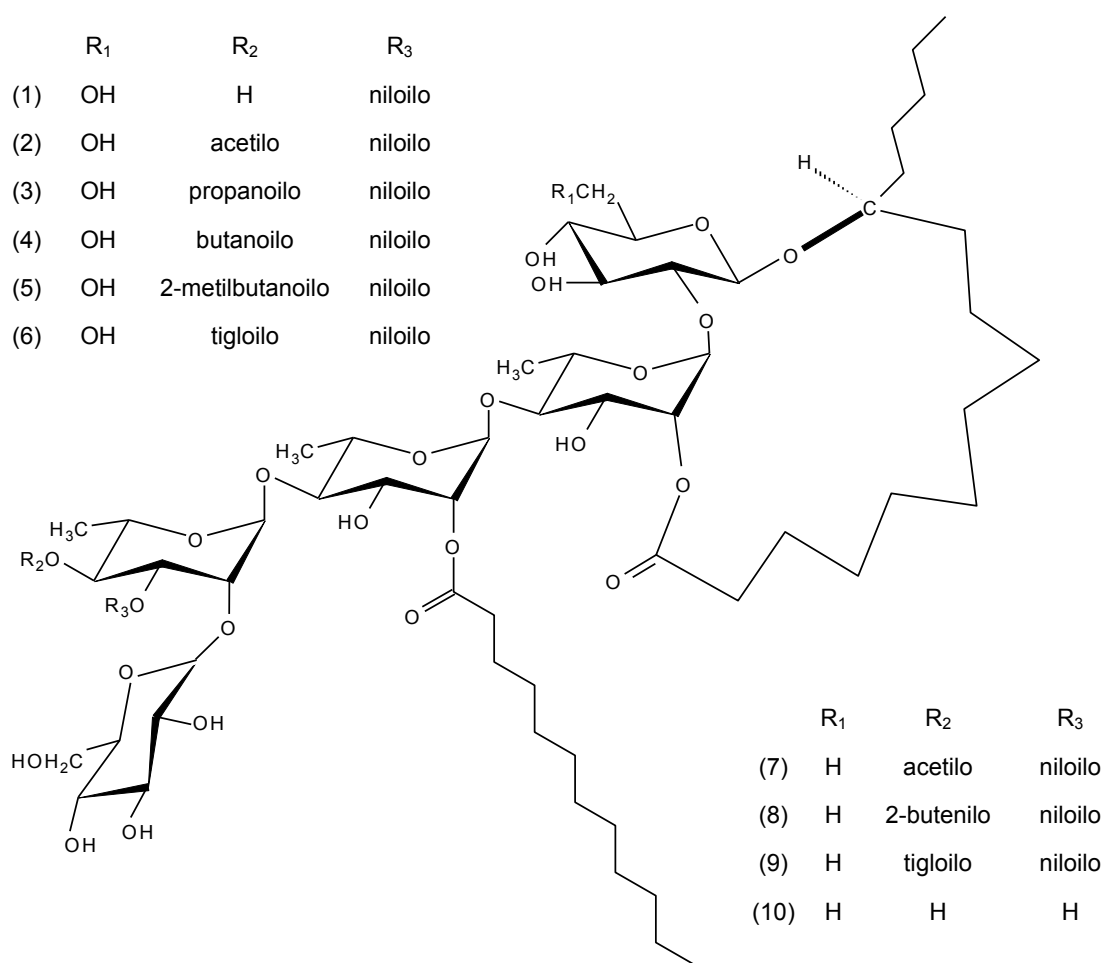


Figura 22. Estructuras de las arborescinas 1-6 y las murucinas 6-9 (7-10)

2.3.2. Ácidos glicosídicos tetrasacáridos de la familia Convolvulaceae

Las resinas glicosídicas tetrasacáridas de igual manera presentan una enorme variedad en sus núcleos oligosacáridos. Por ejemplo, del extracto soluble en éter de las raíces de *Ipomoea operculata*, además de los núcleos glicosídicos pentasacáridos, presenta núcleos glicosídicos de cuatro monosacáridos, llamados ácidos **operculínicos C** (operculinas VI, XI y XII), **E** y **F** (figura 23) (Ono *et al.*, 1989b, 1990a, 1992a). Es importante mencionar que aunque las simoninas pertenecen a la especie *Ipomoea batatas*, la hidrólisis alcalina de esta resina proporciona al ácido glicosídico C junto con el ácido cinámico (Noda *et al.*, 1992a).

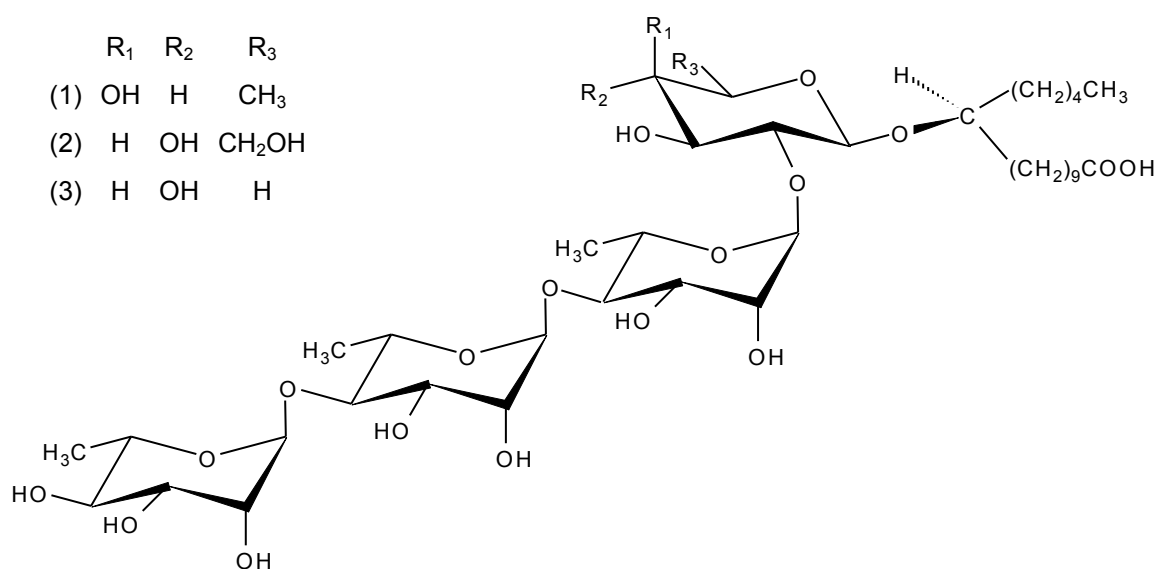


Figura 23. Estructuras de los ácidos operculínicos C (1), E (2) y F (3)

En la especie *Merremia mamosa* además de estar presente el ácido operculínico A, también se encuentran los ácidos glicosídicos designados como **meremósido i** (figura 24) presente en los merremósidos y **mammósido I**, donde

la estructura de este ácido glicosídico es idéntica al ácido operculinico C (figura 23), estando presente en los mammósidos A y B (Kitagawa *et al.*, 1996b, 1997).

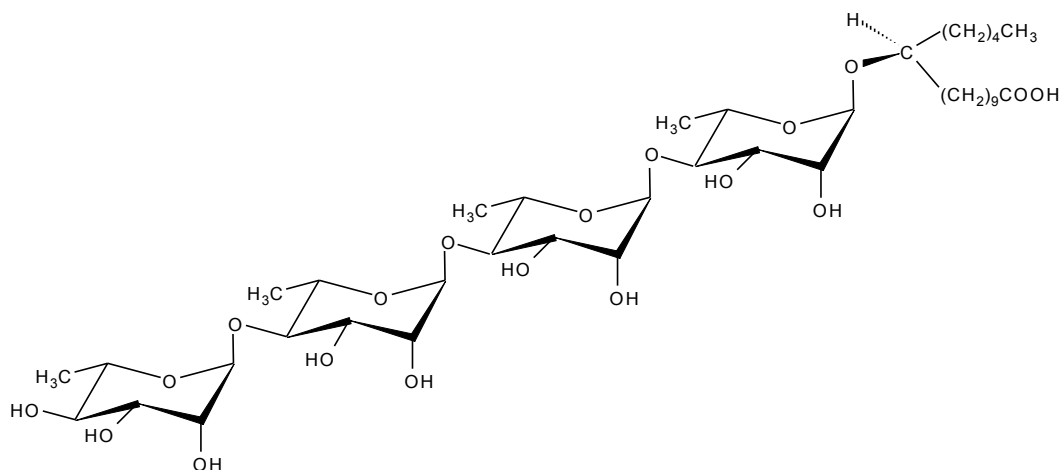


Figura 24. Estructura del merremósido i

De las raíces de *convolvulus scammonia* se aisló el **ácido escamónico A** (figura 25) (Noda *et al.*, 1990). En el caso de la especie mexicana *Ipomoea orizabensis* (orizabinas V-XXI) e *Ipomoea stans* que se encuentran agrupadas taxonómicamente en la misma serie *Tyrianthinae*, sus núcleos oligosacáridos principales también correspondieron al ácido escamónico A (Enríquez *et al.*, 1992; Hernández-Carlos y Pereda-Miranda, 1990; Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2000).

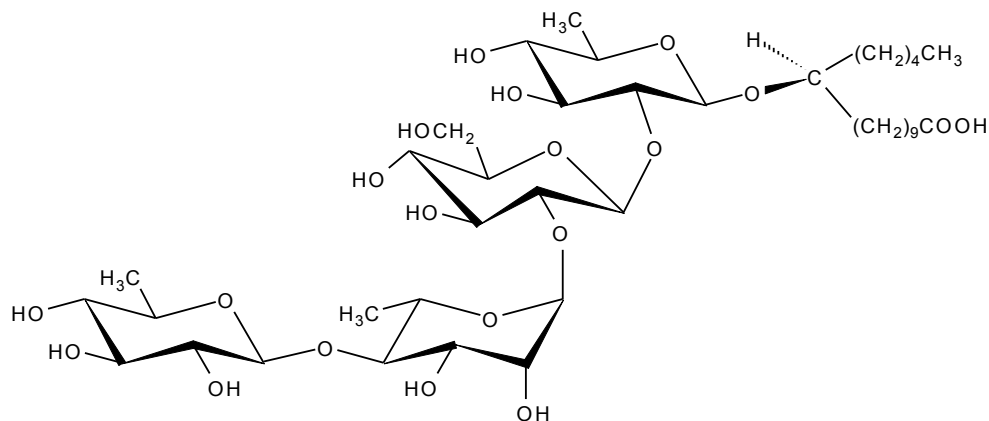


Figura 25. Estructura del ácido escamónico A

Ipomoea tricolor fue una de las primeras plantas sometida a un fraccionamiento biodirigido con el propósito de identificar sus constituyentes alelopáticos (Pereda-Miranda *et al.*, 1993). Una enorme colecta de este material vegetal se colectó en cañaverales del estado de Morelos, donde esta planta se utiliza como un cultivo de cobertura para controlar el crecimiento de las malezas. El extracto soluble en clorofórmico concentró la actividad alelopática y fue sometido a cromatografía en columna abierta. Ensayos de fitotoxicidad indicaron que las resinas glicosídicas eran las responsables de la actividad biológica. La fracción activa mayoritaria se purificó mediante cromatografía líquida de alta eficacia proporcionando un constituyente principal (63%), la tricolorina A, y sus análogos minoritarios, las tricolorinas B-E (Bah y Pereda-Miranda, 1996). La hidrólisis alcalina de las tricolorinas A-D proporcionó el ácido **tricolórico A** (figura 26), en tanto que la estructura de la tricolorina E se basa en un segundo tetrasacárido lineal del ácido jalapínico, ácido **tricolórico B** (figura 26).

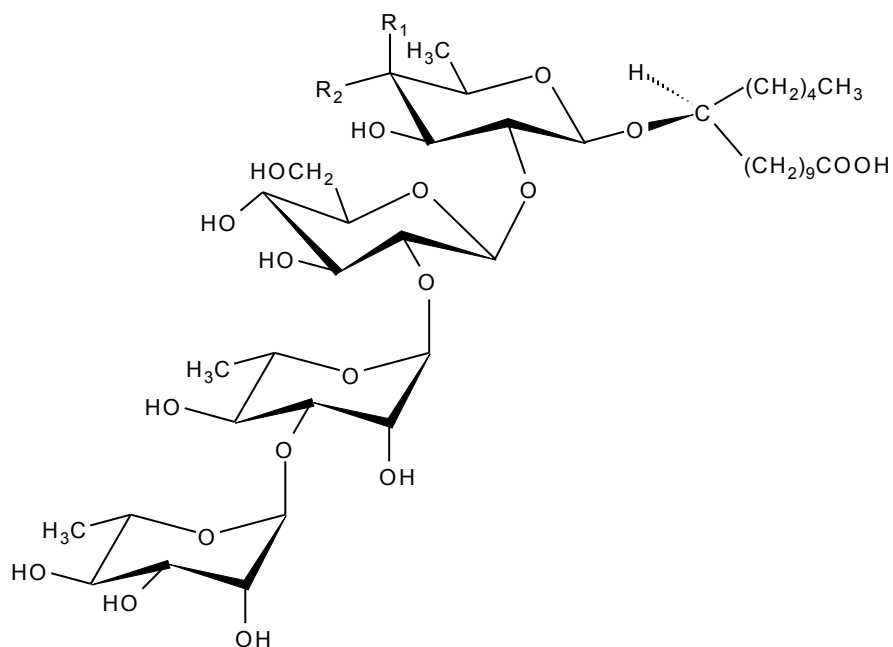


Figura 26. Estructuras de los ácidos tricolórico A ($R_1=OH$; $R_2=H$) y B ($R_1=H$; $R_2=OH$)

2.3.3. Componentes de la convolvulina de *Cuscuta chinensis*

De las hojas de *Cuscuta chinensis* se describió el aislamiento de los glicósidos Cus-1 y -2 a partir de la jalapina (Miyahara *et al.*, 1996). Sin embargo, en el estudio de la convolvulina, sólo se lograron identificar los núcleos oligosacáridos como productos de degradación debido a las dificultades en la separación que presentaron estas mezclas complejas. Los productos de hidrólisis básica de la convolvulina se identificaron como ácidos **cuscúuticos A–D** (figura 27) y los ácidos acéticos, (2*S*)-2-metilbutanoico y (2*R*,3*R*) 3-hidroxi-2-metilbutanoico (Du *et al.*, 1998).

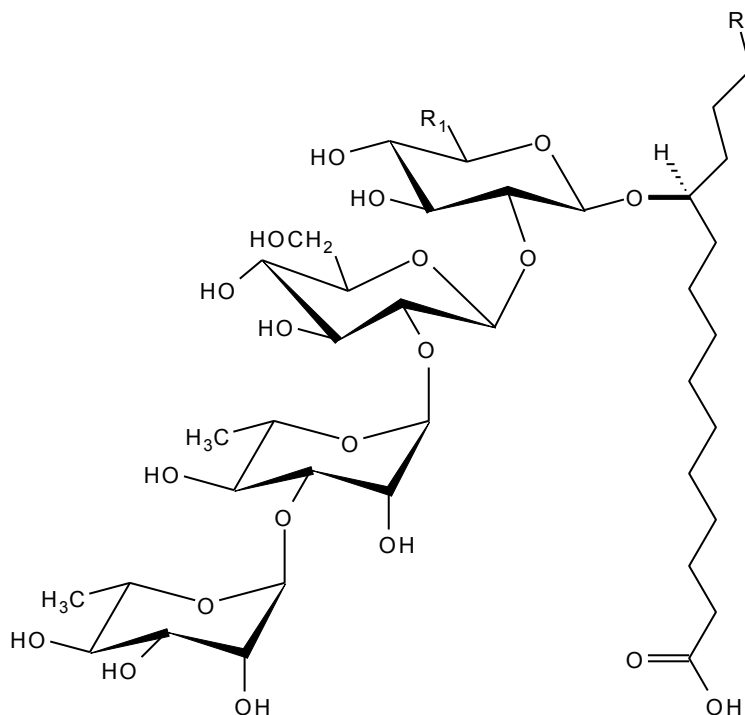


Figura 27. Estructuras de los ácidos cuscúticos A ($R=H$; $R_1=CH_2OH$), B ($R=R_1=H$), C ($R=H$; $R_1=CH_3$), y D ($R=C_2H_5$; $R_1=CH_2OH$)

2.3.4. La especie *Ipomoea pes-caprae*

Ipomoea pes-caprae es conocida en México con los nombres de batatilla, churristate de playa, hierba de la raya o riñonina. Es un bejuco frondoso y rastrero que crece a la orilla de la playa en el límite de la marea alta, donde forma grandes colonias que ayudan a estabilizar la arena de las dunas. Sus tallos suculentos de savia color leche y postrados puede extenderse por más de 10 metros, sus flores con una corola en forma de embudo o campana de color púrpura o rosado de 3-6 cm de diámetro pueden crecer separadas o en racimos. El color tiende a ser más oscuro dentro de la base de cada flor; los filamentos y estambres, el estigma y estilo son blancos. Sus flores son de vida corta, florecen con la salida del sol,

cierran a media tarde y se marchita la planta al siguiente día. Tiene un cáliz de 5 sépalos lampiños como de 1 cm de largo. Los frutos consisten en cápsulas o vainas, dehiscentes cuando se secan, ovoides a globulosas de 12 a 17 mm de largo. En cada cápsula se encuentran 4 semillas de color café oscuro, con muchos pelos cortos con apariencia como si estuvieran forradas de terciopelo, llegan a medir de 6 a 10 mm de largo (figura 28). Estas contienen sustancias químicas que resultan ser venenosas para quien desee comerlas, excepto para un pequeño coleóptero de la familia de los gorgojos (Bruchidadae) cuyo nombre científico es *Megacerus leucospilus*, de la misma familia de gorgojos que encontramos como plaga en los frijoles.



Figura 28. Flor de la riñonina (*Ipomoea pes-caprae*).

Las hojas son simples y alternas, reniformes (en forma de riñón, figura 29), coriáceas; su nombre específico se debe a la forma de las hojas como una pata de cabra (*pes-caprae*), debido a la similitud de la huella de la pezuña de las cabras. Las hojas más largas que anchas (suborbiculares), miden de 6 a 10 cm de largo, son de color verde oscuro de superficie lisa y brillante, y comúnmente roídas en el ápice.



Figura 29. Droga cruda de la planta medicinal riñonina (*Ipomoea pes-caprae*).

La planta crece en áreas soleadas protegidas y empiezan a florecer en mayo. Pero el punto máximo de florecimiento depende de la localización. En el golfo de México es de julio a septiembre. Esta especie se reconoce por su peculiar forma de tenderse sobre la arena, pues generalmente crece guiándose sobre dos grandes tallos paralelos que se extienden hasta medir aproximadamente 75 pies de largo. Es una planta que se desarrolla y sobrevive bien en playas rocosas o arenosas y permanece verde aun cuando está sometida a la sal y al golpe de las olas (figura 30). Probablemente, compite por espacio y luz con *Ipomoea stolonifera*. Devall (1992) sugirió que en Florida, cuando esto sucede *Ipomoea pes-caprae* es más inestable en el sustrato arenoso y se localiza en las dunas expuestas al oleaje. Sin embargo, las poblaciones de esta última se recuperan bastante bien de los huracanes y las tormentas tropicales.



Figura 30. *Ipomoea pes-caprae* a lo largo de las dunas del Pacífico en la Bahía de Chamela, Jalisco.

En México *Ipomoea pes-caprae* se distribuye a todo lo largo de la costa mexicana, (con mayor endemismo del lado del pacífico) desde los estados de Sonora, Sinaloa, Jalisco, Guerrero, Oaxaca y Chiapas, así como también en Veracruz (figura 31), Quintana Roo y Yucatán.



Figura 31. *Ipomoea pes-caprae* a lo largo de las playas del Golfo de México en la playa de Chachalacas, municipio de Ursulo Galván, Veracruz.

Es una planta medicinal utilizada como remedio natural para curar procesos inflamatorios, cólicos, trastornos renales y gonorrea entre otras patologías (figura 32). En las Bahías de Chamela, Jalisco, por ejemplo, se prepara un té con las hojas secas previamente trituradas de la planta y se pone en fomento para calmar el dolor en las zonas inflamadas. En la Sierra de los Tuxtlas en Veracruz se utiliza

para curar el asma, mientras que en la región de Misantla de ese mismo estado se usa para curar los riñones del mal de orín, para calmar las reumas y la lumbalgia, así como para tratar la disentería, el dolor de cintura y sanar las picaduras de animales ponzoñosos (Lorenzi *et al.*, 2002; Roig y Mesa, 1974).



Figura 32. Riñonina de venta en expendios de plantas medicinales en el centro de la Ciudad de México, DF.

Investigaciones clínicas y preclínicas han confirmado algunas propiedades farmacológicas de esta planta. El extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de esta planta exhibe una actividad antinociceptiva considerable así como también una acción analgésica (de Souza, *et al.*, 2000).

El análisis preliminar fitoquímico de esta planta medicinal mediante cromatografía en capa fina y utilizando reactivos específicos mostró que las fracciones de acetato de etilo contenían esteroides, terpenoides, alcaloides y flavonoides, mientras que la fracción acuosa indicó la presencia de taninos y saponinas (de Souza, *et al.*, 2000). Pongprayoon y colaboradores (1989) describieron que el extracto etéreo de *Ipomoea pes-caprae* inhibía la contracción del íleon de cobayos. El fraccionamiento biodirigido de este extracto resultó en el aislamiento de 2 compuestos; la β -damascenona y el *E*-fitol, que mostraron la misma potencia en el efecto biológico esperado con respecto a la papaverina, utilizada como control positivo (Pongprayoon, *et al.*, 1992a). El mismo extracto también mostró actividad desinflamatoria considerable en distintos modelos experimentales, lo cual se relaciona con la presencia de varios compuestos que interactúan con los procesos bioquímicos de la inflamación (Pongprayoon *et al.*, 1991a, 1992b). Por otro lado, Khan y colaboradores (1994) reportaron las actividades insulínogénica e hipoglucemiante del extracto alcohólico obtenido de las hojas de *Ipomoea pes-caprae*.

III. JUSTIFICACION

Las plantas ricas en resinas glicosídicas pertenecientes al género *Ipomoea* han demostrado un poderoso efecto citotóxico (Pereda-Miranda, 1994), antimicrobiano (Pereda-Miranda *et al.*, 2006a) y purgante (Pereda-Miranda y Bah, 2003) de posible interés terapéutico para el desarrollo de nuevos agentes medicinales. Por lo que la especie medicinal mexicana *Ipomoea pes-caprae* con base en su importancia como un remedio ampliamente utilizado en la medicina tradicional de nuestro país y considerando un criterio quimiotaxonómico, fue seleccionada para dar continuidad a la investigación química de este género vegetal y ampliar el conocimiento sobre la diversidad estructural de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas (Pereda-Miranda y Bah, 2003; Pereda-Miranda, 1995). Esta investigación permitió el establecimiento de perfiles cromatográficos de las resinas glicosídicas mediante la cromatografía de líquidos. Estos análisis serán de gran utilidad para el desarrollo de metodologías analíticas para el control de calidad de los preparados herbolarios que se comercializan con esta droga cruda en expendidos de productos naturistas y mercados de plantas medicinales.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVOS GENERALES

- 4.1.1. Implementar condiciones instrumentales en la cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) para desarrollar una metodología analítica que permita la separación y la purificación de los constituyentes individuales de naturaleza oligosacárida a partir de las resinas glicosídicas presentes en los extractos lipofílicos de *Ipomoea pes-caprae*.
- 4.1.2. Determinar la estructura molecular de los constituyentes presentes en las resinas glicosídicas solubles en hexano de *Ipomoea pes-caprae* mediante la aplicación de métodos espectroscópicos y espectrométricos con el propósito de ampliar el escaso conocimiento relacionado con la diversidad estructural de estos metabolitos biodinámicos.

4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 4.2.1. Estandarizar a nivel analítico, mediante la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficiencia, las condiciones instrumentales para lograr la máxima resolución de las complejas mezclas de resinas glicosídicas obtenidas a partir de las fracciones lipofílicas solubles en hexano.
- 4.2.2. Obtener perfiles cromatográficos (CLAE) para desarrollar metodologías analíticas de posible aplicación en el control de calidad de esta droga cruda y que permitan establecer comparaciones entre las dos colectas silvestres y los dos lotes provenientes de expendios comerciales de plantas medicinales.
- 4.2.3. Extrapolar las condiciones analíticas instrumentales a un nivel preparativo en la cromatografía líquida de alta eficacia para lograr el aislamiento de los constituyentes individuales presentes en las resinas glicosídicas lipofílicas de *Ipomoea pes-caprae*.
- 4.2.4. Purificar a nivel preparativo mediante la aplicación de la técnica de reciclaje los constituyentes presentes en las resinas glicosídicas de *Ipomoea pes-caprae*.
- 4.2.5. Establecer la estructura molecular de los constituyentes individuales presentes en las fracciones hexánicas tanto de la colecta silvestre como de las dos provenientes de expendios de plantas mediante la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución.

V. PARTE EXPERIMENTAL

5.1. Métodos

5.1.1. Métodos cromatográficos

Los análisis cromatográficos en capa fina (CCF) se efectuaron de acuerdo con las técnicas convencionales, utilizando placas de aluminio, recubiertas con gel de sílice (sílica gel 60 F₂₅₄, Merck) y diferentes sistemas de elución. Se utilizó la mezcla de H₂SO₄-sulfato cérico como agente revelador, mediante calentamiento sobre una parrilla a 80 °C para desarrollar el color. Para las separaciones cromatográficas en columna abierta se empleó gel de sílice 60 Merck (0.063-0.200mm) como adsorbente. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE) se realizó en un cromatógrafo marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, USA), equipado con un sistema de entrega de disolventes 600E, un refractómetro diferencial modelo 410 y una computadora (Optiplex 466/Le, Dee). El control del equipo, así como la adquisición y el procesamiento de la información se realizaron utilizando el programa Millenium 2000 Software (Waters).

5.1.2. Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) ¹H y ¹³C se obtuvieron en un aparato Varian XL-500 y en una unidad Bruker DMX-500, los cuales operaron a una frecuencia de 500 MHz para el registro de los espectros de RMN-¹H y a 125 MHz para los de ¹³C. El registro de los espectros de masas se

realizó mediante el bombardeo rápido de átomos (FAB) y, en algunos casos, cuando se trató de una muestra volátil, requirió del acoplamiento de un cromatógrafo de gases marca Hewlett Packard 5890 serie II al espectrómetro de masas modelo JEOL SX-102 A, utilizando la técnica de impacto electrónico (IE) para lograr la ionización.

5.2. Material Vegetal

Dos lotes de partes aéreas de la planta medicinal *Ipomoea pes-caprae* fueron colectados; uno en las bahías del océano Pacífico localizadas en el municipio de La Huerta, Estado de Jalisco en noviembre de 1989 y otro en playa de Chachalacas (Golfo de México) del municipio Ursulo Galván, y por otra parte, se compraron dos lotes de los expendios de plantas medicinales “La Magnolia” y “Las Plantas Medicinales de América, S.A. de C.V.” ubicados ambos en Guatemala No. 10 (pasaje Catedral), locales 18 y 12-13, respectivamente, Col. Centro, México, D.F., en junio de 2004. La identificación del material vegetal la realizó el Dr. Robert Bye, investigador del Jardín Botánico del Instituto de Biología, UNAM.

5.2.1. Preparación del extracto del material vegetal de *Ipomea pes-caprae*

El material vegetal seco y pulverizado fue sometido a una maceración exhaustiva preliminar con *n*-hexano para obtener los constituyentes de baja polaridad. Al término de la extracción, las soluciones se filtraron y concentraron a

sequedad mediante presión reducida. Los rendimientos obtenidos a partir de cada lote fueron los siguientes:

Primera colecta Municipio De la Huerta	Segunda colecta Municipio Ursulo Galván	Expendio "La Magnolia"
Extracto hexánico 40.6	Extracto hexánico 13.95	Extracto hexánico 41.83

5.3. Fraccionamiento primario

5.3.1. Fraccionamiento preliminar: primera colecta.

El fraccionamiento de 40.6 g de extracto hexánico se llevó a cabo mediante cromatografía en columna abierta, la cual se empacó con 250 g de gel de sílice. Primero, se inició la elución con hexano, obteniéndose dos fracciones de 500 mL cada una. Posteriormente, se incrementó gradualmente la polaridad con los sistemas hexano-CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO, y CHCl₃-Me₂CO-MeOH. Se colectaron 74 fracciones de 125 mL cada una. Cada fracción se analizó mediante cromatografía en capa fina y se reunieron todas aquellas que resultaron similares. De esta forma, se generaron ocho fracciones que contienen las mezclas de glicolípidos y que fueron numeradas como fracción **IV** a fracción **XI**. En el cuadro 2 se resume el fraccionamiento realizado mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico proveniente de la primera colecta.

Cuadro 2. Fraccionamiento preliminar del extracto hexánico de la primer colecta.

Eluyente	Porporción	Fracción	Fracciones reunidas	Clave
hexano	100	1-2	27-29	FIV
hex-CHCl ₃	3:1	3-6	30-40	FV
hex-CHCl ₃	1:3	7-11	41-48	FVI
CHCl ₃	100	12-18	49-52	FVII
CHCl ₃ -Me ₂ CO	75:25	19-23	53-58	FVIII
CHCl ₃ -Me ₂ CO	1:1	24-27	59-65	FIX
CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH	45:45:10	28-43	66-67	FX
CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH	47.5:47.5:5	44-51	68-76	FXI
CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH	47:45.4:7.6	52-65		
CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH	40:40:20	66-75		
CHCl ₃ -Me ₂ CO-MeOH	25:25:30	76		

5.3.1.1. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FIV

La fracción FIV (1.16 g) presentó una coloración verde oscuro, así como residuos de consistencia oleosa, por lo que se sometió a un proceso de decoloración mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice utilizando como sistema de elución de polaridad creciente la mezcla de CHCl₃ en MeOH, lo que permitió la obtención de 3 fracciones secundarias denominadas **IpIVa**, **IpIVb** e **IpIVc**. Las fracciones **IpIVa** e **IpIVc** presentaron apariencia grasosa y un bajo rendimiento. La fracción **IpIVb** (0.656) proporcionó un sólido amaforno e incoloro del cual se aislaron los siguientes constituyentes: el pescaprosido A y las Pescapreínas I, V, VI y IX.

5.3.1.2. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria FV

La fracción FV se sometió a un proceso de purificación mediante cromatografía en columna abierta, empleando 56.30 g de gel de sílice de fase inversa (C-18) como adsorbente y eluyendo con MeOH. Se colectaron 17 subfracciones. El proceso de fraccionamiento se resume en el cuadro siguiente:

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

Por medio de un análisis cromatográfico (CCF), se optó por desechar las fracciones I y V y reunir las fracciones II, III y IV. Estas últimas fracciones estuvieron constituidas por las pescapreínas II, III, IV y VIII, así como por la estoloniferina III.

5.3.2. Fraccionamiento preliminar: segunda colecta.

Antes de iniciar el fraccionamiento primario del extracto hexánico (13.95 g), primeramente éste se solubilizó en cloroformo y se agregó una cantidad suficiente de carbón activado para lograr la decoloración de la solución, la cual se filtró y concentró a sequedad bajo presión reducida. Este procedimiento proporcionó 9.33 g de extracto en peso seco y fue sometido a un proceso de fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta, la cual se empacó con 180 g de gel de sílice. Para el fraccionamiento, se utilizó como primer sistema de elución

hexano. Posteriormente, se incrementó gradualmente la polaridad con sistemas de elución constituidos por mezclas de polaridad creciente de hexano-CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO, y CHCl₃-Me₂CO-MeOH. Se colectaron 38 fracciones de 250 mL cada una. Cada fracción se analizó mediante cromatografía en capa fina y se reunieron todas aquellas que resultaron similares. De esta forma, se generaron ocho fracciones que contenían las mezclas de glicolípidos y que fueron numeradas como fracción **2Hex.IpI**, **2Hex.IpII**,...**2Hex.IpVIII**. En el cuadro 3 se resume el fraccionamiento realizado mediante cromatografía en columna abierta del extracto hexánico proveniente de la segunda colecta. La fracción **2Hex.IpVI** fue la que se sometió a su resolución mediante CLAE para permitir el aislamiento del pescaprosido B y de la pescarepina VII.

Cuadro 3. Fraccionamiento preliminar del extracto hexánico de la segunda colecta.

Eluyente	Porporción	Fracción	Fracciones reunidas	Clave
hexano-CHCl ₃	50:50	1-5	1	2Hex. IpI
CHCl ₃	100	6-10	2-7	2Hex.IpII
CHCl ₃ -Me ₂ CO	75:25	11-20	8-12	2Hex.Ip.III
CHCl ₃ -Me ₂ CO	80:20	21-25	13-15	2Hex.IpIV
CHCl ₃ -Me ₂ CO	85:15	26-30	16	2Hex.IpV
CHCl ₃ -Me ₂ CO	90:10	31-35	17-19	2Hex.IpVI
Me ₂ CO	100	36-38	20-25	2Hex.IpVII
			26-38	2HexIpVIII

5.3.3. Fraccionamiento preliminar: material comercial.

Para fraccionar el extracto hexánico fue necesario disolverlo en una cantidad mínima de cloroformo y agregar 25 g de gel de sílice 60 (0.063-0.200 mm) para

adsorberlo. La columna abierta (diámetro 80 cm, longitud 8 cm) se empacó con 628 g de gel de sílice de partícula 0.063-0.200 mm y 239 g de gel de sílice de partícula 0.040-0.063 mm. La fase estacionaria de menor tamaño se colocó en la parte superior de la columna con el propósito de lograr una mejor separación del extracto al inicio del proceso cromatográfico. Para el fraccionamiento, se utilizó como primer sistema de elución hexano. Posteriormente, se incrementó la polaridad en forma gradual con mezclas constituidas por hexano-CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO, y CHCl₃-Me₂CO-MeOH. Se colectaron 85 fracciones de aproximadamente 250 mL. Cada fracción se analizó mediante cromatografía en capa fina y se reunieron todas aquellas que resultaron similares. De esta forma, se generaron doce fracciones primarias (que contienen las mezclas de glicolípidos) numeradas de la siguiente manera: **3Hex.IpI**, **3Hex.IpII**, ...**3Hex.IpXII**. (Cuadro 4).

Cuadro 4. Fraccionamiento primario del extracto hexánico de la riñonina comercial.

Eluyente	Porporción	Fracción	Fracciones reunidas	Clave
hexano	100	1-11	1-15	3Hex. IpI
Hexano-CH ₂ Cl ₂	50:50	12-22	16-40	3Hex.IpII
CH ₂ Cl ₂	100	23-43	41-45	3Hex.Ip.III
CH ₂ Cl ₂ -Me ₂ CO	75:25	44-64	46-49	3Hex.IpIV
CH ₂ Cl ₂ -Me ₂ CO	80:20	65-70	50-52	3Hex.IpV
CH ₂ Cl ₂ -Me ₂ CO	95:15	71-75	53-68	3Hex.IpVI
CH ₂ Cl ₂ -Me ₂ CO	90:10	76-80	69-75	3Hex.IpVII
Me ₂ CO	100	81-85	76-81	3HexIpVIII
Me ₂ CO-MeOH	95:5	86-100	82-94	3Hex.IpIX
Me ₂ CO-MeOH	75:25	101-109	95-110	3Hex.IpX
Me ₂ CO-MeOH	50:50	110-119	111-115	3Hex.IpXI
MeOH	100	120-126	116-126	3Hex.IpXII

De las doce fracciones primarias se decidió, con base en el perfil cromatográfico en capa fina, que a partir de la fracción VII se realizarían las pruebas preliminares en cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), ya que a partir de estas fracciones se pudo observar la presencia de resinas mediante la comparación cromatográfica con la fracción IVb obtenida de material vegetal silvestre correspondiente a la planta *Ipomoea pes-caprae* autenticada desde el punto de vista taxonómico. El resto de las fracciones (I-VI) no fueron analizadas debido a su consistencia oleosa, a la presencia de una pigmentación amarilla en grandes cantidades y al bajo rendimiento de las resinas glicosídicas, las cuales se visualizaron mediante cromatografía en capa fina.

5.4. Preparación de derivados

5.4.1. Hidrólisis alcalina

La fracción FV se sometió a una hidrólisis alcalina. A 200 mg de la muestra problema se adicionaron 5 mL de KOH al 5%, la mezcla de reacción se mantuvo en reflujo (95 °C) con agitación durante dos horas. Al término de este tiempo, se ajustó el pH a 4 con HCl 4N y, posteriormente, se extrajo con Et₂O (3× 10 mL). La fase etérea proporcionó una mezcla de ácidos grasos la cual fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. La fase acuosa se extrajo de nuevo con *n*-butanol (3× 10 mL) y se concentró a presión reducida. Posteriormente, la fracción resultante (FV-OH) se sometió a una reacción de acetilación.

5.4.2. Reacción de acetilación

La fase orgánica (butanólica) obtenida de la hidrólisis alcalina se sometió a una reacción de acetilación. A 80.3 mg de FV-OH se adicionaron 10 mL de Ac₂O y 7 mL de piridina. Esta mezcla se mantuvo en agitación a temperatura ambiente por 24 horas, al término de las cuales se adicionaron 5 mL de agua destilada y se procedió a la extracción con AcOEt (3× 10 mL). La fase orgánica se trató con HCl 1N (5× 5mL) y agitación, lavando por último con agua destilada (3× 5mL). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida (FV-OHAc).

5.4.3. Reacción de alquilación con diazometano

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

5.4.4. Preparación del diazometano

Una solución de KOH (5 g en 7.5 mL de agua), 25 mL de EtOH y 15 mL de éter se hizo reaccionar con 30 mL de una solución etérea de N-metil-N-nitroso-*p*-toluen-sulfonamida (30 mg). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación continua en baño maría (58-60 °C). El CH₂N₂ generado se colectó mediante destilación en 20 mL de éter en baño de hielo.

5.4.5. Reacción de alquilación

Se adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano a la fracción FV-OHAc, previamente disuelta en éter, para llevar a cabo la reacción de alquilación. Se adicionó el agente alquilante hasta que cesó la emisión del gas N₂ en la mezcla de reacción.

5.4.6. Hidrólisis ácida

Se adicionaron 10 mL de HCl 1N a 45 mg de la fracción FV-OH, la mezcla se calentó a reflujo a 90 °C durante 5 horas y, posteriormente, se diluyó la mezcla de reacción con 5 mL de H₂O y se extrajo con Et₂O (3× 10mL). La fase etérea proporcionó la aglicona. La fase acuosa se neutralizó con KOH y se extrajo con *n*-

butanol (5× 10 mL) agitando fuertemente en cada extracción. La fase butanólica se lavó con H₂O (2× 5 mL) y se concentró en el rotaevaporador hasta sequedad total para obtener una mezcla de monosacáridos, la cual se analizó por espectroscopía de RMN ¹H.

5.4.7. Análisis de la mezcla de carbohidratos

De manera independiente a las fracciones IV y V (15 mg) se les agregó una solución (10 mL) de HCl 4 N, cada mezcla se calentó bajo reflujo a 90°C por 2 horas. La mezcla de reacción en cada caso se diluyó con agua (5 mL) y se extrajo con éter etílico (3 x 10 mL). La fase acuosa se neutralizó con KOH 1 N, y se extrajo con *n*-BuOH (30 mL). Esta fase se lavó con agua (2 x 5 mL) y el disolvente se evaporó al vacío para dar un sólido incoloro. Este sólido incoloro fue disuelto en CH₃CN-H₂O y analizado directamente mediante CLAE, para lo cuál se utilizó una columna para análisis de carbohidratos (μ Bondapak NH₂; 3.9 × 300 mm, 10 μ m) y utilizando una elusión isocrática de CH₃CN-H₂O (17:3) a un flujo de 1 mL/min, y una inyección de muestra de 20 mL (concentración muestra: 5 mg/mL)

Los experimentos de co-elución con muestras estadares de carbohidratos permitieron la identificación de L-ramnosa ($t_R = 7.2$ min) y D-fucosa ($t_R = 9.8$ min). Cada uno de estos eluatos fue colectado de manera individual, concentrado y disuelto en agua. Las actividades ópticas fueron registradas después de agitarlas por dos horas a temperatura ambiente: L-ramnosa $[\alpha]_{598} +8$, $[\alpha]_{578} +8$, $[\alpha]_{546} +9$,

$[\alpha]_{436} +15$, $[\alpha]_{365} +21$ (c 0.1, H₂O); D-fucosa $[\alpha]_{598} +81$, $[\alpha]_{578} +83$, $[\alpha]_{546} +94$, $[\alpha]_{436} +155$, $[\alpha]_{365} +236$ (c 0.1, H₂O).

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

5.5. Purificación del compuesto acetilado-metilado mediante

CLAE

Con el propósito de lograr la purificación del ácido glicosídico peracetilado y metilado mayoritario presente en el extracto hexánico fue necesaria la implementación de las condiciones analíticas y preparativas en la cromatografía de líquidos para efectuar su posterior análisis espectroscópico (RMN). Se utilizaron las siguientes condiciones instrumentales a nivel analítico:

Columna: Symetry C-18, tamaño de partícula 5 μm; 4.6 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud (Waters).

Fase móvil: Acetonitrilo-Agua (95:5)

Flujo: 1 ml/min

Detector: Índice de refracción.

Volumen de inyección: 10 μL

Concentración de la muestra de prueba: 1 mg/100μL

Sensibilidad: 128 RIU

Tipo de elución: Isocrática

Las condiciones instrumentales a nivel preparativo fueron las siguientes:

Columna:	SymetryPrep C18, tamaño de partícula 7 μm , 19 mm de diámetro interno \times 300 mm de longitud (Waters).
Fase móvil:	Acetonitrilo-Agua (95:5)
Flujo:	9 mL/min
Detector:	Índice de refracción
Volumen de inyección:	500 μl
Concentración de la muestra de prueba:	60 mg/mL
Sensibilidad:	128 RIU
Tipo de elución:	Isocrática

5.6. Purificación de glicolípidos individuales

Las pruebas preliminares para establecer las condiciones instrumentales en CLAE que permitieron la separación de los glicolípidos individuales se efectuaron en columnas analíticas de fase inversa (C_{18} 4.6 X 250 5 μm) con un sistema de detección inicial tanto en índice de refracción como en un equipo de arreglo de diodos ($\lambda = 240 \text{ nm}$) a un flujo de elución de 0.7 mL/min. Una vez que se logró encontrar el mejor sistema cromatográfico de elución para la máxima resolución de la muestra problema, el cual consistió en un columna analítica C_{18} y una fase móvil de $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ (9:1). Por medio de CLAE a nivel preparativo (C_{18} 19 X 300 7 μm) y aplicando las técnicas de sobrecarga de columna

(Hostettmann *et al.*, 1986) y corte del núcleo (Cidlingmeyer, 1992; Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002) se logró la purificación de cada una de las pescapreínas.

5.6.1. Condiciones cromatográficas

5.6.1.1 Preparación de la fase móvil

Cada fase móvil se liberó de impurezas sólidas a través de su paso por un filtro Millipore conectado al vacío, empleando una membrana de polipropileno hidrofílico de 0.45 μm . Posteriormente, la fase móvil fue desgasificada por desplazamiento del aire mediante un sistema de helio a una velocidad de 10 mL/min durante 15 minutos.

5.6.1.2. Preparación de las muestras

Todas las muestras de prueba se disolvieron en MeOH para su posterior inyección en el equipo de cromatografía líquida de alta eficacia. En algunas ocasiones fue necesario filtrar la muestra mediante un filtro propio para jeringa llamado Acrodisco GHP, provisto de una membrana de polipropileno hidrofílico de 0.2 μm (PALL Gelman Laboratory).

5.6.1.3. Condiciones instrumentales: nivel analítico

Columna: Symetry C-18, tamaño de partícula 5 μm ; 4.6 mm de diámetro interno \times 250 mm de longitud (Waters).

Fase móvil: Acetonitrilo-MeOH (9:1)

Flujo: 0.7 ml/min

Detector: Índice de refracción.

Volumen de inyección: 10 μL

Concentración de la muestra de prueba: 1 mg/100 μL

Sensibilidad: 256 RIU

Tipo de elución: Isocrática

5.6.1.4. Condiciones instrumentales: nivel preparativo

Columna: SymetryPrep C-18, tamaño de partícula 7 μm , 19 mm de diámetro interno \times 300 mm de longitud (Waters).

Fase móvil: Acetonitrilo-MeOH (9:1)

Flujo: 9 mL/min

Detector: Índice de refracción

Volumen de inyección: 500 μl

Concentración de la muestra de prueba: 60 mg/ml

Sensibilidad: 256 RIU

Tipo de elución: Isocrática

5.6.2. Obtención del pescaprócido A y de las pescapreínas I, V, y VI

La fracción **IpIVb** se analizó mediante CLAE en condiciones analíticas y, posteriormente, se extrapolaron estas condiciones a nivel preparativo para lograr su fraccionamiento. Durante este procedimiento, únicamente, se consideraron los picos con tiempos de retención en la región del cromatograma posterior a los 20 minutos de elución para garantizar el aislamiento de los compuestos con una estructura novedosa ya que los picos con tiempos de elución menores correspondieron a compuestos mayoritarios aislados previamente, i.e., las pescapreína II-IV (Pereda-Miranda et al.).

Al considerar los rendimientos de las 14 bandas colectadas, se purificaron los compuestos presentes en las bandas **IpIVb11** (31.20mg) e **IpIVb12** (45.70mg) para lo cual fue necesario fraccionar nuevamente cada una de estas bandas mediante CLAE en condiciones preparativas, de donde se obtuvieron 6 picos, de los cuales se decidió purificar el constituyente de mayor rendimiento asignado con la clave **IpIVb12-6** (37.20mg). Este se sometió nuevamente a condiciones preparativas logrando la resolución de la fracción en 5 picos, purificándose al mismo tiempo el compuesto mayoritario ($T_R = 10.14$ min, 4.10 mg) mediante la técnica de reciclaje de la muestra.

De los otros picos, se purificó el asignado con la clave **IpIVb12-6-1** mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico” (Hostettmann et al., 1986), seguida del reciclaje del mismo a través de la columna, utilizándose de 5 a 15 ciclos para obtener la máxima resolución que garantizó una pureza mayor al 99% de cada uno de los picos. Estos dos compuestos purificados y asignados con

las claves **IpIVb12-6-1** ($T_R = 9.13$ min, 3.8 mg), **IpIVb12-6-2** ($T_R = 10.14$, 3.8 mg) correspondieron al **pescaprósido A** y a **la pescapreína I**, respectivamente.

En el caso de las pescapreínas V y VI, estos oligosacáridos provinieron de la banda **IpIVb3** ($T_R = 36.99$ min), la cual se reinyectó a nivel analítico en busca de condiciones para mejorar su resolución (CH₃CN-MeOH; 6:4). Posteriormente, éstas se escalaron a nivel preparativo para lograr su fraccionamiento. Este procedimiento resultó en 5 picos con rendimientos muy bajos. Los picos asignados con la clave **IpIVb3-2** ($T_R = 12.53$) e **IpIVb3-5** ($T_R = 17.86$) se purificaron mediante la técnica “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna. Cada uno de ellos: **IpIVb3-2** (1.0 mg) e **IpIVb3-5** (0.8 mg) correspondieron a las **pescapreínas V** y **VI**, respectivamente.

Pescaprósido A: sólido amorfo blanco; p.f. 89-91 °C; $[\alpha]_D -40$ (c 0.1 MeOH); RMN¹H y ¹³C (cuadros 19 y 20); HRFAB-MS m/z : 1197.6990 [M – H]⁻ (calculada para C₅₉H₁₀₅O₂₄ requiere 1197.6995)

Pescapreína I: sólido amorfo blanco; p.f. 131-133 °C; $[\alpha]_D -65$ (c 0.06 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 15 y 16); FABMS (modo negativo) m/z 1165 [M – H]⁻, 983 [M – H – C₁₂H₂₂O]⁻ 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1165.6730 [M – H]⁻ (calculada para C₅₈H₁₀₁O₂₃ requiere 1165.6733)

Pescapreína V: sólido amorfo blanco; p.f. 140-142 °C; $[\alpha]_D -57$ (c 0.1 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 17 y 18); FABMS (modo negativo) m/z 1103 [M – H]⁻, 1019 [M – H – C₅H₈O]⁻ 921 [M – H – C₁₂H₂₂O]⁻, 873 [1019 – C₆H₁₀O₄]⁻ 691, 545, 417,

271; HRFAB-MS m/z : 1103.6730 $[M - H]^-$ (calculada para $C_{57}H_{99}O_{20}$ requiere 1103.6729)

Pescapreína VI: sólido amorfo blanco; p.f. 136-138 °C; $[\alpha]_D -17$ (c 0.1 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 17 y 18); FABMS (modo negativo) m/z 1103 $[M - H]^-$, 921 $[M - H - C_{12}H_{22}O]^-$ 775 $[921 - C_6H_{10}O_4]^-$, 873, 691, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1103.6728 $[M - H]^-$ (calculada para $C_{57}H_{99}O_{20}$ requiere 1103.6729)

5.6.3. Obtención de la estoloniferina III y de las pescapreínas II, III, IV, VIII y IX

La fracción hexánica **FV** (350 mg) proveniente de la primera colecta se fraccionó hasta agotarla para reunir cantidades suficiente de las subfracciones: **A** ($t_R = 9$ a 11 min), **B** ($t_R = 11.8$ min), **C** ($t_R = 12.9$ min), **D** ($t_R = 13.5$ min), **E** ($t_R = 14.3$ min), **F** ($t_R = 15.2$ min), **G** ($t_R = 16.1$ min), **H** ($t_R = 17.5$ min), **I** ($t_R = 18$ a 28.5 min), **J** ($t_R = 29.7$ min), **K** ($t_R = 33.4$ min), **L** ($t_R = 36.7$ min) y **M** ($t_R = 39.6$ min). Las subfracciones **B**, **C**, **D**, **E**, **G**, y **H** se reinyectaron en una columna C_{18} preparativa con un sistema de elución binario constituido por CH_3CN -MeOH (9:1). Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra (Kubo y Nakatsu, 1990), utilizándose de 10 a 20 ciclos para obtener la máxima resolución de los constituyentes de estas subfracciones. Se obtuvieron 15.8 mg de la estoloniferina III (Noda, 1994) a partir de la subfracción **B**, 3.0 mg de la **pescapreína IX** a partir de la subfracción **C**, 7.6 mg de la **pescapreína II** a partir de la subfracción **D**, 4.0 mg de la **pescapreína VIII**

a partir de la subfracción **E**, 53.2 mg de la **pescapreína III** a partir de la subfracción **G**, y 8 mg de la **pescapreína IV** a partir de la subfracción **H**.

Pescapreína II: sólido amorfo blanco; p.f. 120-123 °C; $[\alpha]_D -81$ (c 0.19 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 15 y 16); FABMS (modo negativo) m/z 1235 [M – H]⁻, 1165 [M – H – C₄H₆O]⁻, 1019, 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1235.7147 [M – H]⁻ (calculada para C₆₂H₁₀₇O₂₄ requiere 1235.7152)

Pescapreína III: sólido amorfo blanco; p.f. 121-123 °C; $[\alpha]_D -70$ (c 0.43 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 15 y 16); FABMS (modo negativo) m/z 1249 [M – H]⁻, 1165 [M – H – C₅H₈O]⁻, 1067 [M – H – C₁₂H₂₂O]⁻, 1019, 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1249.7224 [M – H]⁻ (calculada para C₆₃H₁₀₉O₂₄ requiere 1249.7309)

Pescapreína IV: sólido amorfo blanco; p.f. 120-122 °C; $[\alpha]_D -60$ (c 0.81 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 15 y 16); FABMS (modo negativo) m/z 1263 [M – H]⁻, 1165 [M – H – C₆H₁₀O]⁻, 1081 [M – H – C₁₂H₂₂O]⁻, 1019, 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1263.7499 [M – H]⁻ (calculada para C₆₃H₁₀₉O₂₄ requiere 1263.7465)

Pescapreína VIII: sólido amorfo blanco; p.f. 110-112 °C; $[\alpha]_D -17$ (c 0.1 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 17 y 18); FABMS (modo negativo) m/z 1235 [M – H]⁻, 1089 [M – H – C₆H₁₀O]⁻ 1053 [M – H – C₁₂H₂₂O]⁻, 907 [1053 – C₆H₁₀O₄]⁻, 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1235.7154 [M – H]⁻ (calculada para C₆₂H₁₀₇O₂₄ requiere 1235.7152)

Pescapreína IX: sólido amorfo blanco; p.f. 123-124 °C; $[\alpha]_D -53$ (c 0.1 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 17 y 18); FABMS (modo negativo) m/z 1235 [M – H]⁻, 1137 [M – H – C₆H₁₀O]⁻ 1081 [M – H – C₁₀H₁₈O]⁻, 991, 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1235.7153 [M – H]⁻ (calculada para C₆₂H₁₀₇O₂₄ requiere 1235.7152)

Estoloniferina III: sólido amorfo blanco; p.f. 120-123 °C; $[\alpha]_D -64$ (c 0.43 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 15 y 16); HRFAB-MS m/z : 1221.7049 [M – H]⁻ (calculada para C₆₁H₁₀₅O₂₄ requiere 12621.6996)

5.6.4. Obtención del pescaprósido B y de la pescapreína VII

Las pruebas preliminares para lograr la separación del pescaprósido B y de la pescapreína VII también incluyeron la utilización de columnas analíticas de fase reversa (C₁₈) con un sistema de detección de índice de refracción, un flujo de elución de 0.7 mL y una fase móvil compuesta de CH₃CN (9:1). El empleo del sistema cromatográfico de líquidos a un nivel preparativo permitió la aplicación de las técnicas de sobrecarga de columna y corte del núcleo (Bidlingermyer *et al.*, 1992). La fracción **2Hex.IpVI** (0.6083g) permitió el aislamiento de la pescapreína III, el pescaprósido B y nuevamente la obtención del pescaprósido A. Para ello, fue necesario establecer las condiciones analíticas de máxima resolución para la fracción 2Hex.IpVI y proseguir con su escalamiento a nivel preparativo para lograr el fraccionamiento hasta agotar el total de la fracción. De este fraccionamiento, inicialmente, se purificó al constituyente mayoritario, el cual corresponde al pico

de mayor rendimiento asignado con la clave **2Hex.IpVI-3** ($T_R = 44.65$ min, 378.60mg) que se sometió nuevamente a condiciones preparativas de cromatografía líquida de alta eficacia, resolviéndose en 6 picos. Sin embargo, este fraccionamiento que utilizó como fase de elución $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ (9:1) no resultó óptimo para mejorar el tiempo de retención ni para conseguir la resolución del pico mayoritario. Por tal motivo, se modificaron las condiciones de la fase móvil para lograr una mejor resolución del constituyente mayoritario que se designó con la clave **2Hex.IpVI-3-6** ($T_R = 48.65$ min, 216.7mg) el cual se sometió nuevamente a condiciones preparativas de cromatografía líquida de alta eficacia, purificándose al mismo tiempo el compuesto asignado con la clave **2Hex.IpVI-3-6e** ($T_R = 11.33$ min, 27.4mg), mediante la técnica de reciclaje del mismo pico.

Los picos asignados con la claves **2Hex.IpVI-3-6a** ($T_R = 8.45$ min.) y **2Hex.IpVI-3-6d** ($T_R = 10.61$ min.) se purificaron mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna. Cabe señalar que el pico asignado con la clave **2Hex.IpVI-3-6a** ($T_R = 8.45$ min.) correspondió al **pescapróside A** (23.3 mg), anteriormente aislado del extracto proveniente de la primera colecta de partes aéreas silvestres. El pico **2Hex.IpVI-3-6d** ($T_R = 10.61$ min.) correspondió al **pescapróside B** (2.5 mg). El pico **2Hex.IpVI-3-6e** ($T_R = 11.33$ min.) correspondió a la **pescapreína III** (7.6 mg) también aislada a partir de la primera colecta.

Por otro parte, de la fracción **2Hex.IpVI-1** ($T_R = 32.91$ min.) se analizó en columna C_{18} preparativa con un sistema de elución binario constituido por $\text{CH}_3\text{CN-MeOH}$ (9:1), lográndose su resolución en 8 picos. El análisis del perfil cromatográfico generado de este sistema permitió tomar la decisión de modificar

la polaridad del sistema de elución binario, cambiándose a un sistema de CH₃CN-MeOH (55:45) para mejorar la resolución del constituyente mayoritario, asignado con la clave **2Hex.IpVI-1h** ($T_R = 40.35$ min, 48.3 mg). Este pico se sometió nuevamente a un análisis mediante la cromatografía de líquidos a nivel preparativo (fase móvil, CH₃CN-MeOH 55:45; columna, fase reversa C₁₈; flujo, 9 mL/min.). Estas condiciones permitieron la obtención de 5 picos de los cuales el pico asignado con la clave **2Hex.IpVI-1h5** ($t_R = 10.2$ min) se recicló, lográndose la purificación de su constituyente mayoritario. De los picos restantes, sólo se logró la purificación del asignado con la clave **2Hex.IpVI-1h2** mediante la técnica conocida como “rasurado del pico”, seguida de su reciclaje a través de la misma columna, utilizándose de 5 a 15 ciclos. La molécula asignada con la clave **2Hex.IpVI-1h2** (6.4 mg) correspondió a la **pescapreína VII**. El pico **2Hex.IpVI-1h5** (15.0 mg) correspondió a la **Estoloniferina III**, previamente purificada a partir del extracto proveniente de la primera colecta de partes aéreas silvestres.

Pescaprosido B: sólido amorfo blanco; p.f. 87-88 °C; $[\alpha]_D -35$ (c 0.1 MeOH); RMN¹H y ¹³C (cuadros 19 y 29); HRFAB-MS m/z : 1281.7572 $[M - H]^-$ (calculada para C₆₄H₁₁₃O₂₅ requiere 1281.7570).

Pescapreína VII: sólido amorfo blanco; p.f. 134-136 °C; $[\alpha]_D -72$ (c 0.1 MeOH); RMN¹H ¹³C, (cuadros 17 y 18); FABMS (modo negativo) m/z 1137 $[M - H]^-$, 983 $[M - H - C_{10}H_{18}O]^-$, 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1137.6421 $[M - H]^-$ (calculada para C₅₆H₉₇O₂₃ requiere 1137.6420).

5.6.5. Obtención de las pescapreínas X, XI y XII

La fracción **3Hex.lpXI** proveniente del tercer extracto se analizó utilizando las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente (sistema de elución:CH₃CN-MeOH, 9:1). Sin embargo, no se logró una resolución aceptable por lo que fue necesario modificar las condiciones de la fase móvil. Se utilizó el sistema CH₃CN-H₂O (8:2) que permitió la generación de un perfil cromatográfico con una mayor resolución. Estas condiciones analíticas fueron extrapoladas a nivel preparativo, colectándose 4 picos de interés.

A pesar de su bajo rendimiento, cada pico fue analizado por separado bajo condiciones analíticas, mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia, utilizando como sistema de elución CH₃CN-MeOH (9:1). Posteriormente, estas condiciones se llevaron a nivel preparativo para lograr la purificación de cada uno de los constituyentes individuales. Durante el reciclaje de las fracciones **3Hex.lpXI-1** ($T_R = 19.10$ min.) y **3Hex.lpXI-2** ($T_R = 21.88$ min.), cada una de éstas se desdobló en dos picos generando perfiles cromatográficos similares. La única diferencia radicaba en la proporción de cada uno de sus componentes. De la primera fracción, se purificó el segundo pico **3Hex.lpXI-1b** mediante la técnica de “rasurado del pico”, seguida de su reciclaje a través de la misma columna. De la segunda fracción, se purificó el primer pico asignado con la clave **3Hex.lpXI-2a**. Por otra parte, la fracción **3Hex.lpXI-3** se resolvió en 3 picos que fueron purificados en forma independiente. El primero **3Hex.lpXI-3** ($T_R = 33.85$ min.) se purificó mediante la técnica de “rasurado del pico”, seguida de su reciclaje a través de la misma columna. Los picos **3Hex.lpXI-3b** y **3Hex.lpXI-3c** al colectarse

en forma individual, se reinyectaron nuevamente y se sometieron al reciclaje en la misma columna. Por otra parte, el pico **3Hex.lpXI-4** ($T_R = 43.56$ min.) de mayor rendimiento, no presentó impurezas y su rendimiento fue aceptable después de la primera serie de reciclajes.

Cabe señalar que el pico asignado con la clave **3Hex.lpXI-2a** (2.7 mg) resulto ser la **estoloniferina III**, aislada a partir del extracto proveniente de la primera colecta silvestre (Pereda-Miranda *et al.*, 2005). Los picos **3Hex.lpXI-1b** (4.7 mg) y **3Hex.lpXI-3b** (2.3 mg) correspondieron a las **pescapreínas X** y **XI**, respectivamente. El pico **3Hex.lpXI-3c** correspondió a la **pescapreína XII**, el cuál es homologo de la **pescapreína III (3Hex.lpXI-4, 22.3 mg)**, nuevamente aislada:

Pescapreína X: sólido amorfo blanco; p.f. 130-131 °C; $[\alpha]_D - (c 0. \text{MeOH})$; RMN¹H ¹³C, (cuadros 19 y 29); FABMS (modo negativo) m/z 1266 $[M - H]^-$, 1182 $[M - H - C_5H_8O]^-$, 1084 $[M - H - C_{12}H_{22}O]^-$, 1036 $[M - H - C_6H_{10}O_4 - C_5H_8O]^-$, 561, 433; HRFAB-MS m/z : 1266.7262. $[M - H]^-$ (calculada para C₆₃H₁₀₉O₂₅ requiere 1265.7258)

Pescapreína XI: sólido amorfo blanco; p.f. 77 -79 °C; $[\alpha]_D - (c 0. \text{MeOH})$; RMN¹H ¹³C, (cuadros 19 y 20); FABMS (modo negativo) m/z 1236 $[M - H]^-$, 1053 $[M - H - C_{12}H_{22}O]^-$, 823 $[1053 - C_6H_{10}O_4 - C_5H_8O]^-$, 531, 403; HRFAB-MS m/z : 1235.7155 $[M - H]^-$ (calculada para C₆₂H₁₀₇O₂₄ requiere 1235.7152)

Pescapreína XII: sólido amorfo blanco; p.f. 126128 °C; $[\alpha]_D - (c 0. \text{MeOH})$; RMN¹H ¹³C, (cuadros 19 y 20); FABMS (modo negativo) m/z 1249 $[\text{M} - \text{H}]^-$, 1165 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}]^-$, 1067 $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}]^-$, 1019, 837, 545, 417, 271; HRFAB-MS m/z : 1249.7224 $[\text{M} - \text{H}]^-$ (calculada para $\text{C}_{63}\text{H}_{109}\text{O}_{24}$ requiere 1249.7309).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. Extracción y fraccionamiento

La selección primaria del material vegetal de estudio, *i.e.*, la riñonina (*Ipomoea pes-caprae*), se realizó de acuerdo al criterio quimiotaxonómico que considera las semejanzas en el metabolismo secundario de especies filogenéticamente relacionadas y, por lo tanto, se esperaba la identificación de las resinas glicosídicas características de todas las especies pertenecientes a la familia de las convolvuláceas (Pereda-Miranda y Bah, 2003). El procedimiento de maceración permitió obtener 40.6 g (colecta 1: Bahía de Chamela, De la Huerta, Jalisco), 13.95 g (colecta 2: Playa Chachalacas, Ursulo Galván, Veracruz) y 41.83 g (material comercial: Expendio “La Magnolia”) de extractos hexánicos que fueron fraccionados, de manera preliminar, mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, iniciando la elución con hexano e incrementando gradualmente la polaridad con los sistemas hexano-CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO, y CHCl₃-Me₂CO-MeOH. Esta secuencia metodológica permitió en el caso del material proveniente de la primera colecta la obtención de ocho fracciones primarias FIV-FXI (ver Parte Experimental, inciso 5.3.1). Las fracciones FIV y FV se sometieron a un fraccionamiento mediante cromatografía en columna abierta usando fase normal originando tres subfracciones: a, b y c, siendo la fracción **IpIVb** (0.656) la que se sometió a su posterior análisis mediante CLAE. El proceso de partición secundario para la fracción FIV se realizó mediante cromatografía abierta en fase inversa, obteniendo un rendimiento final de 3.3379 g.

El material proveniente de la segunda colecta fue necesario antes de fraccionarlo someterlo a un proceso de decoloración para liberarlo de pigmentos fotosintéticos. Después de este procedimiento, el rendimiento del extracto fue de 9.33 g. Se obtuvieron ocho fracciones primarias identificadas con las claves 2Hex.lp I–VIII (figura 33), siendo la fracción **2Hex.lpVI** la seleccionada para su posterior análisis bajo las condiciones de cromatografía líquida previamente descritas (ver Parte Experimental, inciso 5.3.2).

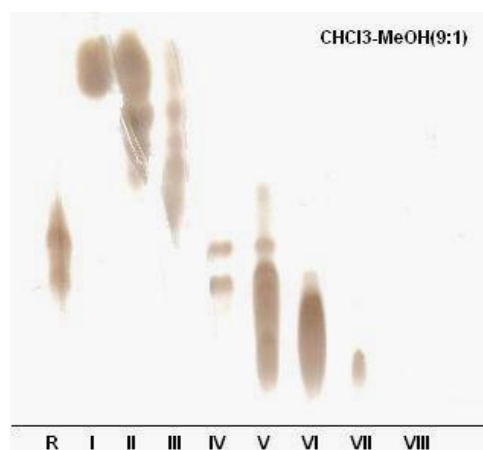


Figura 33. Cromatograma en capa fina de las fracciones primarias 2Hex.lp I–VIII provenientes de la segunda colecta.

El material vegetal proveniente del expendio comercial fue fraccionado de manera preliminar mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice lo que permitió la obtención de doce fracciones primarias, denominadas con las claves de indentificación 3Hex.lp I–XII (ver Parte Experimental, inciso 5.3.3), de las cuales se decidió con base en su perfil cromatográfico en capa fina (figura 34), que a partir de la fracción VII se realizarían las pruebas preliminares en cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE), ya que a partir de estas fracciones

se pudo observar la presencia de resinas mediante la comparación cromatográfica con la fracción IVb obtenida de material vegetal correspondiente a la planta *Ipomoea pes-caprae* plenamente identificada.

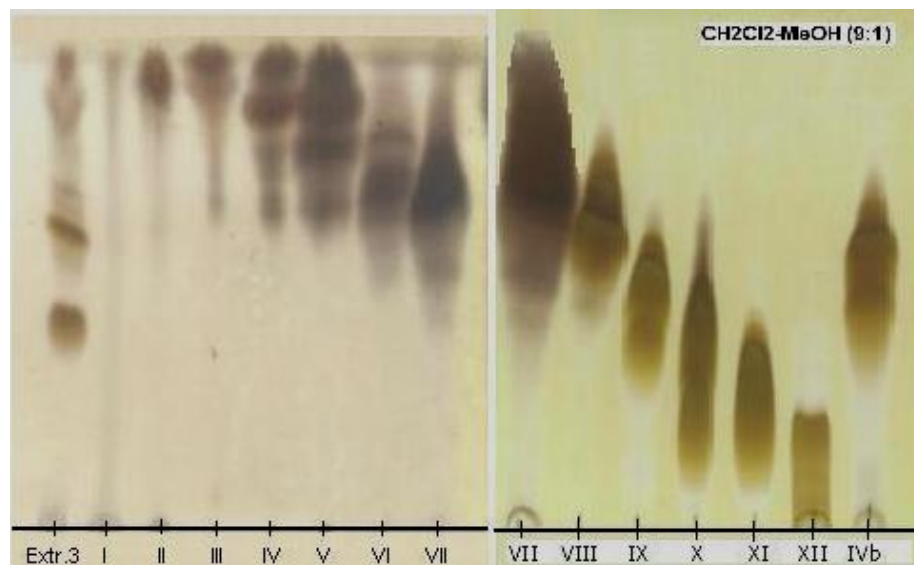


Figura 34. Perfil cromatográfico de las fracciones primarias del extracto preparado con las partes aéreas de la riñonina comercial.

6.2. Hidrólisis ácida

A partir de la hidrólisis ácida de los ácidos glicosídicos podemos obtener en la fase orgánica soluble en éter o cloroformo la aglicona mientras que de la fase acuosa se recupera la mezcla de monosacáridos constitutivos del oligosacárido mediante una extracción butanólica. (Pereda-Miranda y Bah, 2003; Pereda-Miranda *et al.*, 2006)

6.2.1. Identificación de carbohidratos por RMN

Sólo el monosacárido mayoritario contenido en la mezcla de carbohidratos obtenida a partir de la hidrólisis ácida de la fracción primaria FV se identificó plenamente mediante el registro del espectros unidimensionales de RMN ^1H de la mezcla y su posterior comparación con el generados por cada uno de los estándares indicados en el apartado 5.4.7. De acuerdo con este análisis, el espectro de la mezcla de hidrólisis presenta las misma señales a las observadas en el espectro de la muestra estándar de ramnosa y, por lo tanto, se confirmó que el oligosacárido estaba compuesto principalmente de este carbohidrato. Esta similitud es especialmente importante para las señales que se encuentran centradas entre 3–4 ppm y las señales para los protones anoméricos, ca. 5 ppm (figuras 35 y 36).

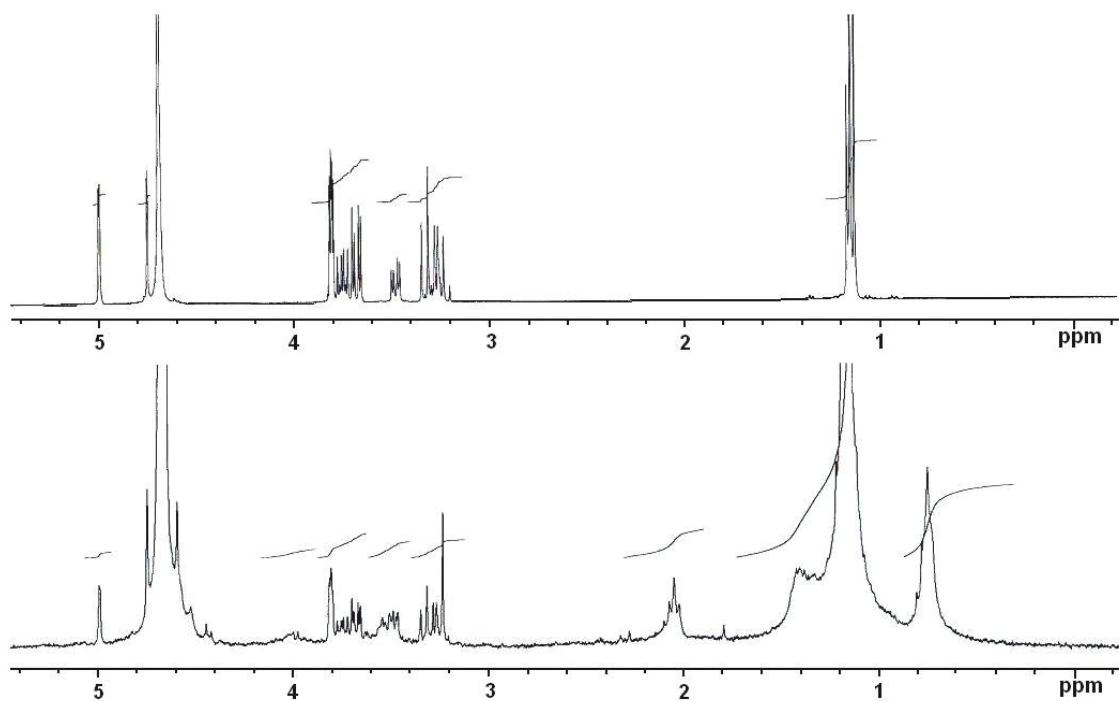


Figura 35. Espectro de RMN ^1H del estándar de ramnosa (superior). Espectro de RMN ^1H de la mezcla de monosacáridos (inferior).

La naturaleza del segundo monosacárido constitutivo del oligosacárido se estableció como la fucosa mediante el empleo de las técnicas espectroscópicas bidimensionales en la RMN de los productos naturales. El análisis realizado se explicará detenidamente en los apartados que incluyen la elucidación estructural del núcleo oligosacárido: El análisis de la mezcla mediante HPLC permitió identificar a los carbohidratos mediante la técnica de coelución con los estándares de L-ramnosa ($t_R = 5.9$ min; $[\alpha]_{598} +8$, $[\alpha]_{578} +8$, $[\alpha]_{546} +9$, $[\alpha]_{436} +15$, $[\alpha]_{365} +21$ y L-Fucose ($t_R = 7.7$ min; D-fucose $[\alpha]_{598} +81$, $[\alpha]_{578} +83$, $[\alpha]_{546} +94$, $[\alpha]_{436} +155$, $[\alpha]_{365} +236$ (c 0.1, H₂O).

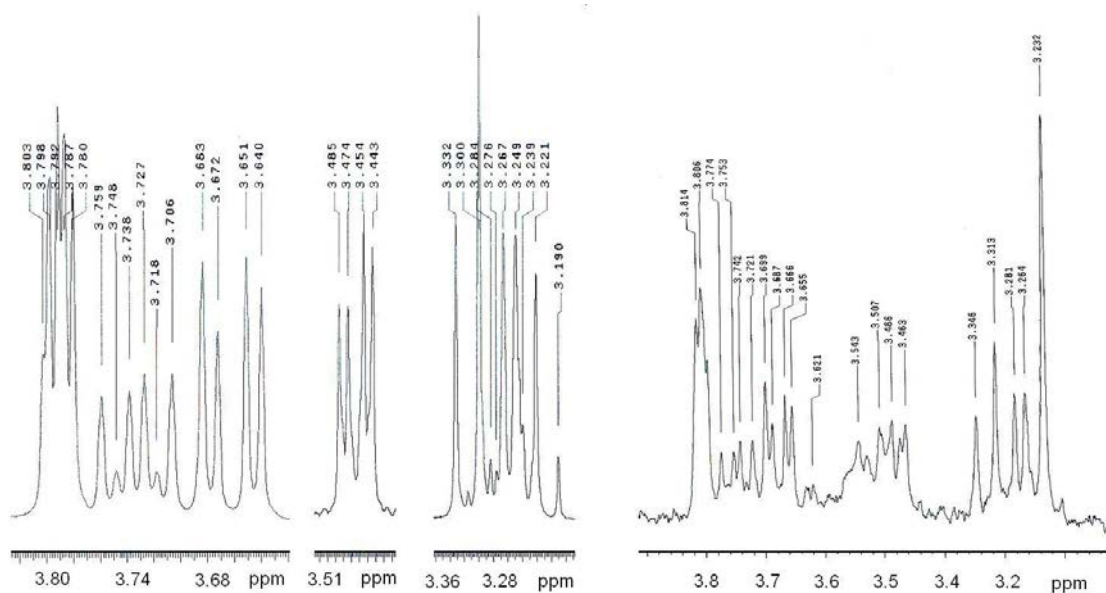


Figura 36. Expansión de región centrada en 3-4 ppm del espectro de la muestra estándar de ramnosa (izquierda). Misma región para el espectro de la mezcla de hidrólisis (derecha).

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

La fase etérea obtenida de la reacción de hidrólisis alcalina se analizó mediante cromatografía de gases (figura 37) acoplada a la espectrometría de masas (figura 38). El análisis por espectrometría de masas de los picos correspondientes se presenta en el cuadro 5. La identificación de cada uno de los constituyentes de esta mezcla se realizó mediante la comparación de los patrones de fragmentación observados para cada una de los picos con los generados por muestras auténticas.

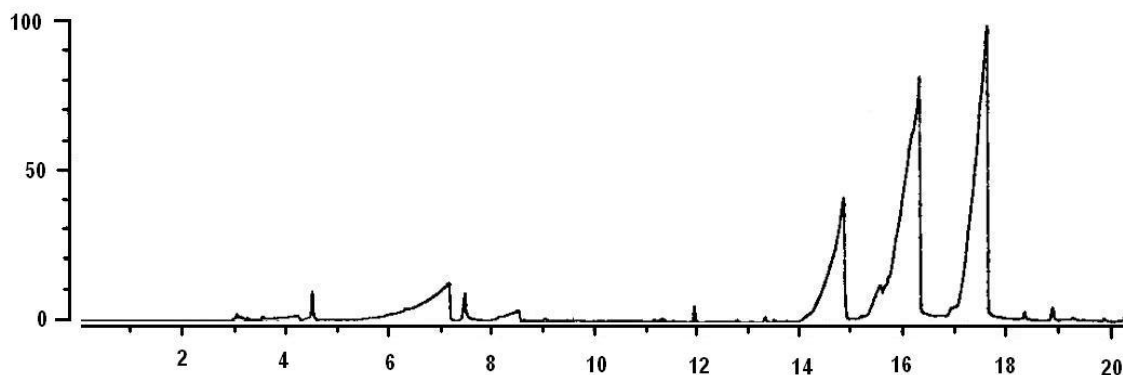


Figura 37. Cromatograma de gases obtenido para la fase orgánica de la hidrólisis alcalina.

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

t_R (min)		Identificación
6.89	$[M]^+$ 102 (2), 87 (33), 74 (100), 57 (50), 41 (28), 39 (8)	ácido 2-metilbutírico
8.47	$[M]^+$ 116 (2), 99 (3), 87 (21), 73 (63), 60 (100), 41 (16), 39 (7)	ácido capríco
14.72	$[M]^+$ 172 (12), 155 (3), 143 (12), 129 (62), 115 (15), 112 (12), 87 (20), 73 (100), 60 (90), 57 (40), 43 (35), 41 (30)	ácido decanóico
16.15	$[M]^+$ 148 (90), $[M-1]$ 147 (100), 131 (25), 103 (40), 102 (20), 77 (25), 74 (8), 51 (20), 50 (8), 39 (5), 38 (4)	ácido cinámico
17.53	$[M]^+$ 200 (15), 183 (2), 171 (18), 157 (40), 143 (10), 129 (48), 115 (20), 101 (15), 85 (33), 73 (100), 60 (80), 43 (44), 41 (30)	ácido dodecanóico

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

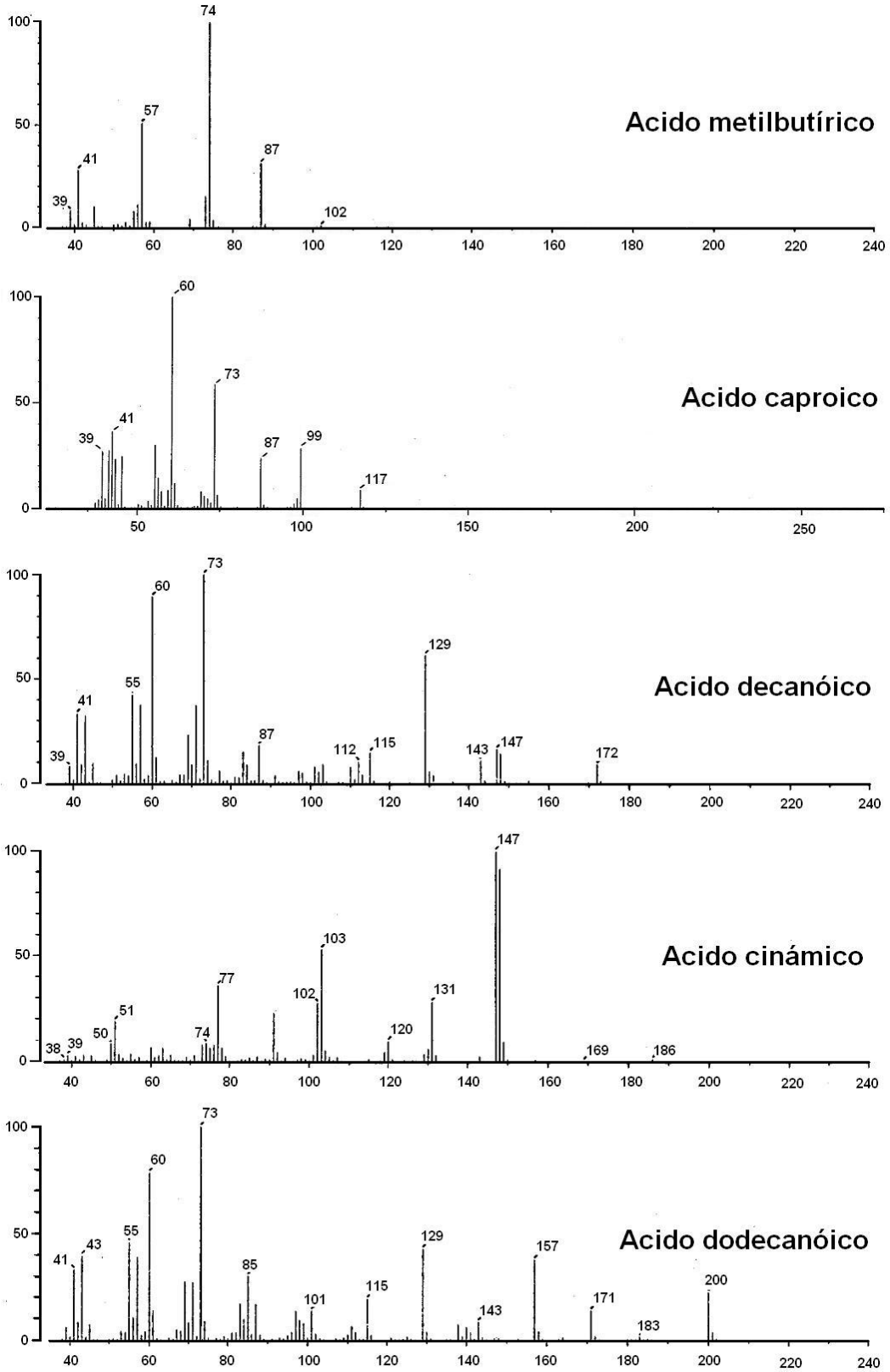


Figura 38. Espectros de masas para los ácidos grasos liberados.

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

Con el propósito de lograr la purificación del ácido glicosídico constitutivo de las resinas presentes en el extracto hexánico de *Ipomoea pes-caprae*, se requirió de la implementación de la técnica de HPLC en nivel analítico y preparativo. La primera permitió determinar las condiciones instrumentales más adecuadas, en tanto que la segunda, se utilizó con el fin de separar y purificar al derivado mayoritario para su posterior análisis espectroscópico. Los procedimientos a nivel preparativo utilizaron las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo, así como el rasurado y el reciclaje de picos (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002). La aplicación de esta metodología permitió la separación del pico con tiempo de retención de 12.5 minutos. Es importante enfatizar que el escalamiento de estas condiciones instrumentales analíticas a un nivel preparativo, como son la dimensión de la columna, la cantidad de muestra y la velocidad de flujo de elución (Ver Parte Experimental, apartado 5.7.3) resultó en una disminución en el tiempo de retención de la muestra problema, sin representar un impedimento para la purificación exitosa del ácido glicosídico.

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

6.5. Purificación de los glicolípidos individuales: Primera colecta.

Las primeras pruebas de purificación de los glicolípidos individuales se iniciaron con la fracción hexánica **FV** mediante cromatografía líquida de alta eficiencia utilizando una columna de fase inversa (C₁₈). La cromatografía en capa fina de esta fracción demostró la presencia de componentes visibles al UV y, por tal razón, las primeras pruebas de separación en HPLC se efectuaron con un detector de UV-VIS. También, se realizaron pruebas de separación con un detector de índice de refracción. Estos primeros análisis se realizaron empleando CH₃CN puro como fase móvil. Sin embargo, la escasa coincidencia obtenida en los tiempos de retención entre los dos cromatogramas para cada pico propició la elección del sistema de detección más confiable. Para esto, se realizaron pruebas de colecta de subfracciones con ambos detectores que permitieron identificar que el método de detección de luz UV (240 nm) presentó una relación muy pobre entre la intensidad observada para los picos y la cantidad de la subfracción recolectada. Por lo tanto, se eligió el método cromatográfico con el detector de índice de refracción. Finalmente, las diversas pruebas realizadas en busca de la mejor fase móvil permitieron identificar la mezcla compuesta por CH₃CN-MeOH (9:1) como la óptima ya que ésta permitió el incremento de la afinidad de la fase estacionaria por los componentes de la mezcla, mejorar los tiempos de retención y la resolución del cromatograma.

6.5.1. Obtención del Pescaprócido A y de la Pescapreína I

Antes de iniciar el fraccionamiento de la fracción **IpIVb**, para su aislamiento fue necesario realizar una purificación preliminar de la fracción primaria **FIV** (ver apartados 5.3.1.1 y 5.6.1). La fracción **IpIVb** se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficacia (CLAE) en condiciones analíticas y, posteriormente, se extrapolaron estas condiciones a nivel preparativo (figura 39) para lograr su fraccionamiento. Durante este procedimiento únicamente se prestó atención a la región del cromatograma con un tiempo de elución posterior a los 20 minutos de retención con el objeto de garantizar compuestos de estructura novedosa, ya que los picos que eluyeron antes de este tiempo corresponden a compuestos mayoritarios presentes en la fracción **FV** (*i.e.*, las pescapreínas II-IV) y, que de igual manera, se purificaron de acuerdo con los procedimientos que se discutirán posteriormente. De este fraccionamiento se colectaron 14 picos (sus rendimientos se incluyen en el cuadro 1).

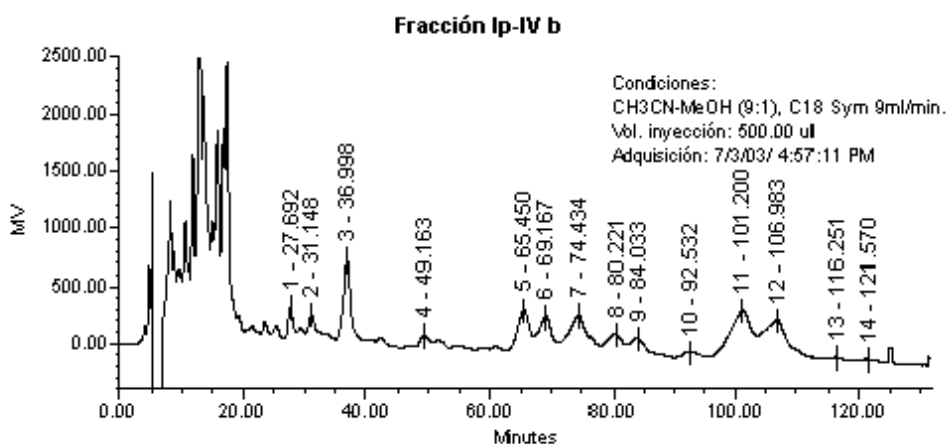


Figura 39. Perfil cromatográfico obtenido de la fracción IpIVb.

Cuadro 6. Rendimiento de la fracción IpIVb

Muestra	Peso (mg)
Ip-IV-b-1	6.30
Ip-IV-b-2	9.90
Ip-IV-b-3	26.80
Ip-IV-b-4	6.70
Ip-IV-b-5	21.10
Ip-IV-b-6	34.60
Ip-IV-b-7	30.00
Ip-IV-b-8	33.80
Ip-IV-b-9	27.00
Ip-IV-b-11	31.20
Ip-IV-b-12	45.70
Ip-IV-b-13	3.70
Ip-IV-b-14	5.00

Para cada pico o banda colectada se estableció su perfil cromatográfico bajo condiciones analíticas con el propósito de verificar su complejidad. Después de analizar el perfil individual y tomando en cuenta cada uno de sus rendimientos, se decidió dar inicio a la purificación de los compuestos presentes en las bandas **IpIVb11** (31.20mg) e **IpIVb12** (45.70mg). Se fraccionaron nuevamente cada una de estas bandas mediante CLAE en condiciones preparativas de donde se obtuvieron 6 picos de los cuales se decidió purificar el constituyente de mayor rendimiento asignado con la clave **IpIVb12-6** (37.20mg). Este se sometió nuevamente a condiciones preparativas de cromatografía líquida de alta eficacia, resolviéndose en 5 picos (figura 40) y purificándose, al mismo tiempo, el compuesto mayoritario (ver los rendimientos obtenidos en el cuadro 7) mediante la técnica de reciclaje de esta muestra.

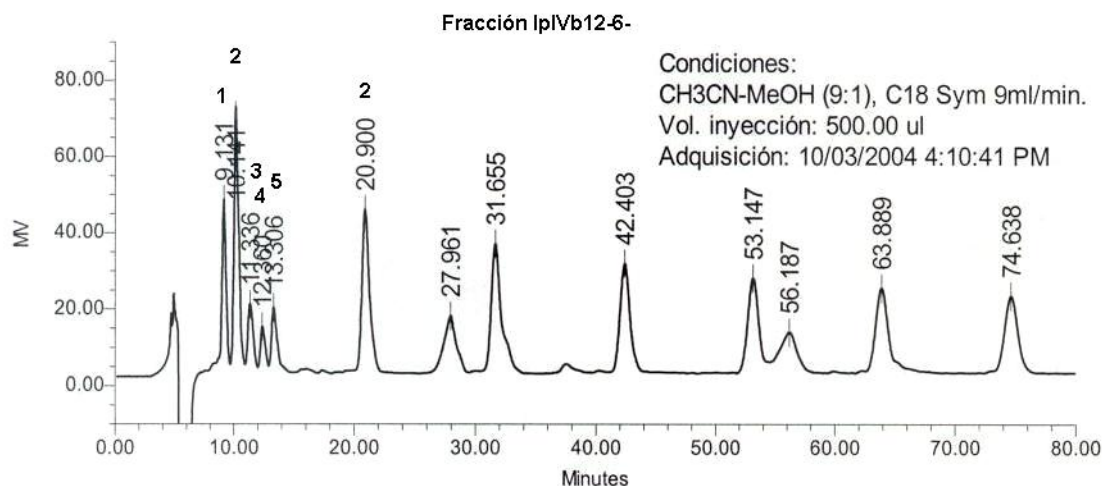


Figura 40. Fraccionamiento y reciclaje del pico mayoritario de la fracción IpIVb12-6.

Cuadro 7. Rendimiento de la fracción IpIVb12-6

Muestra	Peso (mg)
IpIVb12-6-1	3.80
IpIVb12-6-2	4.10
IpIVb12-6-3	2.80
IpIVb12-6-4	1.80
IpIVb12-6-5	3.50

De los otros picos, se decidió continuar con la purificación de aquellos asignados con las claves IpIVb12-6-1 e IpIVb12-6-5 mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del núcleo del pico cromatográfico a través de la columna, utilizándose de 5 a 15 ciclos para obtener la máxima resolución lo que nos garantizó una pureza mayor al 99% del compuesto (ver figura 41).

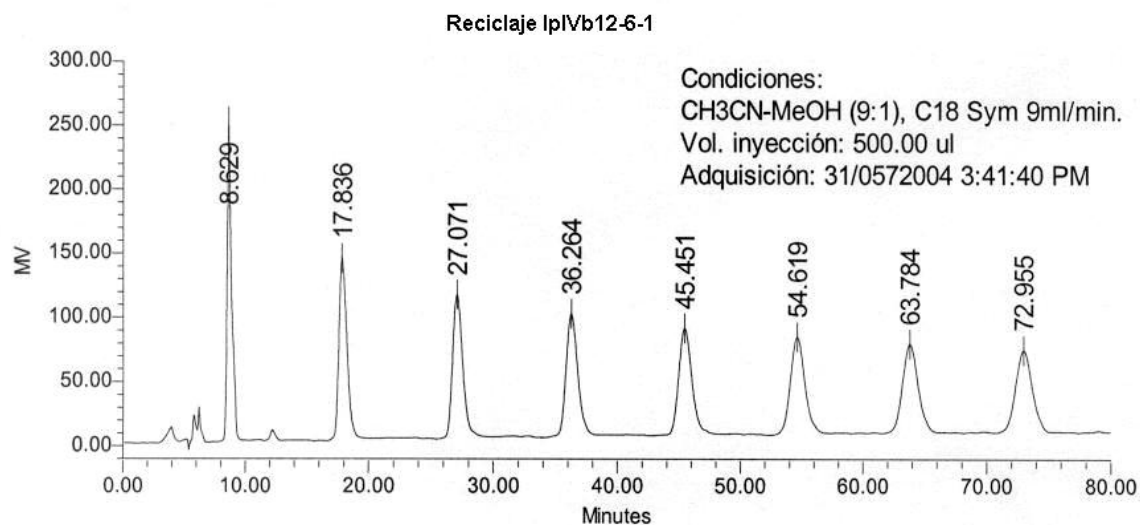


Figura 41. Purificación del pico IpIVb12-6-1 mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna.

Estos tres compuestos purificados y asignados con las claves IpIVb12-6-1 (**pescapróside A**; 3.8 mg), IpIVb12-6-2 (**pescapreína I**; 3.8 mg) e IpIVb12-6-5 (3.5 mg) se enviaron a resonancia magnética nuclear (RMN 400-500 MHz) para así obtener la asignación total de los espectros de RMN-¹H y ¹³C que fue apoyada en experimentos mono- y bidimensionales (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HMQC, HMBC). Estos experimentos permitieron la caracterización de la estructura intacta de los productos naturales, establecer la posición de la lactonización en uno de ellos, así como la posición y el grado de esterificación por ácidos grasos del núcleo oligosacárido. Desafortunadamente, el tercer compuesto resultó ser una mezcla de dos compuestos, que debido a la complejidad y al bajo rendimiento total de 3.5 mg no fue posible lograr la purificación de los componentes individuales de esta mezcla de constituyentes minoritarios.

6.5.2. Obtención de las Pescapreínas V y VI

Después de haber analizado las fracciones **IpIVb11** e **IpIVb12**, se decidió analizar la fracción **IpIVb3** al considerar las diferencias en su perfil cromatográfico así como su rendimiento que garantizaban la purificación de sus constituyentes mayoritarios (ver figura 39 y cuadro 6). Inicialmente, se buscaron las condiciones analíticas que proporcionaran la mayor resolución para cada pico y, posteriormente, éstas se escalaron a nivel preparativo (figura 42) para lograr su fraccionamiento. Este procedimiento resultó en 5 picos con rendimientos bajos. Los picos asignados con la clave **IpIVb3-2** e **IpIVb3-5** se purificaron mediante la técnica “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje de los mismos a través de la columna (ver figura 43). Estos compuestos se designaron con las claves **IpIVb3-2** (**pescapreína V**, 1.0 mg) e **IpIVb3-5** (**pescapreína VI**, 0.8 mg) y se sometieron a experimentos de RMN (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HMQC, HMBC), para lograr la caracterización de su estructura intacta.

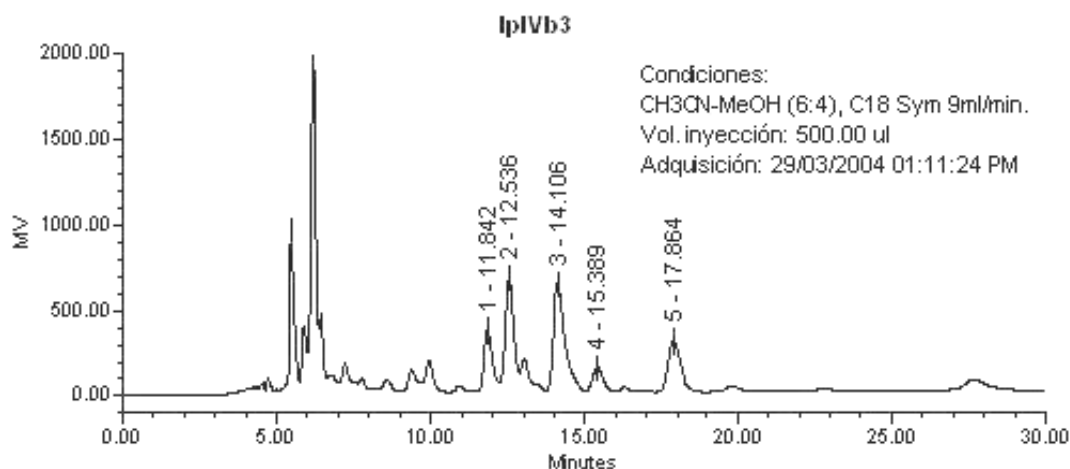


Figura 42. Perfil cromatográfico bajo condiciones preparativas de la fracción IpIVb3.

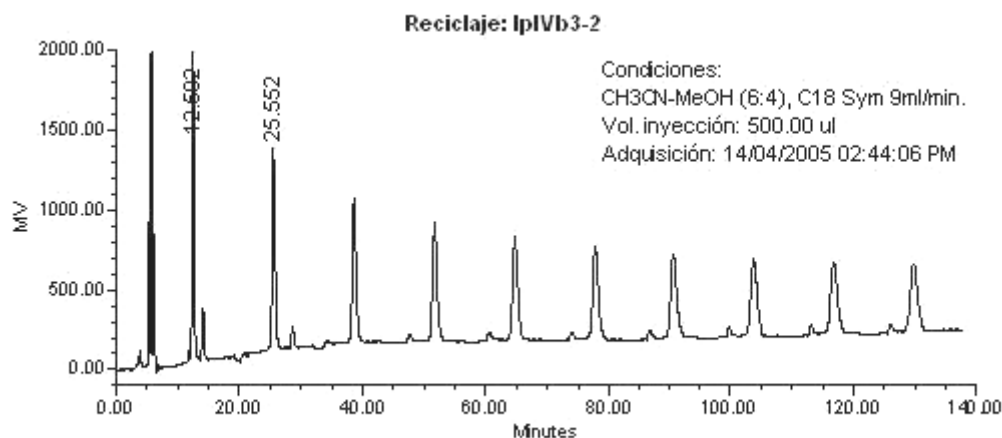


Figura 43. Purificación del pico IpIVb3-2.

6.5.3. Obtención de la Estoloniferina III y de las Pescapreínas II, III, IV, VIII y IX

El fraccionamiento de la fracción **FV** (figura 44) a nivel preparativo mediante una columna C_{18} se efectuó utilizando los mismos procedimientos descritos anteriormente, mismos que permitieron reunir cantidades suficientes de las subfracciones **A-M** (apartado 5.6.2). De estas se inyectaron las subfracciones **B, C, D, E, G, y H** de manera independiente para utilizar la técnica de reciclaje de muestra y así lograr la separación de sus constituyentes (Bah *et al.*, 1996; Kubo *et al.*, 1990). Tomando en cuenta que se obtuvo una buena resolución en la separación de las subfracciones **B-H** se consideró que las condiciones anteriormente utilizadas para el nuevo fraccionamiento de la **FV** eran adecuadas para la purificación de los glicolípidos presentes en cualquiera de estas subfracciones. El reciclaje de las muestras **B, D, G, H, C y E** permitió la purificación de la **estoloniferina III** y de las **pescapreínas II, III, IV, VIII y IX** a

partir de cada una de las subfracciones respectivas (figuras 45 a 50). Es importante mencionar que para la obtención de los primeros dos compuestos fue necesario disminuir la velocidad de flujo para incrementar el tiempo de retención, con esto se logró mejorar la separación de los constituyentes al evitar la sobreposición de los picos durante su reciclaje a través de la columna.

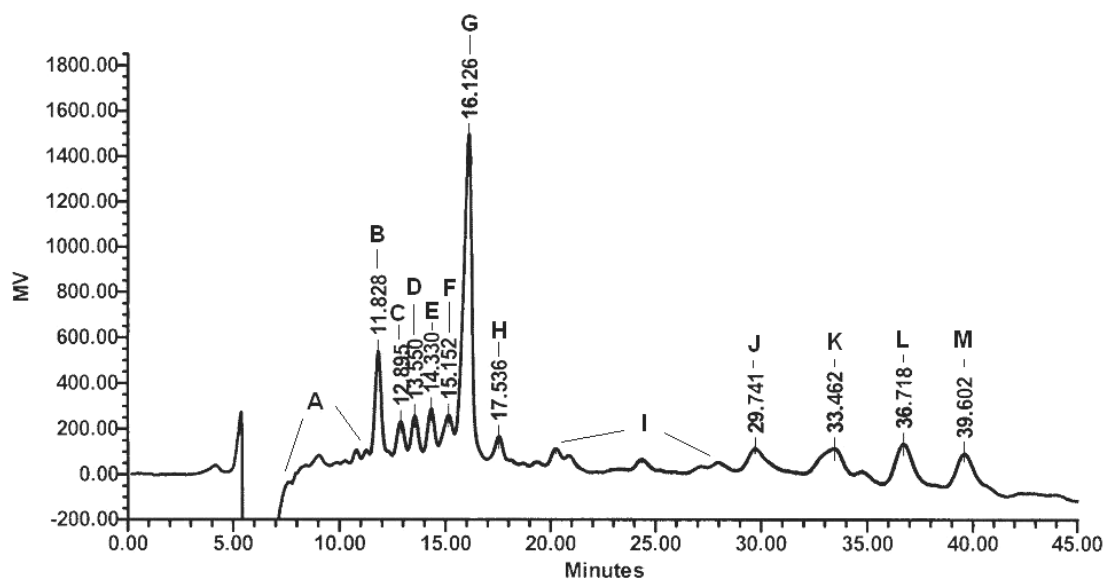


Figura 44. Cromatograma de líquidos de la fracción primaria FV a una escala preparativa. Condiciones instrumentales: columna C₁₈ (19 × 300 mm, 7 μm); fase móvil: CH₃CN-MeOH (9:1); flujo de elución: 9 mL/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μL (60 mg/ ml); detector: índice de refracción.

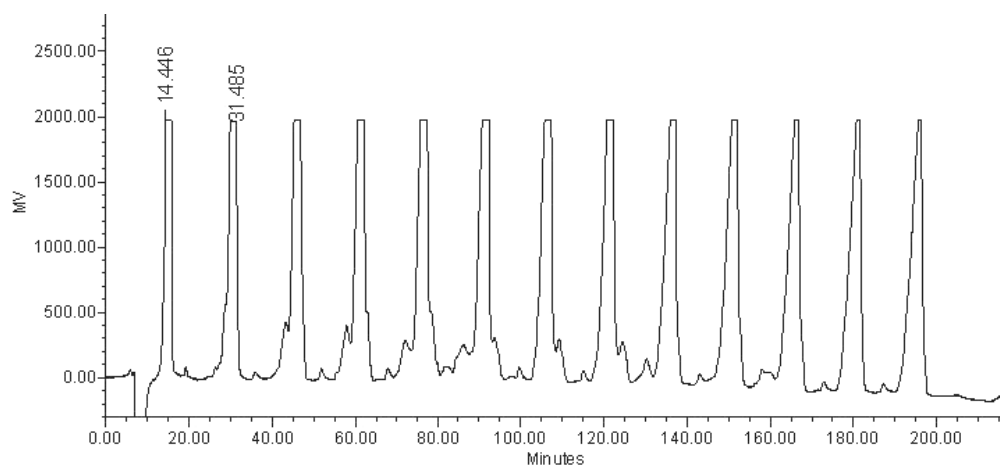


Figura 45. Cromatograma de líquidos de la subfracción **B**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la **estoloniferina III**. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (19 × 300 mm, 7 μ m); fase móvil: CH_3CN -MeOH (9:1); flujo de elución: 7 ml/min; volumen de inyección la muestra: 500 μ l (30 mg/ml).

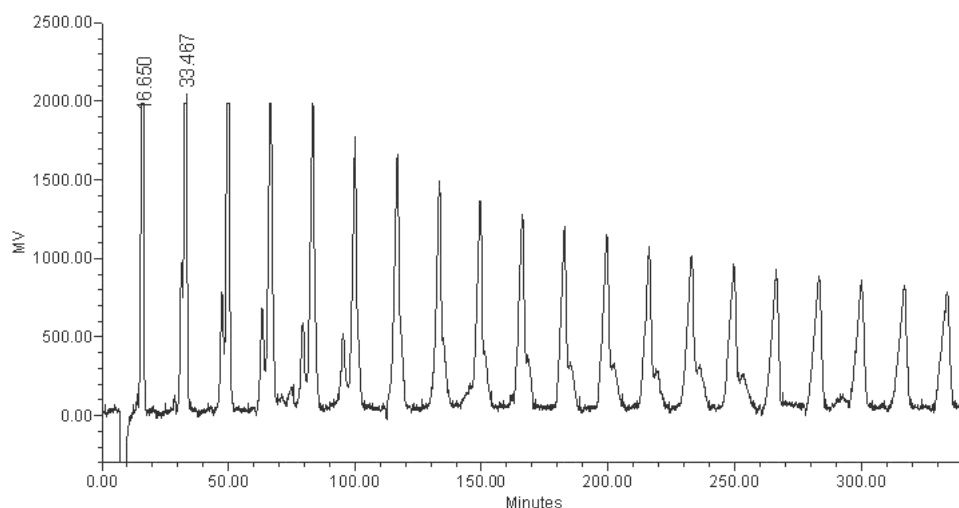


Figura 46. Cromatograma de líquidos de la subfracción **D**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la **pescapreína II**. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (19 × 300 mm, 7 μ m); fase móvil: CH_3CN -MeOH (9:1); flujo de elución: 7 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μ l (15 mg/ml).

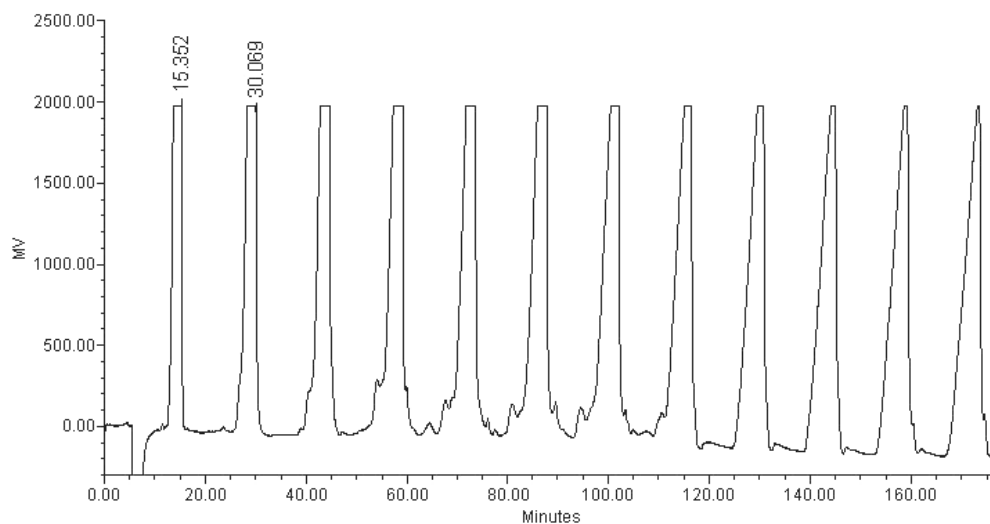


Figura 47. Cromatograma de líquidos de la subfracción **G**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la **pescapreína III**. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (19 × 300 mm, 7 μ m); fase móvil: CH_3CN -MeOH (9:1); flujo de elución: 9 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μ l (30 mg/ml).

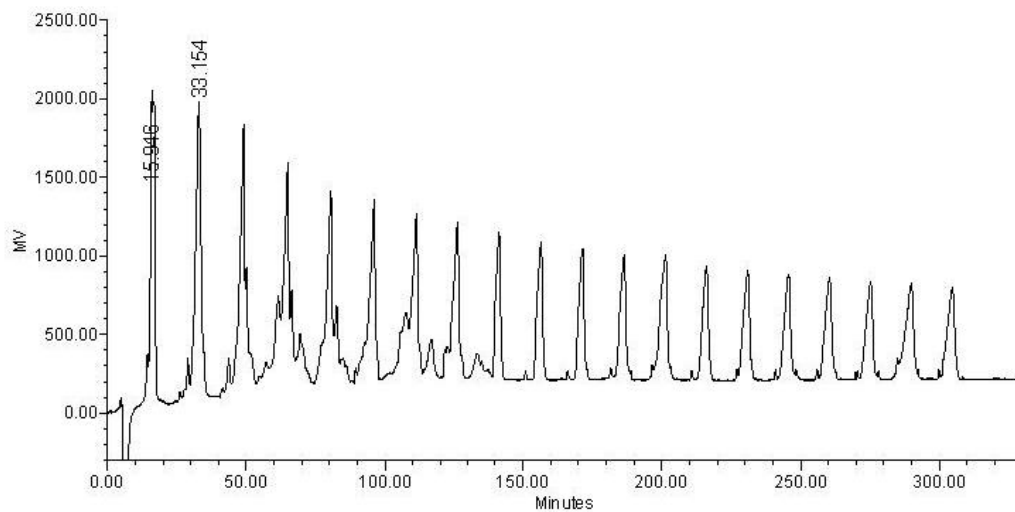


Figura 48. Cromatograma de líquidos de la subfracción **H**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la **pescapreína IV**. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (19 × 300 mm, 7 μ m); fase móvil: CH_3CN -MeOH (9:1); flujo de elución: 9 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μ l (30 mg/ml).

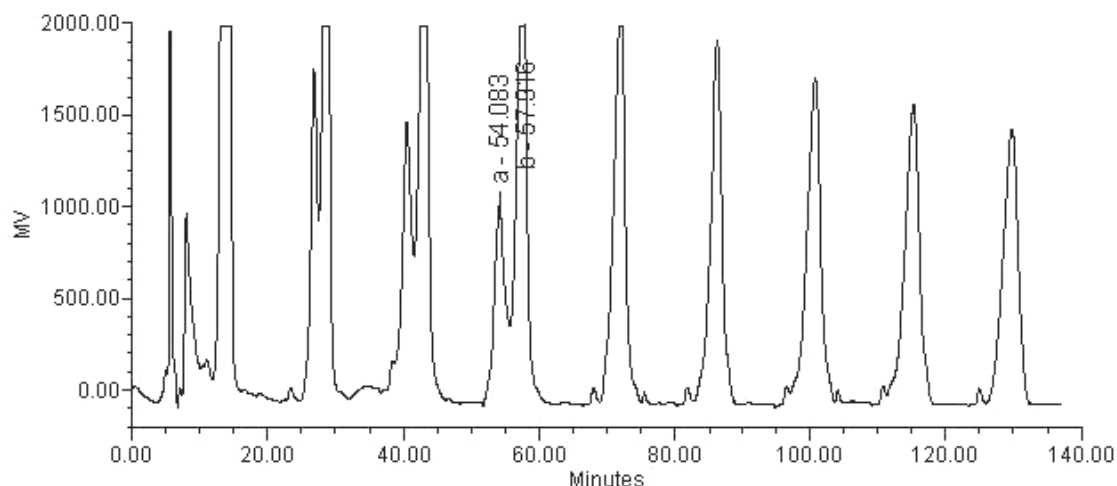


Figura 49. Cromatograma de líquidos de la subfracción **C**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la **pescapreína VIII**. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (19 × 300 mm, 7 μ m); fase móvil: CH_3CN -MeOH (9:1); flujo de elución: 9 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μ l (30 mg/ml).

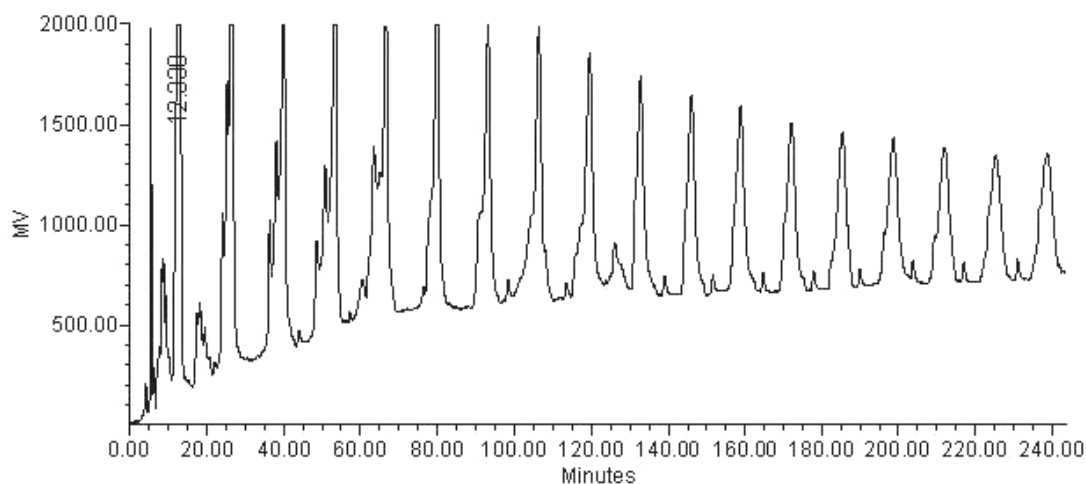


Figura 50. Cromatograma de líquidos de la subfracción **E**. Aplicación del reciclaje de la muestra para la purificación de la **pescapreína IX**. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (19 × 300 mm, 7 μ m); fase móvil: CH_3CN -MeOH (9:1); flujo de elución: 9 ml/min; volumen de inyección de la muestra: 500 μ l (30 mg/ml).

6.6. Purificación de los glicolípidos individuales: Segunda colecta.

6.6.1. Obtención del Pescaprosido B

El empleo del sistema cromatográfico de líquidos a nivel preparativo permitió la aplicación de las técnicas de sobrecarga de columna y corte del núcleo (Bidlingmyer, 1992) a la fracción **2Hex.IpVI** (0.6083g) (ver apartado 5.3.2.) para conseguir el aislamiento de la pescapreína III, el pescaprosido B y, nuevamente, la obtención del pescaprosido A. Para ello, fue necesario establecer las condiciones analíticas de máxima resolución para la fracción **2Hex.IpVI** y, posteriormente, escalarlas a nivel preparativo (Figura 51) para lograr su fraccionamiento hasta agotar la fracción. Este procedimiento resultó en la obtención de 4 picos mayoritarios (ver figura 1): **2Hex.IpVI-1** ($t_R = 32.9$ min), **2Hex.IpVI-2** ($t_R = 38.4$ min), **2Hex.IpVI-3** ($t_R = 44.7$ min), y **2Hex.IpVI-4** ($t_R = 55.6$ min). Sus rendimientos se incluyen en el cuadro 8.

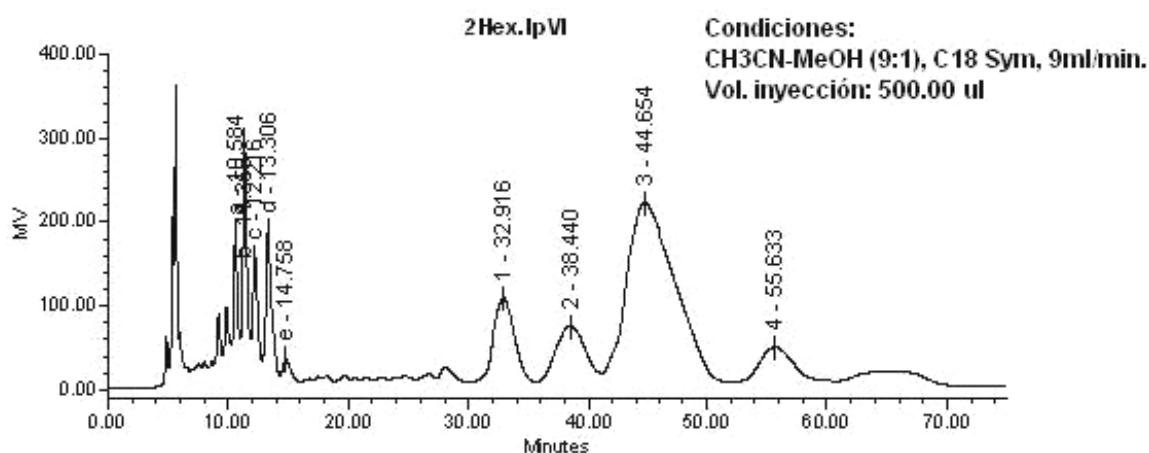


Figura 51. Perfil cromatográfico obtenido de la fracción 2Hex.IpVI.

Cuadro 8. Rendimiento de la fracción IpVI

Muestra	Peso (mg)
2Hex.IpVI-1	78.4
2Hex.IpVI-2	72.4
2Hex.IpVI-3	378.6
2Hex.IpVI-4	57.8

De este fraccionamiento se decidió purificar, en primer lugar, al constituyente mayoritario, el cual correspondió al pico de mayor rendimiento asignado con la clave **2Hex.IpVI-3** (378.60mg) que se sometió nuevamente a condiciones preparativas de cromatografía líquida de alta eficacia, resolviéndose en 6 picos. Los rendimientos obtenidos para cada pico se muestran en el cuadro 9.

Cuadro 9. Rendimiento de la fracción 2Hex.IpVI-3

Muestra	Peso (mg)
2Hex.IpVI-3-1	13.4
2Hex.IpVI-3-2	10.5
2Hex.IpVI-3-3	4.8
2Hex.IpVI-3-4	3.8
2Hex.IpVI-3-5	60.2
2Hex.IpVI-3-6	216.7

Sin embargo, este fraccionamiento que utilizó como fase de elución CH₃CN–MEOH (9:1), no resultó ser el óptimo para la resolución del pico mayoritario, por lo que se modificaron las condiciones de la fase móvil para lograr la purificación del constituyente mayoritario, asignado con la clave **2Hex.IpVI-3-6** (216.7mg). Este se sometió nuevamente a condiciones preparativas de cromatografía líquida de alta eficacia, resolviéndose en 5 picos (figura 52), purificándose al mismo tiempo el compuesto asignado con la clave **2Hex.IpVI-3-**

6e (27.4mg) (ver los rendimientos obtenidos en el cuadro 10), mediante la técnica de reciclaje del mismo pico.

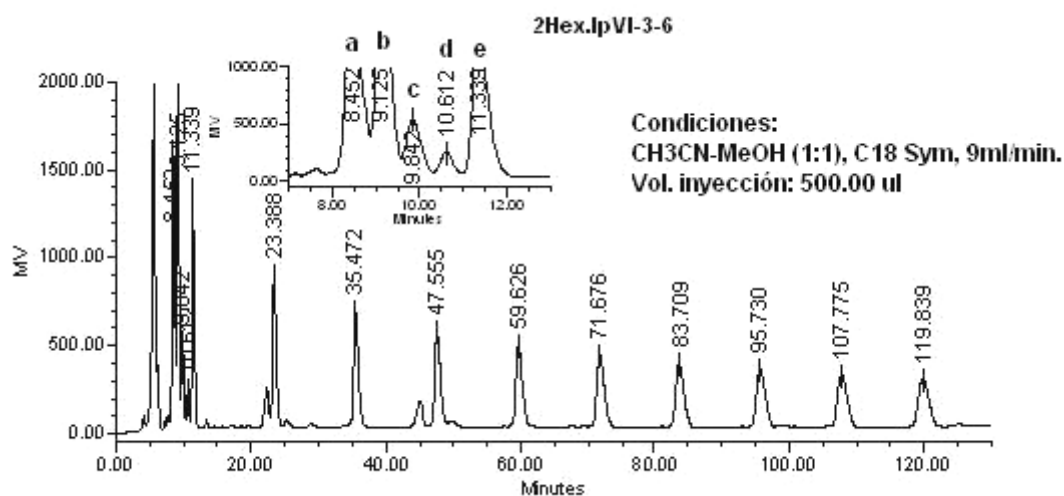


Figura 52. Fraccionamiento en cromatografía líquida de alta eficiencia y reciclaje del pico asignado con la clave 2Hex.lpVI-3-6e de la planta *Ipomoea pes-caprae*.

Cuadro 10. Rendimiento de la fracción 2Hex.lpVI-3-6

Muestra	Peso (mg)
2Hex.lpVI-3-6a	37.7
2Hex.lpVI-3-6b	38.4
2Hex.lpVI-3-6c	12.9
2Hex.lpVI-3-6d	7.6
2Hex.lpVI-3-6e	27.4

De los otros picos se decidió continuar con la purificación de **2Hex.lpVI-3-6a** y **2Hex.lpVI-3-6d** mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna, utilizándose de 5 a 15 ciclos para obtener la máxima resolución lo que nos garantizó una pureza mayor al 99% de los compuestos (ver figura 53).

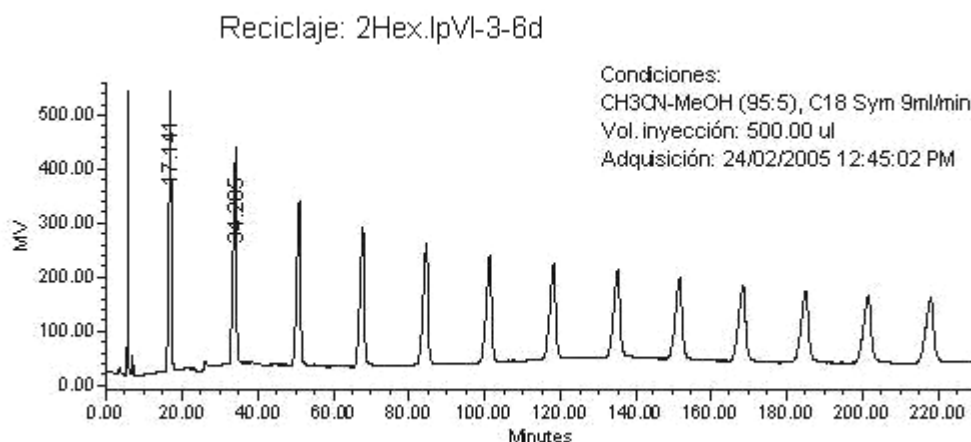


Figura 53. Purificación del pico 2Hex.IpVI-3-6d mediante la técnica conocida como “de rasurado del pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna.

Estos 3 compuestos purificados y asignados con las claves **2Hex.IpVI-3-6a** (23.3 mg), **2Hex.IpVI-3-6d** (2.5 mg) y **2Hex.IpVI-3-6e** (7.6 mg) se enviaron a resonancia magnética nuclear (RMN 400-500 MHz) para así obtener la asignación total de los espectros de RMN-¹H y ¹³C que fue apoyada en experimentos mono- y bidimensionales (COSY, TOCSY, NOESY, ROESY, HMQC, HMBC).

Cabe señalar, en base al cromatograma de la figura 52, el pico con tiempo de retención de 8.4 min correspondió al pescaprósido A, caracterizado en el extracto de la primera colecta de partes aéreas silvestres; el pico con tiempo de retención de 10.6 min correspondió al **pescaprósido B** y el pico con tiempo de retención de 11.3 min correspondió a la pescapreína III anteriormente aislada de la fracción FV.

6.6.2. Obtención de la Pescapreína VII

La fracción **2Hex.IpVI-1** (Cromatograma de la figura 51) se analizó en una columna C₁₈ preparativa con un sistema de elución binario constituido por CH₃CN–MeOH(9:1), lográndose su resolución en 8 picos (figura 54). Los rendimientos obtenidos para cada pico se muestran en el cuadro 11.

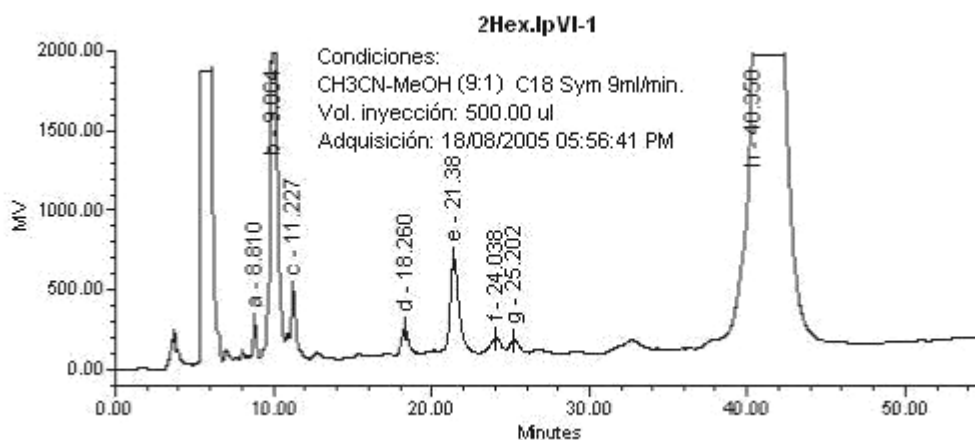


Figura 54. Perfil cromatográfico de la fracción 2Hex.IpVI

Cuadro 11. Rendimiento de la fracción 2Hex.IpVI-1

Subfracción	Peso (mg)
2Hex.IpVI-1a	1.4
2Hex.IpVI-1b	9.6
2Hex.IpVI-1c	0.9
2Hex.IpVI-1d	0.9
2Hex.IpVI-1e	2.4
2Hex.IpVI-1f	1.0
2Hex.IpVI-1g	0.6
2Hex.IpVI-1h	48.3

Al analizar este perfil cromatográfico (figura 54), se decidió modificar la polaridad del sistema de elución binario y cambiarlo a un sistema de

CH₃CN–MeOH (55:45) para mejorar la resolución del constituyente mayoritario, asignado con la clave **2Hex.IpVI-1h** (48.3 mg). El pico colectado con un tiempo de retención de 40.35 min, se sometió nuevamente a un análisis CLAE (fase móvil, CH₃CN–MeOH 55:45; columna, fase reversa C₁₈; flujo, 9 mL/min.). Este procedimiento resultó en la obtención de 5 picos (ver figura 55): **2Hex.IpVI-1h1** ($t_R = 7.4$ min), **2Hex.IpVI-1h2** ($t_R = 7.9$ min), **2Hex.IpVI-1h3** ($t_R = 8.7$ min) **2Hex.IpVI-1h4** ($t_R = 9.3$ min), y **2Hex.IpVI-1h5** ($t_R = 10.2$ min). Los rendimientos se incluyen en el cuadro 12. Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra (Kubo *et al.*, 1990), utilizándose de 10 a 20 ciclos para obtener la máxima separación de los constituyentes de estas subfracciones (ver figura 56). De esta forma se logró la purificación del compuesto asignado con la clave **2Hex.IpVI-1h5** (15 mg).

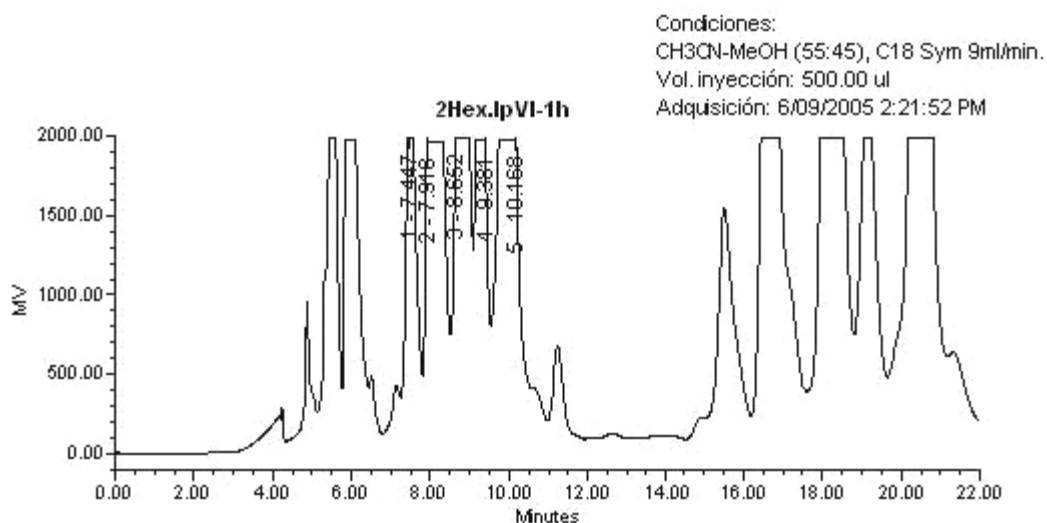


Figura 55. Fraccionamiento de la subfracción 2Hex.IpVI-1h y reciclaje del pico asignado con la clave 2Hex.IpVI-1h.

Cuadro 12. Rendimiento de la fracción 2Hex.lpVI-1h

Subfracción	Peso (mg)
2Hex.lpVI-1h1	3.0
2Hex.lpVI-1h2	10.6
2Hex.lpVI-1h3	9.8
2Hex.lpVI-1h4	3.9
2Hex.lpVI-1h5	15.0

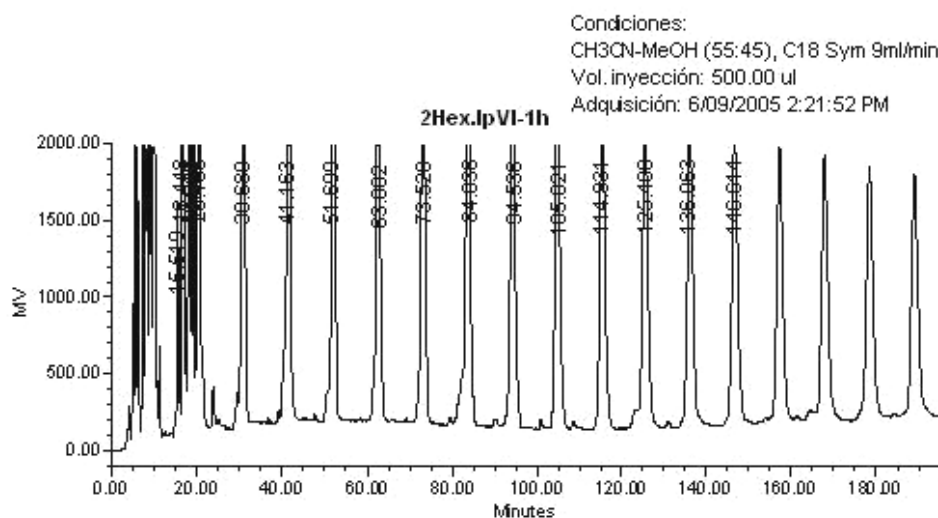


Figura 56. Reciclaje del pico asignado con la clave 2Hex.lpVI-1h5.

De los picos restantes, se decidió continuar con la purificación de los asignados con la clave **2Hex.lpVI-1h2** y **2Hex.lpVI-1h4**. Se utilizaron las mismas técnicas de rasurado del pico y a continuación el reciclaje a través de la misma columna por más de 10 ciclos para obtener la máxima resolución. Al igual que todos los anteriores, se realizó el registro de los experimentos de resonancia magnética nuclear de los tres compuestos purificados y asignados con las claves **2Hex.lpVI-1h2** (6.4 mg), **2Hex.lpVI-1h4** (1.2 mg) y **2Hex.lpVI-1h5** (15.0 mg) para

lograr la asignación total de los espectros de RMN-¹H (500 MHz) y ¹³C (125 MHz). Cabe señalar que con base en el cromatograma ilustrado en la figura 51, el pico con tiempo de retención de 7.9 min correspondió a la molécula asignada con la clave **2Hex.IpVI-1h2 (pescapreína VII)**, molécula de estructura novedosa; del pico con tiempo de retención de 9.38 minutos no fue posible la elucidación de su estructura ya que su bajo rendimiento impidió el registro de un espectro adecuado, no así para el pico con tiempo de retención de 10.2 minutos que correspondió a la **estoloniferina III**, previamente purificada a partir del extracto proveniente de la primera colecta.

6.7. Purificación de los glicolípidos individuales: Material comercial.

6.7.1. Verificación de los oligosacáridos mayoritarios presentes en el extracto hexánico

Antes de iniciar el análisis cromatográfico mediante CLAE de la subfracciones generadas en el fraccionamiento primario del extracto preparado con la muestra comercial (3Hex.Ip I–XII) fue necesario eliminar la presencia de pigmentos fotosintéticos mediante una decoloración con carbón activado. Los rendimientos de cada una de las fracciones se incluyen en el Cuadro 13.

Las pruebas preliminares analíticas para lograr la resolución de las mezclas y obtener una máxima separación de los glicolípidos individuales se efectuaron en una columna analítica de fase reversa (C₁₈) con detección en el índice de

refracción y una fase móvil compuesta de CH₃CN–MeOH (9:1) y con un flujo de elución de 0.7 mL.

Cuadro 13. Rendimiento del fraccionamiento primario del extracto 3Hex.lp (muestra comercial)

Fracción	Peso (mg)
3Hex.lpI	280
3Hex.lpII	2000
3Hex.lpIII	290
3Hex.lpIV	500
3Hex.lpV	5880
3Hex.lpVI	1520
3Hex.lpVII	690
3Hex.lpVIII	970
3Hex.lpIX	2919
3Hex.lpVX	940
3Hex.lpVXI	2230
3Hex.lpVXII	221.7

Cabe señalar que la comparación del perfil cromatográfico generado por cada una de las fracciones 3Hex.lp VII, 3Hex.lp VIII...Hex.lp X (Figuras 57-60) con el registrado para la fracción lpV (Figura 44, ver apartado 6.5.3.) analizada previamente, permitió observar una coincidencia en los tiempos de retención de los picos que se resuelven antes de los 18 minutos. Por lo tanto, se detectó la presencia en estas cuatro fracciones de las pescapreínas II, III y IV ($t_R=13.55$, 16.12 y 17.53, respectivamente) que constituyen tres de los glicolípidos mayoritarios caracterizados en la primera colecta del material vegetal (véase Figura 44). Para facilitar la comparación entre cada uno de los perfiles cromatográficos, se utilizó a la pescapreína III, principal constituyente de las

cuatro primeras fracciones analizadas. Este compuesto corresponde en el cromatograma de la figura 57 al pico con el $t_R = 12.88$ min; para la figura 58 el pico con el $t_R = 11.24$ min; para la figura 59 el pico con el $t_R = 10.11$ min; y para la figura 60 el pico con el $t_R = 9.75$.

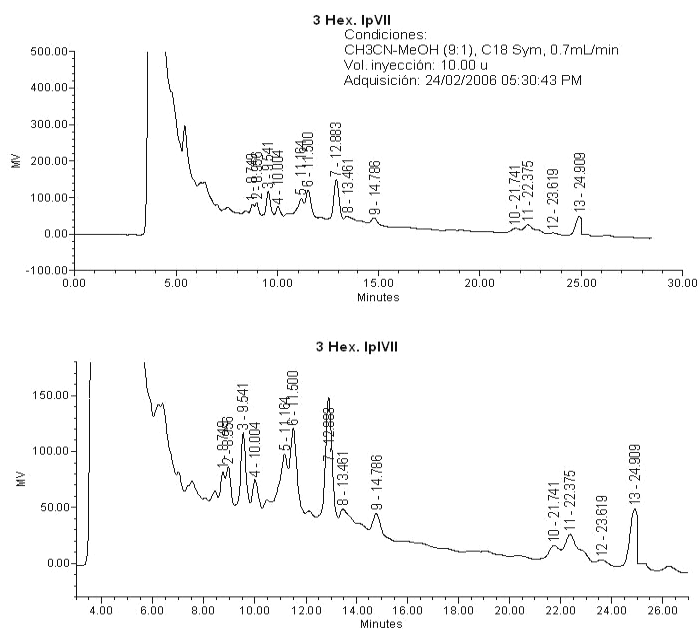


Figura 57. Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.IpVII

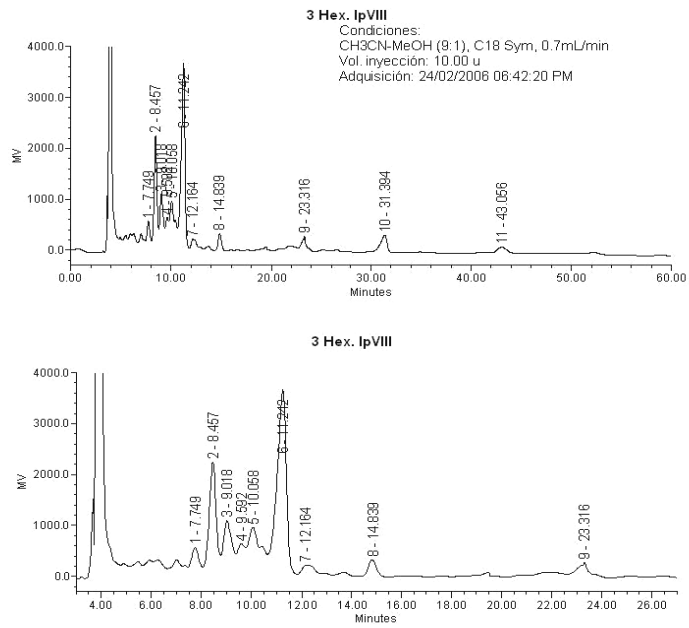


Figura 58. Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.IpVIII.

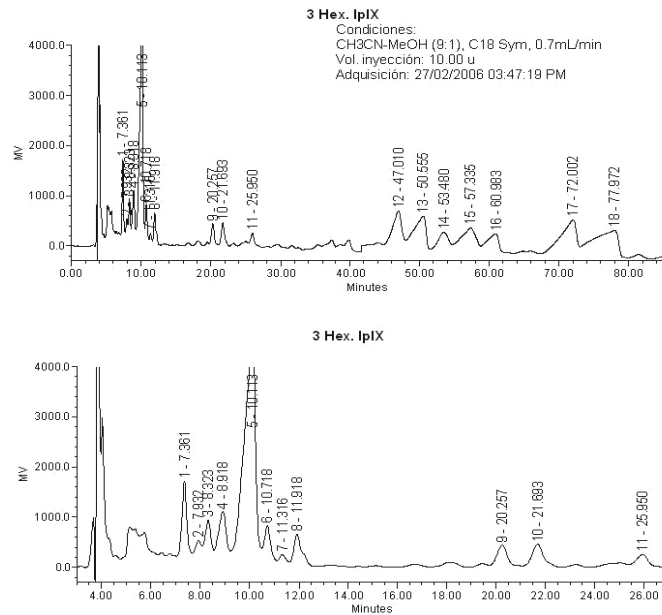


Figura 59. Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.IpXI

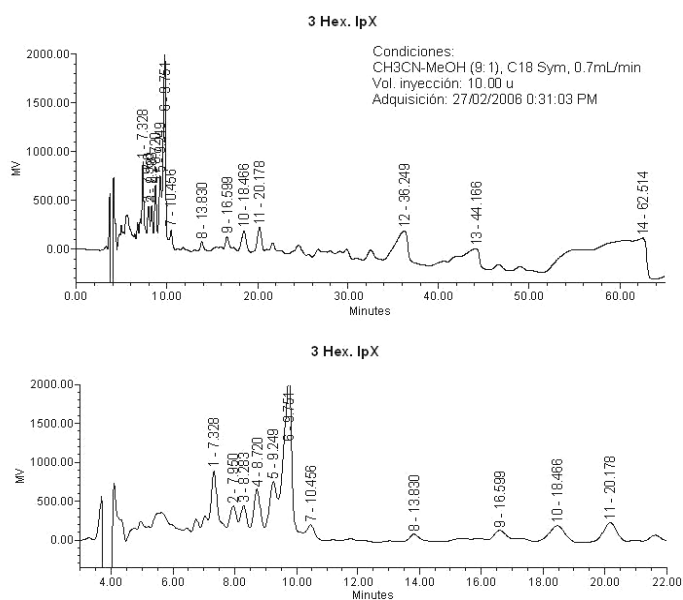


Figura 60. Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.IpX.

Las fracciones 3Hex.IpXI y 3Hex.IpXII se analizaron utilizando las mismas condiciones cromatográficas descritas anteriormente (sistema de elución: CH₃CN–MeOH, 9:1). Sin embargo, no se logró una resolución aceptable por lo que fue necesario modificar las condiciones de la fase móvil. Para este segundo análisis, se utilizó CH₃CN–MeOH (8:2) que permitió la generación del perfil cromatográfico que se ilustra en las figuras 61 y 62.

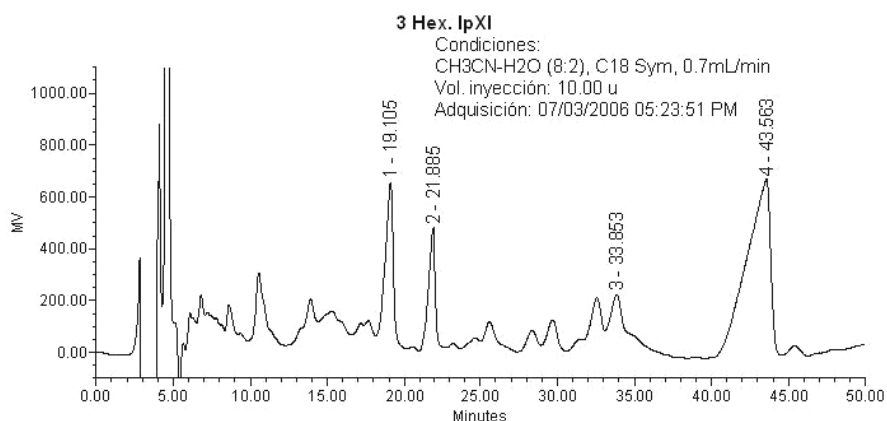


Figura 61. Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.IpXI

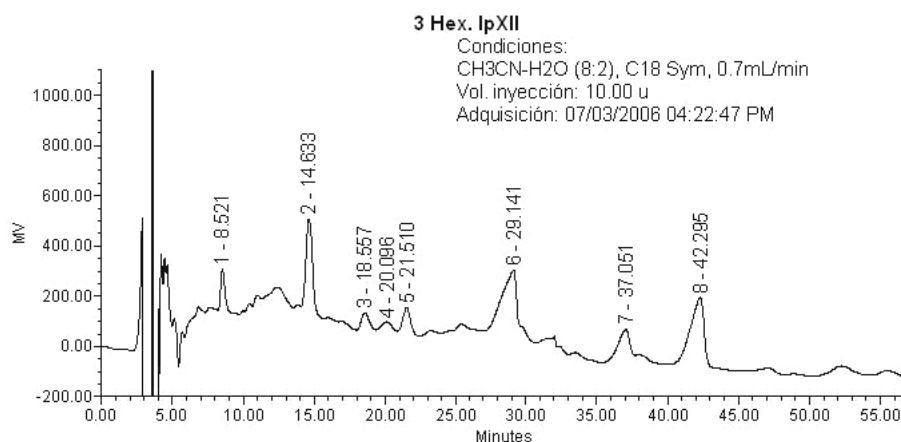


Figura 62. Perfil cromatográfico de la fracción 3Hex.IpXII.

6.7.2. Obtención de las Pescapreínas X, XI y XII

Las condiciones analíticas utilizadas para la resolución de la fracción 3Hex.Ip XI (figura 61) fueron extrapoladas a nivel preparativo, colectándose 4 picos de interés (3Hex.IpXI-1, $T_R = 19.10$ min.; 3Hex.IpXI-2, $T_R = 21.88$ min.; 3Hex.IpXI-3, $T_R = 33.85$ min.; 3Hex.IpXI-4, $T_R = 43.56$ min.), que a pesar de su bajo rendimiento, garantizaban la presencia de glicolípidos con una estructura

novedosa ya que no se realizaron los análisis de las fracciones más polares provenientes de los extractos hexánicos del material vegetal correspondiente a las dos colectas. Los rendimientos de cada pico se muestran en el cuadro 14

Cuadro 14. Rendimiento del fraccionamiento primario del extracto 3Hex.lpXI (extracto comercial)

Fracción	Peso (mg)
3Hex.lpXI-1	16.4
3Hex.lpXI-2	14.0
3Hex.lpXI-3	24.4
3Hex.lpXI-4	24.3

Los rendimientos de estos cuatro picos colectados fueron muy bajos, sin embargo, cada pico fue analizado por separado bajo condiciones analíticas, mediante cromatografía de líquidos de alta eficiencia, utilizando como sistema de elución CH₃CN/MeOH (9:1), posteriormente estas mismas condiciones se llevaron a nivel preparativo para la purificación de cada uno de los constituyentes individuales mayoritarios. La fracción 3Hex.lpXI-1 (figura 63) se desdobló en dos picos, asignado con las claves 3Hex.lpXI-1a y **3Hex.lpXI-1b**, el segundo pico que encontraba en una mayor concentración se purificó mediante la técnica de “rasurado del pico” y reciclaje a través de la misma columna. La fracción 3Hex.lpXI-2 (figura 64) presentó un perfil idéntico a la anterior (Figura 63), sólo que el primer pico se encontró en mayor proporción y fue asignado con la clave **3Hex.lpXI-2a**. Su purificación se realizó de la misma forma que en el caso anterior. Por su parte, la fracción 3Hex.lpXI-3 se resolvió en tres picos (Figura 65) y cada uno de ellos fue purificado; el pico 3Hex.lpXI-3a mediante la técnica de

“rasurado del pico”, seguida de su reciclaje a través de la misma columna, los picos 3Hex.lpXI-3b y 3Hex.lpXI-3c se colectaron y fueron reinyectados y reciclados en forma independiente. En el caso del pico **3Hex.lpXI-4** que fue el de mayor rendimiento, no presentó más picos y su rendimiento fue aceptable después de reciclarlo (Figura 66).

Los seis compuestos purificados y que se designaron con las claves **3Hex.lpXI-1b** (4.7 mg), **3Hex.lpXI-2a** (2.7 mg), **3Hex.lpXI-3a** (3.4 mg), **3Hex.lpXI-3b** (2.3 mg), **3Hex.lpXI-3c** (2.1 mg) y **3Hex.lpXI-4** (22.3 mg) fueron sometidos al análisis espectroscópico rutinario para llevar al cabo su elucidación estructural.

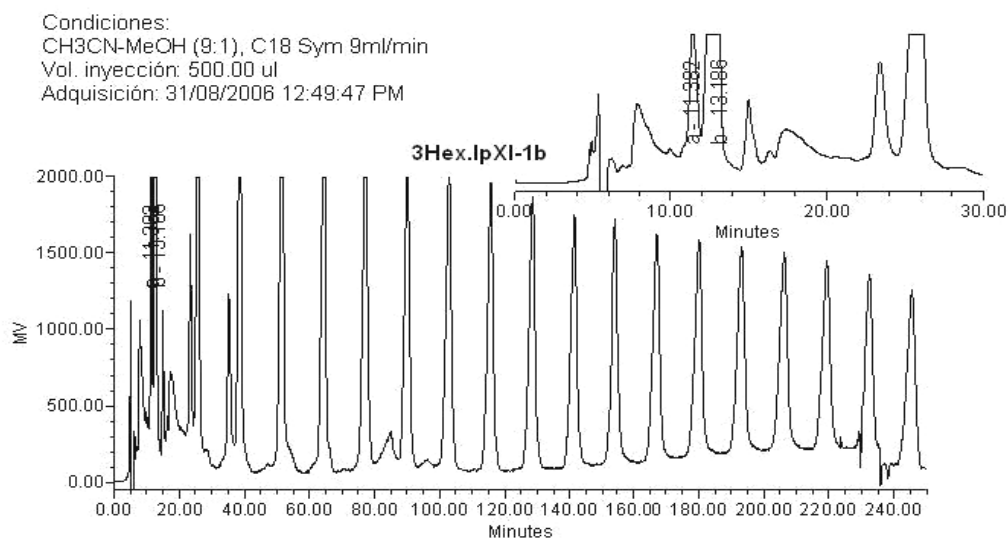


Figura 63. Purificación del pico 3Hex.lpXI-1b

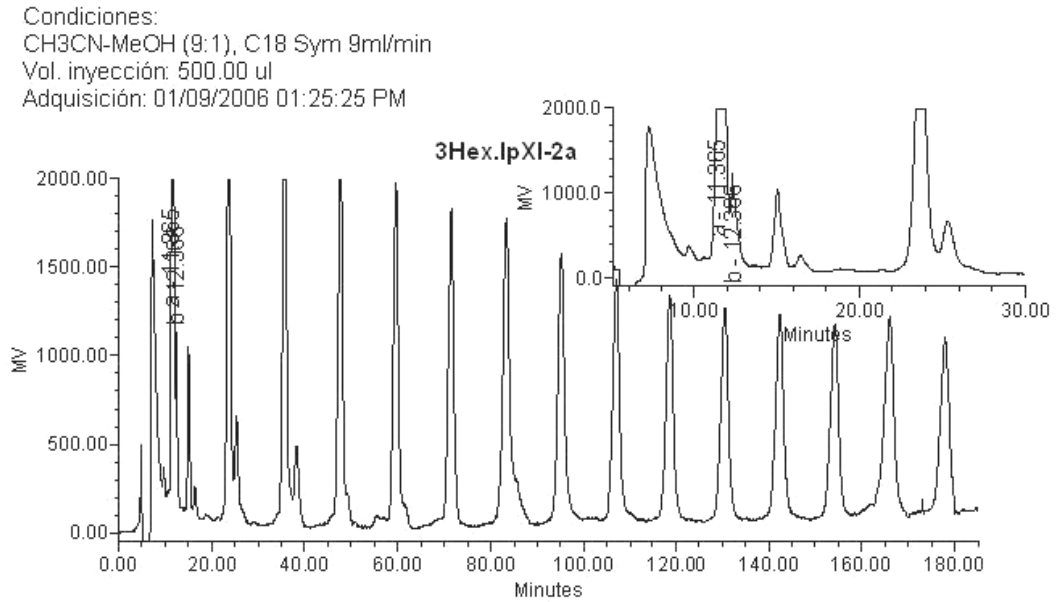


Figura 64. Purificación del pico 3Hex.IpXI-1b

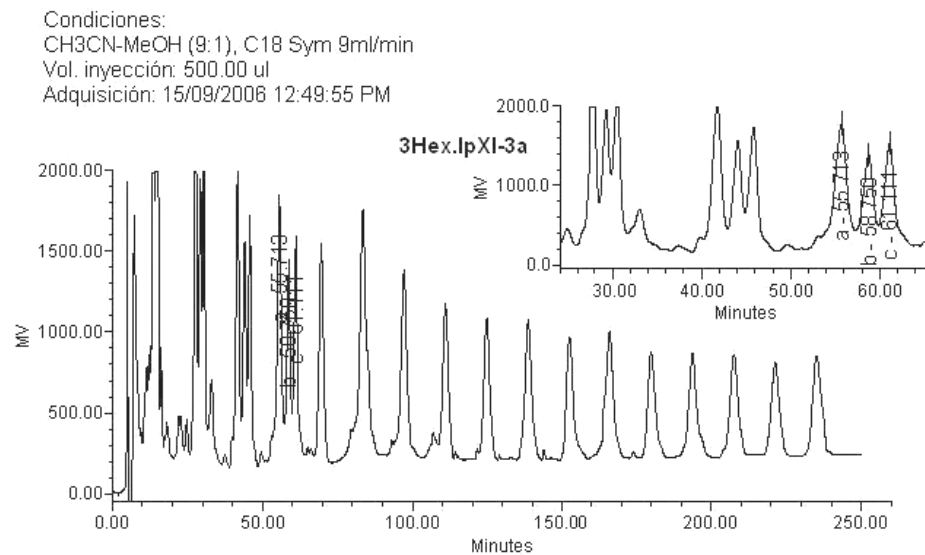


Figura 65. Purificación del pico 3Hex.IpXI-3a y rasurado de los picos 3Hex.IpXI-3b y 3Hex.IpXI-3c

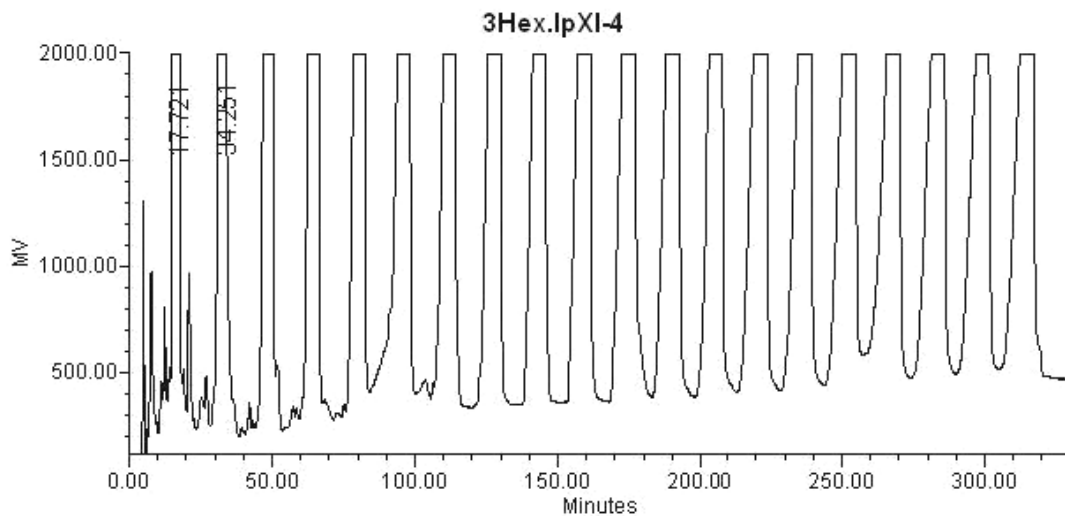


Figura 66. Purificación del pico 3Hex.lpXI-4

Cabe señalar que el reciclaje de los picos asignados con las claves **3Hex.lpXI-2a**, **3Hex.lpXI-3b**, **3Hex.lpXI-4** proporcionaron compuestos anteriormente aislados de la primera colecta y que correspondieron a la **estoloniferina III** y las **pescapreínas II** y **III**, respectivamente. Por último, los picos asignado con las claves **3Hex.lpXI-1b**, **3Hex.lpXI-3a** y **3Hex.lpXI-3c** correspondieron a las **pescapreínas X XI** y **XII**.

6.8. Elucidación estructural del ácido glicosídico

El registro de los espectros unidimensionales de RMN ^1H (Figura 67) y ^{13}C (Figura 68) del derivado peracetilado del éster metílico del ácido glicosídico fue el primer paso realizado para obtener información general acerca de la estructura del núcleo oligosacárido constitutivo de la resinas glicosídicas de la riñonina. La primera observación importante fue el número de señales dobletes observadas entre los desplazamientos químicos de 1 a 2 ppm en el espectro de RMN ^1H (Figura 67). Éstas corresponden a los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas y son señales diagnósticas, que junto con el número de señales singuletes características de los grupos metilo de unidades de acetato presentes entre 2 y 2.5 ppm (Figura 67), fueron las evidencias necesarias para establecer que el número de unidades monosacáridas presentes en el núcleo oligosacárido mayoritario (el ácido simónico B) era de cinco y todas correspondían a metilpentosas.

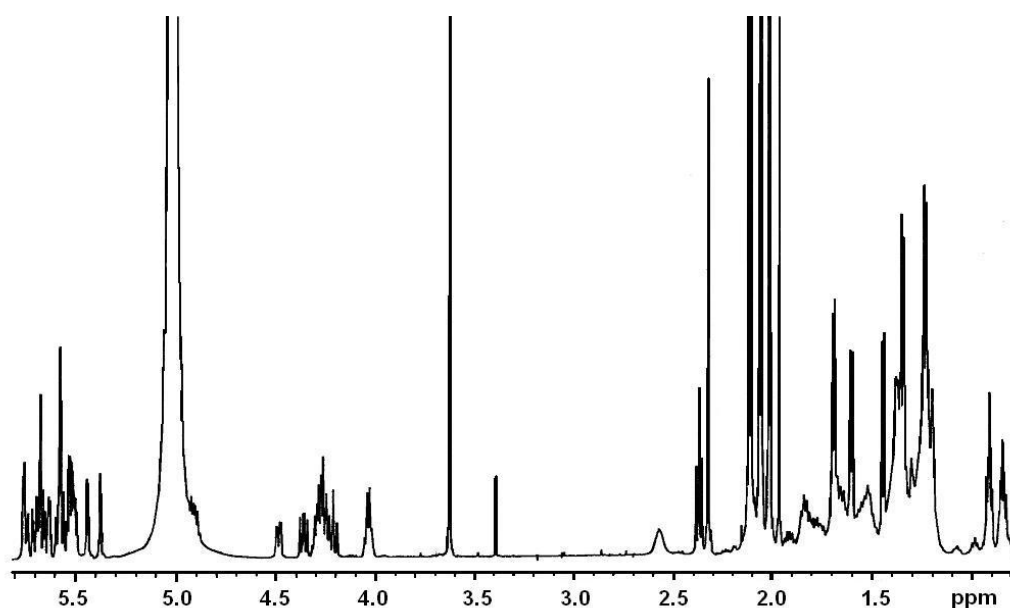


Figura 67. Espectro de RMN ^1H del derivado peracetilado-metilado FV-SAM.

Con el auxilio de las técnicas espectroscópicas bidimensionales en la RMN (COSY, TOCSY) y, al considerar que el núcleo está compuesto por cinco metilpentosas, además de que éstas son en su mayoría de naturaleza ramnosa (véase el análisis de carbohidratos descrito en el apartado 6.2), se pudo resolver la asignación de las señales para los protones de los metinos centrados entre 4.0-5.7 ppm (Figura 67). Esta zona presentó una gran complejidad producto de la sobreposición de las señales. Se logró identificar la presencia de la fucosa como la quinta unidad sacárida del núcleo oligoscárido a través de los valores para las constantes de acoplamiento observados para esta unidad sacárida (Pereda-Miranda *et al.*, 2003). Finalmente, las correlaciones a larga distancia $^{2,3}J_{CH}$ permitieron establecer la secuencia de glicosidación y proponer la estructura molecular del ácido glicosídico.

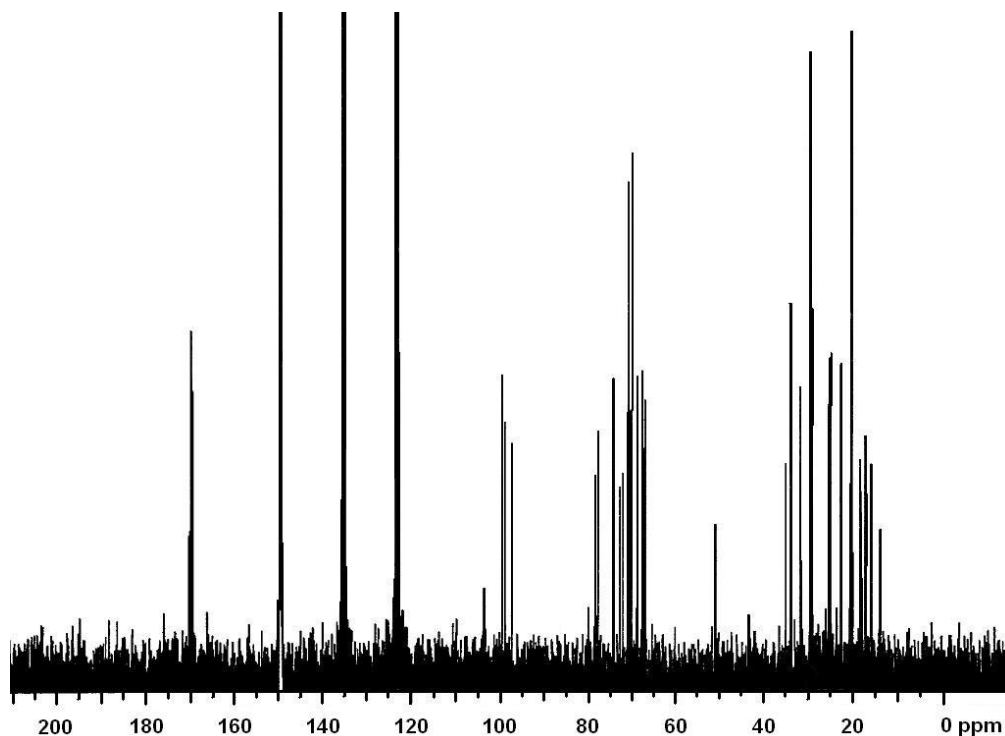


Figura 68. Espectro de RMN ^{13}C del derivado peracetilado-metilado FV-SAM

El procedimiento de asignación se inició localizando las señales mejor resueltas y diagnósticas, e.g., H₂ para la fucosa, así como las cinco señales anoméricas y H₄ para una de las unidades de ramnosa. Como segundo paso, se establecieron los cuadros de conectividades para estas señales en el experimento COSY como se ilustra en la Figura 69.

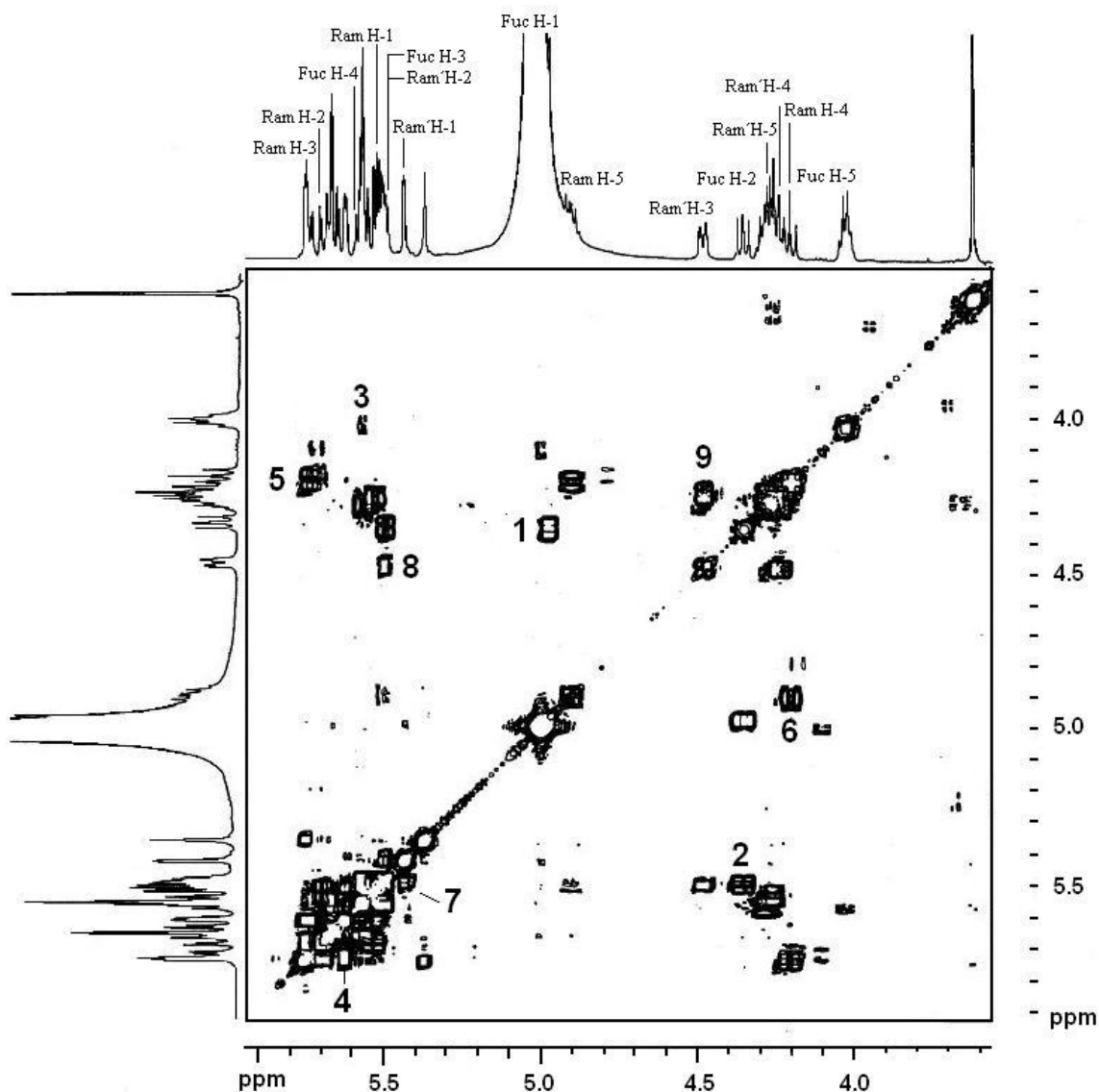


Figura 69. Sección del espectro COSY para la porción oligosacárida del ácido glicosídico B. Correlaciones ($^3J_{H-H}$): **1**; Fuc H₁-H₂, **2**; Fuc H₂-H₃, **3**; Fuc H₄-H₅, **4**; Ram H₂-H₃, **5**; Ram H₃-H₄, **6**; Ram H₄-H₅, **7**; Ram' H₁-H₂, **8**; Ram' H₂-H₃, **I**; Ram' H₃-H₄.

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

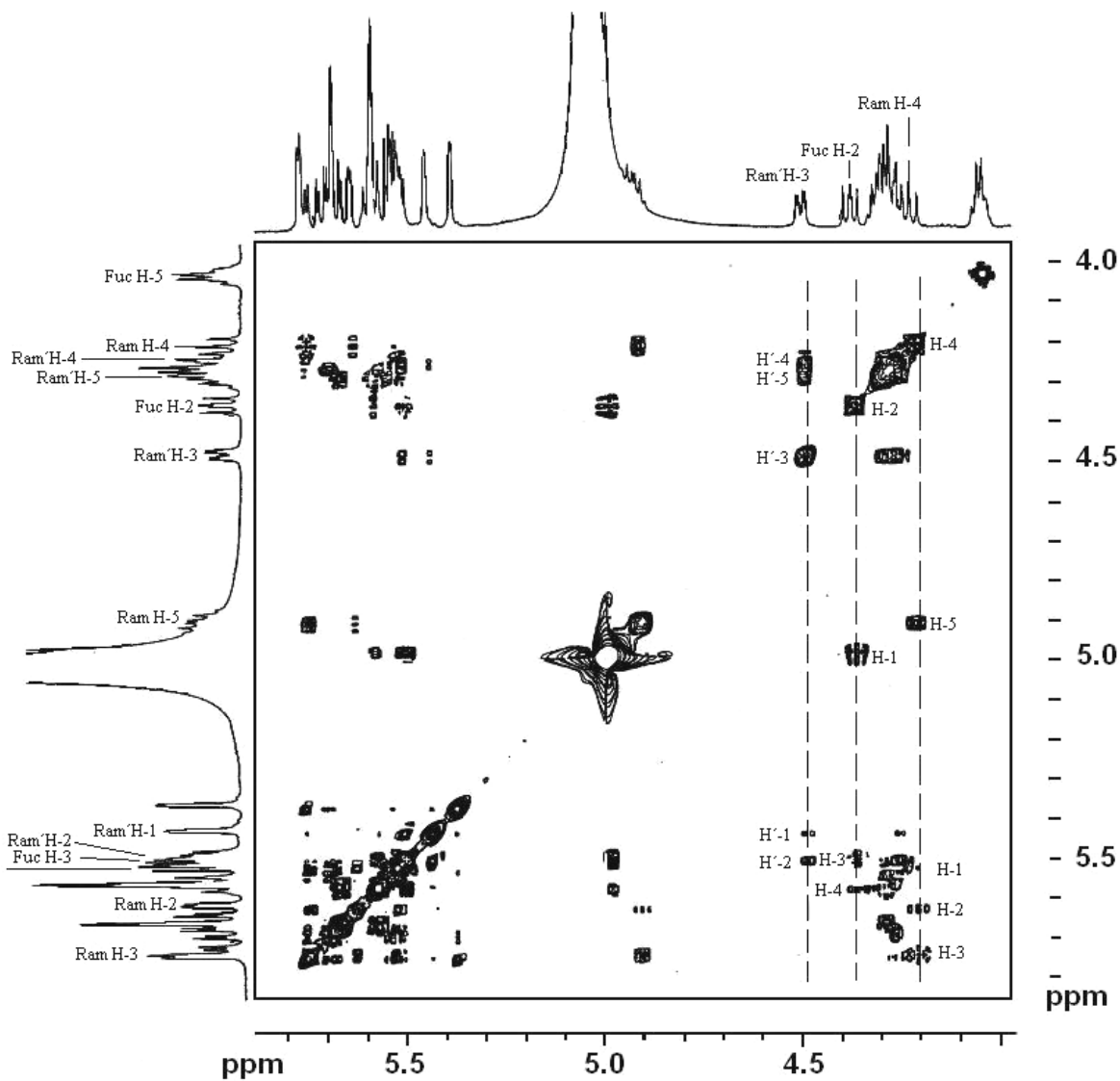


Figura 70. Sección del espectro **TOCSY** para la porción oligosacárida del ácido glicosídico. Abreviaciones: Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior.

En las Figuras que ilustran los espectros COSY (Figura. 69) y TOCSY (Figura. 70), se aprecia que la asignación de las resonancias para la porción sacárida sólo fue posible para tres metilpentosas que incluyen a la fucosa y a dos unidades de ramnosa. Las tres unidades monosacáridas se nombran en todos los espectros con las abreviaciones Fuc, Ram y Ram', respectivamente.

Cuadro 15. Desplazamientos químicos en RMN ^1H y ^{13}C del ácido glicosídico peracetilado y metilado FV-SAM.

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

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

* indican señales sobrepuestas.

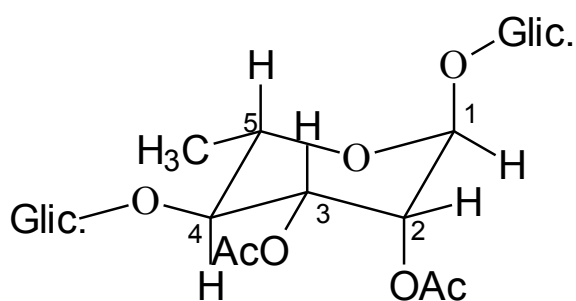
Abreviaciones; s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuadruple. Las asignaciones se basaron en los experimentos ^1H - ^1H COSY y TOCSY.

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

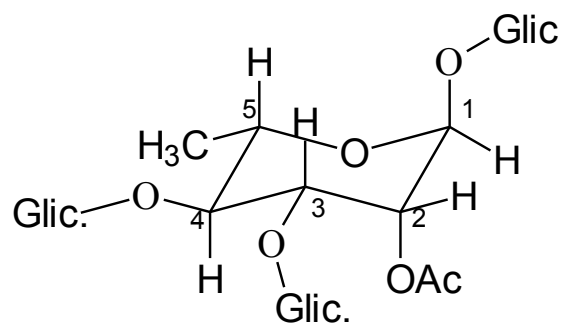
Todas las asignaciones se basan en los experimentos HMQC.

El establecimiento de la secuencia de glicosidación se inició considerando, en primer lugar, los desplazamientos químicos de las señales localizadas fácilmente en los experimentos COSY y TOCSY para las tres metilpentosas. En segundo lugar, partiendo del conocimiento de que los grupos hidroxilo de los azúcares se convirtieron en ésteres de acetato por tratamiento con anhídrido acético y piridina (ver Parte Experimental, apartado 5.4.2) y que esta reacción acetiló sólo a los grupos hidroxilo disponibles en el núcleo oligosacárido original. En los oligosacáridos cualquier grupo hidroxilo de un azúcar puede perder su disponibilidad a la reacción de acetilación al estar enlazado con el carbono anomérico de otro, *i.e.* formando un acetal en los enlaces glicosídicos. Por lo tanto, las señales cuyos desplazamientos químicos aparecieron a campos altos por arriba de 5.3 ppm indicaban las respectivas posiciones de glicosidación de las metilpentosas y, las que estuvieron por debajo correspondían a las posiciones anoméricas y de acetilación. El efecto desprotector del grupo acetato que desplaza las resonancias a campos más bajos con respecto al efecto de los enlaces etéreos glicosídicos hizo posible la distinción de las posiciones que están glicosiladas de aquellas que están acetiladas.

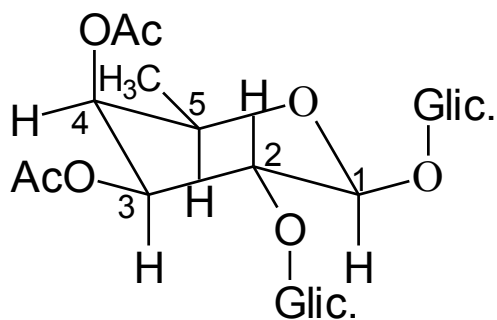
Tomando en cuenta esta explicación, se propuso la situación estructural ilustrada en la Figura 71 para cada una de las tres metilpentosas encontradas. Finalmente, se llegó a la secuencia completa de glicosidación para el compuesto a partir de las principales conectividades observadas en los espectros HMBC, mismas que se ilustran en las Figuras 72 y 73.



α -L-ramnosa (Ram)



α -L-ramnosa (Ram')



β -D-fucosa (Fuc)

Figura 71. Propuestas estructurales para cada una de las tres metilpentosas del núcleo oligosacárido. Abreviaciones: AcO = posición acetilada, Glic. = posición glicosidada.

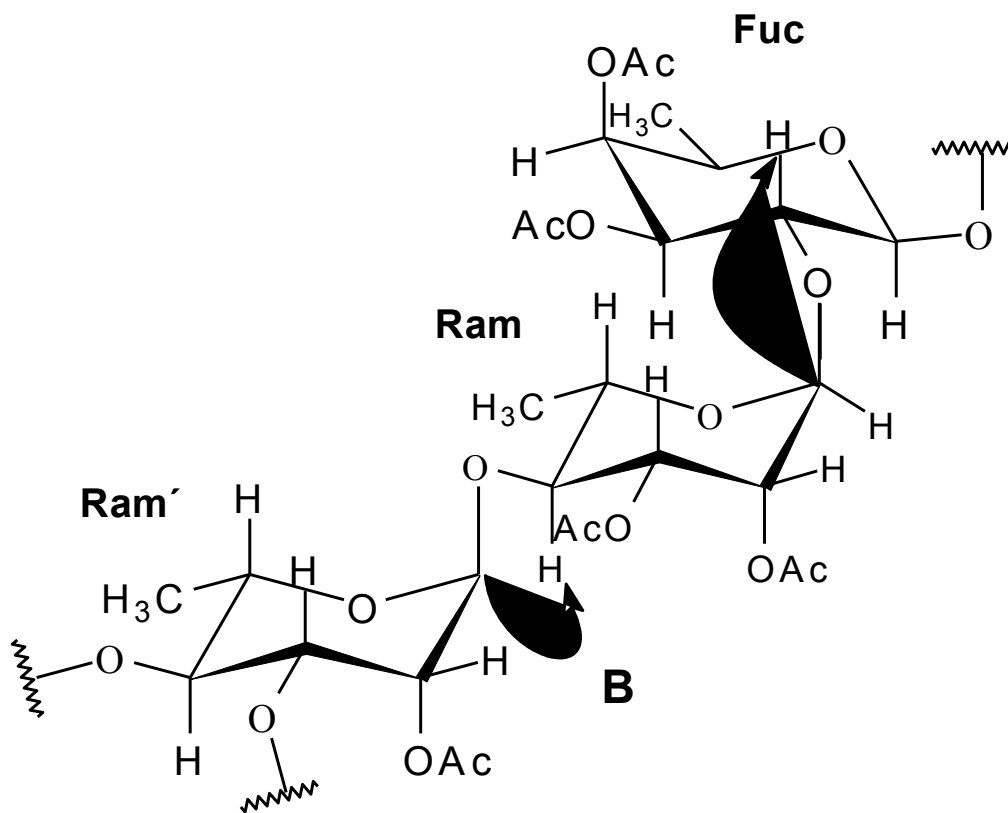
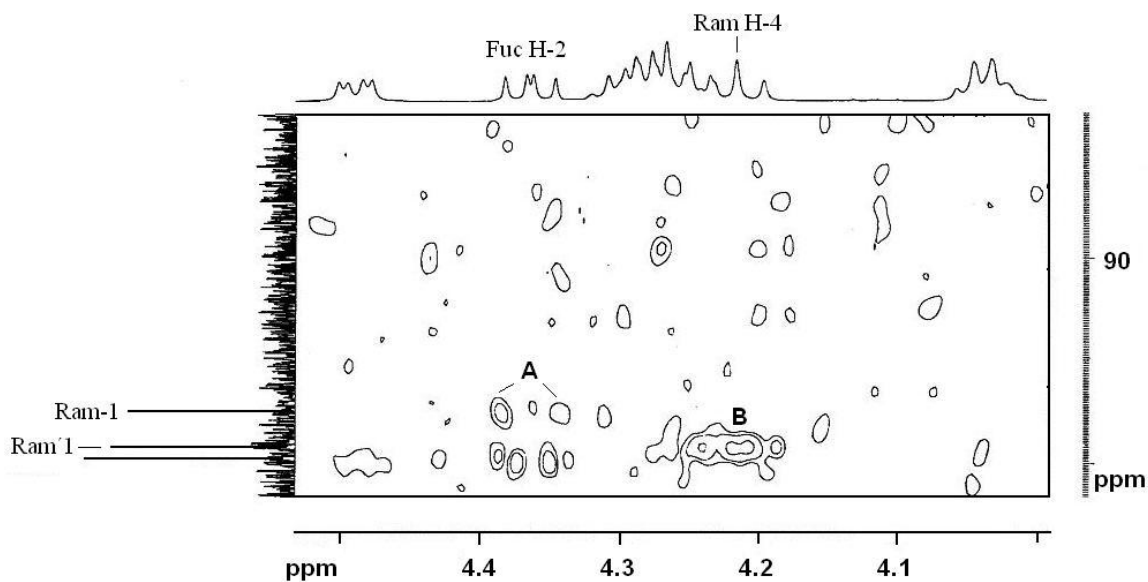


Figura 72. Sección del espectro HMBC y conectividades heteronucleares $^3J_{C-H}$ observadas en el éster metílico del ácido glicosídico peracetilado FV-SAM. Correlaciones: A; C₁Ram-H₂Fuc y B; C₁Ram'-H₄Ram.

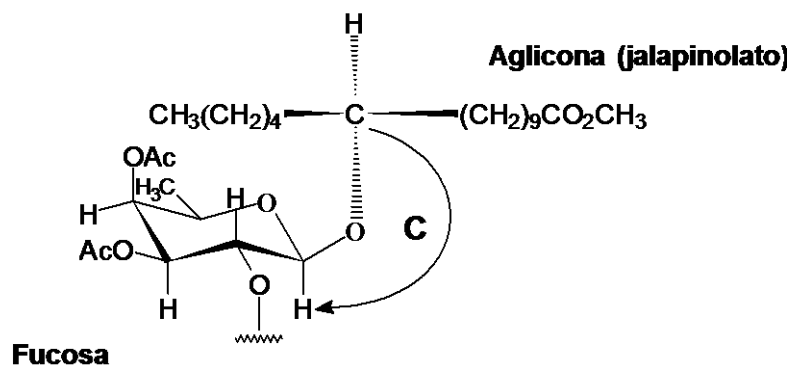
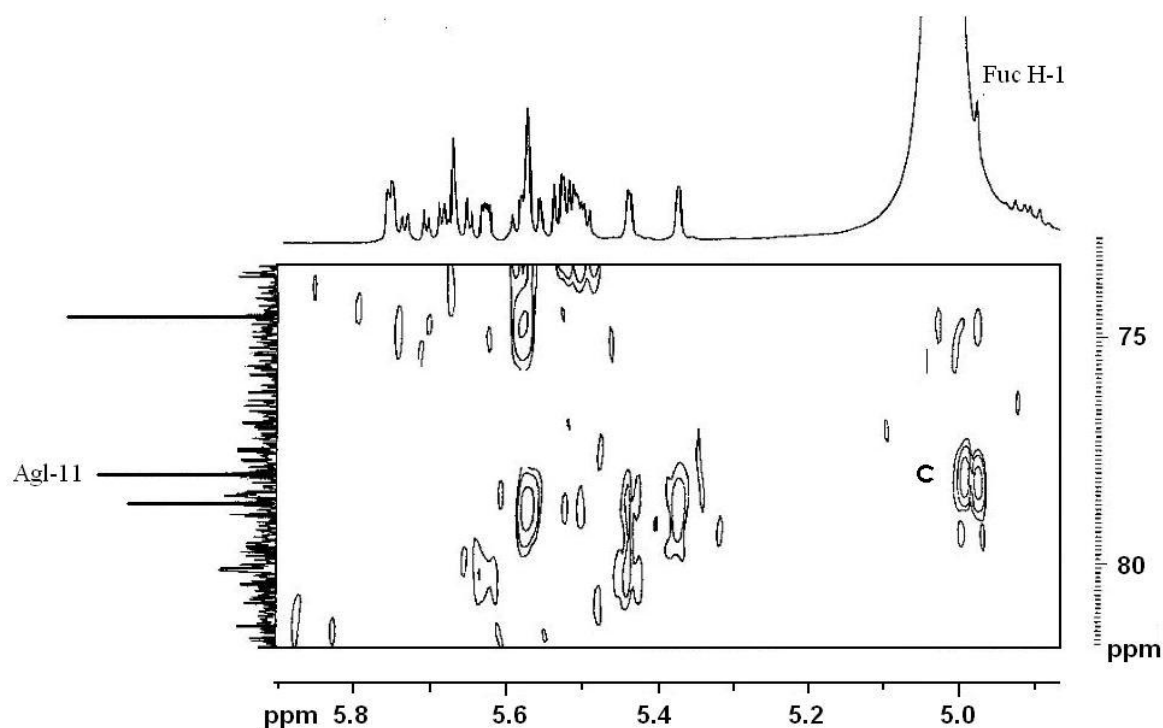


Figura 73. Sección del espectro HMBC del éster metílico del ácido glicosídico peracetilado FV-SAM en donde se muestra la correación entre el C-1 de la fucosa con el H-11 del residuo de jalapinolato (aglicona).

Con estas evidencias y considerando que hay dos unidades adicionales de ramnosa (que se nombran como Ram'' y Ram'''), se logró establecer la estructura del derivado peracetilado y metilado obtenido a partir de la saponificación de la fracción FV hexánica (Figura 74).

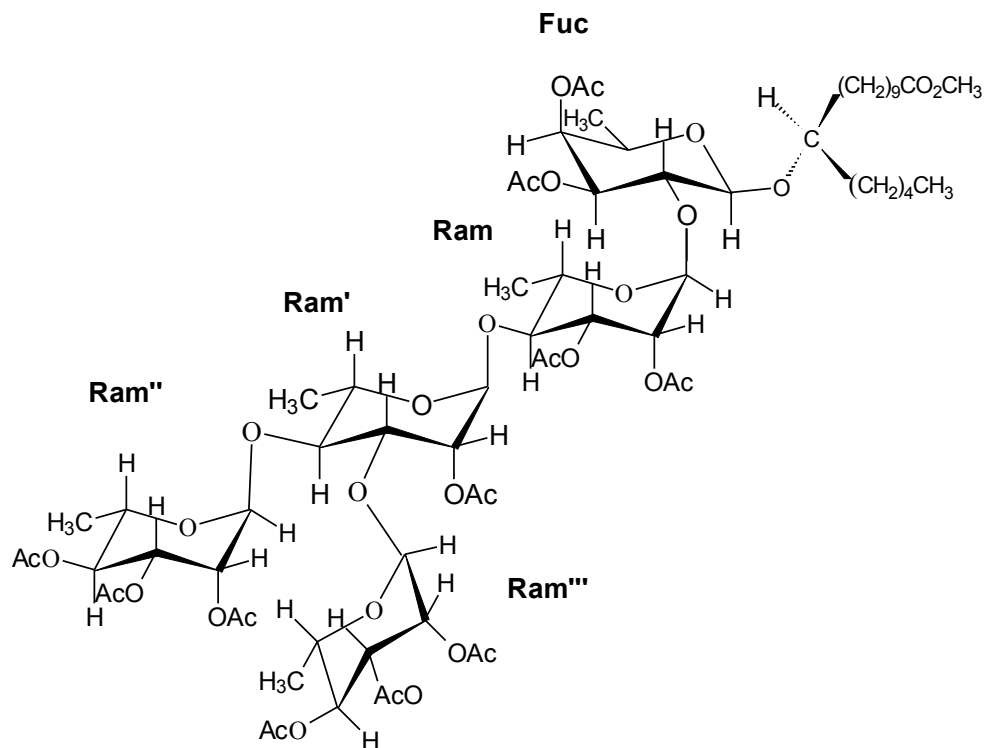
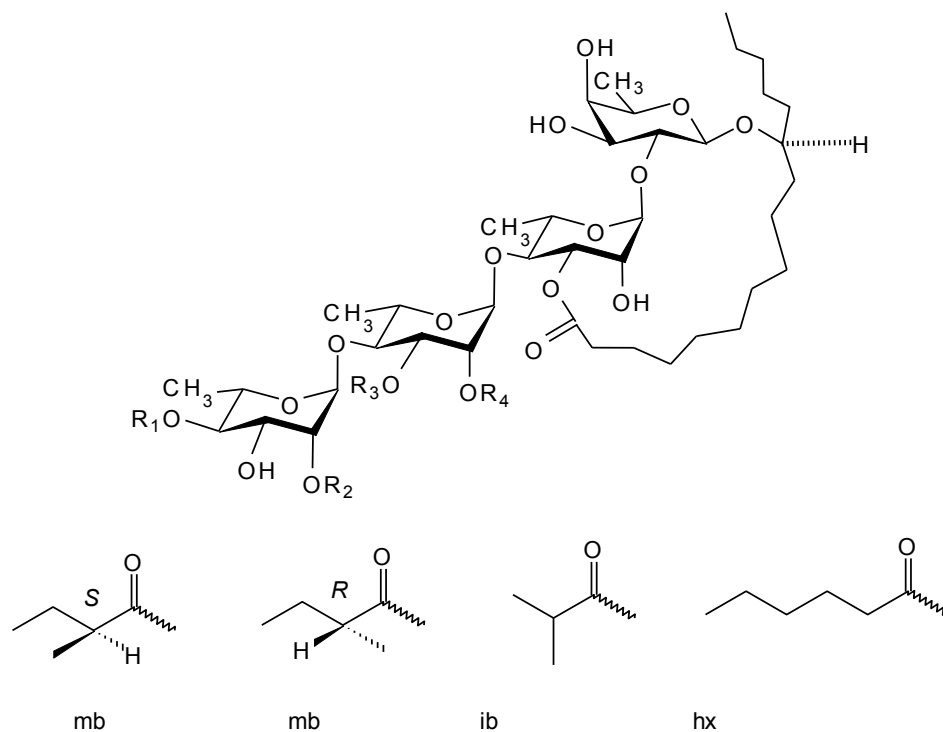


Figura 74. Estructura del derivado **FV-SAM**. Abreviaciones: Fuc = fucosa, Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, y Ram''' = ramnosa externa inferior.

Los resultados anteriores permitieron establecer la estructura del ácido glicosídico mayoritario presente en las fracciones hexánicas de la especie *Ipomoea pes-caprae* como el 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- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico que corresponde con el núcleo oligosacárido presente en la jalapina de las plantas *Ipomoea stolonifera* (Noda, *et al.*, 1994a; 1998), *Ipomoea murucoides* (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006) e *Ipomoea batatas* (Escalante-Sánchez y Pereda-Miranda, 2007; Noda *et al.*, 19921, 1994) y conocido como el ácido simónico.

6.9. Elucidación estructural de las Pescapreínas I–XII y de los Pescaprosido A y B

Las figuras 74, 75, 76 y 77 ilustran las estructuras de los compuestos aislados a partir de los extractos hexánicos de la riñonina. Se presentan en conjunto para facilitar la lectura del texto que describe su elucidación estructural.



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

Pescapreína	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
I	H	H	H	<i>n</i> -dodecanoilo
II	ib	H	ram	<i>n</i> -dodecanoilo
III	(2 <i>S</i>)-mb	H	ram	<i>n</i> -dodecanoilo
IV	hx	H	ram	<i>n</i> -dodecanoilo
V	(2 <i>S</i>)-mb	H	H	<i>n</i> -dodecanoilo
VI	H	<i>n</i> -dodecanoilo	(2 <i>S</i>)-mb	H
VII	H	H	ram	<i>n</i> -decanoilo
VIII	<i>n</i> -dodecanoilo	H	ram	ib
IX	<i>n</i> -hexanoilo	H	ram	<i>n</i> -decanoilo
XII	(2 <i>R</i>)-mb	H	ram	<i>n</i> -dodecanoilo

Figura 75. Estructura de las pescapreínas I–IX y XII.

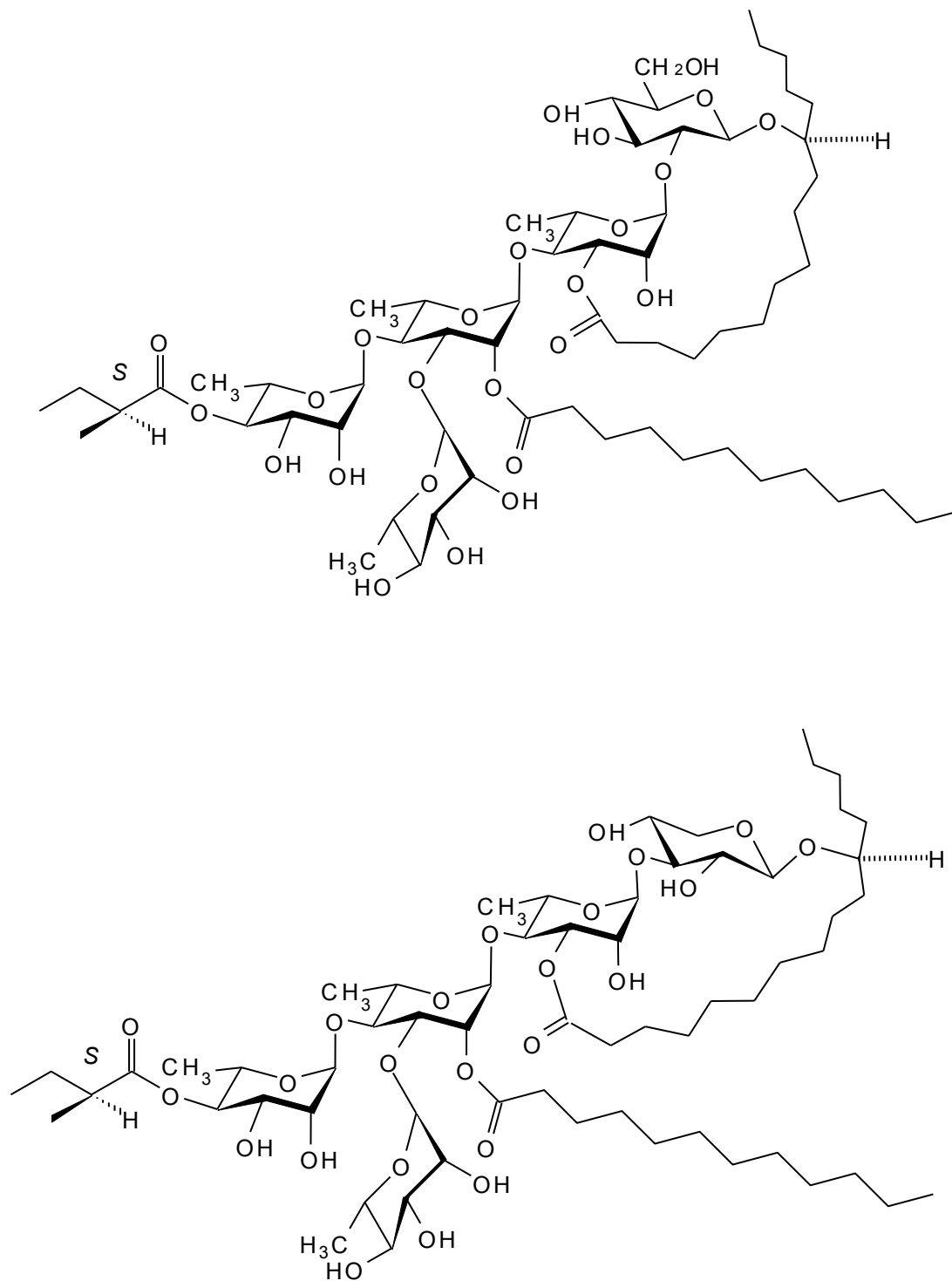
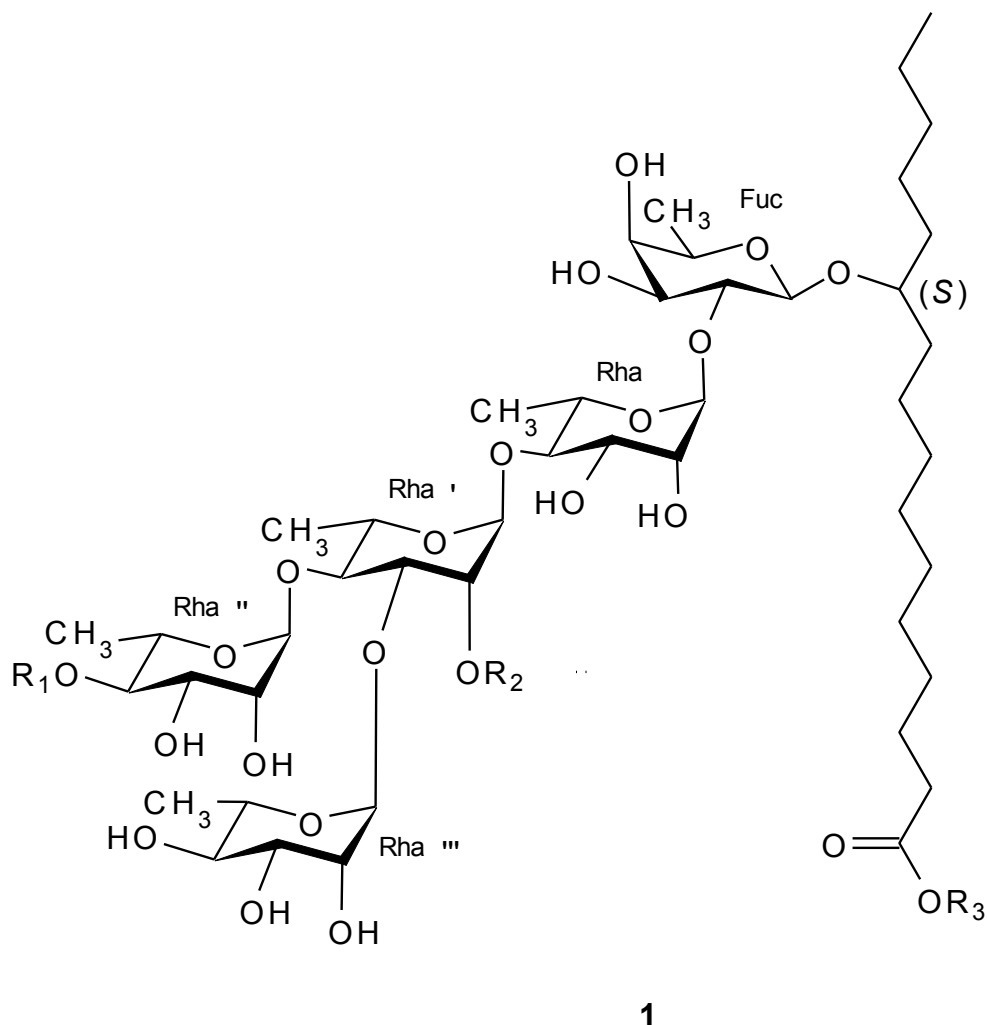


Figura 76. Estructura de la pescapreínas X y XI.



Pescaprosidol	R ₁	R ₂	R ₃
A	H	<i>n</i> -dodecanoilo	CH ₃
B	(2 <i>S</i>)-mb	<i>n</i> -dodecanoilo	CH ₃

Figura 77. Estructura de los pescaprosídeos A y B.

Debido a que diez de los compuestos aislados poseen al ácido simónico B como su núcleo oligosacárido constitutivo, la elucidación estructural de cada uno de estos constituyentes individuales, se realizó mediante la comparación de sus respectivas constantes espectroscópicas, y su diferenciación se logró a través del

análisis individual de la espectrometría de masas. Estos diez compuestos presentan prácticamente las mismas señales en los espectros de RMN ^1H y ^{13}C (Figuras 78, 79, 80, 81, 82 y 83). Sin embargo, presentan diferencias en sus pesos moleculares debido a la diversidad en los ácidos que se encuentran esterificando a los azúcares de la cadena oligosacárida.

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

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

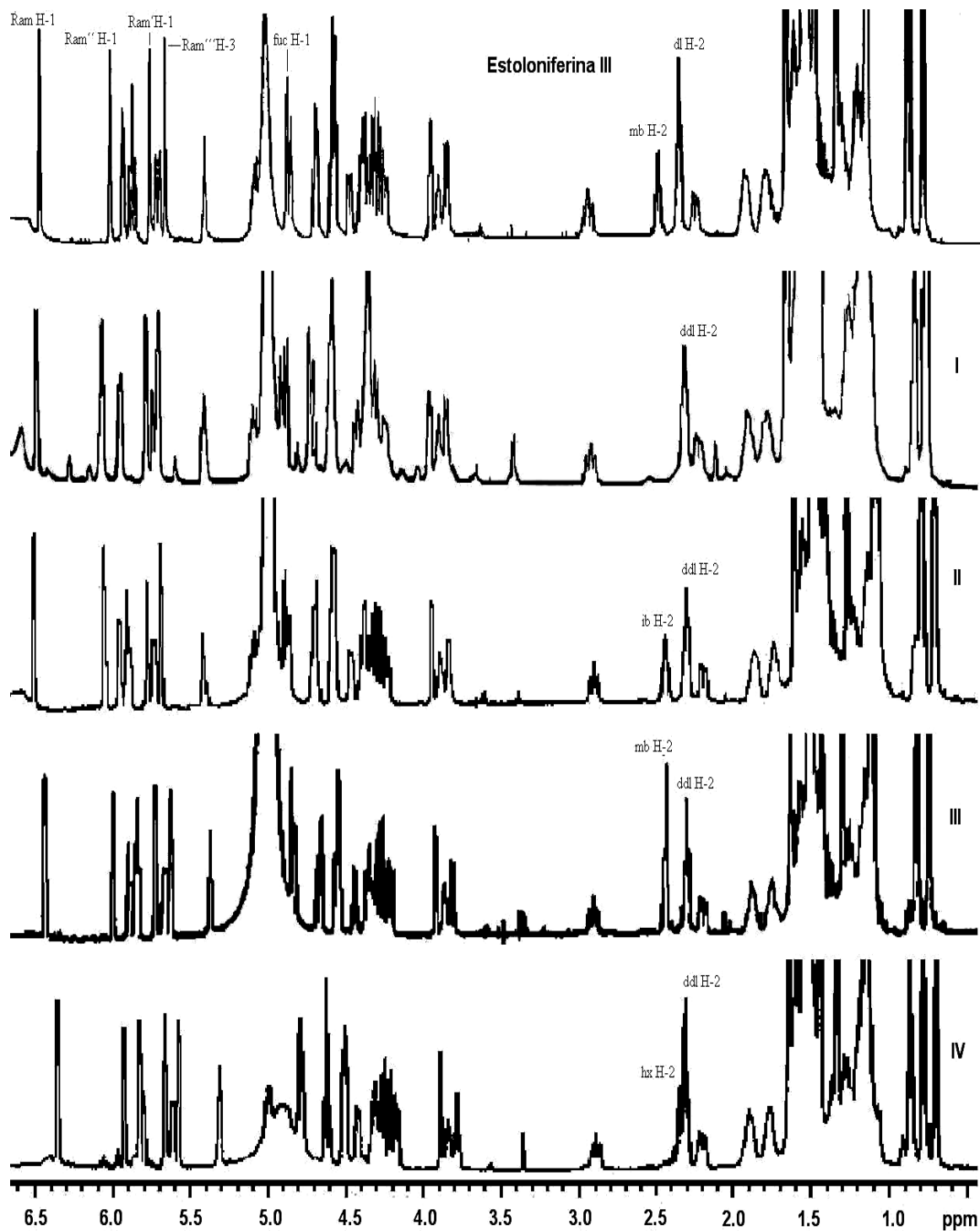


Figura 78. Espectros de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de la estoloniferina III y las pescapreínas I-IV. Se indican las señales que identifican los residuos de 2-metilbutanoilo (mb, H-2), isobutanoilo (ib, H-2), *n*-hexanoilo (hx, H-2), *n*-decanoilo (dl, H-2) y *n*-dodecanoilo (ddl, H-2).

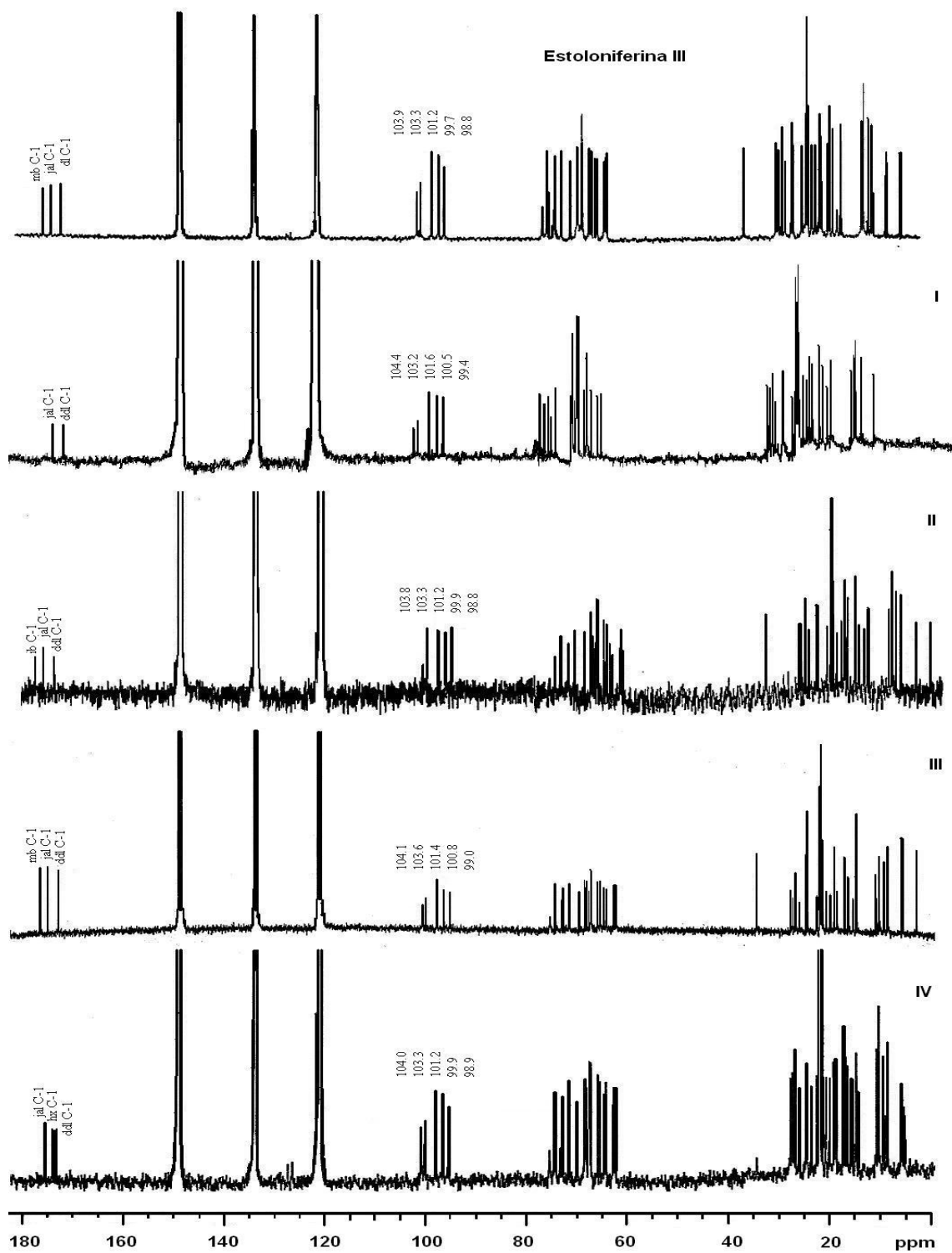


Figura 79. Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la estoloniferina III y las pescapreínas I-IV.

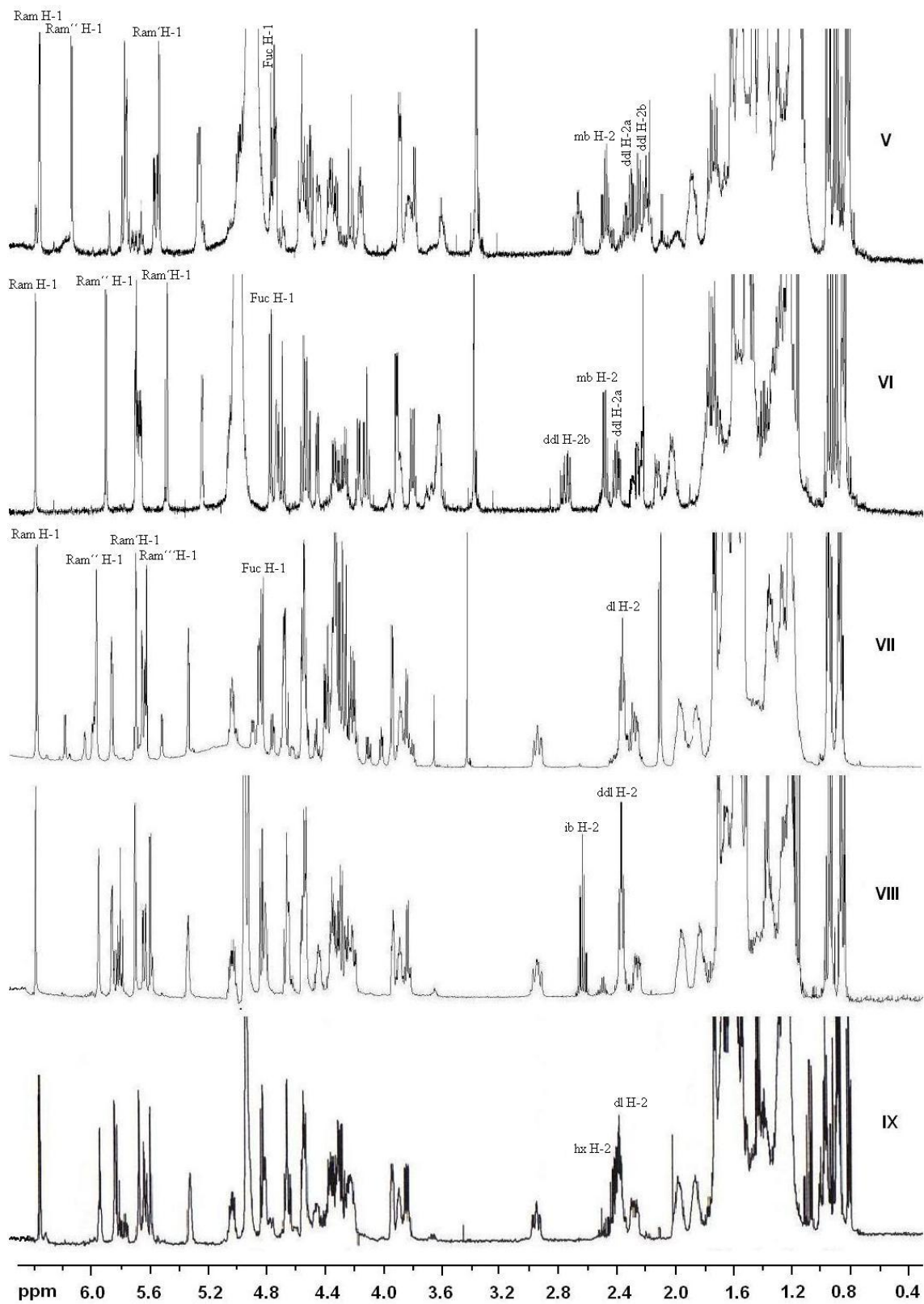


Figura 80. Espectros de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas VII-IX.

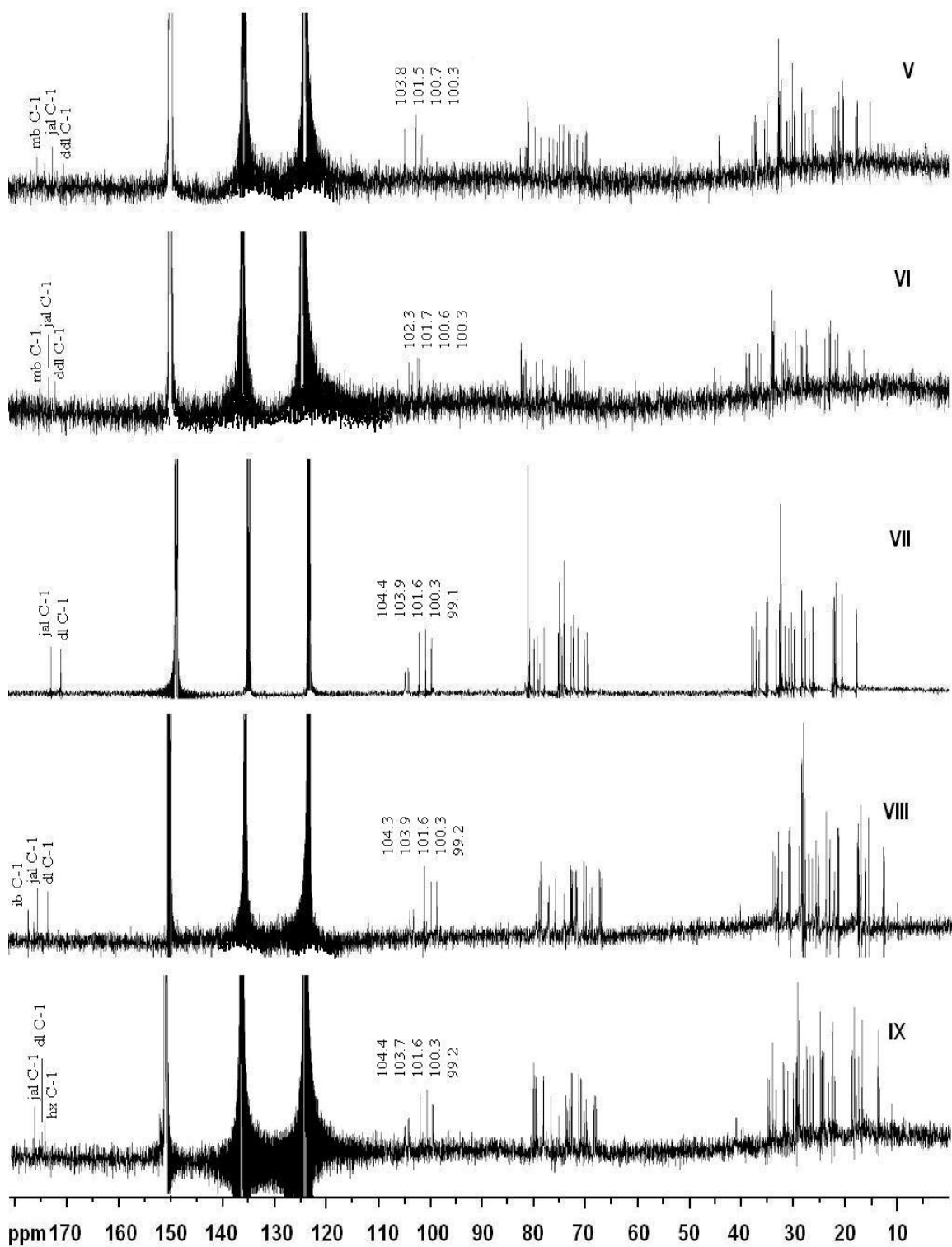


Figura 81. Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas V–IX.

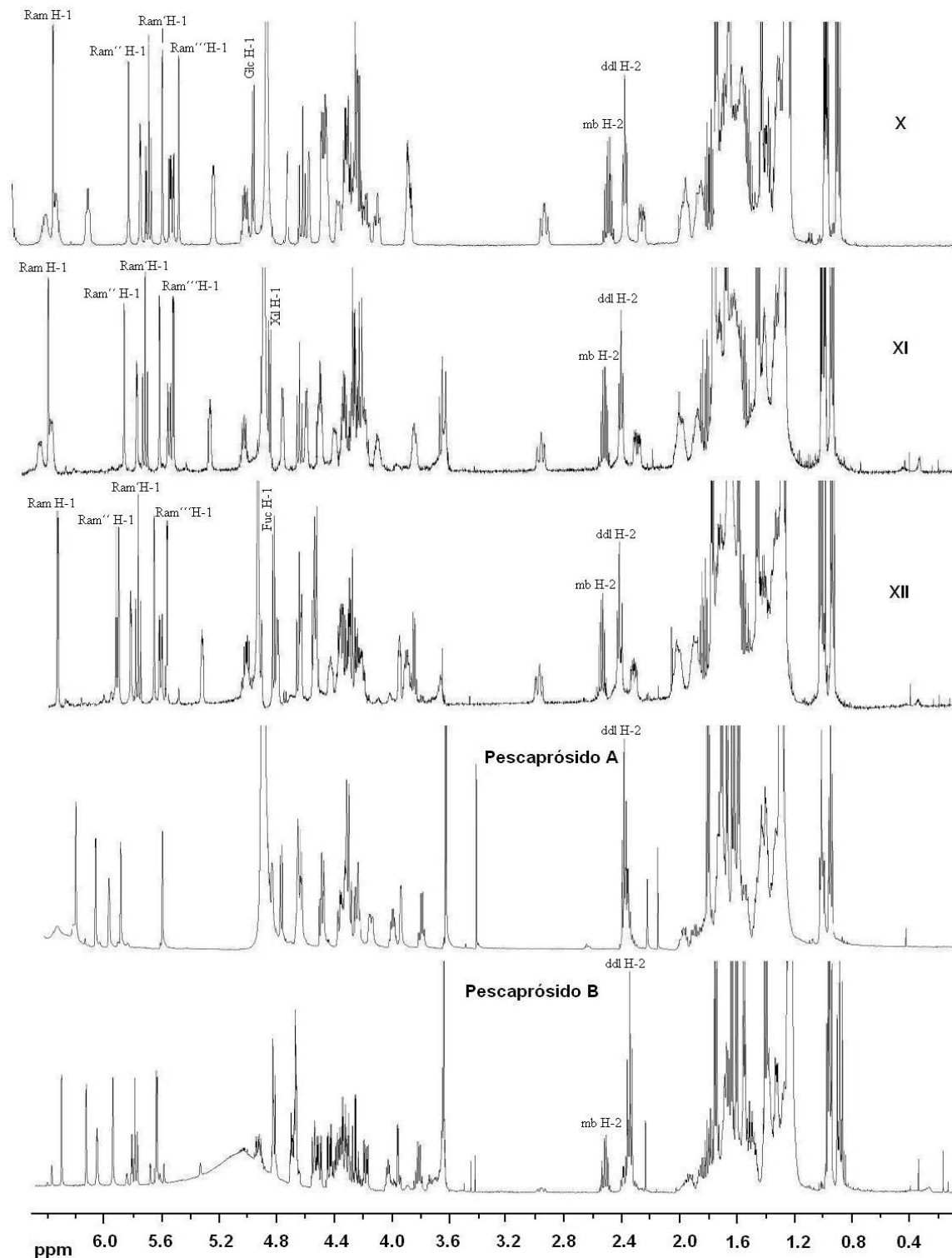


Figura 82. Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas X–XII y de los pescaprosidos A y B.

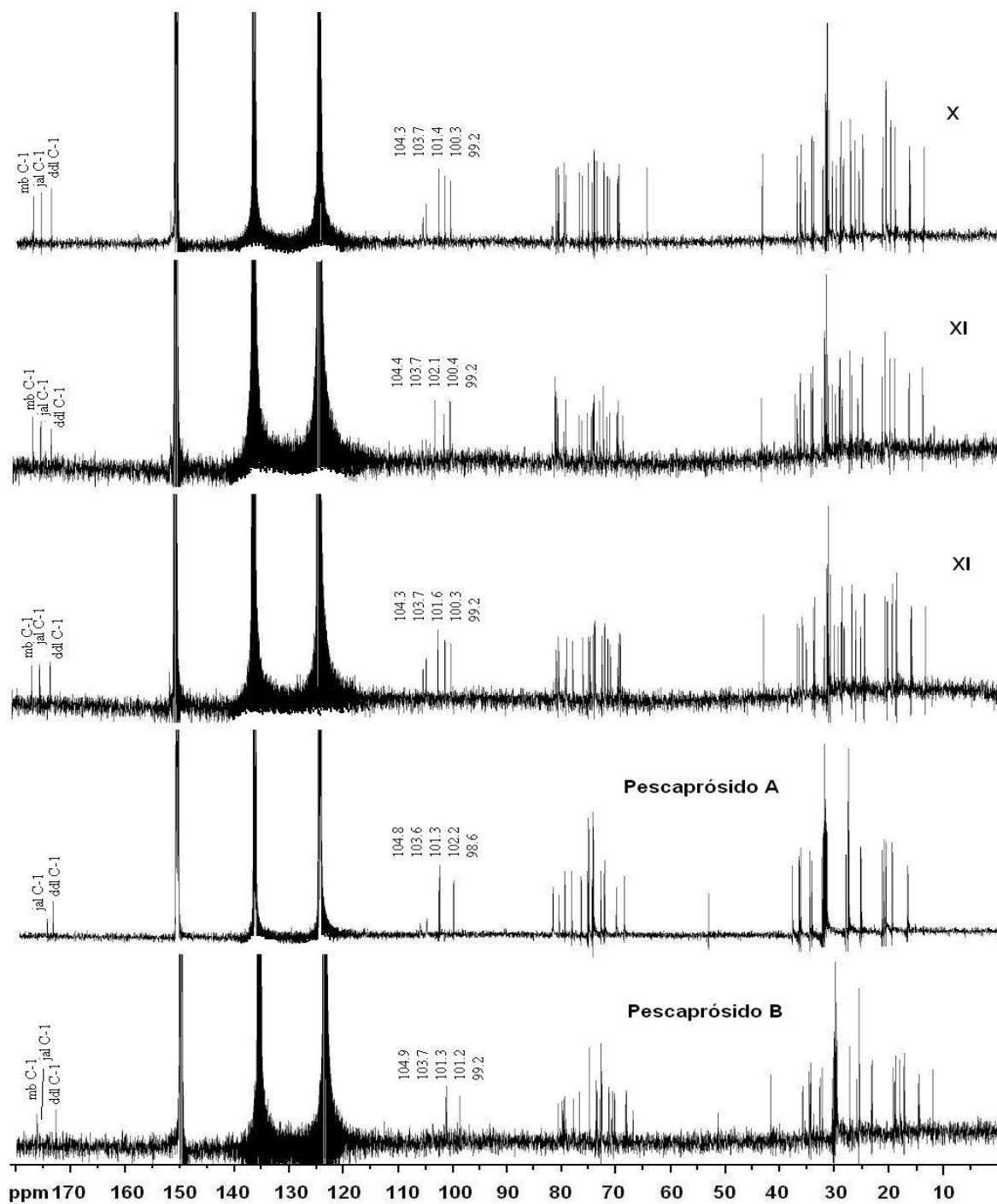


Figura 83. Espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de las pescapreínas X–XI y de los pescaprosido A y B.

El procedimiento de asignación de los correspondientes desplazamientos químicos para la estoloniferina III, las **pescapreínas I–IV, VII–IX, XI** y los **pescaprósidos A y B**, se realizó del mismo modo que en el caso del ácido simónico B ya que todos presentaron a este ácido como su núcleo oligosacárido. No hay que olvidar que en el caso de los espectros correspondientes a los desplazamientos de hidrógeno de los pescaprósidos A y B (Figura 82), éstos no presentaron las señales alrededor de 2.25 y 2.90 ppm correspondientes a los protones del grupo metileno alfa al carbonilo de la macrolactona y que son diagnósticos para este grupo de compuestos (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Por otro lado, la elucidación de las **pescapreínas V y VI** siguió el mismo procedimiento ya que su núcleo oligosacárido está representado por el ácido cuscútico C, un tetrasacárido. La única diferencia de éste con el ácido simónico B es la ausencia de la ramnosa externa inferior (Ram^{'''}). El análisis de los espectros de carbono (Figura 81) confirmó la presencia de sólo cuatro carbonos anoméricos. La secuencia de glicosidación del resto del oligosacárido es la misma que la observada para el ácido simónico B.

Para iniciar la elucidación, primero se localizaron las señales con la mejor resolución y diagnósticas; e.g. H₂ para la fucosa, así como las cinco señales anoméricas y H₄ para una de las unidades de ramnosa. Como segundo paso, se establecieron los cuadros de conectividades para estas señales en el experimento COSY y lograr la identificación de cada uno de los residuos sacáridos, como se ilustra en la Figura 84.

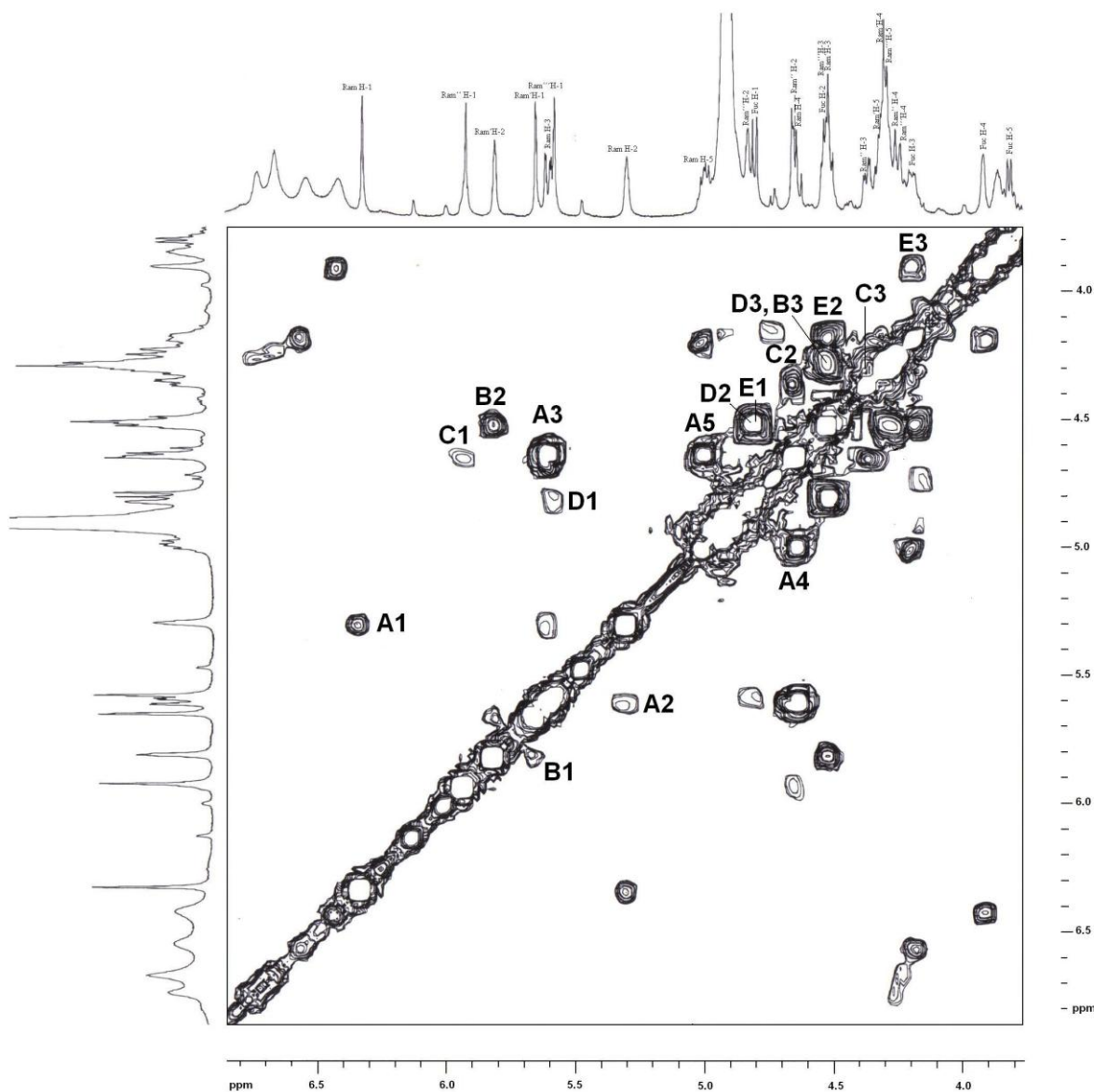


Figura 84. Sección del espectro **COSY** para la porción oligosacárida de la **pescapreína I**. Correlaciones $^3J_{H-H}$ en señal cruzada: A1; Ram H₁-H₂, A2; Ram H₂-H₃, A3; Ram H₃-H₄, A4; Ram H₄-H₅, A5; Ram H₅-H₄, B1; Ram' H₁-H₂, B2; Ram' H₂-H₃, B3; Ram' H₃-H₄, C1; Ram'' H₁-H₂, C2; Ram'' H₂-H₃, C3; Ram'' H₃-H₄, C4; Ram'' H₄-H₅, D1; Ram''' H₁-H₂, D2; Ram''' H₂-H₃, D3; Ram''' H₃-H₄, E1; Fuc H₁-H₂, E2; Fuc H₂-H₃, E3; Fuc H₃-H₄. Abreviaciones : Fuc = fucosa, Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, Ram''' = ramnosa externa inferior.

Posteriormente, se procedió a localizar las señales adicionales que correspondían a cada una de las unidades sacáridas en el espectro TOCSY (Figuras 85 y 86) y, por último, se completó la secuencia de interacciones vecinales ($^3J_{H-H}$) de nueva cuenta con la ayuda del experimento COSY.

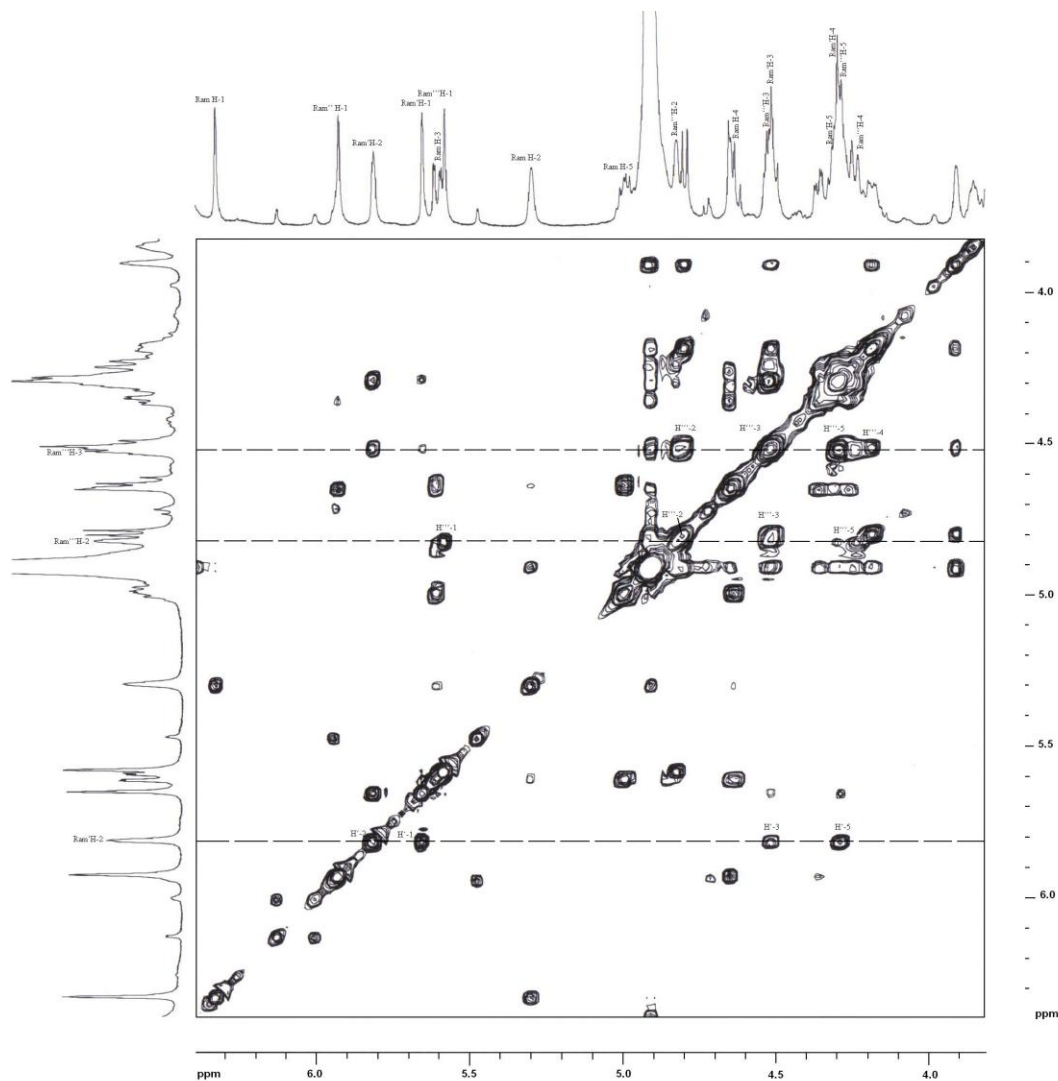


Figura 85. Sección del espectro **TOCSY** para la porción oligosacárida de la **Pescapreína I**. Abreviaciones: Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram''' = ramnosa externa inferior.

Del mismo modo que en los experimentos COSY, en la Figura 86 se esquematiza una sección adicional para la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la **Pescapreína I** indicando las asignaciones que no se incluyeron en la Figura 85.

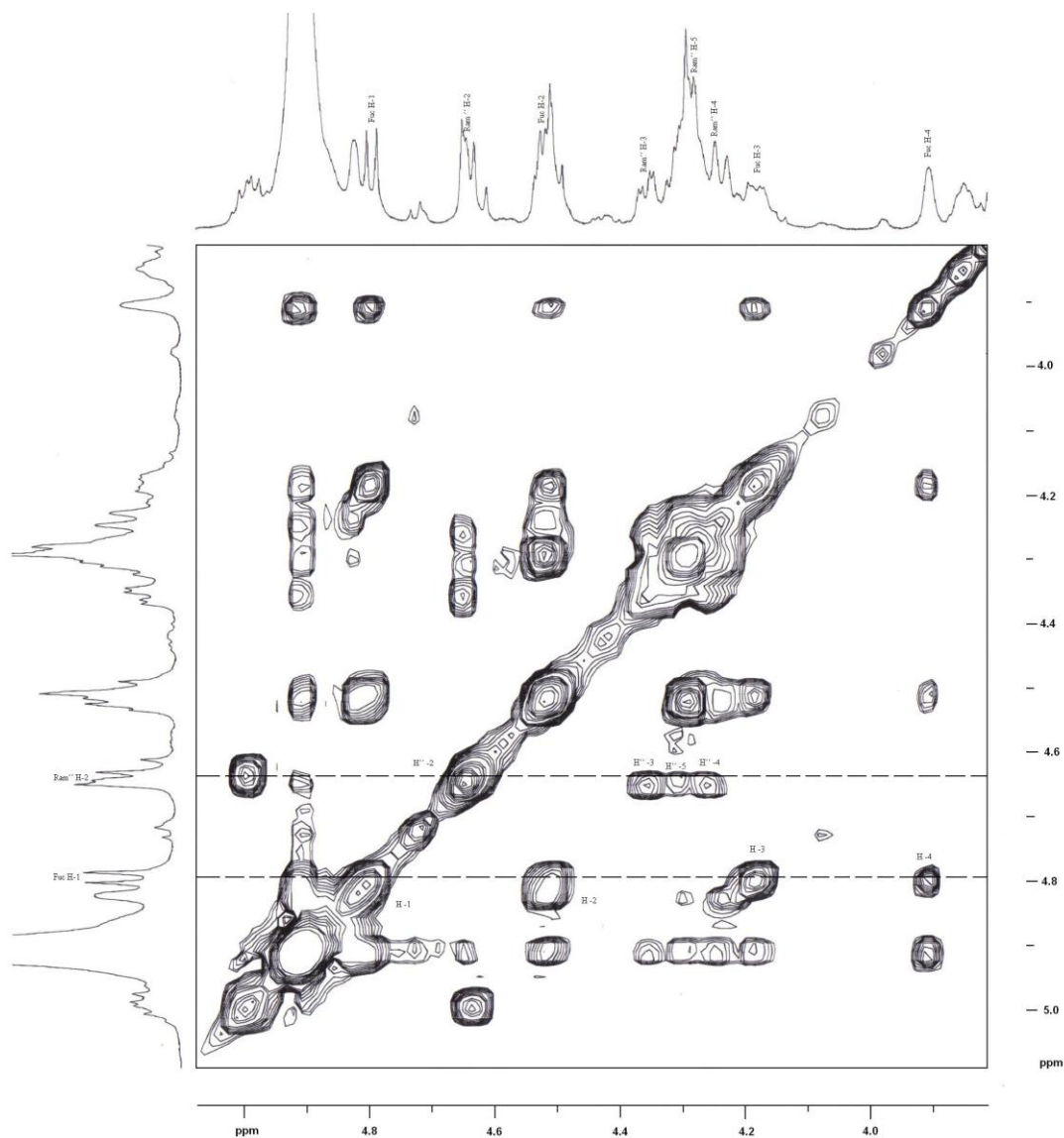


Figura 86. Sección adicional del espectro **TOCSY** para la porción oligosacárida de la **pescapreína I**. Abreviaciones: Fuc = fucosa, Ram'' = ramnosa externa superior.

En el caso de la **Pescapreína X**, la asignación para la porción oligosacárida de su núcleo se realizó identificando las señales 5 señales anoméricas (cuatro unidades de ramnosa y una glucosa) que permitieron la asignación de las interacciones vecinales ($^3J_{H-H}$) correspondientes para cada unidad de azúcar mediante la interpretación del experimento COSY (Figura 87)

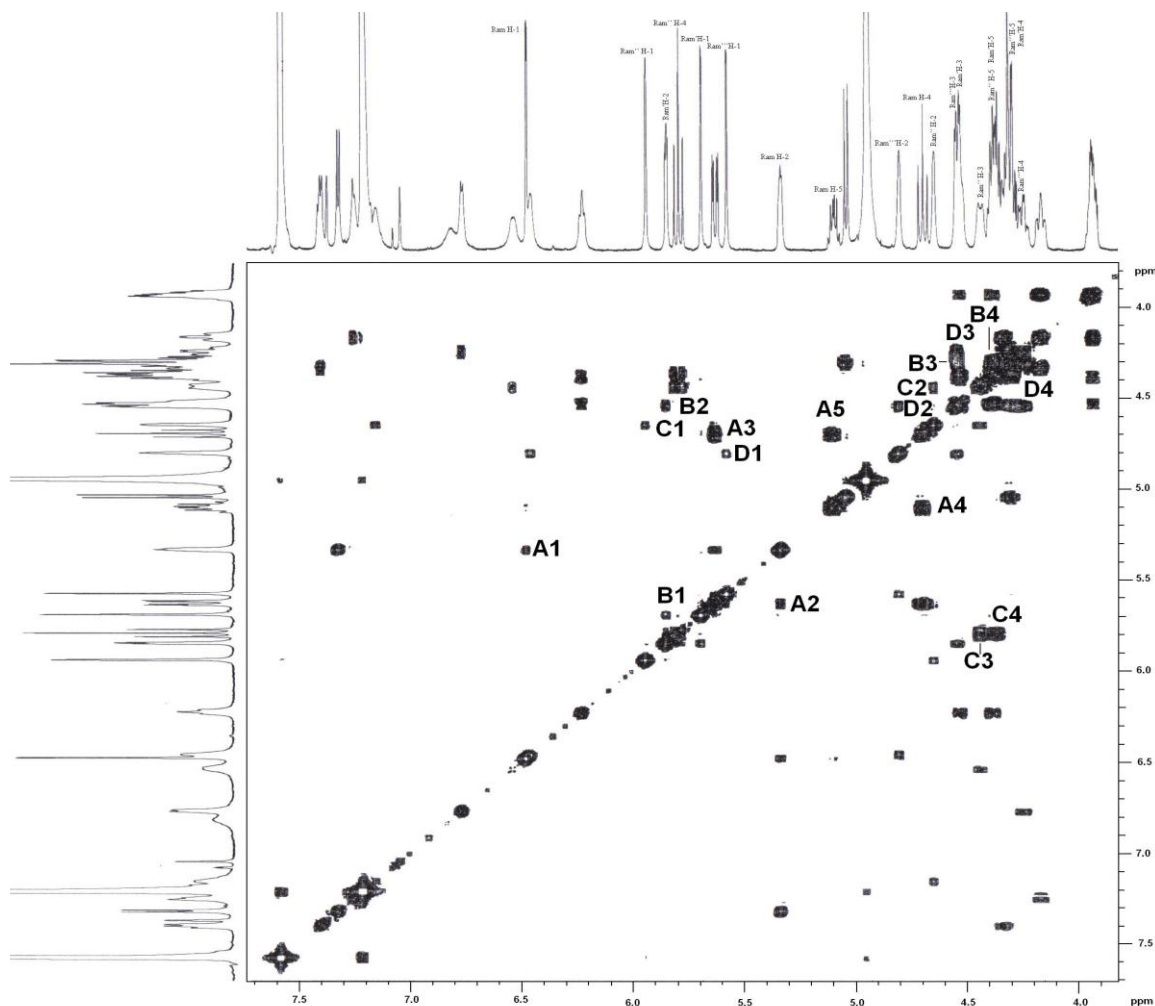


Figura 87. Sección del espectro **COSY** para la porción oligosacárida de la **pescapreína X**. Correlaciones ($^3J_{H-H}$) en señal cruzada: A1; Ram H₁-H₂, A2; Ram H₂-H₃, A3; Ram H₃-H₄, A4; Ram H₄-H₅, A5; Ram H₅-H₄, B1; Ram' H₁-H₂, B2; Ram' H₂-H₃, B3; Ram' H₃-H₄, B4; Ram' H₄-H₅, C1; Ram'' H₁-H₂, C2; Ram'' H₂-H₃, C3; Ram'' H₃-H₄, C4; Ram'' H₄-H₅, D1; Ram''' H₁-H₂, D2; Ram''' H₂-H₃, D3; Ram''' H₃-H₄, D4; Ram''' H₄-H₅. Abreviaciones : Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, Ram''' = ramnosa externa inferior.

En la Figura 85 se esquematiza una sección adicional para la porción oligosacárida del espectro COSY de la **pescapreína X** indicando las asignaciones adicionales que no se incluyeron en la Figura 87.

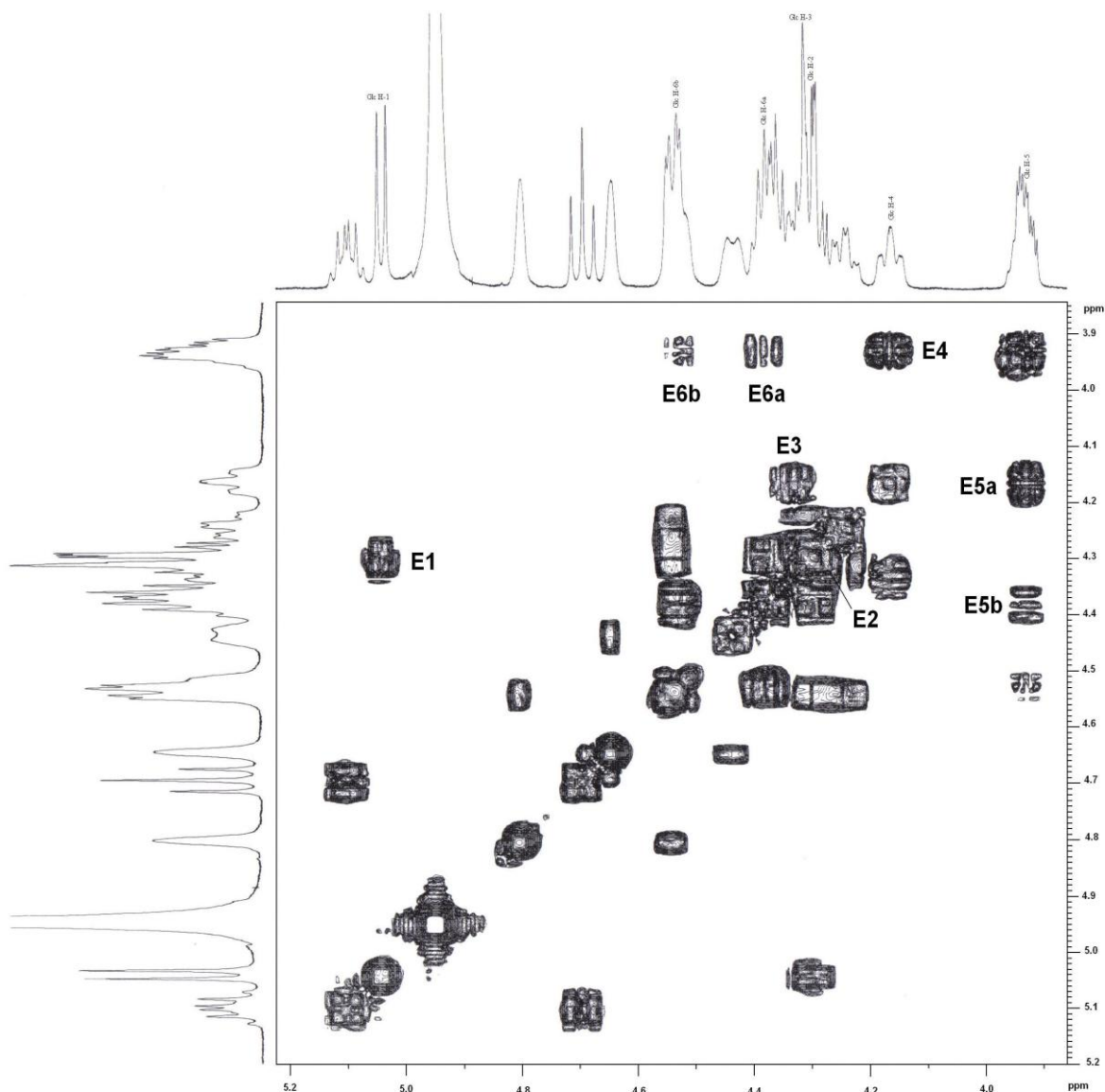


Figura 88. Sección adicional del espectro **COSY** para la porción oligosacárida de la **Pescapreína X**. E1; Glc H₁-H₂, E2; Glc H₂-H₃, E3; Glc H₃-H₄, E4; Glc H₄-H₅, E5a; Glc H₅-H_{6a}, E5b; Glc H₅-H_{6b}, E6a; Glc H_{6a}-H₅, E6b; Glc H_{6b}-H₅ Abreviaciones : Glc = glucosa.

En la Figura 89 se ilustra una sección adicional para la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la **pescapreína X** que ayudó a lograr la asignación de las señales ubicadas entre 1.1 y 1.7 ppm correspondientes a los grupos metilos de los 6-deoxiazúcares.

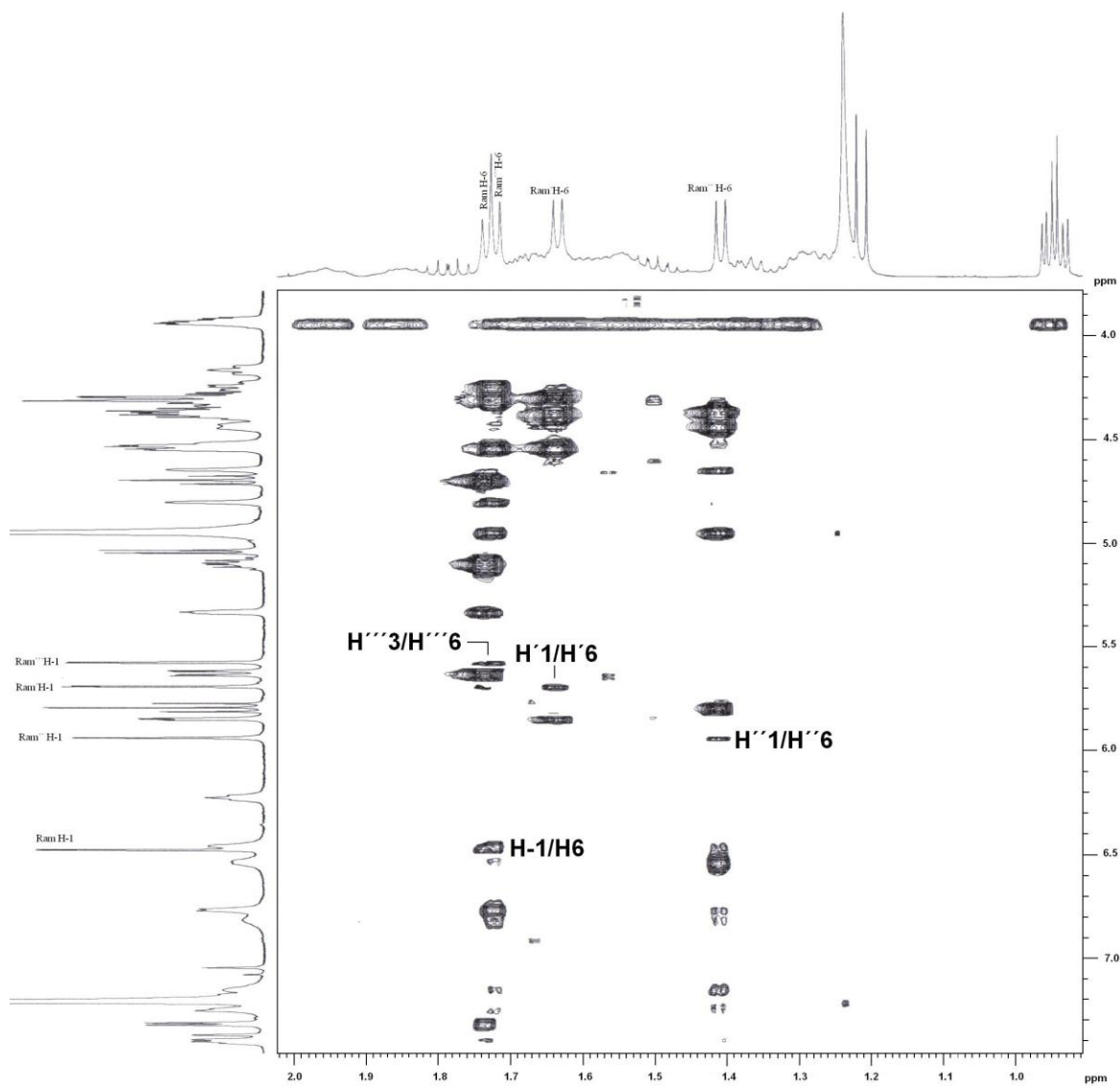


Figura 89. Sección del espectro **TOCSY** para la asignación de los metilos de los 6-deoxiazúcares de la **pescapreína X**.

La **pescapreína XI** fue otro caso especial para la asignación de su porción oligosacárida, ya que aunque el espectro de RMN ^1H presentó cinco señales anoméricas, éstas correspondieron a un núcleo glicosídico que presentó cuatro unidades de ramnosa y una de xilosa.

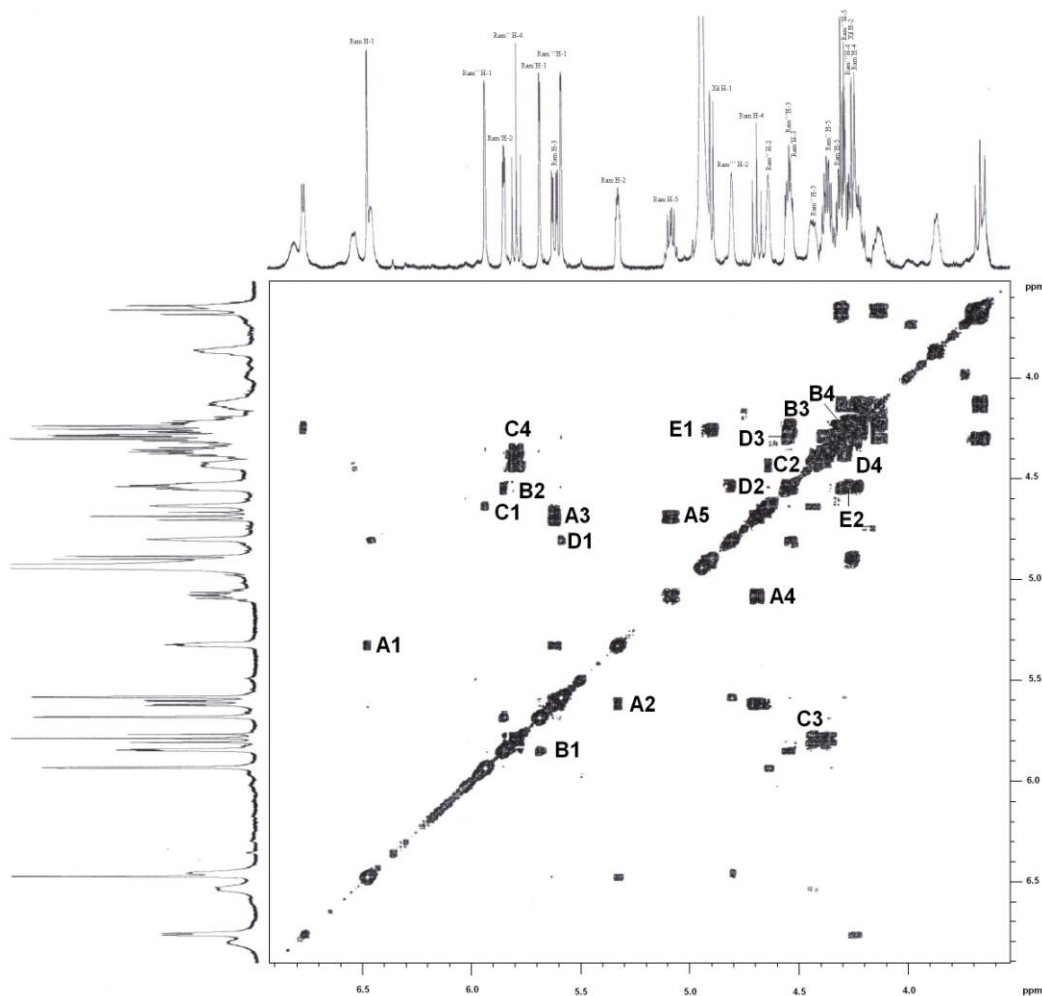


Figura 90. Sección del espectro **COSY** para la porción oligosacárida de la **pescapreína XI**. Correlaciones $^3J_{\text{H-H}}$ en señal cruzada: A1; Ram H₁-H₂, A2; Ram H₂-H₃, A3; Ram H₃-H₄, A4; Ram H₄-H₅, A5; Ram H₅-H₄, B1; Ram' H₁-H₂, B2; Ram' H₂-H₃, B3; Ram' H₃-H₄, B4; Ram' H₄-H₅, C1; Ram'' H₁-H₂, C2; Ram'' H₂-H₃, C3; Ram'' H₃-H₄, C4; Ram'' H₄-H₅, D1; Ram''' H₁-H₂, D2; Ram''' H₂-H₃, D3; Ram''' H₃-H₄, D4; Ram''' H₄-H₅, E1; Xil H₁-H₂, E2; Xil H₂-H₃. Abreviaciones : Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, Ram''' = ramnosa externa inferior, Xil = xilosa.

El procedimiento mediante la identificación de señales diagnósticas nos llevó a identificar las interacciones vecinales (${}^3J_{H-H}$) correspondientes para cada unidad de azúcar mediante la interpretación del experimento COSY (Figura 90). En la Figura 91 se esquematiza una sección adicional para la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la **pescapreína XI** indicando las asignaciones que no se incluyeron en la Figura 90 para la unidad de xilosa.

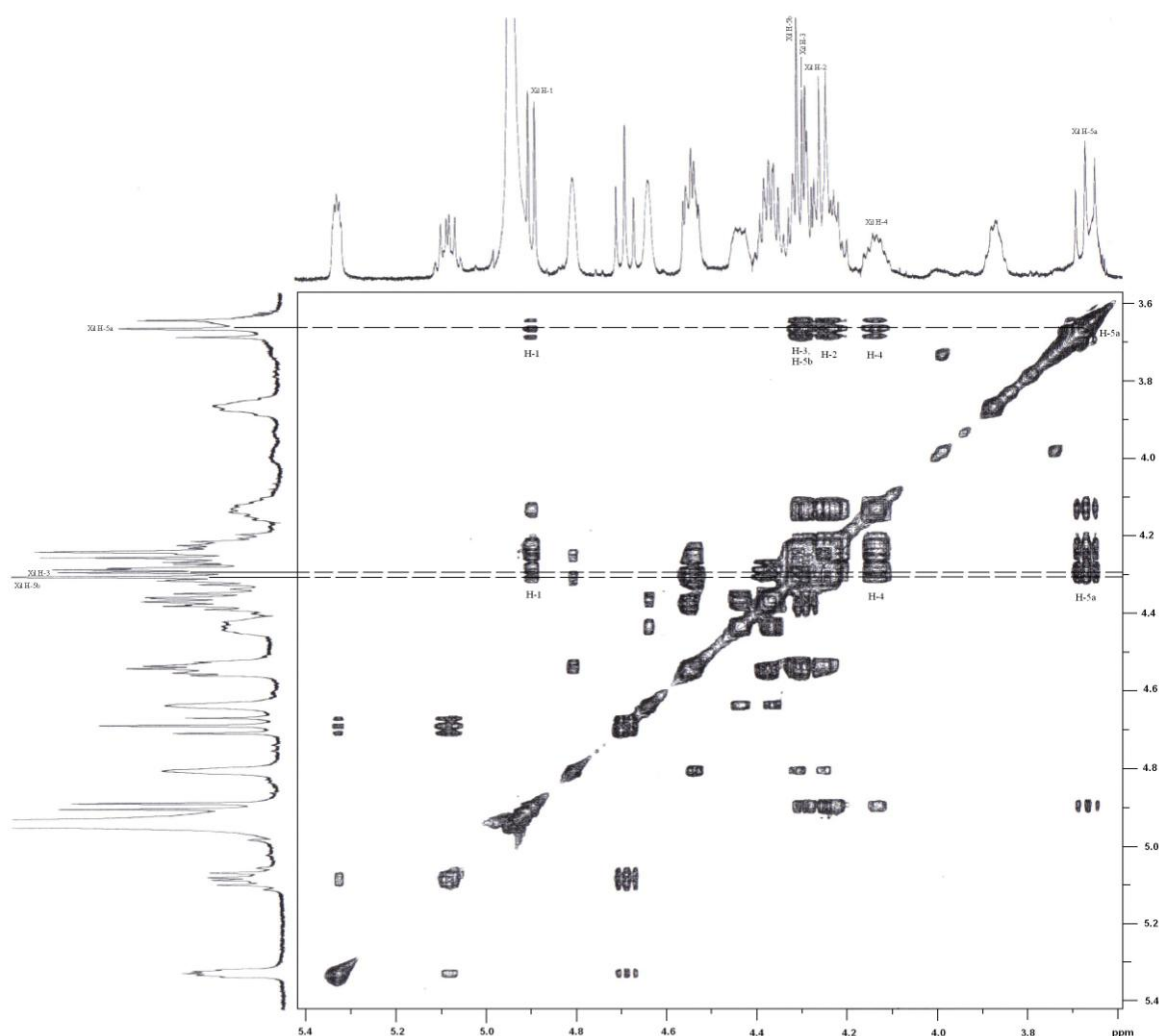


Figura 91. Sección adicional del espectro **TOCSY** para la porción oligosacárida de la **pescapreína XI**. Abreviaciones: Xil = xilosa.

La asignación de las señales de RMN ^{13}C (cuadros 20) se logró principalmente mediante la técnica HSQC, aunque también se empleó la técnica HMBC para verificar que las resonancias hayan sido correctamente asignadas sobre todo en las regiones donde se observó una mayor sobreposición de señales en el espectro de RMN ^1H . Las Figuras 92, 93, 94 y 95 muestran la asignación de señales de RMN ^{13}C para las pescapreínas VII, X y XI, respectivamente.

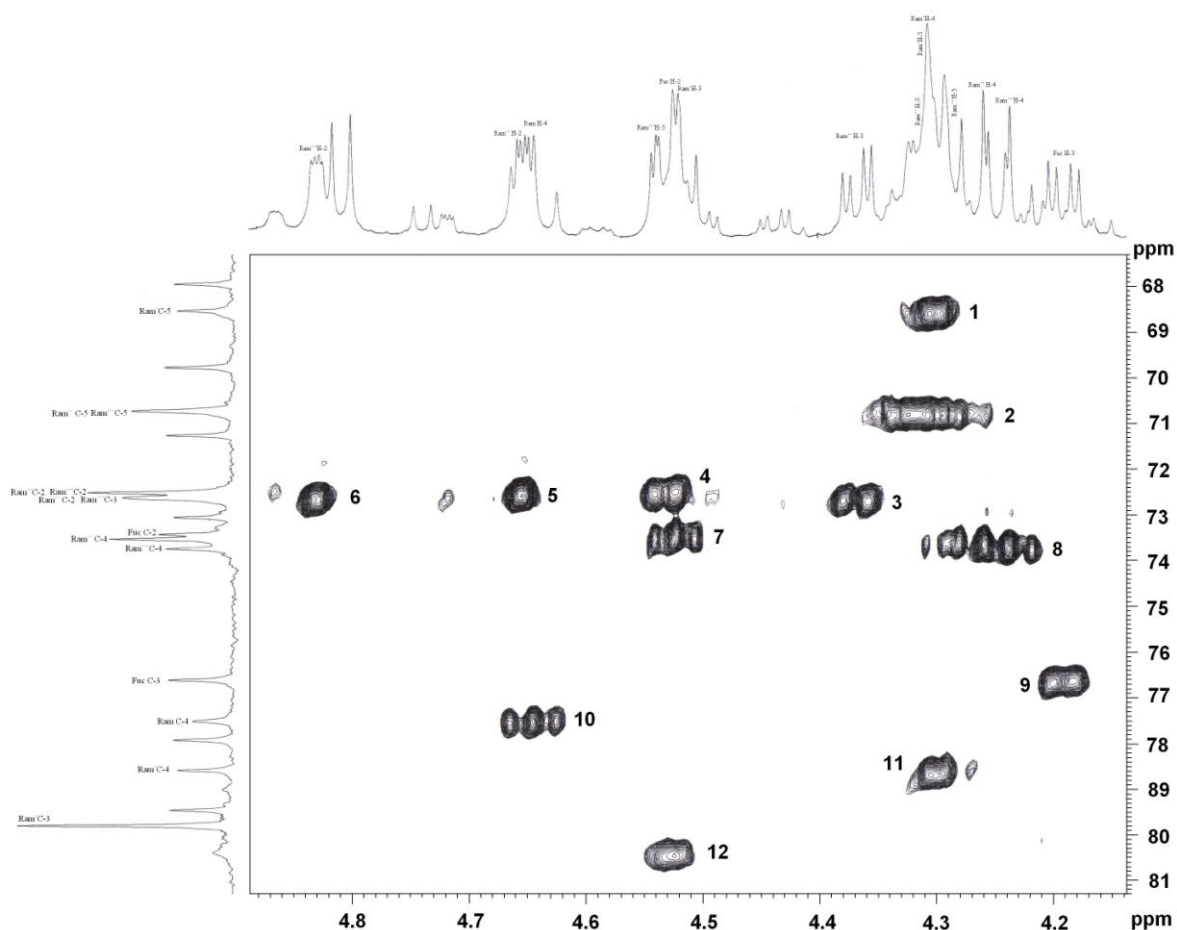


Figura 92. Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la **pescapreína VII**. Asignación de las resonancias de ^{13}C ; **1**; $\text{C}_5\text{Ram}'$, **2**; $\text{C}_5\text{Ram}'$ y $\text{C}_5\text{Ram}''$, **3**; $\text{C}_3\text{Ram}''$, **4**; $\text{C}_3\text{Ram}'''$, **5**; $\text{C}_2\text{Ram}''$, **6**; $\text{C}_2\text{Ram}'''$, **7**; C_2Fuc , **8**; $\text{C}_4\text{Ram}''$ y $\text{C}_4\text{Ram}'''$, **9**; C_3Fuc , **10**; C_4Ram , **11**; $\text{C}_4\text{Ram}'$, **12**; $\text{C}_3\text{Ram}'$.

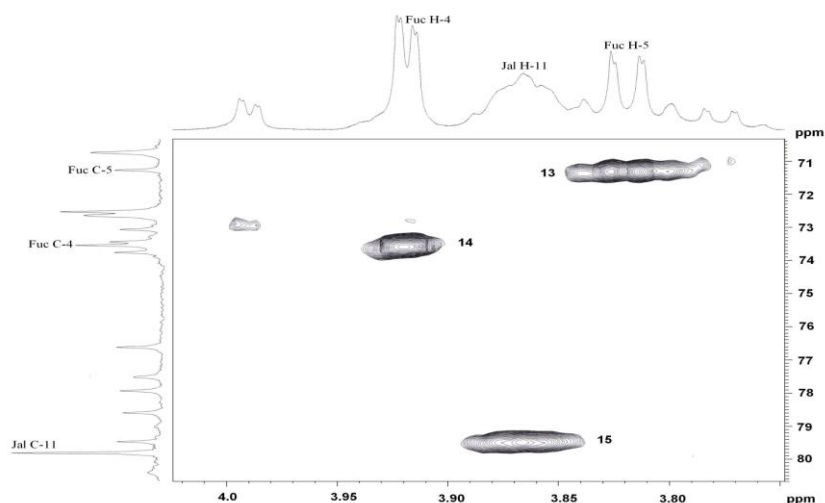


Figura 93. Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la **pescapreína VII**. Asignación de las resonancias de ^{13}C ; **13**; C_5Fuc , **14**; C_4Fuc , **14**; C_{11}Agl .

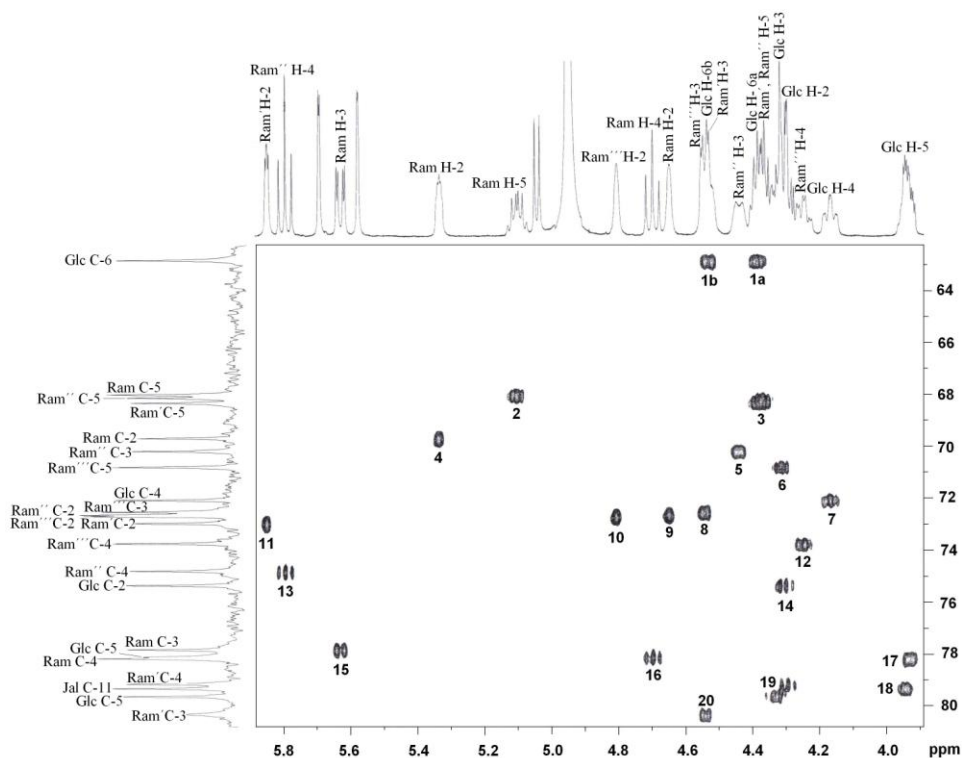


Figura 94. Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la **pescapreína X**. Asignación de las resonancias de ^{13}C ; **1a**; C_6Glc **1b**; C_6Glc , **2**; C_5Ram , **3**; $\text{C}_5\text{Ram}''$ y $\text{C}_5\text{Ram}'$, **4**; C_2Ram , **5**; $\text{C}_3\text{Ram}''$, **6**; $\text{C}_5\text{Ram}'''$, **7**; C_4Glc , **8**; $\text{C}_3\text{Ram}'''$, **9**; $\text{C}_2\text{Ram}''$, **10**; $\text{C}_2\text{Ram}'''$, **11**; $\text{C}_2\text{Ram}'$, **12**; $\text{C}_4\text{Ram}'''$, **13**; $\text{C}_4\text{Ram}''$, **14**; C_2Glc , **15**; C_3Ram **16**; C_4Ram , **17**; C_5Glc , **18**; C_{11}Agl , **19**; $\text{C}_4\text{Ram}'$, **20**; $\text{C}_3\text{Ram}'$.

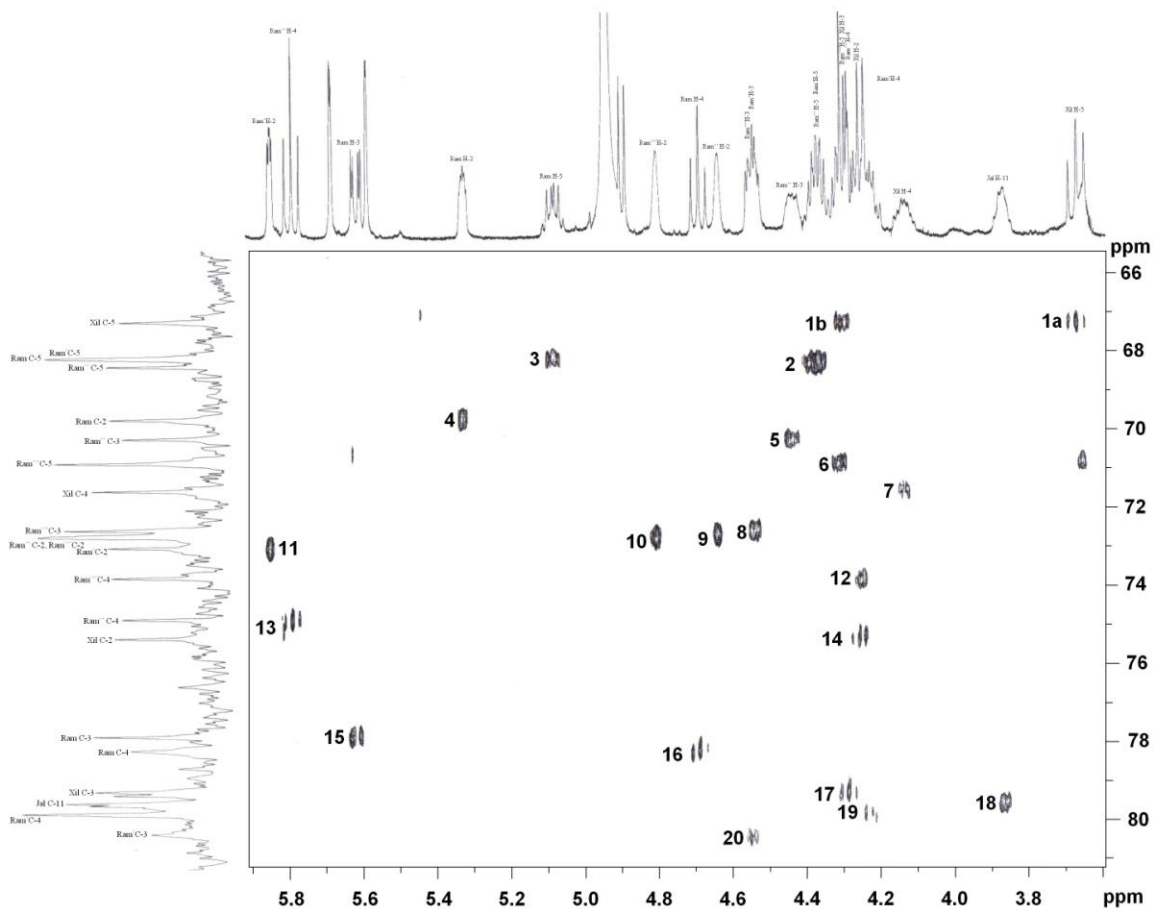


Figura 95. Sección del espectro HSQC para la región oligosacárida de la **pescapreína XI**. Asignación de las resonancias de ^{13}C ; **1a**; $\text{C}_{5\text{a}}$ Xil **1b**; $\text{C}_{5\text{b}}$ Xil, **2**; $\text{C}_5\text{Ram}'$ y $\text{C}_5\text{Ram}''$, **3**; C_5Ram , **4**; C_2Ram , **5**; $\text{C}_3\text{Ram}'''$, **6**; $\text{C}_5\text{Ram}''''$, **7**; C_4Xil , **8**; $\text{C}_3\text{Ram}''''$, **9**; $\text{C}_2\text{Ram}''''$ y $\text{C}_2\text{Ram}'''''$, **10**; $\text{C}_2\text{Ram}''''$, **11**; $\text{C}_2\text{Ram}''''$, **12**; $\text{C}_4\text{Ram}''''$, **13**; $\text{C}_4\text{Ram}''''$, **14**; C_2Xil . **15**; C_3Ram **16**; C_4Ram , **17**; C_3Xil , **18**; C_{11}Agl , **19**; $\text{C}_4\text{Ram}'$, **20**; $\text{C}_3\text{Ram}'$.

Después de identificar y diferenciar las señales de carbono para los grupos metinos de cada unidad de azúcar (ramnosa, glucosa, xilosa y fucosa), se procedió a la asignación de las resonancias en la RMN ^{13}C para los átomos de carbono anoméricos (98-112 ppm) y de los metilos (14-20 ppm) de cada ramnosa, se procedió a la asignación de las resonancias en la RMN ^{13}C para los átomos de carbono anoméricos (Figuras 96 y 97).

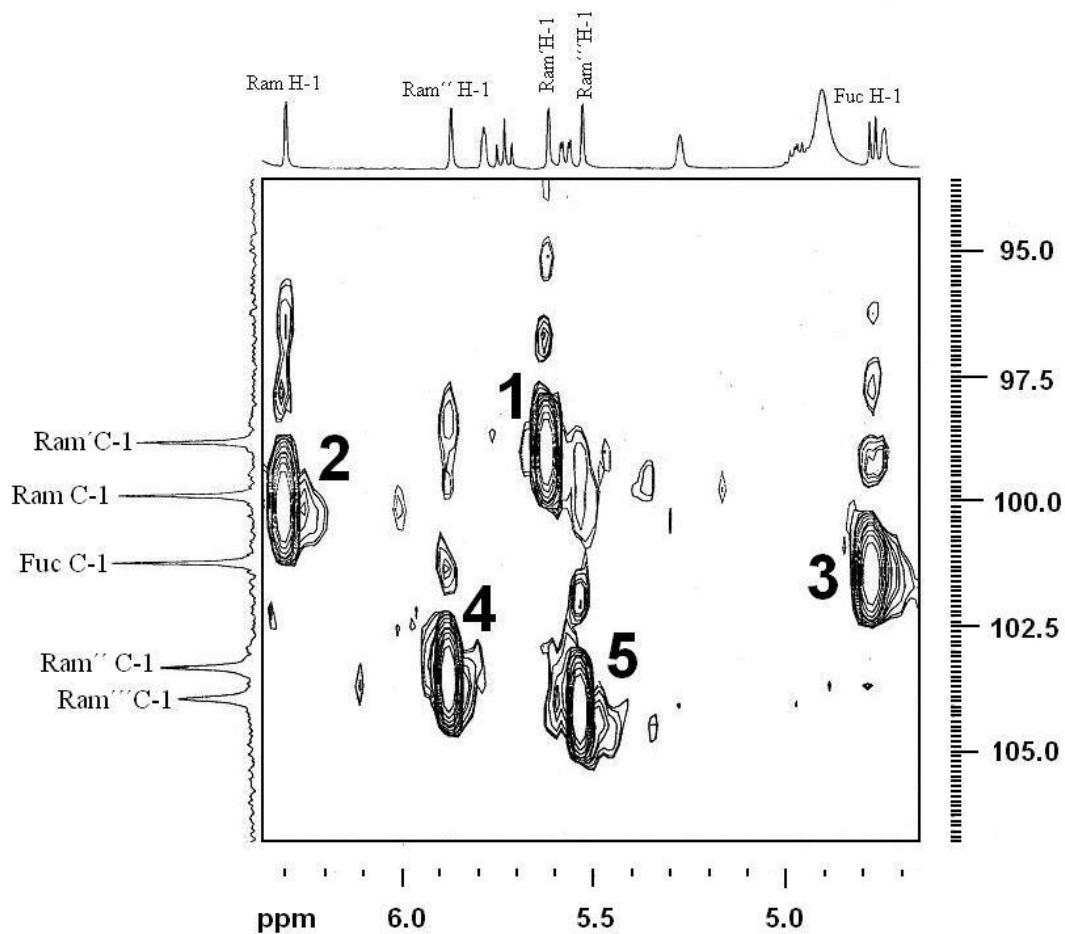


Figura 96. Sección del espectro HMQC del glicolípido **pescapreína II**. Asignación de las resonancias de ^{13}C para la identificación de carbonos anoméricos. Asignaciones: **1**; C_1 Ram', **2**; C_1 Ram, **3**; C_1 Fuc, **4**; C_1 Ram'', **5**; C_1 Ram''''.

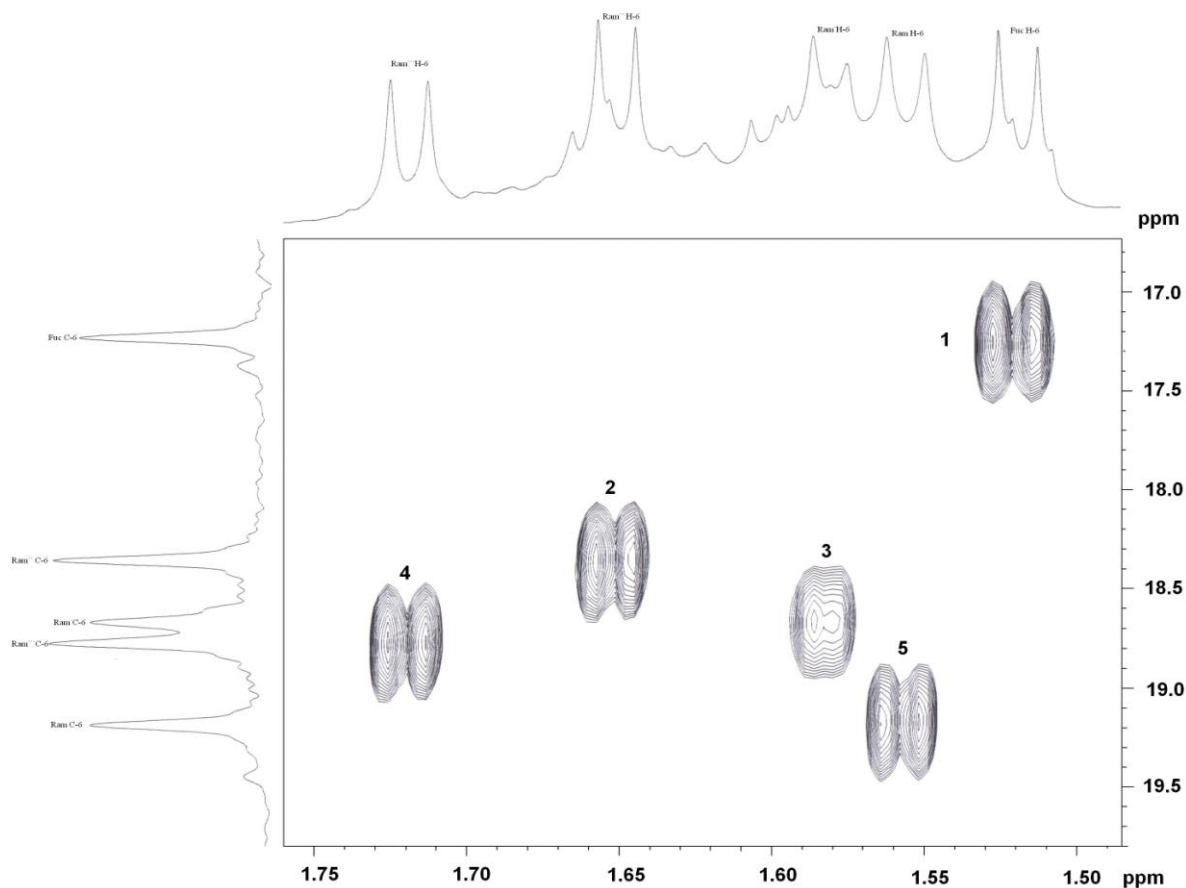


Figura 97. Sección del espectro HMQC del glicolípido **pescapreína VII**. Asignación de las resonancias de ^{13}C para la identificación de carbonos metinos de cada unidad de azúcar. Asignaciones: **1**; C_6Fuc , **2**; $\text{C}_6\text{Ram}''$, **3** $\text{C}_6\text{Ram}'$, **4**; $\text{C}_6\text{Ram}'''$, **5**; C_6Ram .

Para localizar las posiciones de esterificación y lactonización en los oligosacáridos es de suma importancia realizar una asignación correcta para los núcleos de carbono correspondientes a los grupos carbonilo de los ácidos que se encuentran esterificando al núcleo oligosacárido, así como la señal del grupo carbonilo aportado por la aglicona que forma la macrolactona característica de estos compuestos. Para esta asignación, se realizó un análisis de las interacciones que se presentan entre el núcleo de carbono de los grupos carbonilo y los protones H-2 de los correspondientes ácidos y de la aglicona,

como se ejemplifica para la estoloniferina II en la Figura 98. Los desplazamientos químicos observados en la RMN ^1H y ^{13}C para las **pescapreínas I–XII** y los **pescaprosidos A y B** se incluyen en los cuadros 16-21.

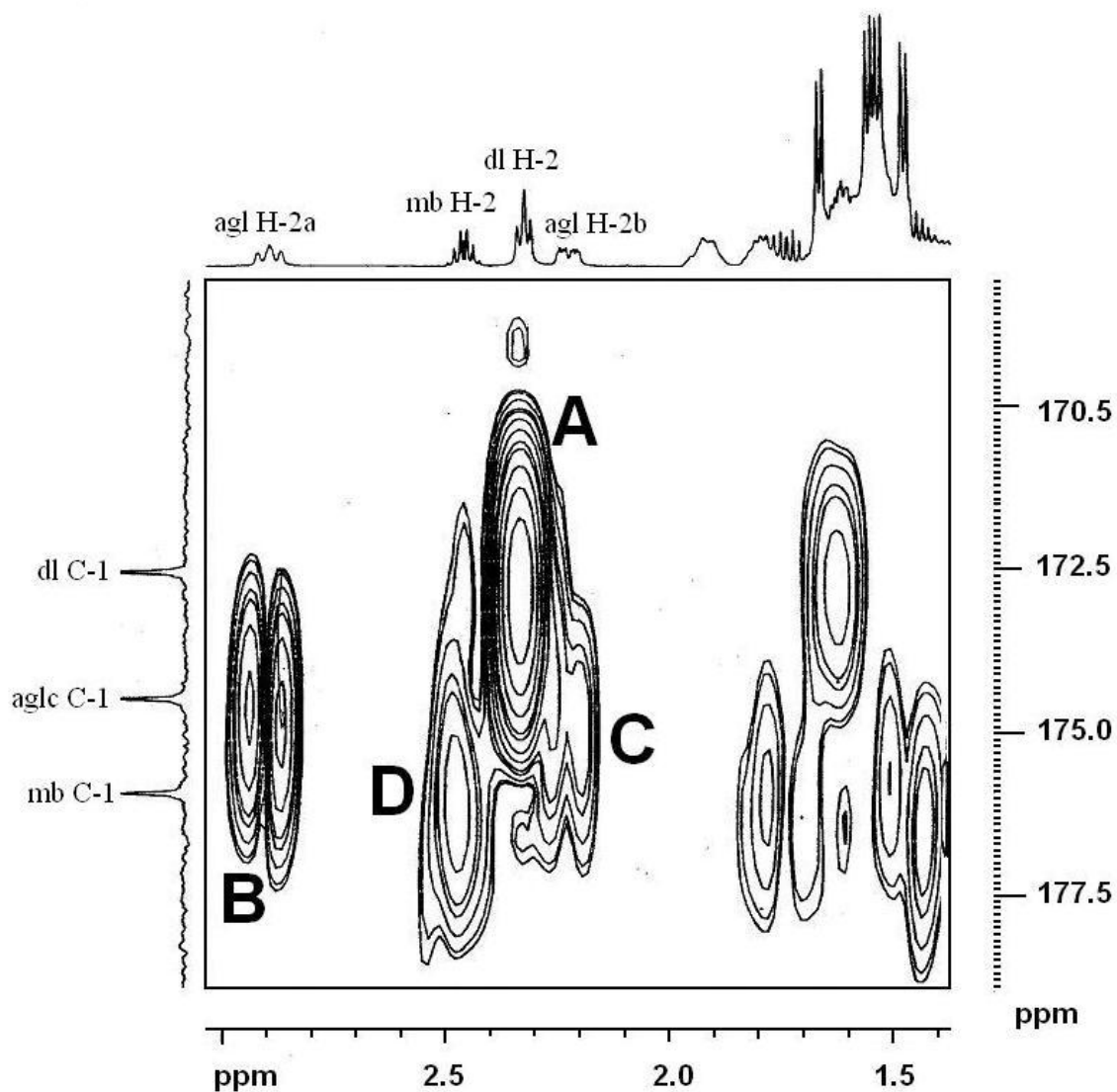


Figura 98. Sección del espectro HMBC de la **estoloniferina III**. Aisgnación de señales de ^{13}C de grupos carbonilo para la aglicona, y ácidos grasos. Correlaciones ($^2J_{\text{C-H}}$): A; $\text{C}_1\text{-H}_2\text{dl}$, B; $\text{C}_1\text{-H}_2\text{a agl}$, C; $\text{C}_1\text{-H}_2\text{b agl}$, D; $\text{C}_1\text{-H}_2\text{ mb}$. Abreviaciones: dl = decanoilo, mb = 2-metilbutanoilo, agl = aglicona.

Cuadro 16. Datos RMN ^1H de la estoloniferina III y pescapreínas I – IV (500 MHz)^a

proton ^b	Estoloniferina III	I	II	III	IV
fuc-1	4.80 d (7.9)	4.79 d (7.8)	4.81 d (7.6)	4.81 d (7.9)	4.78 d (7.9)
2	4.51 dd (9.4, 7.9)	4.49-4.52*	4.52 dd (9.5, 7.6)	4.53 dd (9.5, 7.9)	4.50 dd (9.5, 7.9)
3	4.18 dd (9.4, 3.7)	4.18 dd (9.5, 3.1)	4.19 dd (9.5, 3.4)	4.19 dd (9.5, 3.4)	4.16 dd (9.5, 3.3)
4	3.91 d (3.7)	3.90 (s)	3.91 d (3.4)	3.91 d (3.4)	3.89 d (3.3)
5	3.82 q (6.4)	3.80 q (6.4)	3.82 q (6.4)	3.81 q (6.4)	3.79 q (6.4)
6	1.52 d (6.4)	1.50 d (6.4)	1.52 d (6.4)	1.51 d (6.4)	1.49 d (6.4)
rha-1	6.32 d (1.5)	6.33 s	6.32 d (1.5)	6.35 d (1.4)	6.32 d (1.0)
2	5.30 dd (2.8, 1.5)	5.30 s	5.30 dd (2.8, 1.5)	5.32 dd (2.6, 1.4)	5.29 dd (2.5, 1.0)
3	5.61 dd (9.8, 2.8)	5.60 dd (9.7, 2.5)	5.61 dd (9.8, 2.8)	5.60 dd (9.8, 2.6)	5.58 dd (10.1, 2.5)
4	4.63 dd (9.8, 9.8)	4.64 dd (9.7, 9.7)	4.63 dd (9.8, 9.8)	4.63 dd (9.8, 9.8)	4.61 dd (10.1, 10.1)
5	5.00 dq (9.8, 6.1)	4.98 dq (9.3, 6.2)	5.00 dq (9.8, 6.7)	5.00 dq (9.8, 6.2)	4.98 dq (10.1, 6.2)
6	1.58 d (6.1)	1.57 d (6.2)	1.58 d (6.7)	1.57 d (6.2)	1.55 d (6.2)
rha'-1	5.65 d (1.5)	5.65 d (1.0)	5.65 d (1.5)	5.66 d (1.5)	5.63 d (1.5)
2	5.82 dd (3.2, 1.5)	5.81 dd (3.7, 1.0)	5.82 dd (3.3, 1.5)	5.82 dd (3.2, 1.5)	5.80 dd (2.0, 1.5)
3	4.52 dd (8.9, 3.2)	4.49-4.52*	4.52 dd (8.7, 3.3)	4.52 dd (9.5, 3.2)	4.50 dd (9.4, 2.0)
4	4.25 dd (8.9, 8.9)	4.31 dd (8.5, 8.5)	4.25 dd (8.7, 8.7)	4.23 dd (9.4, 9.4)	4.20 dd (9.4, 9.4)
5	4.32 dq (8.9, 6.1)	4.29 dq (8.5, 5.9)	4.32 dq (8.7, 6.4)	4.32 dq (9.4, 6.0)	4.31 dq (9.4, 6.0)
6	1.69 d (6.1)	1.63 d (5.9)	1.60 d (6.4)	1.59 d (6.0)	1.57 d (6.0)
rha''-1	5.90 s	5.92 s	5.89 s	5.92 s	5.90 s
2	4.61 dd (3.4, 1.5)	4.64*	4.62 dd (3.3, 1.3)	4.62 dd (3.4, 1.3)	4.61 dd (3.2, 1.0)
3	4.40 dd (9.8, 3.4)	4.36 dd (9.5, 3.1)	4.42 dd (9.8, 3.3)	4.41 dd (9.7, 3.4)	4.41 dd (9.7, 3.2)
4	5.76 dd (9.8, 9.8)	4.25 dd (9.5, 9.5)	5.76 dd (9.8, 9.8)	5.78 dd (9.7, 9.7)	5.78 dd (9.7, 9.7)
5	4.34 dq (9.8, 6.1)	4.27-4.33*	4.33 dq (9.8, 6.1)	4.35 dq (9.7, 6.3)	4.33 dq (9.7, 6.2)
6	1.39 d (6.1)	1.54 d (6.14)	1.38 d (6.1)	1.38 d (6.3)	1.38 d (6.2)
rha'''-1	5.56 d (1.0)	5.58 s	5.56 s	5.56 d (1.0)	5.55 s
2	4.77 dd (3.7, 1.0)	4.82 dd (2.9, 1.3)	4.78 dd (3.0, 1.3)	4.79 dd (3.7, 1.0)	4.76 dd (3.0, 1.0)
3	4.50 dd (9.2, 2.7)	4.49-4.52*	4.51 dd (9.5, 3.0)	4.53 dd (9.1, 3.7)	4.50 dd (9.2, 3.0)
4	4.21 dd (9.2, 9.2)	4.27-4.33*	4.21 dd (9.5, 9.5)	4.26 dd (9.1, 9.1)	4.24 dd (9.2, 9.2)
5	4.27 dq (9.2, 6.1)	4.27-4.33*	4.27 dq (9.5, 5.8)	4.28 dq (9.1, 6.1)	4.27 dq (9.2, 6.0)
6	1.70 d (6.1)	1.71 d (6.0)	1.71 d (5.8)	1.70 d (6.1)	1.68 d (6.0)
jal-2	2.27 ddd (15.3, 6.7, 2.7)	2.25 ddd (15.3, 6.1, 2.0)	2.28 m	2.25 ddd (15.3, 7.1, 3.1)	2.24 m
	2.93 t (12.2)	2.91 t (12.1)	2.93 t (12.5)	2.93 t (11.7)	2.91 t (12.7)
11	3.87 m	3.84 m	3.87 m	3.86 m	3.89 m
16	0.85 t (7.0)	0.85 t (7.5)	0.86 t (7.0)	0.85 t (6.8)	0.83 t (6.7)
iba-2			2.64 sept (7.0)		
3			1.17 d (7.0)		
3'			1.20 d (7.0)		
mba-2	2.50 tq (7.0, 6.7)			2.48 tq (7.0, 6.7)	
2-Me	0.94 t (7.3)			1.19 d (7.2)	
3-Me	1.2 d (7.0)			0.92 t (7.4)	
hexa-2					2.38 m
6					0.75 t (7.1)
deca-2	2.37 (t, 7.3)				
10	0.95 (t, 6.7)				
dodeca-2		2.33 t (7.4)	2.38 t (7.3)	2.35 t (7.2)	2.35 t (7.5)
12		0.92 t (7.1)	0.95 t (7.0)	0.93 t (6.8)	0.91 t (6.8)

^aDatos registrados en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm en relación al TMS. Los acoplamientos (J) se encuentran en paréntesis y se expresan en Hz.

^bAbreviaciones; s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuádruple, m = señal múltiple. Las asignaciones se basaron en los experimentos ^1H - ^1H COSY y TOCSY.

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

Cuadro 17. Datos RMN ^{13}C de la estoloniferina III y pescapreínas I – IV (125.7 MHz)^a.

carbon ^b	Estoloniferina III	I	II	III	IV
fuc-1	101.21	101.6	101.2	101.6	101.2
2	73.00	73.4	73.0	73.4	73.0
3	76.25	76.6	76.3	76.7	76.3
4	73.16	73.6	73.2	73.6	73.2
5	70.87	71.2	70.9	71.3	70.9
6	16.83	17.2	16.8	17.2	16.8
rha-1	99.87	100.5	99.9	100.3	99.9
2	69.37	69.8	69.4	69.8	69.4
3	77.44	77.9	77.4	77.8	77.5
4	77.66	77.5	77.6	78.1	77.6
5	67.52	67.9	67.5	67.9	67.5
6	18.78	18.6	18.8	19.2	18.8
rha'-1	98.80	99.4	98.8	99.2	98.8
2	72.59	73.0	72.6	73.0	72.6
3	79.86	80.4	79.9	80.3	79.9
4	78.82	78.5	78.8	79.2	78.7
5	67.93	68.5	67.9	68.4	67.9
6	18.35	18.3	18.4	18.8	18.4
rha''-1	103.31	103.2	103.3	104.3	103.2
2	72.27	72.6	72.3	72.7	72.3
3	69.80	72.5	69.8	70.2	69.8
4	74.41	73.8	74.4	74.8	74.7
5	67.75	70.7	67.7	68.2	67.7
6	17.47	19.1	17.5	17.9	17.5
rha'''-1	103.93	104.4	103.9	103.7	104.0
2	72.27	72.6	72.3	72.6	72.2
3	72.15	72.5	72.2	72.6	72.1
4	73.34	73.6	73.4	73.7	73.4
5	70.42	70.7	70.4	70.8	70.4
6	18.35	18.8	18.4	18.8	18.4
jal-1	174.49	174.9	174.5	174.9	174.5
2	33.30	33.7	33.3	33.7	33.3
11	78.95	79.4	79.0	79.4	79.0
16	13.88	14.3	13.9	14.3	13.9
iba-1	175.94		175.9		
2	41.17		41.2		
3	11.38		11.4		
3'	16.62		16.6		
mba-1				176.4	
2				41.6	
2-Me				17.0	
3-Me				11.8	
hexa-1					173.1
2					34.0
6					13.6
deca-1	172.56				
2	33.99				
10	14.03				
dodeca-1		172.9	172.6	173.0	172.6
2		34.4	34.0	34.4	34.2
12		14.4	14.0	14.4	14.0

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

Todas las asignaciones están basadas en los experimentos HMQC.

^bAbreviaciones: Fuc = Fucosa, Ram = Ramnosa, Jal = 11-hidroxi-hexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo; ib = 2-metilpropanoilo (isobutanoilo), hexa = *n*-hexanoilo, deca = *n*-decanoilo, dodeca = *n*-dodecanoilo.

Cuadro 18. Datos RMN ^1H de las pescapreínas V – IX (500 MHz)^a

proton ^b	V	VI	VII	VIII	IX
fuc-1	4.79 d (8.0)	4.79 d (7.5)	4.80 d (7.9)	4.81 d (7.9)	4.79 d (7.8)
2	4.53 dd (9.5, 8.0)	4.54 dd (9.5, 7.5)	4.52 dd (9.6, 7.9)	4.52 dd (9.5, 7.9)	4.50 dd (9.4, 7.8)
3	4.19 dd (9.5, 3.5)	4.20 dd (9.5, 3.5)	4.18 dd (9.6, 3.4)	4.20 dd (9.5, 3.3)	4.20 dd (9.4, 3.4)
4	3.92 d (3.5)	3.93 d (3.5)	3.91 d (3.4)	3.91 d (3.3)	3.90 d (3.4)
5	3.83 q (6.5)	3.83 q (6.5)	3.81 q (6.4)	3.82 q (6.5)	3.80 q (6.4)
6	1.53 d (6.5)	1.52 d (6.5)	1.51 d (6.4)	1.51 d (6.5)	1.50 d (6.4)
rha-1	6.38 bs	6.4 d (1.5)	6.33 d (1.6)	6.33 d (1.3)	6.32 d (1.6)
2	5.29 bs	5.26 dd (2.3, 1.5)	5.30 dd (2.3, 1.6)	5.31 dd (2.8, 1.3)	5.29 d (2.8, 1.6)
3	5.60 dd (9.5, 2.5)	5.68 dd (9.8, 2.3)	5.61 dd (9.8, 2.3)	5.61 dd (9.6, 2.8)	5.60 dd (9.8, 2.8)
4	4.59 dd (9.5, 9.5)	4.70 dd (9.8, 9.8)	4.65 dd (9.8, 9.8)	4.63 dd (9.6, 9.6)	4.62 dd (9.8, 9.8)
5	5.02 dq (9.5, 6.5)	5.08 dq (9.8, 6.1)	5.00 dq (9.8, 6.4)	5.01 dq (9.6, 6.3)	5.00 dq (9.8, 6.2)
6	1.60 d (6.5)	1.55 bs	1.55 d (6.4)	1.57 d (6.3)	1.56 d (6.2)
rha'-1	5.56 d (1.5)	5.90 d (1.0)	5.66 d (1.7)	5.66 d (1.7)	5.64 d (1.3)
2	5.78 dd (2.8, 1.5)	4.75 bs	5.82 dd (3.4, 1.7)	5.82 dd (3.0, 1.7)	5.81 dd (2.4, 1.3)
3	4.59 dd (9.5, 2.8)	5.70 dd (9.5, 3.0)	4.50 dd (9.1, 3.4)	4.51 dd (9.5, 3.0)	4.49 dd (9.3, 2.4)
4	4.25 dd (9.5, 9.5)	4.57 dd (9.5, 9.5)	4.27–4.34*	4.26 (9.5, 9.5)	4.25–4.32*
5	4.36 dq (9.5, 6.0)	4.34 dq (9.5, 6.3)	4.27–4.34*	4.33 dq (9.5, 6.1)	4.25–4.32*
6	1.67 d (6.0)	1.54 d (6.3)	1.57 d (6.0)	1.59 d (6.1)	1.58 d (6.3)
rha''-1	6.15 d (1.5)	5.50 d (1.5)	5.92 bs	5.91 bs	5.90 bs
2	4.77 dd (3.0, 1.5)	5.71 dd (3.0, 1.5)	4.65 dd (3.3, 1.4)	4.62 dd (3.3, 2.0)	4.62 bs
3	4.18 dd (9.5, 3.0)	4.48 dd (9.3, 3.0)	4.36 dd (9.2, 3.3)	4.42 dd (9.8, 3.3)	4.36 dd (9.8, 3.4)
4	5.82 dd (9.5, 9.5)	4.13 dd (9.3, 9.3)	4.26 dd (9.2, 9.2)	5.76 dd (9.8, 9.8)	5.79 dd (9.8, 9.8)
5	4.41 dq (9.5, 6.5)	4.29 dq (9.3, 6.3)	4.27–4.34*	4.33 dq (9.3, 6.3)	4.34 dq (9.6, 6.2)
6	1.44 d (6.5)	1.63 d (6.3)	1.65 d (6.1)	1.37 d (6.3)	1.39 d (6.3)
rha'''-1			5.58 d (1.5)	5.56 bs	5.55 d (1.1)
2			4.52 dd (3.3, 1.5)	4.78 bs	4.77 bs
3			4.53 dd (9.3, 3.3)	4.52 dd (9.5, 3.2)	4.51 dd (9.3, 3.3)
4			4.24 dd (9.3, 9.3)	4.24 dd (9.5, 9.5)	4.25–4.32*
5			4.27–4.34*	4.29 dq (9.5, 6.2)	4.25–4.32*
6			1.71 d (6.1)	1.70 d (6.2)	1.69 d (6.1)
jal-2	2.23 ddd (14.0, 7.0, 3.0)	2.14 ddd (14.5, 7.0, 2.5)	2.24 ddd (15.7, 7.7, 2.1)	2.25 ddd (14.0, 6.5, 2.6)	2.24 m
	2.71 ddd ^c (14.0, 12.0, 1.7)	2.29 ddd ^c (14.5, 12.5, 2.0)	2.91 ddd ^c (15.7, 12.5, 1.8)	2.94 ddd ^c (14.0, 11.6, 1.7)	2.91 ddd ^c (13.1, 12.5, 1.8)
11	3.87 m	3.91 m	3.86 m	3.87 m	3.85 m
16	1.2 t (7.0)	0.96 t (7.3)	0.94 t (7.0)	0.95 t (6.9)	0.98 t (7.1)
iba-2				2.63 sept (7.0)	
3				1.19 d (7.0)	
3'				1.16 d (7.0)	
mba-2	2.53 tq (7.0, 6.5)	2.51 tq (7.0, 6.5)			
2-Me	1.22 d (7.0)	1.20 d (7.0)			
3-Me	0.96 t (7.5)	0.91 t (7.5)			
hexa-2					2.38 t (7.3)
6					0.93 t (7.1)
deca-2			2.35 t (7.4)		2.35 t (7.5)
10			0.86 t (7.2)		0.77 t (7.2)
dodeca-2	2.34 ddd (15.5, 8.5, 8.5)	2.42 ddd (14.0, 6.5, 6.5)		2.36 t (7.3)	
	2.25 ddd (15.5, 8.0, 8.0)	2.77 ddd (14.0, 6.5, 6.0)			
12	0.87 t (7.0)	0.86 t (7.1)		0.87 t (7.1)	

^aDatos registrados en C₅D₅N. Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm en relación con TMS. Los acoplamientos (J) se encuentran en paréntesis y se expresan en Hz.

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

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

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

Cuadro 19. Datos RMN ^{13}C de las pescapreínas V – IX 125.7 MHz)^a.

carbon ^b	V	VI	VII	VIII	IX
fuc-1	101.5	101.7	101.6	101.6	101.6
2	73.2	73.0	73.4	73.4	73.4
3	76.8	76.9	76.6	76.6	76.7
4	73.5	73.6	73.5	73.6	73.6
5	71.3	71.2	71.2	71.3	70.8
6	17.2	17.2	17.2	17.2	17.2
rha-1	100.3	100.3	100.3	100.3	100.3
2	69.6	69.1	69.8	69.8	69.8
3	77.9	79.0	77.9	77.8	77.9
4	70.9	75.7	77.5	78.0	79.2
5	67.7	67.5	67.9	67.9	68.3
6	19.0	19.3	19.2	19.2	19.2
rha'-1	100.7	102.3	99.1	99.2	99.2
2	74.3	70.3	73.0	73.0	73.0
3	79.2	75.7	79.8	80.3	79.0
4	80.8	77.9	78.6	79.2	79.6
5	68.5	69.1	68.5	68.1	68.0
6	18.7	18.5	18.6	18.7	18.8
rha''-1	103.8	100.6	103.7	103.9	103.7
2	72.3	73.6	72.5	72.6	72.7
3	70.2	70.1	70.7	70.2	69.8
4	75.1	73.6	74.0	74.9	75.1
5	68.0	70.7	70.7	68.3	68.1
6	18.0	18.3	18.3	17.8	17.9
rha'''-1			104.4	104.3	104.4
2			72.6	72.7	72.6
3			72.5	72.5	71.3
4			73.5	73.8	73.8
5			70.7	70.8	70.2
6			18.8	18.8	18.8
jal-1	174.9	174.4	174.9	174.9	174.9
2	34.2	34.6	33.7	33.7	33.7
11	79.3	79.8	79.4	79.4	79.3
16	14.6	14.6	14.4	14.3	14.5
iba-1				176.7	
2				34.5	
3				19.3	
3'				19.1	
mba-1	176.4	176.1			
2	41.6	41.4			
2-Me	11.8	11.7			
3-Me	17.0	16.8			
hexa-1					173.0
2					34.4
6					14.3
deca-1			173.0		173.5
2			34.4		34.7
10			14.3		14.3
dodeca-1	173.2	173.0		172.9	
2	34.4	34.3		34.4	
12	14.3	14.3		14.4	

^aDatos registrados en $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$. Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm relativos al TMS.

Todas las asignaciones están basadas en los experimentos HMQC.

^bAbreviaciones: Fuc = Fucosa, Ram = Ramnosa, Jal = 11-hidroxi-hexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo; ib = 2-metilpropanoilo (isobutanoilo), hexa = *n*-hexanoilo, deca = *n*-decanoilo, dodeca = *n*-dodecanoilo.

Cuadro 20. Datos RMN ¹H de las pescapreínas X – XII y de los pescaprosidos A y B (500 MHz)^a

proton ^b	X	XI	XII	Pescaprosido A	Pescaprosido B
fuc-1			4.82 d (7.5)	4.79 d (7.8)	4.80–4.83*
2			4.53 dd (9.5, 8.0)	4.52 dd (9.1, 7.8)	4.52 dd (9.5, 8.0)
3			4.19 dd (9.0, 3.5)	4.14 dd (9.1, 2.7)	4.16 dd (9.5, 3.5)
4			3.92 d (3.5)	3.93 d (2.7)	3.94 d (3.5)
5			3.82 q (6.0)	3.78 q (6.4)	3.80 q (6.5)
6			1.52 d (6.5)	1.51 d (6.4)	1.53 d (6.5)
glc-1	5.04 d (7.5)				
2	4.29 dd (9.5, 7.0)				
3	4.31 dd (9.5, 9.5)				
4	4.16 dd (8.5, 8.5)				
5	3.92 ddd (9.5, 7.0, 2.5)				
6	4.38 dd (11.5, 5.5) 4.53 dd (11.5, 3.0)				
xil-1		4.88 d (7.0)			
2		4.25 t (8.0)			
3		4.30 t (9.5)			
4		4.12 ddd (10.5, 8.5, 5.5)			
5		3.65 t (10.8) 4.30 dd (11.0, 5.5)			
rha-1	6.47 d (1.5)	6.47 d (1.5)	6.35 d (1.0)	6.26 d (1.6)	6.28 d (1.0)
2	5.33 dd (4.0, 2.0)	5.32 (2.5, 1.0)	5.32 dd (3.0, 2.0)	4.64 dd (2.7, 1.6)	4.64 dd (3.0, 1.0)
3	5.63 dd (10.3, 2.8)	5.61 dd (10.0, 3.0)	5.61 dd (10.0, 2.5)	4.48 dd (9.4, 2.7)	4.33 dd (9.5, 3.0)
4	4.69 dd (9.8, 9.8)	4.68 dd (9.5, 9.5)	4.64 dd (10.0, 10.0)	4.31 dd (9.4, 9.4)	4.31 dd (9.5, 9.5)
5	5.10 dq (9.3, 6.3)	5.07 dq (9.5, 6.5)	5.01 dq (10.0, 6.0)	4.88 dq (9.4, 6.3)	4.91 dq (9.0, 6.0)
6	1.73 d (6.0)	1.71 d (6.0)	1.57 d (6.5)	1.59 d (6.3)	1.62 d (6.0)
rha'-1	5.69 d (1.5)	5.68 d (1.5)	5.66 d (1.5)	5.94 d (1.0)	6.11 d (2.0)
2	5.84 dd (3.0, 1.0)	5.84 dd (2.0, 1.0)	5.83 dd (3.0, 2.0)	6.02 dd (2.2, 1.0)	6.04 dd (3.5, 2.0)
3	4.53 dd (9.0, 2.5)	4.52 dd (9.0, 3.0)	4.52 dd (9.5, 3.0)	4.67 dd (9.1, 2.2)	4.67 dd (9.5, 3.5)
4	4.29 dd (9.5, 9.5)	4.23 dd (9.5, 9.5)	4.27 dd (9.5, 9.5)	4.33-4.35*	4.30 dd (9.5, 9.5)
5	4.36 dq (9.5, 6.0)	4.30 dq (9.5, 6.0)	4.34 dq (9.5, 6.0)	4.32 dq (9.1, 6.0)	4.35 dq (9.5, 6.0)
6	1.62 d (6.0)	1.62 d (6.0)	1.60 d (6.0)	1.63 d (6.0)	1.73 d (6.0)
rha''-1	5.94 s	5.93 s	5.92 bs	6.12 d (1.6)	5.92 s
2	4.64 s	4.63 s	4.63 dd (3.5, 1.2)	4.65 dd (3.2, 1.6)	4.64 dd (3.5, 1.5)
3	4.44 dd (10.5, 3.5)	4.42 dd (9.5, 3.5)	4.42 dd (10.0, 3.5)	4.37 dd (9.5, 3.2)	4.42 dd (9.8, 3.0)
4	5.79 dd (9.8, 9.8)	5.78 dd (10.0, 10.0)	5.78 dd (9.5, 9.5)	4.24 dd (9.5, 9.5)	5.53 dd (9.8, 9.8)
5	4.37 dq (9.5, 5.5)	4.36 dq (9.5, 6.0)	4.35 dq (9.8, 6.3)	4.33-4.35*	4.37 dq (9.8, 6.0)
6	1.41 d (6.0)	1.40 d (6.5)	1.39 d (6.5)	1.52 d (6.2)	1.40 d (6.0)
rha'''-1	5.57 d (1.5)	5.58 d (1.5)	5.57 d (1.5)	5.74 s	5.62 s
2	4.80 s	4.80 s	4.79 s	4.85 dd (3.5, 1.0)	4.80–4.83 bs*
3	4.54 dd (9.0, 2.5)	4.53 dd (9.0, 3.0)	4.53 dd (9.5, 3.0)	4.49 dd (9.5, 3.5)	4.48 dd (9.3, 3.3)
4	4.24 dd (9.0, 9.0)	4.25 dd (9.0, 9.0)	4.25 dd (9.5, 9.5)	4.26 dd (9.5, 9.5)	4.23 dd (9.3, 9.3)
5	4.30 dq (9.5, 6.0)	4.28 dq (9.0, 6.5)	4.30 dq (9.5, 6.0)	4.33-4.35*	4.27 dq (9.3, 6.0)
6	1.71 d (6.0)	1.72 d (6.0)	1.71 d (6.0)	1.73 d (6.2)	1.58 d (6.5)
jal-2	2.27 ddd (15.5, 7.0, 3.0) 2.96 t (12.0)	2.26 ddd (15.0, 7.0, 3.0) 2.95 t (12.0)	2.26 ddd (15.0, 7.0, 2.5) 2.94 t (13.0)	2.31 t (7.52)	2.33 t (7.5)
11	3.92 m	3.86 m	3.87 m	3.97 t (5.8)	4.01 m
16	0.87 t (7.0)	0.87 t (7.0)	0.95 t (7.0)	0.85 t (7.2)	0.94 t (7.0)
mba-2	2.50 tq (7.0, 6.5)	2.50 tq (7.0, 6.5)	2.50 tq (7.0, 6.5)		2.49 tq (7.0, 6.5)
2-Me	1.20 d (7.0)	1.20 d (7.0)	1.20 d (7.0)		1.20 d (7.0)
3-Me	0.94 t (7.5)	0.94 t (7.5)	0.94 t (7.5)		0.93 t (7.5)
dodeca-2	2.38 t (7.5)	2.38 t (7.5)	2.37 t (7.5)	2.32 t (7.5)	2.32 t (7.5)
12	0.95 t (7.3)	0.93 t (7.0)	0.87 t (7.0)	0.91 t (6.8)	0.87 t (7.0)

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

^bAbreviaciones; s = señal simple, d = señal doble, t = señal triple, q = señal cuádruple, m = señal múltiple. Las asignaciones se basaron en los experimentos ¹H-¹H COSY y TOCSY.

Fuc = fucosa, Glc = glucosa, Xil = xilosa, Ram = ramnosa, Jal = 11-hidroxihexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo, dodeca = n-dodecanoilo.

Cuadro 21. Datos RMN ^{13}C de las pescapreínas X – XII y de los pescaprosido A y B (125.7 MHz)^a.

carbon ^b	X	XI	XII	Pescaprosido A	Pescaprosido B
fuc-1			101.6	101.2	101.2
2			73.4	72.7	74.8
3			76.6	76.6	76.7
4			73.6	73.5	73.5
5			71.3	71.2	71.3
6			17.2	17.2	17.2
glc-1	101.4				
2	75.3				
3	79.6				
4	72.1				
5	78.2				
6	62.8				
xil-1		102.1			
2		75.3			
3		79.3			
4		71.5			
5		67.2			
rha-1	100.3	100.4	100.3	101.3	101.3
2	69.7	69.7	69.8	72.9	72.9
3	77.8	77.8	77.8	74.9	80.6
4	78.2	78.2	78.1	80.1	79.7
5	68.0	68.1	67.9	66.9	66.9
6	19.3	18.2	19.2	18.8	18.9
rha'-1	99.2	99.2	99.2	103.6	99.2
2	73.0	73.0	73.0	73.5	72.6
3	80.3	80.3	80.2	80.1	79.8
4	77.8	79.8	79.2	78.9	79.6
5	68.3	67.2	68.3	68.4	68.2
6	18.7	18.8	18.8	18.3	18.7
rha''-1	103.7	103.7	103.7	98.6	103.7
2	72.6	72.7	72.6	72.6	72.7
3	70.2	70.2	70.2	72.7	70.2
4	74.8	74.8	74.8	73.7	74.8
5	68.1	68.3	68.1	70.6	68.1
6	17.9	17.0	17.9	19.1	17.9
rha'''-1	104.3	104.4	104.3	104.8	104.9
2	72.7	72.7	72.7	72.6	72.6
3	72.5	72.5	72.5	72.7	72.7
4	73.7	73.7	73.7	73.6	73.7
5	70.8	70.8	70.8	70.5	73.7
6	18.7	19.3	18.8	18.6	19.1
jal-1	174.9	174.9	174.9	174.0	174.0
2	33.6	33.7	33.7	34.2	34.5
11	79.3	79.5	79.3	77.9	77.8
16	14.2	14.3	14.4	14.3	14.5
mba-1	176.3		176.3		176.3
2	41.5	41.6	41.6		41.6
2-Me	11.8	11.8	11.8		11.8
3-Me	17.0	17.0	17.0		17.0
dodeca-1	172.9	168.5	173.0	172.9	172.9
2	34.4	34.4	34.4	34.4	34.4
12	14.4	14.4	14.3	14.4	14.3

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

Todas las asignaciones están basadas en los experimentos HMQC.

^bAbreviaciones: Fuc = Fucosa, Glc = Glucosa, Xil = Xilosa, Ram = Ramnosa, Jal = 11-hidroxi-hexadecanoilo, mb = 2-metilbutanoilo, dodeca = *n*-dodecanoilo.

6.9.2 Determinación de la secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación

Se estableció la secuencia de glicosidación a partir de las correlaciones $^3J_{C-H}$ en los espectros HMBC para el pescaprósido A (Figura 99), pescapreína V (Figura 100), pescapreína X (Figura 101) y pescapreína XI (Figura 102 y 103).

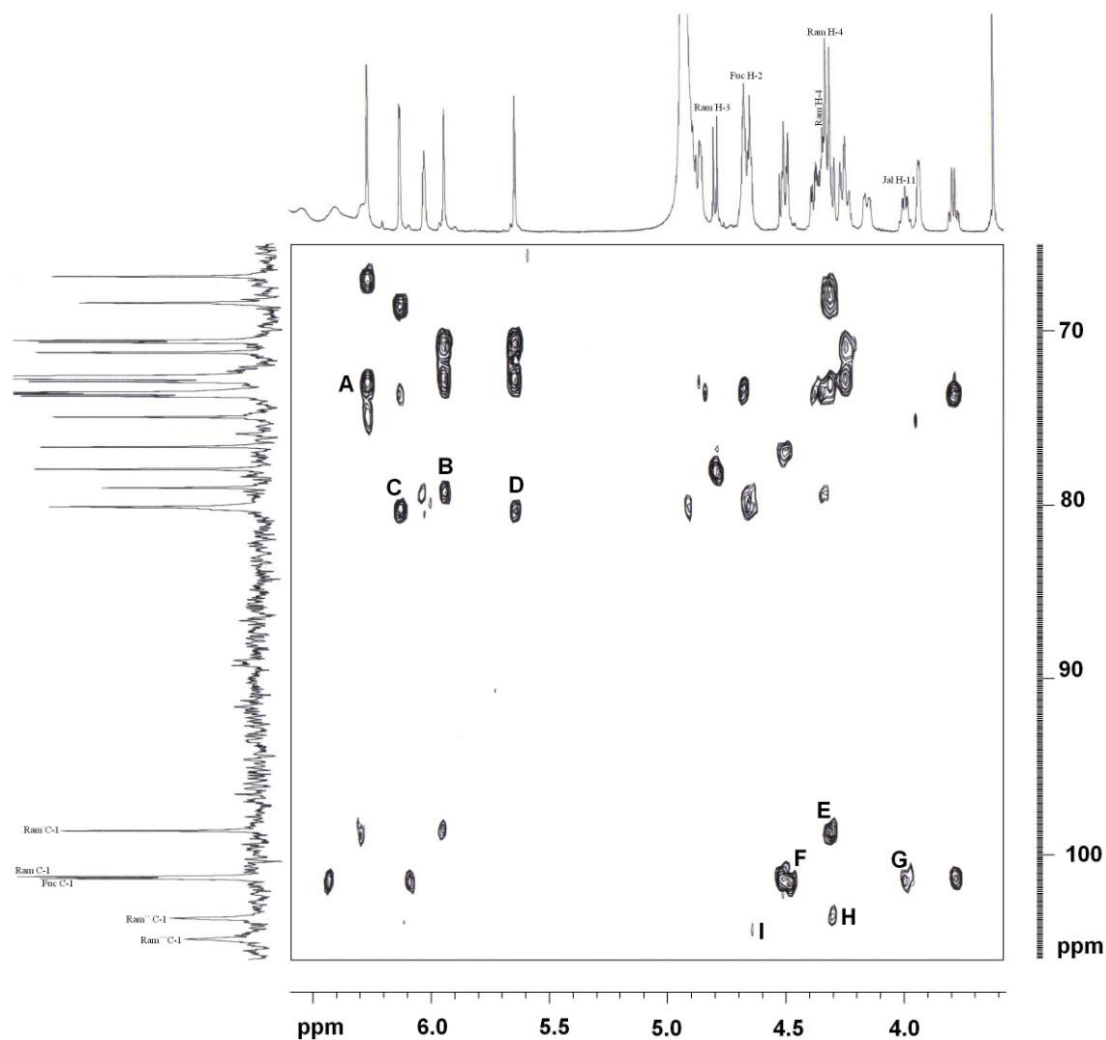


Figura 99. Sección del espectro HMBC del **pescaprósido A**. Conectividades: **A**; $C_2\text{Fuc}-H_1\text{Ram}$, **B**; $C_4\text{Ram}-H_1\text{Ram}'$, **C**; $C_4\text{Ram}'-H_1\text{Ram}''$, **D**; $C_3\text{Ram}'-H_1\text{Ram}''$, **E**; $C_1\text{Ram}'-H_4\text{Ram}$, **F**; $C_1\text{Ram}-H_2\text{Fuc}$, **G**; $C_{11}\text{Agl}-H_1\text{Fuc}$, **H**; $C_1\text{Ram}''-H_4\text{Ram}'$, **I**; $C_1\text{Ram}'''-H_3\text{Ram}'$.

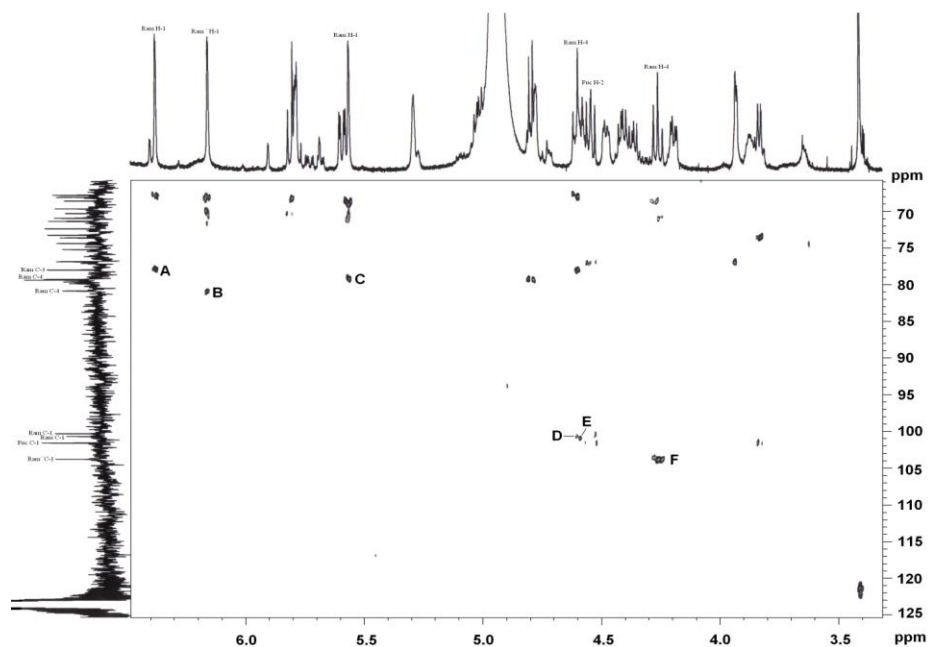


Figura 100. Sección del espectro HMBC de la **pescapreína V**. Conectividades; **A**; RamC₁-RamH₃, **B**; Ram''C₁-RamC₄, **C**; Ram'C₁-RamC₄, **D** Ram'C₁-RamH₄, **E** RamC₁-FucH₂ **F** Ram'''C₁-Ram'H₄ Abreviaciones; Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram''= ramnosa externa superior, Ram'''= ramnosa externa inferior.

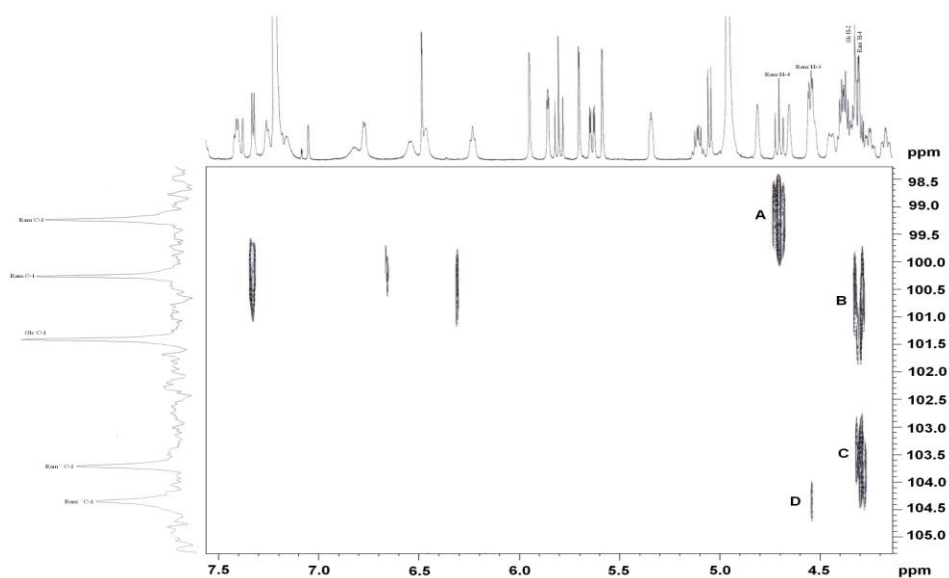


Figura 101. Sección del espectro HMBC de la **Pescapreína X**. Conectividades; **A**; Ram'C₁-RamH₄, **B**; RamC₁-GlcCH₂, **C**; Ram''C₁-Ram'H₄, **D** Ram'''C₁-Ram'H₃.

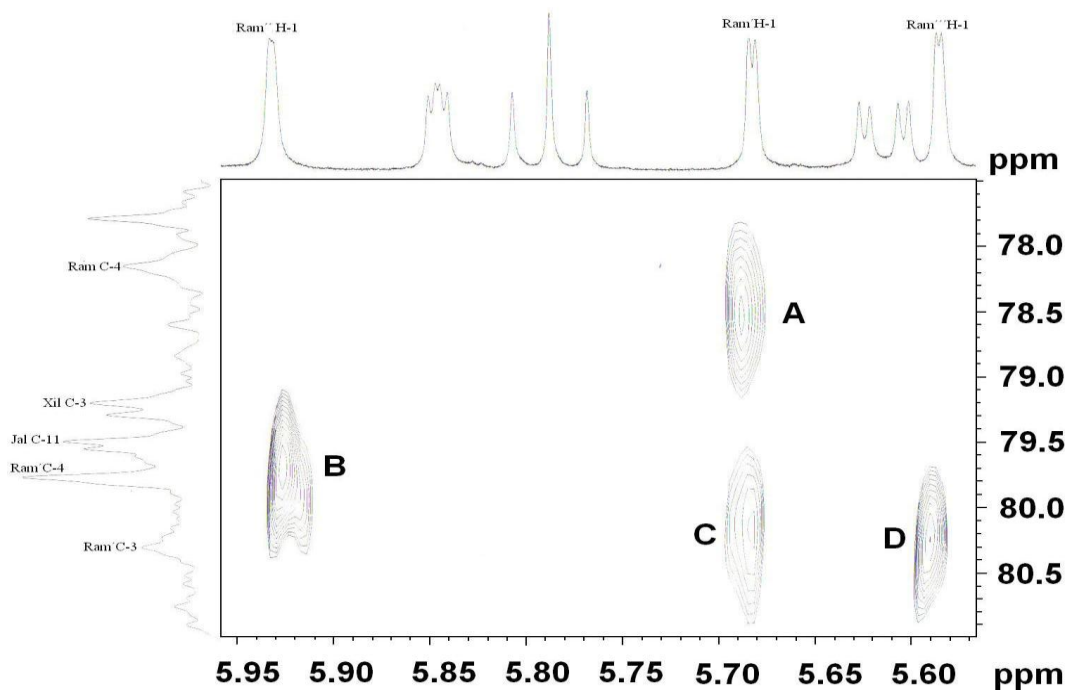


Figura 102. Sección del espectro HMBC de la **pescapreína XI**. Conectividades; **A**; Ram'H₁-RamC₄, **B**; Ram'C₃-Ram''H₁, **C**; RamH₁-RamC₃, **D** Ram'''H₁-Ram'C₃.

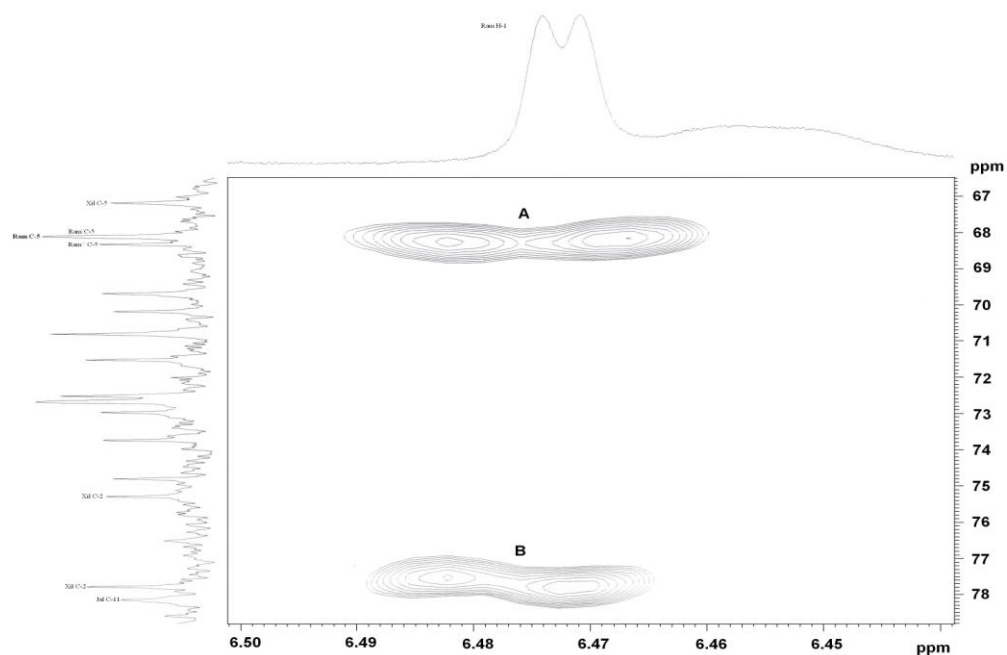


Figura 103. Sección adicional del espectro HMBC de la **pescapreína XI**. Conectividades; **A**; RamH₁-RamC₅, **B**; RamH₁-XilC₃.

La Figura 104 ilustra la determinación de los sitios de acilación para los residuos de grupos esterificantes: isobutanoilo (**ib**), metilbutanoilo (**mb**), *n*-hexanoilo (**hx**), *n*-decanoilo (**dl**) y *n*-dodecanoilo (**ddl**), así como para la aglicona (**Agl**).

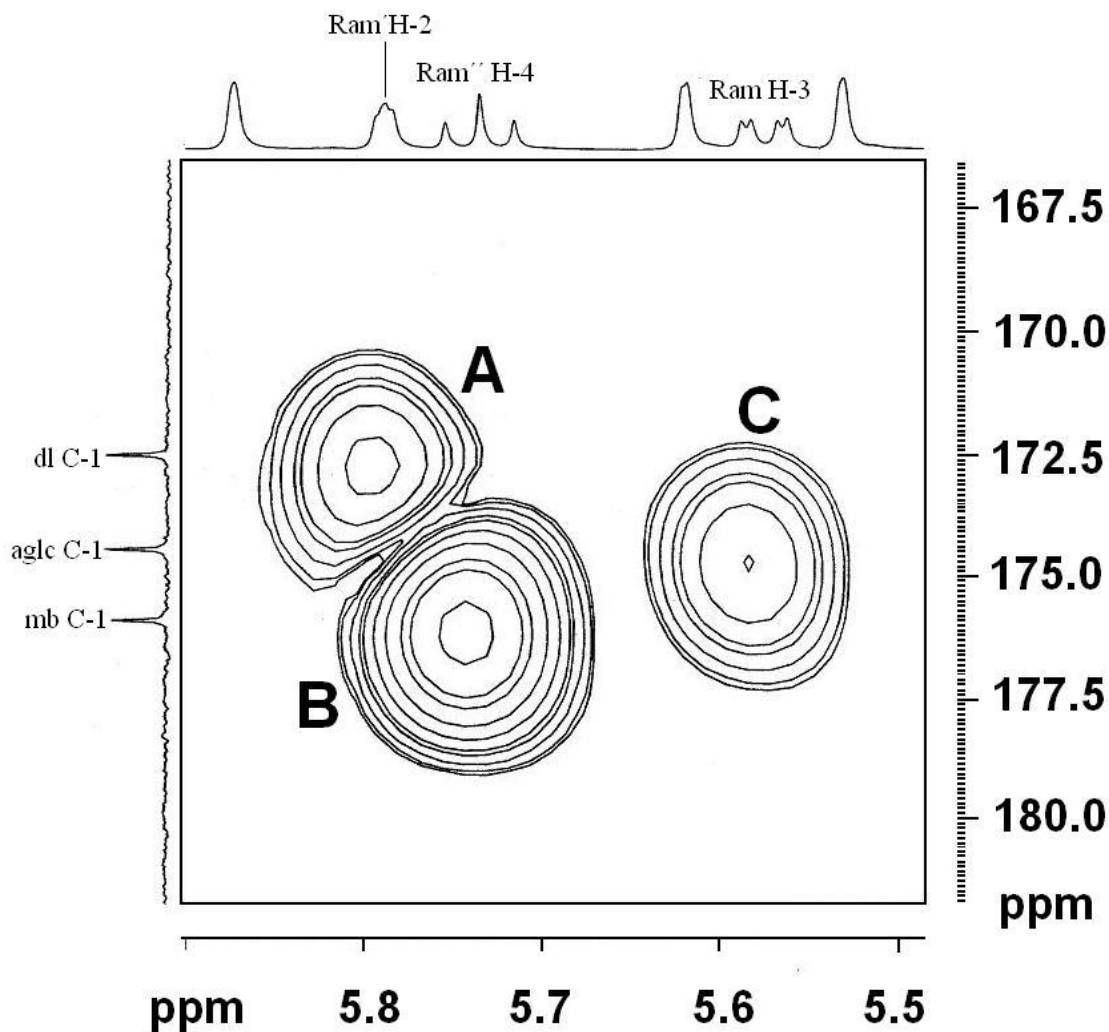


Figura 104. Sección del espectro HMBC de la estoloniferina III para la determinación de los sitios de acilación. Conectividades : **A**; C₁dl-H₂Ram', **B**; C₁mb-H₄Ram'', **C**; C₁Agl-H₃Ram. Abreviaciones: Ram = ramnosa interna superior, Ram' = ramnosa interna inferior, Ram'' = ramnosa externa superior, Agl = aglicona.

6.9.3 Diferenciación de las Pescapreínas y de los Pescaprosidos mediante Espectrometría de Masas

Los espectros de masas FAB (modo negativo) de las **pescapreínas I–XII** y de los **pescaprosidos A y B** permitieron calcular la fórmula molecular para cada uno de ellos (Ver Parte experimental, apartado 5.6). En cada uno de los espectros correspondientes a las pescapreínas I–IX y XI, los pescaprosidos A y B, así como el espectro de la estoloniferina III se observaron picos comunes provocados por las rupturas de los enlaces glicosídicos, similares a los generados por las operculinas presentes en *Ipomoea operculata* (Ono *et al.*, 1990c). La Figura 105 ilustra el patrón de fragmentación característico para esta clase de moléculas.

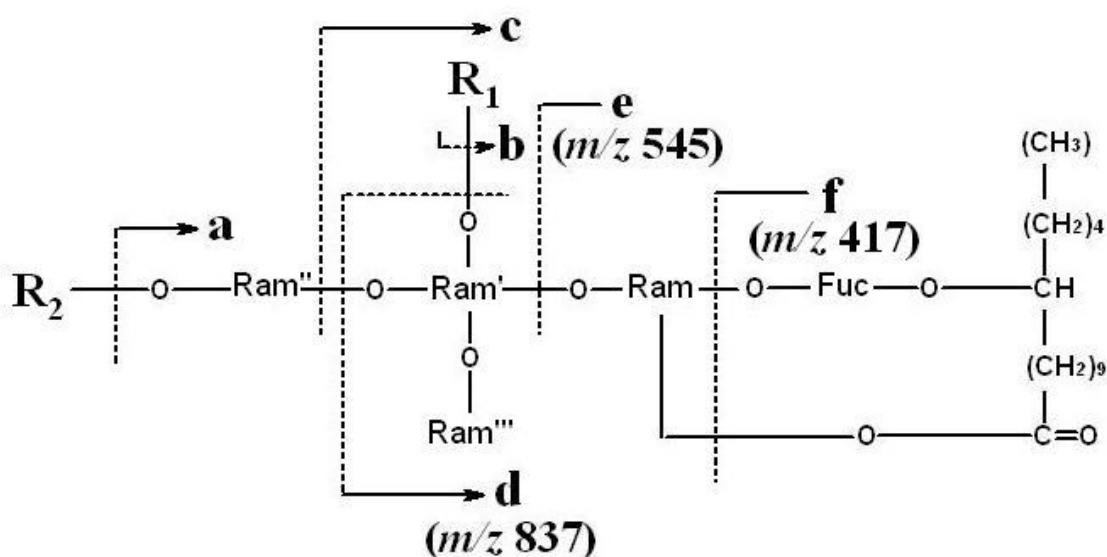


Figura 105. Patrón de fragmentación para la serie de las pescapreínas.

De acuerdo a los espectros de masas FAB (modo negativo), las pescapreínas mostraron patrones de fragmentación semejantes ya que todas

presentaron los iones **d**, **e** y **f** (Figura 105). Sin embargo, para establecer las diferencias entre los quince compuestos resultó de utilidad analizar las diferencias de peso que hay entre sus respectivos iones pseudomoleculares $[M - 1]$ y los iones **a** y **b**. Diferencias que corresponden, por un lado, en el caso de las pescapreínas V, VI, X y XI, a núcleos oligosacáridos diferentes (ya que las dos primeras son tetrasacáridos y las dos últimas no presentaron fucosa, sino glucosa y xilosa) y, por otro lado, a las pérdidas de los ácidos que esterifican los núcleos oligosacáridos y que representan los restos de los ácidos grasos que establecen la diferencia entre cada uno de los compuestos.

Tomando como referencia la Figura 105 que representa la fragmentación de la mayoría de las pescapreínas aisladas, el fragmento **a** que corresponde a la pérdida de restos de metilbutanoilo, isobutanoilo o *n*-hexanoilo, se presentaron los siguientes fragmentos:

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

Pescapreína I: Fragmento de m/z 1165 que corresponde a la pérdida de $[M - H]^-$ ya que no presentó el fragmento **a**.

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

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

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

Pescapreína VII: Fragmento de m/z 1137 que corresponde a la pérdida de $[M - H]^-$ ya que no presentó el fragmento a.

Pescapreína VIII: en la Pescapreína VIII, el fragmento **c** fue el que se encontró en correlación con la pérdida de 2-metilpropanoilo; pues no se registró el correspondiente fragmento **a** en el espectro de este compuesto (Figura 106). El fragmento **c** equivale a m/z 1019 $[M - H - C_4H_6O - C_6H_{10}O_4]^-$ que corresponde a una diferencia de 216 de unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular $[M-1]$ de m/z 1235 unidades.

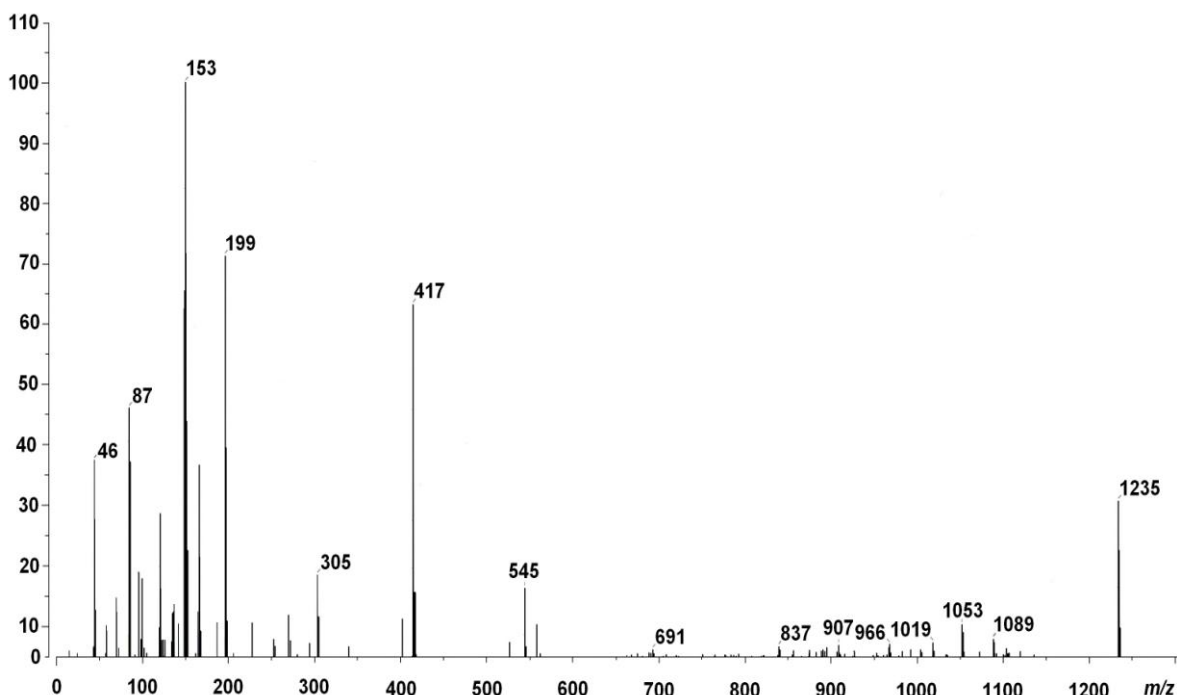


Figura 106. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la **pescapreína VIII**.

Pescapreína IX: Fragmento de m/z 1137 que corresponde a la pérdida del residuo de *n*-hexanoilo con una diferencia de 98 de unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular $[M-1]$ de m/z 1235 unidades.

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

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

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

Pescapreína I: Fragmento de m/z 983 que corresponde a la pérdida del residuo de dodecanoilo con una diferencia de 182 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular $[M - 1]$ de m/z 1165 unidades.

Pescapreína II: En la pescapreína II, el fragmento **d** fue el que presentó una correlación con la pérdida de un residuo de *n*-dodecanoilo, pues no se registró ningún fragmento correspondiente al pico **b** en el espectro de este compuesto (Figura 107). El fragmento **d** equivale a una m/z de 837 $[M - H - C_{12}H_{22}O - C_6H_{10}O_4 - C_4H_6O]^-$ que corresponde a una diferencia de 398 unidades con respecto al ión pseudomolecular $[M - 1]$ de m/z 1235 unidades.

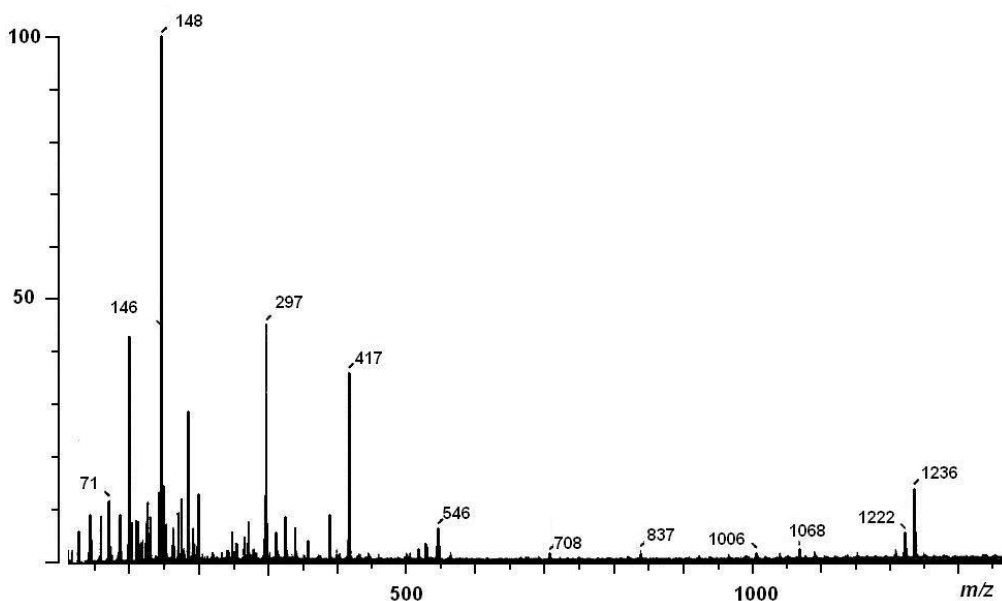


Figura 107. Espectros de masas FAB (modo negativo) de la **pescapreína II**.

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

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

Pescapreína VII: Fragmento de m/z 983 que corresponde a la pérdida del residuo de decanoilo con una diferencia de 154 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular $[M - 1]$ de m/z 1137 unidades.

Pescapreína VIII: Fragmento de m/z 1053 que corresponde a la pérdida del residuo de dodecanoilo con una diferencia de 182 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular $[M - 1]$ de m/z 1235 unidades.

Pescapreína IX: Fragmento de m/z 1081 que corresponde a la pérdida del residuo de dodecanoilo con una diferencia de 182 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular $[M - 1]$ de m/z 1235 unidades.

Pescapreína XII: Fragmento de m/z 1081 que corresponde a la pérdida del residuo de dodecanoilo con una diferencia de 154 unidades con respecto al peso del ión pseudomolecular $[M - 1]$ de m/z 1249 unidades.

Los espectros de masas FAB (modo negativo) generados por las **pescapreínas V y VI** (Figuras 108 y 109) fueron muy similares al presentar el ión pseudomolecular $[M - 1]^-$ de m/z 1103. Estos dos compuestos representaron tetrasacáridos diastereoisómeros de fórmula molecular $C_{52}H_{92}O_{19}$. El análisis cuidadoso de los espectros generados por ambos tetrasacáridos confirmó el patrón de sustitución propuesto para cada glicolípido. La pérdida inicial del grupo que esterifica la unidad sacárida terminal (Ram'') proporcionó un pico de m/z 921 para la pescapreína VI representando $[M - 1 - C_{12}H_{22}O]^-$, mientras la misma eliminación proporcionó el pico de m/z 1019 $[M - 1 - C_5H_8O]^-$, para la pescapreína V. La pérdida de la desoxihexosa terminal proporcionó el pico de m/z 873 $[1019 - 146 \text{ (unidad de metilpentosa)}]^-$, para la pescapreína V y 775 $[921 - 146 \text{ (unidad de metilpentosa)}]^-$, para la pescapreína VI. Por lo que estos picos sugirieron que el residuo *n*-dodecanoilo debería estar en el C-2 de Ram'' en la pescapreína VI.

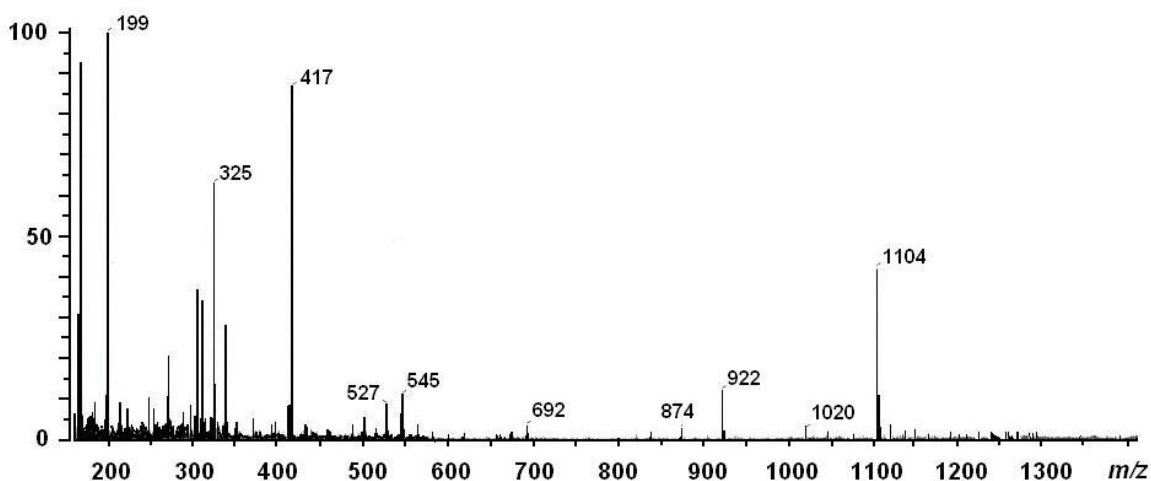


Figura 108. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la **pescapreína V**.

Estas diferencias en las pérdidas fueron debidas a la localización del segundo grupo éster (ácido 2S-metilbutírico) que en el caso de la pescapreína V se localizó en el C-4 de la ramnosa externa superior (Ram'') y en la pescapreína VI en el C-3 de la ramnosa interna inferior (Ram').

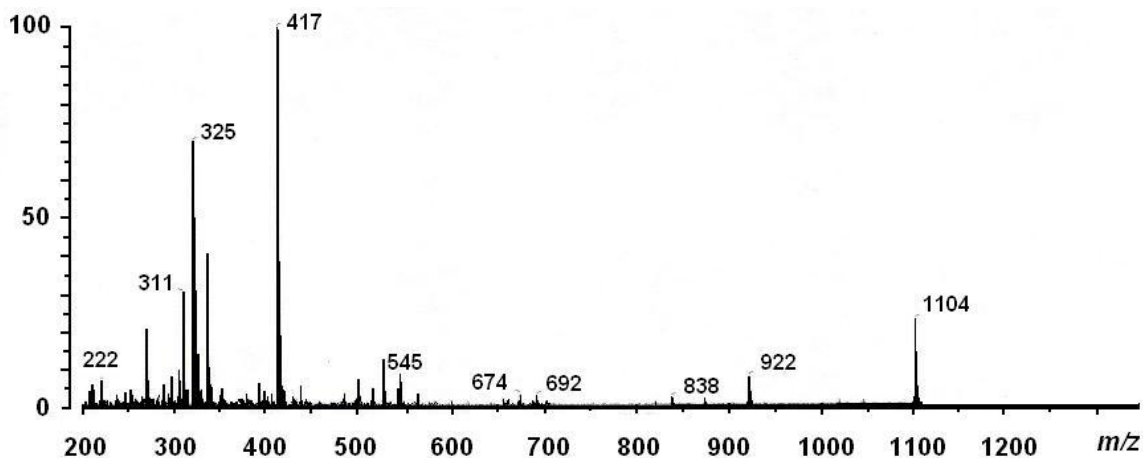


Figura 109. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la **pescapreína VI**.

En el caso de la **pescapreína X**, el espectro de masas FAB (modo negativo, Figura 110) generado presentó el ión pseudomolecular $[M - 1]^-$ de m/z 1266, siendo un pentasacárido de fórmula molecular $C_{63}H_{109}O_{25}$ que en peso molecular tiene una diferencia de 16 unidades con respecto a la pescapreína III ($C_{63}H_{109}O_{24}$), debido a la presencia en su estructura de glucosa en lugar de fucosa. El análisis cuidadoso del espectro generado evidenció la similitud con el generado por la pescapreína III, donde para ésta se observaron los fragmentos 1165 $[M - H - C_5H_8O]^-$, 1067 $[M - H - C_{12}H_{22}O]^-$, 1019, 837, 545 y 417, en tanto que para la pescapreína X se generaron los correspondientes picos con un peso agregado de 16 unidades por el oxígeno adicional que presenta la glucosa. La

primera pérdida corresponde al residuo 2-metilbutanoilo (fragmento de m/z 1182) y le sigue la pérdida del residuo dodecanoilo correspondiente al fragmento de m/z 1084. También, se observa el fragmento de m/z 1036 $[M - H - C_6H_{10}O_4 - C_5H_8O]^-$ que corresponde a la pérdida de una metil pentosa inferior más el residuo de 2-metilbutanoilo; además se observan los fragmentos comunes de m/z 854, 561 y 433 (ver Figura 110).

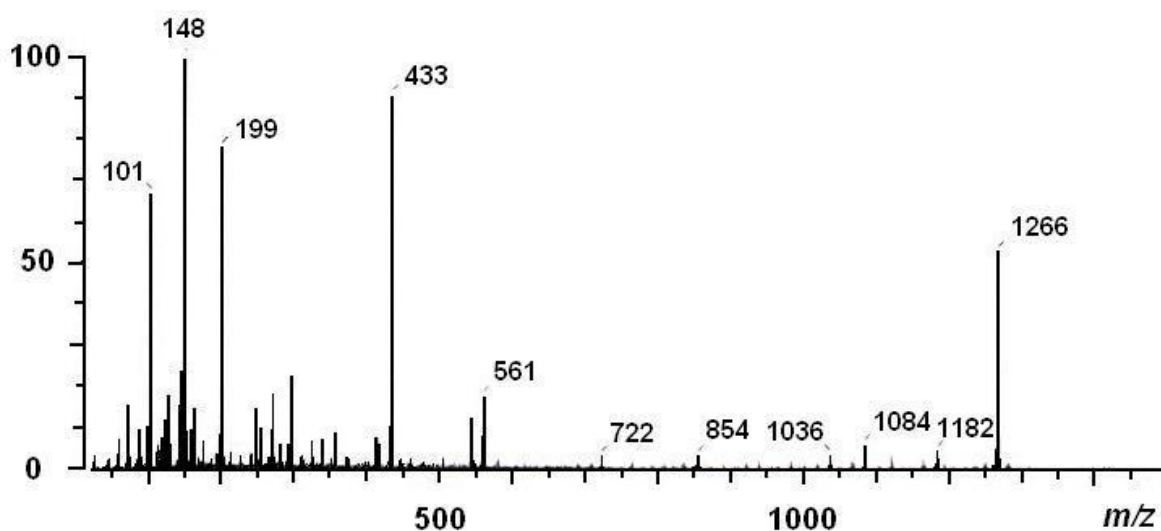


Figura 110. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la **pescapreína X**.

Para la **pescapreína XI**, el espectro de masas FAB (modo negativo, Figura 110) generado presentó el ión pseudomolecular $[M - 1]^-$ de m/z 1236, siendo un pentasacárido de fórmula molecular $C_{62}H_{107}O_{24}$ que en peso corresponde a una diferencia de 14 unidades con respecto a la pescapreína III ($C_{63}H_{109}O_{24}$) debido a la presencia en su estructura de xilosa en lugar de fucosa. De igual manera, el análisis cuidadoso del patrón de fragmentación generado por este glicolípido

permitió concluir que el espectro es muy similar al generado por la pescapreína III, donde para ésta se registraron los fragmentos de m/z 1165 $[M - H - C_5H_8O]^-$, 1067 $[M - H - C_{12}H_{22}O]^-$, 1019, 837, 545 y 417, en tanto que para la pescapreína XI vemos los correspondientes picos pero con un peso disminuido en 14 unidades de masa al tener un carbono menos que la fucosa. La primera pérdida corresponde al residuo de 2-metilbutanoilo en el fragmento de m/z 1153, le sigue la pérdida de la ramnosa externa inferior (Ram''') que corresponde al fragmento de m/z 1006; continua la pérdida del residuo dodecanoilo correspondiente al fragmento de m/z 1054; el fragmento 1006 $[M - H - C_6H_{10}O_4 - C_5H_8O]^-$ que corresponde a la pérdida de una metil pentosa más el residuo de 2-metilbutanoilo; además de observarse los fragmentos de m/z 823, 531 y 403 (ver Figura 111).

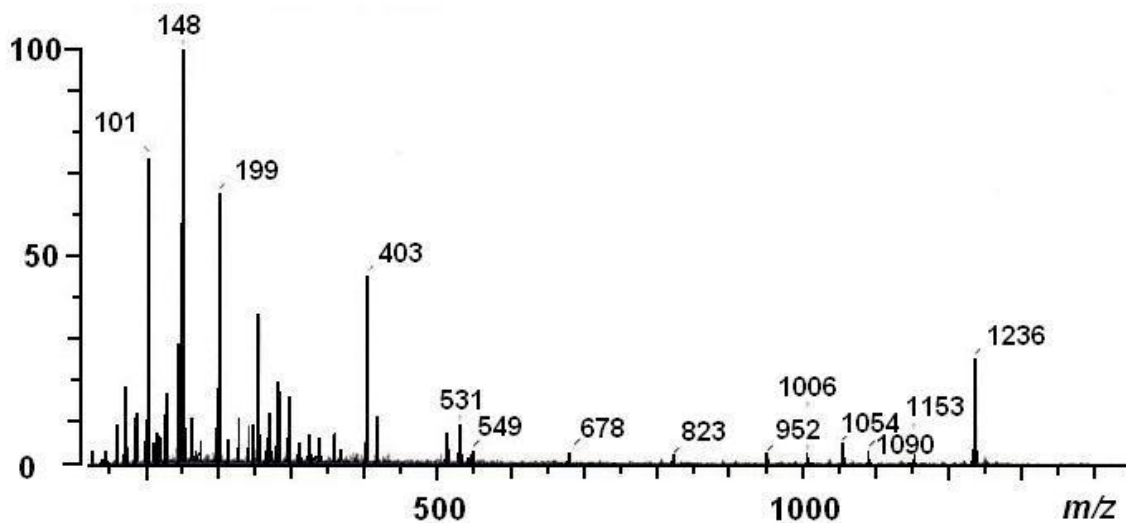


Figura 111. Espectro de masas FAB (modo negativo) de la **pescapreína XI**.

Los pescaprosidos A y B al presentar estructuras acíclicas y ser ácidos glicosídicos acilados por un grupo metilo en el ácido jalapinolico; sus respectivos

fragmentos tienen un peso adicional de 32 unidades en comparación con la pescapreína I y III y que corresponde a una molécula de agua producto de la hidrólisis de la lactona y un grupo metileno adicional del éster metílico. Los fragmentos más importantes para el pescaprósido A fueron los siguientes: fragmento de m/z 1052 $[M - H - C_6H_{10}O_4]^-$, que representó la pérdida de una ramnosa inferior; fragmento de m/z 1016 $[M - H - C_{12}H_{22}O]^-$, que representó la pérdida del residuo docecanoilo; además de observar los fragmentos de m/z 870 y 578 (ver Figura 112).

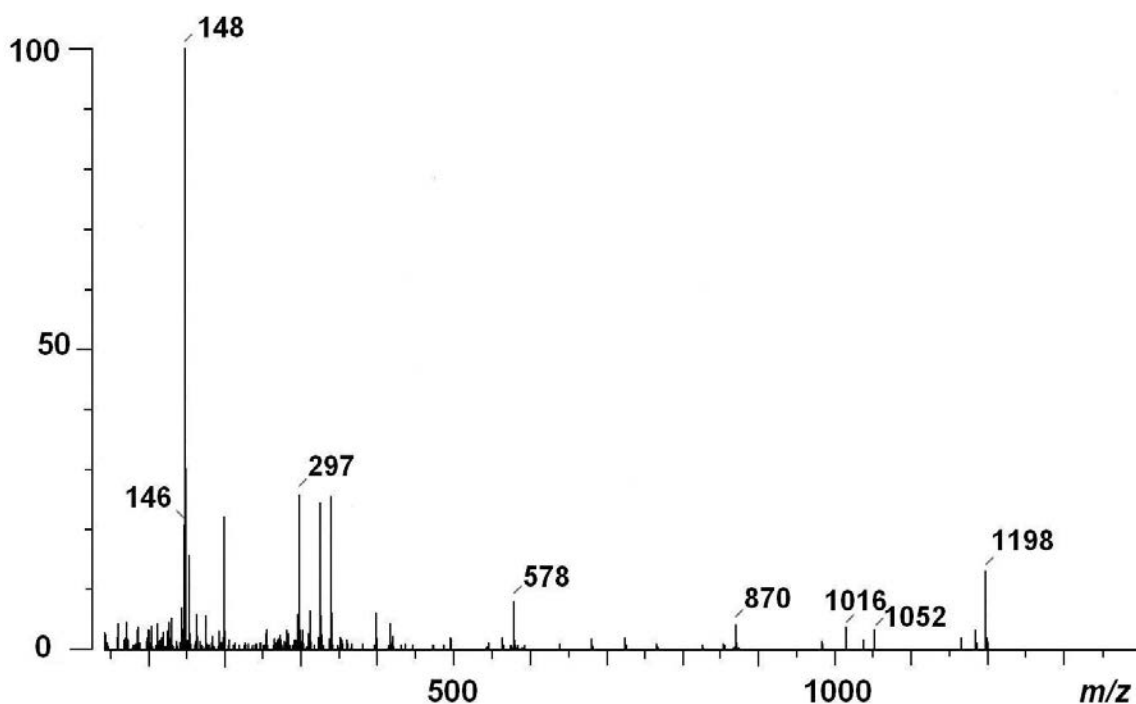


Figura 112. Espectro de masas FAB (modo negativo) del **pescaprósido A**.

Para el pescaprósido B los fragmentos más importantes fueron los siguientes: fragmento de m/z 1135 $[M - H - C_6H_{10}O_4]^-$ que representó la pérdida de

una ramnosa inferior; fragmento de m/z 1099 $[M - H - C_{12}H_{22}O]^-$ que correspondió a la pérdida del residuo docecanoilo; además de observarse los fragmentos comunes de m/z 869 y 578 (ver Figura 113).

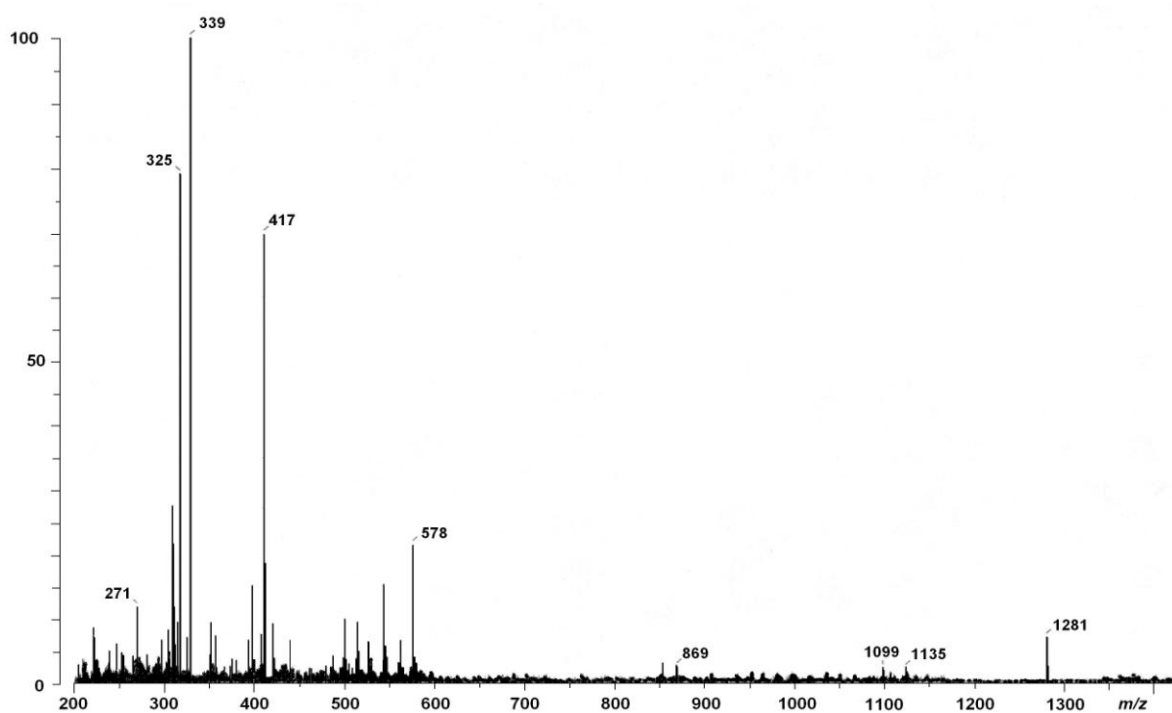


Figura 113. Espectro de masas FAB (modo negativo) del **pescaprosido B**.

VII. CONCLUSIONES

- 7.1 Utilizando técnicas de cromatografía líquida de alta eficacia se obtuvieron catorce glicolípidos novedosos, las **pescapreínas I–XII** y los **pescaprósidos A y B**; todos ellos provenientes de las resinas glicosídicas solubles en hexano de *Ipomoea pes-caprae*, junto con la **estoloniferina III** que representa un constituyente de estructura conocida y aislado de *Ipomoea stolonifera*.
- 7.2 La cromatografía de líquidos permitió la resolución de la compleja mezcla de oligosacáridos, muchos de ellos representando formas diastereoisoméricas que hacen imposible su separación mediante el empleo de las técnicas cromatográficas de baja resolución como la cromatografía en columna o capa fina.
- 7.3 Las técnicas analíticas desarrolladas para la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas solubles en hexano de la planta medicinal riñonina podrán ser utilizadas como protocolos analíticos para el desarrollo de técnicas instrumentales para el control de calidad de los preparados herbolarios que contengan este material vegetal.
- 7.4 El empleo de las técnicas analíticas de alta resolución en la resonancia magnética nuclear (500 MHz) y la espectrometría de masas FAB

permitieron la caracterización estructural de estos compuestos e identificaron una amplia diversidad en la composición química de las resinas glicosídicas de la riñonina.

- 7.5 Las pescapreínas I–IV, VII–IX presentaron como núcleo oligosacárido al 11 – O - α - L –ramnopiranosil - (1→3) -O-[O - α - L - ramnopiranosil - (1→4)] - O - α -L-ramnopiranosil-(1→4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)-O- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico, que es el mismo núcleo oligosacárido presente en la jalapina de la planta *Ipomoea stolonifera*, *Ipomoea batatas* e *Ipomoea muruoides*, conocido como el ácido simónico B.
- 7.6 La pescapreína X presentó como núcleo oligosacárido al 11 – O - α - L –ramnopiranosil - (1→3) -O-[O - α - L - ramnopiranosil - (1→4)] - O - α -L-ramnopiranosil-(1→4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)- β -D-glucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico, que es otro de los núcleos oligosacáridos también presente en la jalapina de la planta *Ipomoea batatas* y conocido como el ácido simónico A.
- 7.7 La pescapreína XI presentó como núcleo oligosacárido al 11 – O - α - L –ramnopiranosil - (1→3) -O-[O - α - L - ramnopiranosil - (1→4)] - O - α -L-ramnopiranosil-(1→4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→3)- β -D-xilopiranosido del

- ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico, el cual constituye un núcleo inédito en la literatura fitoquímica.
- 7.8 Las pescapreína **V** y **VI** presentaron como núcleo oligosacárido al 11-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-O-[O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico que es el mismo núcleo oligosacárido presente en la jalapina de la planta *Ipomoea operculata* conocido como el ácido operculínico C.
- 7.9 Los pescaprósidos **A** y **B** presentaron como núcleo oligosacárido al ácido simónico B y aunque no presentan la estructura macrocíclica se convierten en las segundas resinas glicosídicas aciclícas aisladas dentro de la familia de las convolvulácea.
- 7.10 Las doce pescapreínas junto con los pescaprósido y la estolonierina III mostraron cinco residuos ácidos esterificando el núcleo oligosacárido. Estos residuos ácidos fueron identificados como el metilbutanoilo, el *n*-hexanoilo, el isobutanoilo, el *n*-decanoilo y el *n*-dodecanoilo. Todos los compuestos, aunque no presentaron el mismo núcleo oligosacárido, están esterificados por los distintos residuos ácidos en la posición 2 de la ramnosa interna inferior (**Ram'**) y en la posición 4 de la ramnosa externa superior (**Ram''**).

- 7.11 El sitio de lactonización del núcleo oligosacárido por la aglicona se localizó en la posición C-3 de la unidad de ramnosa en toda la serie de las pescapreínas.
- 7.12 Las pescapreínas no han sido descritas en la literatura y la principal diferencia estructural con respecto a las simoninas III a V (ver Figura 14) es la posición para el establecimiento del éster intramolecular entre la aglicona y la ramnosa interna superior. Las estoloniferinas I–III (ver Figura 15) están lactonizadas en la misma posición que pescapreínas I–IV, VII–IX y XII. La pescapreína **II** está acilada por ácido dodecanoico, mientras que la estoloniferina II por el ácido decanoico (Figuras 15 y 115).
- 7.13 Las pescapreínas **III** y **XII** ambas son diastereoisómeros de la estoloniferina X, ya que ésta última está formando el éster macrocíclico en la posición 2 de la unidad sacárida de ramnosa interna superior (ver Figuras 15 y 115), mientras que las pescapreína III y XII lo hacen en la posición 3 de esta misma unidad. Estos compuestos tienen la misma fórmula molecular y sus espectros de masas y resonancia magnética nuclear son idénticos. Sólo difieren en sus valores para las constantes físicas (punto de fusión y rotación óptica). Por lo tanto, la diferencia estructural radica en la configuración absoluta del único residuo quiral que esterifica al núcleo oligosacárido, es decir el residuo de 2-metilbutanoilo, que resultó estar

- presente en sus dos formas enantioméricas *2S* y *2R* en las pescapreínas III y XII, respectivamente.
- 7.14 Con respecto a la pescapreína **IV** y **IX**, ningún pentasacárido compuesto por el ácido simónico B se ha descrito en forma de éster del ácido hexanóico. En tanto que para las pescapreína **I** y **VII**, ningún compuesto con el ácido simónico B y monosustituido por un residuo de cadena larga (decanoilo o dodecanoilo) se encuentra descrito en la literatura.
- 7.15 La pescapreína **VIII** representa un diastereoisómero, dentro de esta misma serie, de la pescapreína II. La diferencia radica en que los residuos ácidos se encuentran sustituyendo las mismas posiciones del núcleo oligosacárido pero en forma inversa, es decir el dodecanoilo en C4 de la tercera ramnosa y el isobutilo en la posición C2 de la segunda unidad de ramnosa en la pescapreína VIII, entanto que le isobutilo de la pescapreína II se encuentra en C4 de la tercera ramnosa.
- 7.16 La pes es un diastereoisómeros de la simonina II (ver Figura 14), ya que esta última forma el éster macrocíclico en la posición C-2 de la unidad sacárida de ramnosa interna superior (ver Figuras 15 y 116), mientras que la pescapreína XII lo hacen en la posición C-3 de esta misma unidad.
- 7.17 Dentro de los pentasacáridos de esta serie, la pescapreína **XI** constituye un compuesto novedoso al no haber descripciones de glicolípidos entre los

miembros de las convolvuláceas con la presencia del monosacárido xilosa (ver Figura 117).

7.18 Los **pescaprósidos A y B** (ver Figura 118) se convierten en las segundas resinas glicosídicas aciclícas aisladas dentro de la familia de las convolvuláceas después de los ácidos cuscúticos A–D de *Cuscuta chinensis*.

7.19 De acuerdo con toda la información espectroscópica y espectrométrica analizada se propusieron las siguientes estructuras para las **pescapreínas I–XII** y los **pescaprósidos A y B**:

Pescapreína I: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O - α - L –ramnopiranosil - (1→3) -O- α - L - ramnopiranosil - (1→4)- O - (2-O-*n*-dodecanoil) - α -L-ramnopiranosil-(1→4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína II: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O - α - L –ramnopiranosil - (1→3) -O-[4-O – isobutanoil - α - L - ramnopiranosil - (1→4)] - O - (2-O-*n*-dodecanoil) - α - L-ramnopiranosil-(1→4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1→2)- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína III: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – (2S) – 2 – metilbutiril – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína IV: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – *n* – hexanoil – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína V: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – [4-O – (2S) – 2 – metilbutiril – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína VI: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – [2-O-*n*-dodecanoil – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – [(2S) – 3 – metilbutiril) – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína VII: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – (4-O-*n*-decanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína VIII: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – *n*-dodecanoil – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-isobutanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína IX: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – *n* – hexanoil – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-decanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína X: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – (2*S*) – 2 – metilbutiril – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – glucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína XI: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – (2*S*) – 2 – metilbutiril – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-dodecanoil) – α – L – ramnopiranosil – (1→4) – O – α – L – ramnopiranosil – (1→2) – β – D – xilopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescapreína XII: éster intramolecular 1, 3'' – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1→3) – O – [4-O – (2*R*) – 2 – metilbutiril – α – L – ramnopiranosil – (1→4)] – O – (2-O-*n*-

dodecanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico.

Pescaprósido A: metil (11S)-11-hidroxihexadecanoato – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1 \rightarrow 3) – O – α – L – ramnopiranosil – (1 \rightarrow 4)– O – (2-O-*n*-dodecanoil) – α – L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido.

Pescaprósido B: metil (11S)-11-hidroxihexadecanoato – 11 – O – α – L – ramnopiranosil – (1 \rightarrow 3) – O [4-O – (2*R*) – 2 – metilbutiril – α – L – ramnopiranosil – (1 \rightarrow 4)]– O – (2-O-*n*-dodecanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido.

VIII . B I B L I O G R A F I A

- **Achnine, L., Pereda-Miranda, R., Iglesias-Prieto, R., Moreno-Sánchez, R., y Lotina-Hennsen, B.** (1999) Tricolorina A, a Potent Natural Uncoupler and Inhibitor of Photosystem II Acceptor Side of Spinach Chloroplasts. **Physiologia Plantarum** 106, 246-252.
- **Agrawal, P.K.** (1992) NMR Spectroscopy in the structural elucidation of Oligosaccharides. **Phytochemistry** 31, 3307-3330.
- **Agrawal, P.K. y Pathak, K.A.** (1996) Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy Approach for the Determination of Interglycosidic Linkage and Sequence in Oligosaccharides. **Phytochemical Analysis** 7, 113-130.
- **Amor.Prats, D. y Harbones, J. B.** (1993) Allelochemical effects on ergoline alkaloids from *Ipomoea parasitica* on *Heliothis virescens*. **Chemoecology**, 4, 55-61.
- **Anaya, A. L., Calera, M. R., Mata, R. y Pereda-Miranda, R.** (1990) Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav (Convolvulaceae). **Journal of Chemical Ecology**, 16, 2145-2152.
- **Argueta, A.** (1994). Atlas de Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México.
- **Bah, M.** (1997) Aplicación de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (FAB) de alta resolución en la elucidación estructural de las tricolorinas A-J, oligosacáridos aislados de las resinas de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM, México, 292 pp.
- **Bah, M. y Pereda-Miranda, R.** (1996) Detailed FAB-Mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor*. **Tetraedron** 52, 13063-13080.
- **Bah, M. y Pereda-Miranda, R.** (1997) Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). **Tetraedron** 53, 9007-9022.
- **Baldwin, M. A.** (1995) Modern Mass Spectrometry in Biorganic Analysis. **Natural Products Reports**, 34-44.

- **Barnes, C.C., Smalley, M. K., Manfredi, K. P. Kindscher, K., Loring H. y Sheeley, D. M.** (2003) Characterization of an Anti-tuberculosis Resin Glycoside from the Prairie Medicinal Plant *Ipomoea leptophylla*. **Journal Natural of Products** 66, 1457-1462.
- **Bieber, L. W., Da Silva Filho, A. A., Correa-Lima, R. M. O., De Andrade-Chiappeta, A., Carnero Do Nascimento, S., De Souza, I. A., De Mélo, J. F. y Jürgen-Veith, H.** (1986) Anticancer and Antimicrobial Glycosides from *Ipomoea bahiensis*. **Phytochemistry**, 25, 1077-1081.
- **Bidlingmyer, B. A.** (1992) Practical HPLC Methodology and applications. John Wiley, Nueva York, 269-283.
- **Blanken, W. M., Bergh, M. L., Koppen, P. L. y Eijnden, D. H.** (1985) High-pressure liquid chromatography of neutral oligosaccharides: effects of structural parameters. **Analytical Biochemistry**, 145, 322-330.
- **Boersma, A., Lamblin, G., Degand, P y Roussel, P.** (1981) Separation of a complex mixture of oligosaccharides by HPLC on bonded-primary amine packing using a linear gradient solvent system. **Carbohydrate Research**, 94, C7-C9.
- **Botz, I. Hahn, E. y Szabo, L. G.** (1990-1991) Botanical identification of *Ipomoea tricolor* Cav. Seed samples from Hungary and layer chromatographic examination of their hallucinogen ergot alkaloids. **Acta Bot Hung**, 36, 229-243.
- **Castelli, M. V., Cortés, J. C. G., Escalante, A. M., Bah, M., Pereda-Miranda, R., Ribas, J. C., y Zacchino, S. A.** (2002) *In vitro* Inhibition of (1,3)- β -Glucan Synthase by Glycoresins from Convolvulaceous Plants. **Planta médica** 68, 739-742 (2002).
- **Contreras C. M., Chacón, L. y Enríquez, R. G.** (1996) Anticonvulsant properties of *Ipomoea stans*. **Phytomedicine** 3, 41-44.
- **Costello, C.E.** (1997) Time, life...and mass spectrometry. New techniques to adress biological questions. **Biophysical Chemistry**, 68, 173-188.
- **Chao, J-M. y DerMarderosian, A. H.** (1973) Identification of the ergoline alkaloids in the genus *Argyreia* and related genera and their chemotaxonomic implication in the Convolvulacea. **Phytochemistry**, 12, 2435-2440.
- **Chaplin, M. F. y Kennedy, J. F.** (1986) Carbohydrate Analysis. A practical Approach. IRL Press limited. **Oxford**, 1-53.
- **Chérigo, L. y Pereda-Miranda, R.** (2006) Resin Glycosides from the Flowers of *Ipomoea muricoides*. **J. Nat. Prod.**, 69, 595-599.

- **De Souza, M. M., Madeira, A., Berti, C., Krogh, R., Yunes, R. A., y Cechinel-Filho, V.** (2000). Anticonceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br., **Journal of Ethnopharmacology** 69, 85-90.
- **Devall, M. S.** (1992). The biological flora of coastal dunes and wetlands.2 *Ipomoea pes-caprae* (L) Roth., **Journal of Coastal Research** 8, (2) 442-456.
- **Díaz, J. L.** (1976) Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas I. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A.C.IME PLAM. México.
- **Díaz, J. L.** (1976) Usos de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas II. Instituto Mexicano Para el Estudio de las Plantas Medicinales A.C. IME PLAM. México.
- **Du, X., Kohinata, K., Kawasaki, T., Guo, Y.-T. y Miyahara, K.** (1998). Components of the ether-insoluble resin glycosidelike fraction from *Cuscuta chinensis*, **Phytochemistry**. 48, 843-850.
- **Duus, J., Gotfredsen, CH. H. y Bock, K.** (2000) Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. **Chem. Rev.** 100, 4589-4614.
- **Enríquez, R. G.; León, I.; Pérez, F., Carpenter, K. A.; Puzzuoli, F. V. y Reynolds, W. L.** (1992). Characterization by two-dimensional NMR spectroscopy of a complex tetrasaccharide glycoside isolated from *Ipomoea stans*. **Canadian Journal of Chemistry**, 70, 1000-1008.
- **Escalante-Sánchez, E. y Pereda-Miranda, R.** (2007). Batatins I and II, Ester-Type Dimers of Acylated Pentasaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. **J. Nat. Prod.**, in press.
- **FONT QUER.** (1973) Diccionario de Botánica. Editorial Labor. España.
- **Henric, A., Kaloga, M. y Eich, E.** (1994) Jacpaniculines, the first lignanamidea alkaloids from the Convolvulacea. **Phytochemistry**, 37, 1637.
- **Hernández-Carlos, B. Bye, R. y Pereda-Miranda, R.** (1999) Orizabins V-VIII, Tetrassaccharides Glycolipds from the Mexican Sacammony Root (*Ipomoea orizabensis*). **J. Nat. Prod.**, 62, 1096-1100.

- **Hostettmann, K. Hostettmann, M. y Marson, A.** (1986) Preparative Chromatography techniques. Applications in Natural Products Isolation. Springer-Verlag, Berlin, 37-40.
- **Hueza, I. M., Fonseca, E. S. M., Paulino, C.A., Haraguchi, M. y Górnaiak, S. L.** (2003). Evaluation of immunomodulatory activity of *Ipomoea carnea* on peritoneal cell of rats. **Journal of Ethnopharmacology** 87, 181-186.
- **Jenett-Siems, K., Kaloga, M. y Eich, E.** (1993) Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulacea. **Phytochemistry**, 34, 437-440.
- **Jenett-Siems, K., Kaloga, M. y Eich, E.** (1994a) Ergobalansine/ergobalansine, a proline free peptyde-type alkaloid of the fungal genus balansia is a constituent of *Ipomoea piurensis*. **J. Nat. Prod.**, 57, 1304-1306.
- **Jenett-Siems, K., Kaloga, M. y Eich, E.** (1994b) Hygrines and tropanes, alkaloids of considerable importance for the chemotaxonomy of the Convolvulacea. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, 2, 122.
- **Khan, M. M., Ahmad, F., Rasgogi, A. K. Kidwai, J. R.** (1994). Insulinogenic and hypoglycemic activities of *Ipomoea pes-caprae*. **Fitoterapia**, 65, 231-234.
- **Kitagawa, I., In Baek, N., Ohashi, K., Sakagami, M., Yoshikawa, M. y Shibuya, H.** (1988). Structures of Merremosides B and D, New antiserotonic Resin-Glycosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an indonesian folk medicine. **Chem. Pharm. Bull.**, 36, 1618-1621.
- **Kitagawa, I., In Baek, N., Ohashi, K., Sakagami, M., Yoshikawa, M. y Shibuya, H.** (1989). Merremosides B and H, New Ionophoric Resin-Glycosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an indonesian folk medicine. **Chem. Pharm. Bull.**, 37, 1131-1133.
- **Kitagawa, I., In Baek, N., Kawashima, K., Ykokawa, Y., Yoshikawa, M., Ohashi, K. y Shibuya, H.** (1996a). Indonesian Medicinal Plants. XV. Chemical Structures of five New Resin-Glycosides, Merremosides a, b,c, d, and e, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulacea). **Chem. Pharm. Bull.**, 44, (9) 1680-1692.
- **Kitagawa, I., In Baek, N., Ykokawa, Y. y Yoshikawa, M.** (1996b). Chemical Structures of Four New Resin-Glycosides, Merremosides f, g, h₁, and h₂, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). **Chem. Pharm. Bull.**, 44, (9) 1693-1699.
- **Kitagawa, I., Ohashi, K., In Baek, N., Sakagami, M., Yoshikawa, M. y 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.
- **Kubo, I. y Nakatsu, T.** (1990). Recent examples of preparative-scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. **LC-CG**, 8, 933-939.
 - **Lara, F. y Márquez, C.** (1996) Plantas Medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. UNAM. México.
 - **Lara, F. y Márquez, C., Esquivel, B. y Mata, R.** (1999). Plantas Medicinales de México II. UNAM. México.
 - **León, I. Enriquez, R.G., Nieto, D.A., Alonso, D., Reynolds, W.F., Aranda, E. y Villa J.** (2005) Pentasaccharide Glycosides from the Roots of *Ipomoea muricoides*. **J. Nat. Prod.**, 68, 1141-1146.
 - **León, I. Mirón, G. y Alonso, D.** (2006) Characterization of pentasaccharide Glycosides from the Roots of *Ipomoea arborescens*. **J. Nat. Prod.**, 69, 896-902.
 - **Lorenzi, H., Abreu Matos, F. J.** (2002). Plantas medicinales no Brasil Nativas e Exóticas. Instituto Plantarum de Estudos da flora Ltda. Sao Paulo, pp. 182.
 - **Mannich, C. y Schumann, P.** (1938) Jalap Resins and its principal constituent, convolvulin. **Archiv der Pharmazie** 276, 211-226.
 - **Matuda, E.** (1963) El género *Ipomoea* en México. **An. Inst. Biol. México**. Vol 34:85-145.
 - **Matuda, E.** (1964) El género *Ipomoea* en México. **An. Inst. Biol. México**. Vol 35:85-76.
 - **Matuda, E.** (1965) El género *Ipomoea* en México. **An. Inst. Biol. México**. Vol 36:85-106.
 - **Martínez, M.** (1987). Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
 - **Martínez, M.** (1989) Las plantas medicinales de México. Ediciones Botas. México.
 - **MacLeod, J. K., Ward, A. y Oelrichs, P. B.** (1997) Structural investigation of resin glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. **Journal of Natural Products**, 60, 467-471.

- **McDonald, A.** (1991) Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. **Anales Inst. Bio. Univ. Nac. Autón. México. Sec. Bot.** 62 (1):65-82.
- **Miyahara, K., Du, X.-M., Watanabe, M., Sugimura, CH., Yahara, SH. y Nohara, T.** (1996). Resin glycosides XXIII. Two Novel Acylated Trisaccharides Related to Resin Glycosides from the Seeds of *Cuscuta chinensis*. . **Chem. Pharm. Bull.** , 44, (3) 481-485.
- **Nikolov, Z. L., Meagher, M. M. y Reilly, P. J.** (1985) High performance liquid chromatography of disaccharides on amine-bonded silica columns. **Journal of chromatography**, 319, 51-57.
- **Noda, N., Ono, M., Miyahara, K. y Kawasaki, T.** (1987). Resin Glycosides I. Isolation and structure elucidation of Orizabin I, II, III and IV. Genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. **Tetrahedron**, 43, 3889-3902.
- **Noda, N., Kogetsu, H., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1990). Scammonins I y II, the resin glycosides of radix scammoniae from *Convolvulus scammonia*. **Phytochemistry**. , 29, (11) 3565-3569.
- **Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1992a). Resin glycosides XV. Simonins I-V, Ether-Soluble resin Glycosides (Jalapins) from the roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). **Chem. Pharm. Bull.** , 40, 3163-3168.
- **Noda, N., Takahashi, T., Kawasaki, T., Miyahara, K. y Yang, CR.** (1994a). Stoloniferins I-VII, Resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. **Phytochemistry**, 36, 365-371.
- **Noda, N., Tsuji, K., Miyahara, K. y Yang, CR.** (1994b). Resin Glycosides XXI. Tuguajalpíns I-X, the resin glycosides having long-chain fatty acid groups from the root of *Merremia hungaiensis*. **Chem. Pharm. Bull.**, 42, 2011-2016.
- **Noda, N., Takahashi, N., Miyahara, K. y Yang, CR.** (1998). Stoloniferins VII-XII, Resin Glycosides, from *Ipomoea stolonifera*. **Phytochemistry**, 48, 837-841.
- **Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K. y Kawasaki, T.** (1989a). Operculin I and II, new ether soluble resin glycosides ("Jalapin") with fatty acid ester groups from rhizoma jalapae braziliensis (roots of *Ipomoea operculata*). **Chem Pharm. Bull.**, 37, 241-244.
- **Ono, M., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1989b). Resin Glycosides V. Identification and Characterization of the Component Organic and Glycosidic Acids of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides ("Jalapin") from Rhizoma

- Jalapae Braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). **Chem. Pharm. Bull.**, 37, 3209-3213.
- **Ono, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1990a). Four New Glycosides Acids, Operculinic Acids D, E, F y G, of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides ("Jalapin") from Rhizoma Jalapae Braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). **Chem. Pharm. Bull.**, 38, (10) 2650-2655.
 - **Ono, M., Noda, N., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1990b). Resin Glycosides. VII. Reinvestigation of the Component Organic and Glycosidic Acids of Pharbitin, the Crude Ether-Insoluble Resin Glycoside ("Convolvulin") of *Pharbitis Semen* (Seeds of *Pharbitis nil*). **Chem. Pharm. Bull.**, 38, (7) 1892-2897.
 - **Ono, M., Nishi, M., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1990c). Resin Glycosides IX. Operculins I, II, V, VII and VIII. New Ether-Soluble resin Glycosides of rhizoma Jalapae Braziliensis (Root of *Ipomoea operculata*). **Chem. Pharm. Bull.**, 38, 2986-2991.
 - **Ono, M., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1991). Resin glycosides XI. Operculins II, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII. New ether-soluble resin Glycosides of rhizoma Jalapae Braziliensis (Root of *Ipomoea operculata*). **Chem. Pharm. Bull.**, 39, 2534-2539.
 - **Ono, M., Fujimoto, K., Kawata, T., Fukunawa, T., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1992a). Resin Glycosides XII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from Rhizoma *Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). **Chem. Pharm. Bull.**, 40, 1400-1403.
 - **Ono, M., Kuwabata, K., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1992b). Resin Glycosides XVI. Quamoclins I-IV, new ether-soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. **Chem. Pharm. Bull.**, 40, 2674-2680.
 - **Ono, M., Nakagawa, T., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1993b). Woodrosins I and II, Ether-Insoluble resin Glycosides from the stems of *Ipomoea tuberosa*. **Chem. Pharm. Bull.**, 41, 1925-1932.
 - **Ono, M., Honda, F., Karahashi, A., Kawasaki, T. y Miyahara, K.** (1997). Resin Glycosides XXV. Multifidins I and II, New Jalapins, from the seed of *Quemoclit x multifida*. **Chem. Pharm. Bull.**, 45, 1955-1960.
 - **Osuna, L., Ponces-Monter, H., Campos, G. M., Rojas, J. y Meckes, M.** (1996) Effect of *Ipomoea intrapilosa* methanol extract on the serotonergic response in rat uterus. **Phytotherapy Research.** 10, 257-259.

- **Pereda-Miranda, R.** (1994). Bioactive Natural Products from traditionally used Mexican Plants. En J. T. Arnason (Ed). *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum Press. New York, pp. 83-112.
- **Pereda-Miranda, R.** (1995). Estructura de la tricolorina A, un glicolípido modulador de la actividad enzimática de la proteína cinasa C y pincipal agente alelopático de *Ipomoea tricolor* Cav (Convolvulacea). Tesis doctoral. Facultad de Química, UNAM, México.
- **Pereda-Miranda, R. y Bah, M.** (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, 3, 1-20.
- **Pereda-Miranda, R. y Hernández-Carlos, B.** (2002) HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasacharides from mexican scammony root. **Tetrahedron**, 58, 1460-1466.
- **Pereda-Miranda, Kaatz, G.W. Gibbons, S.** (2006a) Polyacilated Oligosaccharides from Medicinal Mexican morning glory Species as Antibacterials and Inhibitors of Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus* . **Journal of Natural Products**, 69, 406-466.
- **Pereda-Miranda, R. Fragoso-Serrano M., Escalante-Sánchez, E. Hernández-Carlos, B., Linares, E. y Bye, R.** (2006b) Profiling of the Resin Glycoside Content of Mexican Jalap Roots with Purgative Activity. **Journal of Natural Products**, 69, 1460-1466.
- **Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Winckramaratne, D. B. M., Pezuto, J. M. y Kinhorn, A. D.** (1993). Tricolorin A, mayor phyto growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. **J. Nat, Prod.**, 56, 571-582.
- **Pérez-Amador, N. C., Amor, D., Murguía, G.** (1992). **Phyton**, 53, 1-4.
- **Perusquía, M., Mendoza, S., Bye, R., Linares, E. y Mata, R.** (1995). Vasoactive effects of aquous extract from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. **Journal of Ethnopharmacology**, 46, 63-69.
- **Pongprayoon, U., Bohlin, L. Sandberg, F.** (1989). Inhibitory effect of extract of *Ipomoea pes-caprae* on guinea-pig ileum smooth muscle. **Acta Pharm. Nordica**, 1, 41-44.
- **Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M., Bohlin L..** (1991a). Compounds inhibiting protaglandin synthesis isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Med.**, 57, 516-518.

- **Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M., Bohlin L..** (1992a). Antispasmodic activity of beta-damascedone and E-phytol isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Planta Med.**, 58, 19-21.
- **Pongprayoon, U., Baeckström, P., Jacobsson, U., Lindström, M., Bohlin L..** (1992b). Inhibition of ethil phenyl-propiolate-induced rat ear oedema by compounds isolated from *Ipomoea pes-caprae*. **Phytother. Res.**, 6, 104-107.
- **Rencurosi, A., Mitchell, E.P., Cioci, G., Pérez, S., Pereda-Miranda, R., Imberty, A.** (2004) Crystal structure of tricolorin A: Molecular rationale for the biological properties of resin glycosides found in some Mexican herbal remedies. **Angewandte Chemie international edition** 43, 5918-5922.
- **Reynolds, W. F. y Enriquez, R. G.** (1995). Isolation and characterization of citotoxic and antimicrobial glycosides from *Ipomoea stans*. **Journal of Natural Products**, 58, 1730-1734.
- **Roig y Mesa, J. T.** (1974). Plantas medicinales aromáticas venenosas de cuba. En Instituto del libro (Ed).La Habana, pp. 223-124.
- **Sarin, J. P. S., Hari, G. S., Nandu, K. M. y Dhar, M. M.** (1973) Ipolearósido: A new glycoside from *Ipomoea leari*, with anti-cancer activity. **Phytochemistry**, 12, 2461-2468.
- **Schimming, T., Tofern, B., Mann, P., Richter, A., Jenett-Siems, K., Dräger, B., Asno, N., Gupta, P., Correa, D. M. y Eich, E.** (1998) Distribution and Taxonomic significance of Calystegines in the Convolvulacea. **Phytochemistry**, 49, 1989-1995.
- **Shugeng Cao, Rebecca C. Guza, Jan H. Wisse, James S. Miller, Randy evans, y David G. I. Kingston** (2005) Ipomoessins A-E, Cytotoxic Macrocyclic Glycoresins from the Leaves of *Ipomoea squamosa* from the Suriname Rainforest. **J. Nat. Prod.**, 68, 487-492.
- **Srivastava, R. y Kassum, S.** (1991). Structure of pescaproside E, a fatty acid glycoside from *Ipomoea pes-caprae*. **Carbohydrate Research**, 212, 169-176.
- **Stauffacher, D., Tschertter, H. y Hofmann.** (1965). Isolierung von Ergosin and Ergosinin neben Agroclavin aus den Samen von *Ipomoea argyrophylla* VATKE (Convolvulacea). **Hel. Chim Acta**, 48, 1379-1380.
- **Sugandhika, T., Nalinie, S. M. D. y Jansz, E. R.** (2000). Oral hypoglycaemic activity of *Ipomoea aquatica*. **Journal of Ethnopharmacology**, 72, 293-298.

- **Trease, G. E. y Evans, W. C.** (2002). Pharmacognosy. 15th ed. WB Saunders, USA.
- **Wagner, H.** (1973), The chemistry of resin glycosides of the convolvulaceae family: **Nobel Symposium**, 25, 235-240.
- **Wagner, H. y Schwarting, G.** (1997), Struktur der microphyllinsäure aus dem harz von *Convolvulus Microphyllus*. **Phytochemistry**, 16, 715-717.
- **Wolfender, J.L, Maillard, M., Marston, A. y Hostettmann, K.** (1992) Mass Spectrometry of Underivatized Naturally Occurring Glycosides. **Phytochemical analysis** 3, 193-214.
- **Yang, M. T., Milligan, L. P. Y Mathison, G. W.** (1981) Improved sugar separation by high performance liquid chromatography using porous microparticle carbohydrate columns. **Journal of Chromatography**, 209, 316-322.

A P E N D I C E

Artículos generados por la presente investigación:

1. Rogelio Pereda-Miranda, Edgar Escalante-Sánchez and Carolina Escobedo-Martínez.

Characterization of Lipophilic Pentasaccharides from Beach Morning glory (*Ipomoea pes-caprae*).

Journal of Natural Products 68, 226-239 (2005)

2. Carolina Escobedo-Martínez and Rogelio Pereda-Miranda.

Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*.

Received January 25, 2007

Journal of Natural Products

En prensa

3. Carolina Escobedo-Martínez and Rogelio Pereda-Miranda.

Pescaprein XI, a new pentasaccharide containing xilose from the resin glycosides of beach morning glory *Ipomoea pes-caprae*

En preparación

Trabajos presentados en congresos:

- 19 al 22 de mayo de 2004, participación en la Primera Reunión Nacional de Química de Productos Naturales, con el trabajo libre en modalidad cartel titulado: **Análisis químico preliminar de las resinas glicosídicas de *Ipomoea pes-caprae***, celebrado en Mérida, Yucatán. México.
- 25 al 28 de mayo de 2005, participación en la Segunda Reunión Nacional de Química de Productos Naturales, con el trabajo libre en modalidad cartel titulado: **Análisis químico de las resinas glicosídicas de la riñonina, *Ipomoea pes-caprae* (Convolvulaceae)**, celebrado en Cuernavaca, Morelos. México.
- 16 al 19 de mayo de 2006, participación en la Tercera Reunión Nacional de Química de Productos Naturales y Primera Reunión Nacional de Investigación en Productos Naturales, con el trabajo libre en modalidad cartel titulado: **Resinas Glicosídicas lipofílicas de la riñonina (*Ipomoea pes-caprae*)**, celebrado en Querétaro, Qro. México.
- 5 al 9 de agosto de 2006, participación en el 47nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy, con el trabajo libre en modalidad cartel titulado: **Lipophilic resin glycosides from the Mexican herbal drug “riñonina”, beach morning glory (*Ipomoea pes-caprae*)**, celebrado en la Ciudad de Washintong, D.C. EE.UU.