



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO.**

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

**“UN NUEVO LIPOPENTASACÁRIDO DEL ÁCIDO SIMÓNICO B DE
LAS RESINAS GLICOSÍDICAS DEL CAZAHUATE (*Ipomoea
murucoides*), UNA PLANTA MEDICINAL MEXICANA”**

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

BERENICE CORONA CASTAÑEDA



Tutor: Dr. Rogelio Pereda Miranda

Año: 2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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	Dr. Leovigildo Quijano
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Secretario	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
Primer suplente	Dra. María Yolanda Rios Gómez
Segundo suplente	Dr. Enrique Ramón Ángeles Anguiano

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.

Sustentante: Berenice Corona Castañeda.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo brindado por las siguientes personas e instituciones:

- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de Agosto de 2006 – Agosto de 2008 y por el apoyo económico brindado a través del proyecto 45861-Q.
- Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN 208307-3) por el financiamiento parcial de esta investigación.
- M. en C. Atilano Gutiérrez de la Universidad Autónoma Metropolitana por el registro de los espectros de RMN.
- M. en C. Georgina Duarte y M. en C. Margarita Guzmán de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de los espectros de masas.
- Q.F.B. Marisela Gutiérrez de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de las rotaciones ópticas.
- Miembros del jurado por sus observaciones que me permitieron la corrección del presente manuscrito.
- Dr. Rogelio Pereda Miranda y por sus atenciones, tiempo, dedicación y paciencia en la dirección de la presente tesis.
- Dra. Mabel por su apoyo y cooperación en la realización de la presente investigación.

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1. La familia <i>Convolvulaceae</i>	3
2.2. El género <i>Ipomoea</i>	4
2.3. Las resinas glicosídicas en la familia <i>Convolvulaceae</i>	5
2.4. Núcleos pentasacáridos de las resinas en la familia <i>Convolvulaceae</i>	6
2.5. Estudios químicos de las glicorresinas.	12
2.6. Antecedentes botánicos y etnobotánicos.	13
2.7. Estudios químicos de las resinas glicosídicas de <i>Ipomoea murucoides</i>	15
3. Justificación	22
4. Objetivos	22
4.1. Objetivo general	22
4.2. Objetivos específicos	22
5. Parte experimental	23
5.1. Determinación de las constantes físicas.	23
5.2. Métodos cromatográficos	23
5.2.1. Cromatografía en capa fina.....	23
5.2.2. Cromatografía en columna abierta.....	23
5.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución.	24
5.3. Colecta del material vegetal	24

5.4.	Preparación del extracto clorofórmico.	24
5.5.	Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.	25
5.6.	Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.	25
5.6.1.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XXIII	25
5.6.2.	Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XXV	26
6.	Resultados y discusión.	27
6.1.	Estudio químico de las flores.	27
6.2.	Extracción y fraccionamiento.	27
6.3.	Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.	29
6.3.1.	Fraccionamiento de la fracción primaria XXIII	29
6.3.2.	Fraccionamiento de la fracción primaria XXV	31
6.4.	Caracterización de los glicolípidos.	33
6.4.1.	Elucidación estructural de la murucoidina XIX (1)	33
6.4.2.	Elucidación estructural de la murucoidina III (2)	39
6.4.3.	Elucidación estructural de la murucoidina V (3)	45
6.5.	Espectrometría de masas	54
6.5.1.	Espectrometría de masas modalidad FAB negativo de las murucoidinas XIX y III.	54
6.5.2.	Espectrometría de masas modalidad FAB negativo de la murucoidina V.	57
7.	Conclusiones	62
8.	Bibliografía	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología general de las Convolvuláceas.	3
Figura 2. Distribución del género <i>Ipomoea</i> en México.	4
Figura 3. Árbol de <i>Ipomoea murucoides</i>	14
Figura 4. Flores y semillas de <i>Ipomoea murucoides</i>	14
Figura 5. Murucoidinas I-III.	16
Figura 6. Murucoidinas IX, X y XVIII.	16
Figura 7. Murucoidinas VI-VIII.	17
Figura 8. Murucoidina IV.	18
Figura 9. Murucoidinas V, XI y XVII.	18
Figura 10. Murucoidina XIV.	19
Figura 11. Murucoidinas XV y XVI.	20
Figura 12. Murucoidinas XII-XIII.	20
Figura 13. Murucinas I-V.	21
Figura 14. Cromatografía en capa fina de los eluatos obtenidos de fraccionamiento primario de la jalapina de las flores de <i>Ipomoea murucoides</i>	28
Figura 15. Cromatograma generado mediante HPLC a nivel analítico de la fracción primaria XXIII.	30
Figura 16. Purificación de la subfracción B utilizando la técnica de reciclaje.	31
Figura 17. Cromatograma generado mediante HPLC a nivel analítico de la fracción primaria XXV.	31
Figura 18. Purificación de la subfracción H utilizando la técnica de reciclaje.	32
Figura 19. Purificación de la subfracción J utilizando la técnica de reciclaje.	32
Figura 20. Espectro de RMN ¹ H de la murucoidina XIX (1).	33
Figura 21. Espectro de RMN ¹³ C de la murucoidina XIX (1).	34
Figura 22. Sección anomérica del espectro heteronuclear HSQC de la murucoidina XIX.	35
Figura 23. Sección de la porción oligosacárida del espectro homonuclear COSY de la murucoidina XIX en donde se ilustran las conectividades para la ramnosa interna Ram'.	36

Figura 24. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la muruoidina XIX en donde se ilustran las señales de las unidades sacáridas.....	37
Figura 25. Sección de la región oligosacárida del espectro HMBC de la muruoidina XIX en donde se ilustran las conectividades de los carbonos anoméricos de las unidades sacáridas.	38
Figura 26. Sección del espectro HMBC de la muruoidina XIX donde se ilustran las correlaciones entre los carbonos de los carbonilos de cada uno de los ésteres (ac, jal y mba) con las señales protónicas geminales a los grupos acilantes.....	39
Figura 27. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 2	40
Figura 28. Espectro de RMN ¹³ C de la muruoidina III	41
Figura 29. Sección anomérica del espectro HSQC de la muruoidina III	42
Figura 30. Sección de la porción oligosacárida del espectro COSY de la muruoidina III en donde se ilustran las conectividades para la ramnosa interna Ram'	43
Figura 31. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la muruoidina III en donde se ilustran las señales de las unidades sacáridas.....	44
Figura 32. Sección del espectro HMBC de la muruoidina III donde se ilustran las correlaciones entre los carbonos de los carbonilos de cada uno de los ésteres (jal, mba y mba') con las señales protónicas geminales a los grupos acilantes.....	45
Figura 33. Espectro de RMN ¹ H de la muruoidina V	46
Figura 34. Espectro de RMN ¹³ C de la muruoidina V	47
Figura 35. Sección anomérica del espectro heteronuclear HSQC de la muruoidina V	48
Figura 36. Sección de la porción oligosacárida del espectro COSY de la muruoidina V en donde se ilustran las conectividades para la ramnosa interna Ram.	49
Figura 37. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la muruoidina V en donde se ilustran las señales de las unidades sacáridas.....	50

Figura 38. Sección del espectro HMBC de la mururoidina V donde se ilustran las correlaciones entre los carbonos de los carbonilos de cada uno de los ésteres (jal, mba y mba') con las señales protónicas geminales a los grupos acilantes.....	51
Figura 39. Patrón de fragmentación de los compuestos 1 y 2.	54
Figura 40. Fragmentación de la mururoidina XIX.....	55
Figura 41. Espectro de masas modo FAB negativo de la mururoidina XIX.	56
Figura 42. Espectro de masas modo FAB negativo para la mururoidina III (2).	56
Figura 43. Fragmentación de la mururoidina III.	57
Figura 44. Patrón de fragmentación de la mururoidina V (3).	58
Figura 45. Espectro de masas modo FAB negativo para la mururoidina V (4).	59
Figura 46. Fragmentación de la mururoidina V.	59
Figura 47. Estructura de la mururoidina XIX (1).....	60
Figura 48. Estructura de la mururoidina III (2).	60
Figura 49. Estructura de la mururoidina V (3).	61

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios químicos y ejemplos de actividades farmacológicas.	2
Cuadro 2. Núcleos pentasacáridos.....	7
Cuadro 3. Núcleos pentasacáridos (continuación).	8
Cuadro 4. Núcleos pentasacáridos (continuación).	9
Cuadro 5. Núcleos pentasacáridos (continuación).	10
Cuadro 6. Núcleos pentasacáridos (continuación).	11
Cuadro 7. Desplazamientos químicos en la RMN ¹ H de los compuestos 1-3.....	52
Cuadro 8. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³ C de los compuestos 1-3.....	53

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Significado
COSY	Correlation Spectroscopy.
CHCl ₃	Cloroformo.
CHCN ₃	Acetonitrilo.
d	Doblete.
dd	Doble de doble.
ddd	Doble de doble de doble.
FAB	Fast Atom Bombardment.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy.
Hz	Hertz.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
<i>m/z</i>	Relación masa carga.
MeOH	Metanol.
p.f.	Punto de fusión.
ppm	Partes por millón.
Q.P.	Químicamente puro.
R.A.	Reactivo analítico.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica.
t	Triplete.
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy.

1. Introducción

El uso de plantas medicinales como recurso para tratar diversos problemas de salud se remonta a los inicios de la civilización humana. Actualmente, diversos sectores de la población recurren al uso de medicina tradicional debido a que algunos no tienen acceso a los sistemas oficiales de salud y otros que la utilizan en forma paralela a la medicina alopática (Argueta, 1994). Las plantas medicinales representan un recurso extenso en productos naturales con actividad biológica, éstas pueden ser comercialmente útiles por sí mismas o pueden servir como fuente natural de prototipos químicos para desarrollar derivados modificados con mayor actividad y/o menor toxicidad. El 81% de las formas farmacéuticas desarrolladas en el periodo de 1981 a 2002 contienen productos de origen natural o derivados de la síntesis total o parcial basada en productos naturales (Newman, *et al.*, 2003).

Los géneros *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Operculina* y *Cuscuta* de la familia *Convolvulaceae* se distinguen por su extensa distribución en el mundo y por sus propiedades medicinales, alucinógenas (uso en rituales religiosos) y citotóxicas, principalmente. La actividad alucinógena propia de algunas especies del género *Ipomoea* se debe a la presencia de alcaloides derivados del ácido lisérgico. Las actividades purgante y citotóxica están asociadas a la presencia de resinas glicosídicas en el tejido foliar y radicular. Desde el punto de vista químico, las resinas glicosídicas constituyen una mezcla compleja de glicolípidos con alto peso molecular de naturaleza anfipática por la presencia de una porción hidrofílica que corresponde al núcleo oligosacárido (que puede estar constituido por dos hasta seis unidades sacáridas) y la porción hidrofóbica constituida por la aglicona que usualmente forma un éster intramolecular con la cadena oligosacárida.

Las actividades biológicas de las resinas glicosídicas son diversas, a continuación se mencionan los resultados de algunos estudios químicos y farmacológicos de las resinas glicosídicas del género *Ipomoea* (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Estudios químicos y ejemplos de actividades farmacológicas.

Especie	Glicolípido	Actividad	Referencia
<i>Ipomoea tricolor</i>	Tricolorina A	Antimicrobiana Citotóxica	Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 1993
<i>Ipomoea muricata</i>	Muricatinas A y B	Laxante Carminativo	Noda <i>et al.</i> , 1988
<i>Ipomoea murucoides</i>	Murucoidinas VI – XI Estoloniferina I	Antibacteriana	Clérigo <i>et al.</i> , 2008
<i>Ipomoea murucoides</i>	Murucoidinas I – V Estoloniferina I	Citotóxica	Chérigo y Pereda- Miranda, 2006

2. Antecedentes.

2.1. La familia *Convolvulaceae*.

La familia *Convolvulaceae* se encuentra extensamente distribuida en las regiones tropicales, subtropicales y templadas. Se estima que existen 55 géneros y 1650 especies, los géneros más representativos son *Ipomoea* (500 especies), *Convolvulus* (250 especies) y *Cuscuta* (170 especies) (Trease y Evans, 2002). La morfología de las convolvuláceas es muy parecida (**Figura 1**), la mayoría son enredaderas con hojas alternas y simples, tallos trepadores, flores grandes y vistosas, su cáliz constituido por cinco sépalos libres y una corola con cinco pétalos fusionados formando un embudo (Alcántara, 1980).



Figura 1. Morfología general de las Convolvuláceas.

El nombre de esta familia proviene del vocablo latino *convolvere* que significa entrelazarse y se refiere a su modo de crecimiento. Una de las características anatómicas más notables, es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas tanto en el tejido foliar como en sus raíces. Estas resinas constituyen uno de los aspectos quimiotaxonómicos de esta familia y se les atribuyen propiedades purgantes y citotóxicas (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

2.2. El género *Ipomoea*.

El género *Ipomoea* es uno de los mayoritarios dentro de la familia *Convolvulaceae* con un grado de endemismo de 65% en México, esto se refiere al porcentaje de especies presentes en nuestro país (104) y el número aproximado de especies en el género (160). La distribución de estas especies en el territorio mexicano se ilustra en la **Figura 2**, el primer número representa el número de especies que existen en cada región y el segundo el número de especies endémicas para cada una (McDonald, 1991).

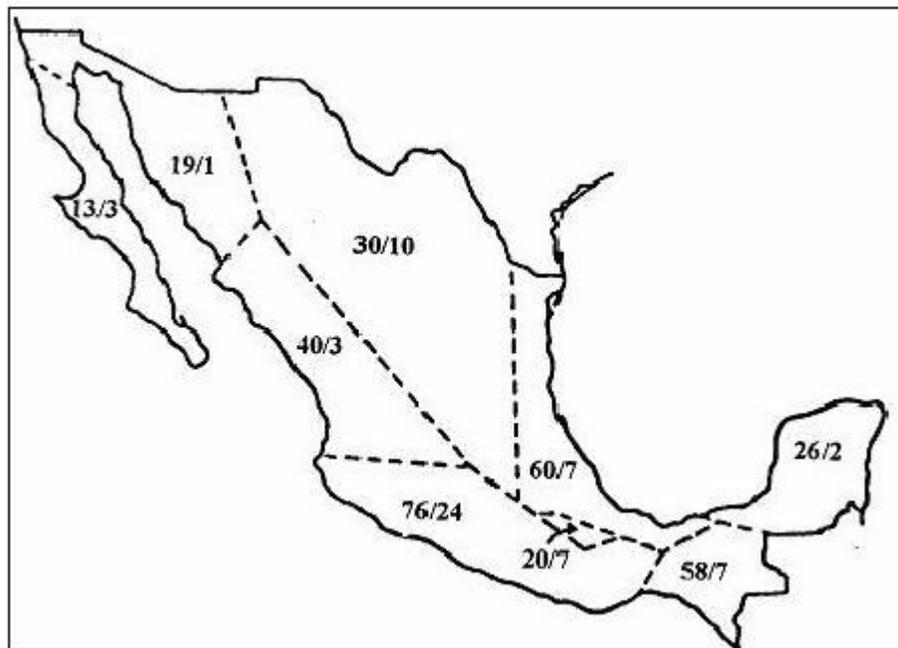


Figura 2. Distribución del género *Ipomoea* en México.

La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* no poseen gran variedad morfológica (enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros de altura), sin embargo existen especies que presentan variantes a dicha morfología general: *Ipomoea phillomega* e *Ipomoea santillanii* son lianas tropicales que alcanzan alturas de hasta 15 metros; *Ipomoea imperata* e *Ipomoea pescaprae* crecen a iguales longitudes pero crecen de forma tendida formando extensas cubiertas sobre arenas costeras; *Ipomoea stans*, *Ipomoea duranguensis* e *Ipomoea sescossiana* son arbustos perennes leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1 metro;

algunas especies de la serie arborescentes crecen en forma de árboles de madera suave de 3 a 9 metros de altura (Alcántara, 1980).

La importancia económica de éste género reside en su uso alimenticio (*Ipomoea batatas*), ornamental (*Ipomoea alba*) y medicinal (*Ipomoea purga* e *Ipomoea stans*). El principal uso medicinal de algunas especies de éste género es purgante (Pereda-Miranda y Bah, 2003) y se conoce desde la época prehispánica, siendo *Ipomoea purga* la especie exponente del denominado complejo medicinal de la “raíz de jalapa” (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).

2.3. Las resinas glicosídicas en la familia *Convolvulaceae*.

Las resinas glicosídicas están constituidas por ácidos grasos volátiles, no volátiles y carbohidratos. Los residuos volátiles identificados con mayor frecuencia incluyen a los ácidos tíglico, isobutírico, metilbutírico (MacLeod y Ward, 1997), nílico (Hernández-Carlos *et al.*, 1999) y cinámico (Noda *et al.*, 1992). Los ácidos grasos de alto peso molecular caracterizados en las especies del género *Ipomoea* incluyen a los ácidos hexanóico, octanóico, decanóico y dodecanóico (Pereda-Miranda *et al.*, 2005; Chérigo y Pereda-Miranda, 2006). El ácido hexadecanóico hidroxilado en la posición C11, conocido con el nombre de ácido jalapinólico, representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas del género *Ipomoea*. Por otra parte, los carbohidratos incluyen a la D-glucosa, la D-fucosa, la D-quinovosa y la L-ramnosa (Fürstner y Müller, 1999; Pereda-Miranda y Bah, 2003).

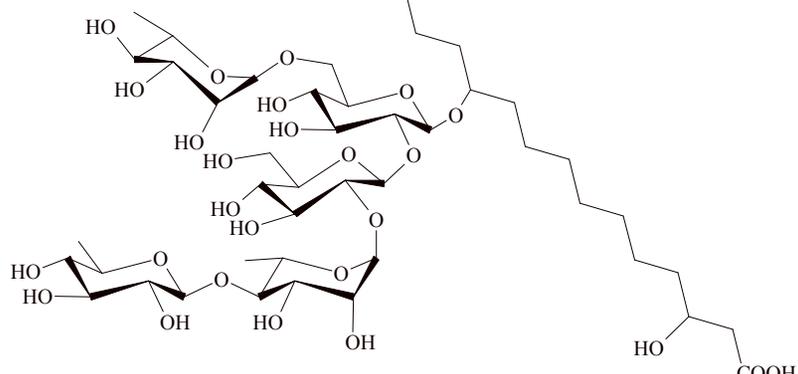
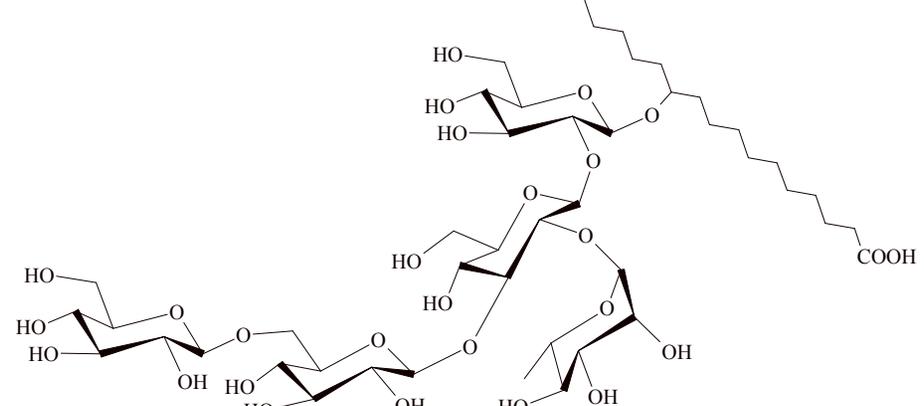
La complejidad de estas resinas se debe a la semejanza estructural de los constituyentes individuales pues representan principalmente mezcla de isómeros que involucran diferentes sitios de esterificación del núcleo oligosacárido. Esta complejidad constituye la mayor dificultad para su completa purificación y caracterización.

Mediante el empleo de un tratamiento alcalino, los glicolípidos liberan ácidos volátiles de cadena corta y el respectivo ácido glicosídico, el cual al ser sometido a un tratamiento ácido, produce una mezcla de monosacáridos y la aglicona. Estos métodos de degradación han constituido una de las formas para lograr la identificación estructural de las resinas en conjunto con el análisis espectroscópico (RMN, 500 MHz) y espectrométrico (EM-FAB) de alta resolución de los oligosacáridos inalterados (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

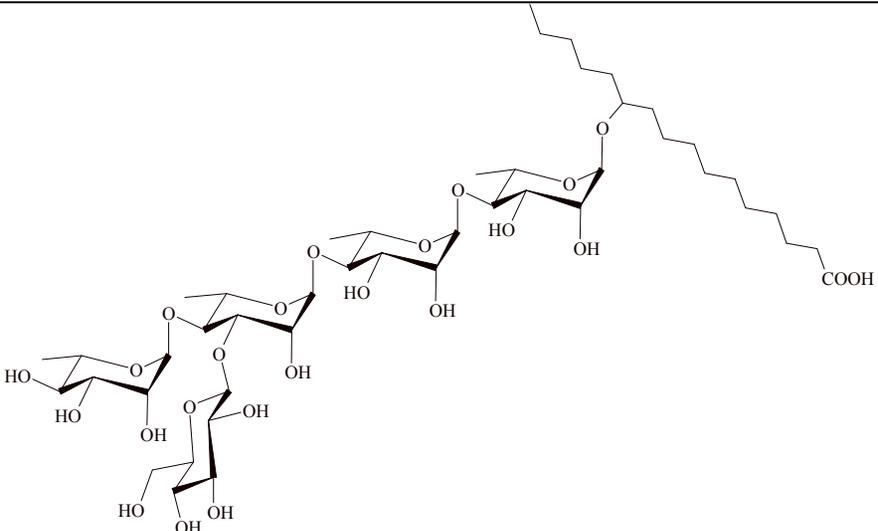
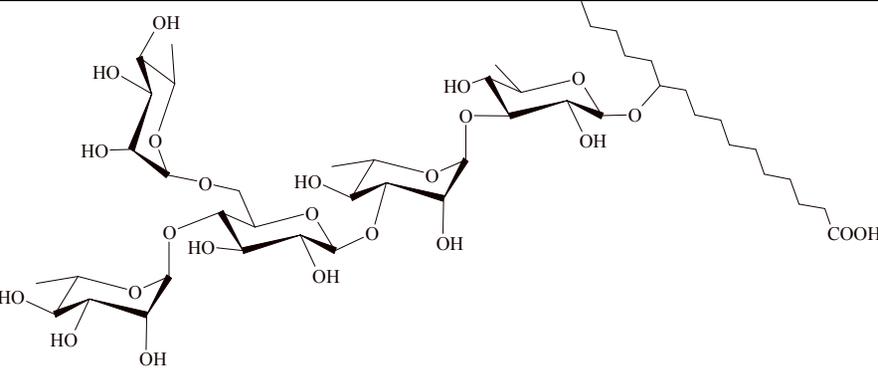
2.4. Núcleos pentasacáridos de las resinas en la familia *Convolvulaceae*.

En los **Cuadros 2 a 6** se ilustran algunos núcleos pentasacáridos descritos en diversas especies de la familia de las convolvuláceas.

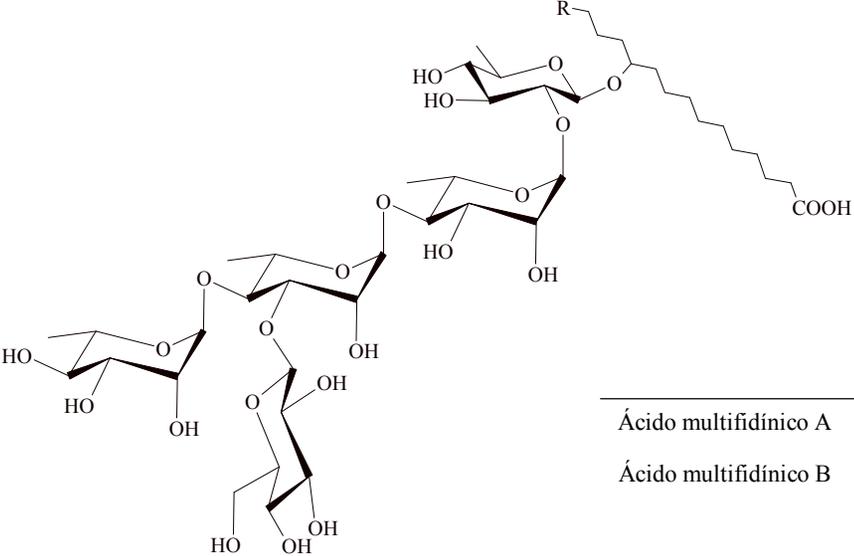
Cuadro 2. Núcleos pentasacáridos.

Ácido	Fuente natural	Estructura	Referencia
<p>Ácido farbítico C</p>	<p>Convolvulina de las semillas de <i>Pharbitis nil</i></p>	 <p><i>O</i>-β-D-quinovopiranosil-(1\rightarrow4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow6)]-<i>O</i>-β-D-glucopiranosido del (3<i>S</i>, 11<i>S</i>) ácido ipurúlico.</p>	<p>Ono, <i>et al.</i>, 1990</p>
<p>Ácido woodrosínico A</p>	<p>Convolvulina de <i>Ipomoea tuberosa</i></p>	 <p><i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow6)-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow2)]-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-β-D-glucopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxihexadecanóico.</p>	<p>Ono, <i>et al.</i>, 1993.</p>

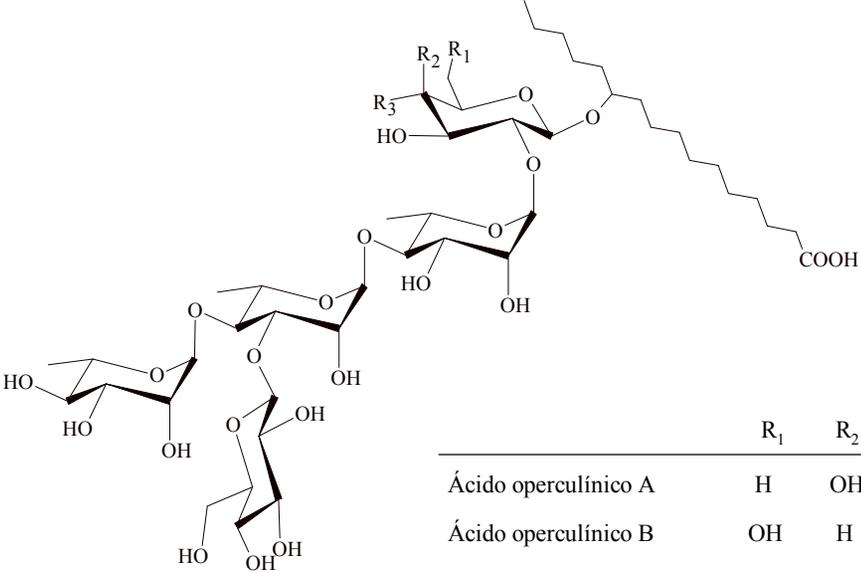
Cuadro 3. Núcleos pentasacáridos (continuación).

Ácido	Fuente natural	Estructura	Referencia
<p>Ácido merremósido j</p>	<p>Jalapina de los tubérculos de <i>Merremia mammosa</i></p>	 <p><i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-<i>O</i>-[β-D-glucopiranosil-(1→3)]-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxihexadecanóico.</p>	<p>Kitagawa, <i>et al.</i>, 1997</p>
<p>Ácido microfílico</p>	<p>Jalapina de <i>Convolvulus microphyllus</i></p>	 <p><i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→6)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-<i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1→3)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→3)-<i>O</i>-β-D-fucopiranosido del ácido 11-hidroxipalmitico.</p>	<p>Wagner, <i>et al.</i>, 1977.</p>

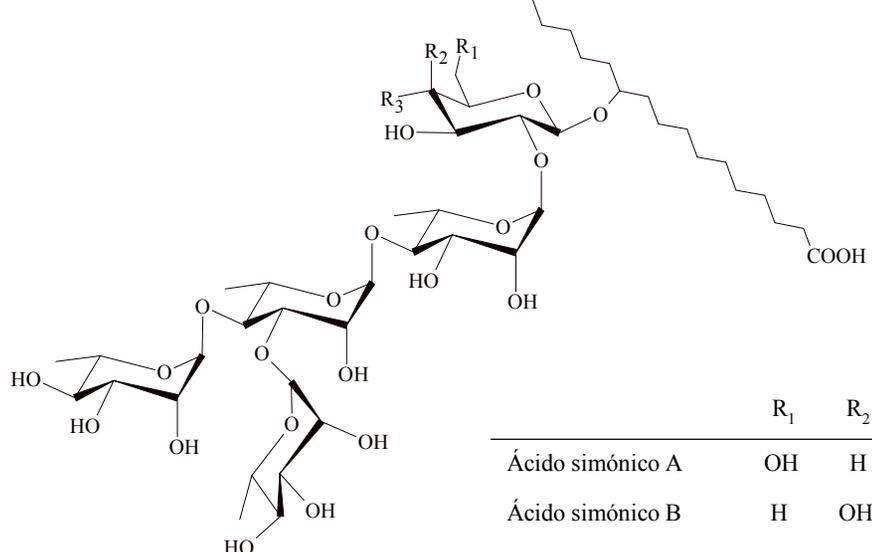
Cuadro 4. Núcleos pentasacáridos (continuación).

Ácido	Fuente natural	Estructura	Referencia						
<p>Ácidos multifidínicos A y B</p>	<p>Jalapina de las hojas de <i>Quamoclit multifida</i></p>	 <table border="1" data-bbox="1249 787 1612 909"> <thead> <tr> <th></th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ácido multifidínico A</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Ácido multifidínico B</td> <td>C₂H₅</td> </tr> </tbody> </table> <p>Multifidínico A: <i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)]-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-β-D-quinovopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxitetradecanoico.</p> <p>Multifidínico B: <i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)]-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-β-D-quinovopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxihexadecanoico.</p>		R	Ácido multifidínico A	H	Ácido multifidínico B	C ₂ H ₅	<p>Ono, <i>et al.</i>, 1997.</p>
	R								
Ácido multifidínico A	H								
Ácido multifidínico B	C ₂ H ₅								

Cuadro 5. Núcleos pentasacáridos (continuación).

Ácido	Fuente natural	Estructura	Referencia												
<p>Ácidos operculínicos A y B</p>	<p><i>Ipomoea operculata</i></p>	 <table border="1" data-bbox="1087 867 1619 1000" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ácido operculínico A</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>Ácido operculínico B</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> </tbody> </table> <p>Operculínico A: <i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1→3)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-<i>O</i>-β-D-fucopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxihexadecanóico.</p> <p>Operculínico B: <i>O</i>-β-D-glucopiranosil-(1→3)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-<i>O</i>-β-D-glucopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxihexadecanóico.</p>		R ₁	R ₂	R ₃	Ácido operculínico A	H	OH	H	Ácido operculínico B	OH	H	OH	<p>Ono, <i>et al.</i>, 1989.</p>
	R ₁	R ₂	R ₃												
Ácido operculínico A	H	OH	H												
Ácido operculínico B	OH	H	OH												

Cuadro 6. Núcleos pentasacáridos (continuación).

Ácido	Fuente natural	Estructura	Referencia												
<p>Ácidos simónicos A y B</p>	<p>Jalapina de la raíz de <i>Ipomoea batatas</i></p>	 <table border="1" data-bbox="1123 771 1606 909"> <thead> <tr> <th></th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>R₃</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ácido simónico A</td> <td>OH</td> <td>H</td> <td>OH</td> </tr> <tr> <td>Ácido simónico B</td> <td>H</td> <td>OH</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table> <p>Simónico A: <i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)]-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-β-D-glucopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxihexadecanóico.</p> <p>Simónico B: <i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow3)-<i>O</i>-[α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)]-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow4)-<i>O</i>-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow2)-<i>O</i>-β-D-fucopiranosido del ácido (11<i>S</i>)-hidroxihexadecanóico.</p>		R ₁	R ₂	R ₃	Ácido simónico A	OH	H	OH	Ácido simónico B	H	OH	H	<p>Noda, <i>et al.</i>, 1992.</p>
	R ₁	R ₂	R ₃												
Ácido simónico A	OH	H	OH												
Ácido simónico B	H	OH	H												

Los primeros glicolípidos caracterizados íntegramente fueron las orizabinas I–IV por Noda y colaboradores (1987) y se ha descrito que los constituyentes de las resinas glicosídicas son glicolípidos cuyas agliconas son los ácidos convolvulínico (C₁₄) o jalapínico (C₁₆) (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).

Se ha encontrado que las resinas glicosídicas presentes en el género *Ipomoea* poseen como característica estructural común un núcleo oligosacárido, que en la mayoría de los casos se encuentra acilado con el grupo carboxilo de la aglicona para formar un éster macrocíclico (Pereda-Miranda y Bah, 2003). En los estudios de actividad biológica se encontró que la lactona macrocíclica constituye una característica estructural importante para la actividad de estos compuestos, ya que cuando se hidroliza el enlace éster disminuye o desaparece la actividad (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

El aislamiento del glicolípidos llamado “Ipolearósido” de *Ipomoea leari* constituye uno de los primeros estudios en donde se pretendía relacionar a los glicolípidos con una posible actividad anticancerígena de aplicación terapéutica (Sarin *et al.*, 1973).

2.5. Estudios químicos de las glicorresinas.

Los resultados de los primeros estudios químicos generaron las definiciones de “jalapina” para describir la fracción de la resina soluble en éter o cloroformo y de “convolvulina” para la porción insoluble en estos disolventes lipofílicos (Ono *et al.*, 1989).

Los estudios químicos se enfocaron principalmente a la caracterización de los productos de hidrólisis ácida y básica con ayuda de las técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM) en su modalidad de impacto electrónico para derivados peracetilados. La cromatografía de gases aplicada a la espectrometría de masas constituye la herramienta de mayor uso para la identificación de los derivados volátiles (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es la técnica que ha permitido el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales de las resinas de las convolvuláceas. Actualmente, el empleo de la técnica de reciclaje de muestra permite la separación de los componentes de las mezclas de manera eficiente, consiguiendo garantizar alta pureza en los productos aislados (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002; Pereda-Miranda y Bah, 2003).

2.6. Antecedentes botánicos y etnobotánicos.

Ipomoea murucoides es una planta originaria de México que crece en regiones con climas semicálido, semiseco y templado desde los 600 a los 2600 m sobre el nivel del mar. Es un árbol de 5 a 9 m de altura con ramas densas y su madera es blanca y pulida (**Figura 3**). Las hojas son alargadas, los frutos son ovoidales y lisos, presenta grupos de flores blancas que son muy vistosas y las semillas están cubiertas con pelos blancos y suaves (**Figura 4**) (Alcántara, 1980).

Entre los nombres comunes que recibe *Ipomoea murucoides* se conocen los siguientes: cazahuate blanco, cazahuate liso, cazahuate manso, ozote, palo blanco, palo bobo, palo del muerto, siete camisas y tonche; mientras que en el estado de Morelos, *cazahuatl* y *micaquahutl*, vocablos de la lengua náhuatl (Argueta, 1994). La especie se encuentra distribuida desde Jalisco hasta Chiapas en la costa pacífica y el centro del país en el Estado de México, Querétaro, Hidalgo, Puebla y Morelos. En este último es la especie dominante de los bosques tropicales caducifolios. La flor del cazahuate se utiliza para detener las hemorragias. Su corteza se emplea como antídoto en la picadura de alacranes y mordedura de serpientes; su látex se aplica sobre heridas y llagas. Por otra parte, la corteza del cazahuate se combina con otras plantas para tratar la inflamación estomacal. Además, el cazahuate se utiliza contra la hidropesía y la parálisis, su cáscara hervida para evitar la caída del cabello refregándolo después de haberlo lavado (Monroy, 2000). *Ipomoea murucoides* forma parte de la lista de plantas medicinales y aromáticas de procedencia nacional con mayor demanda comercial en México.

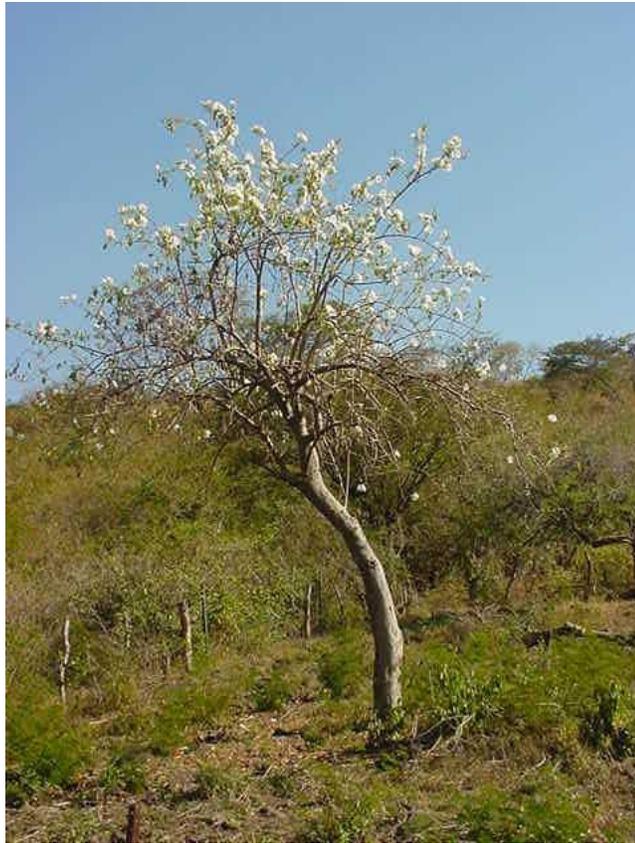


Figura 3. *Árbol de Ipomoea murucoides.*

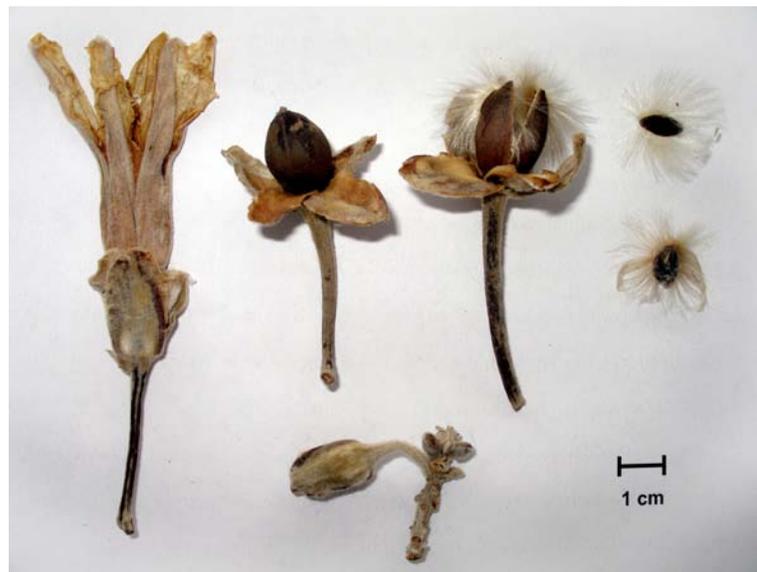


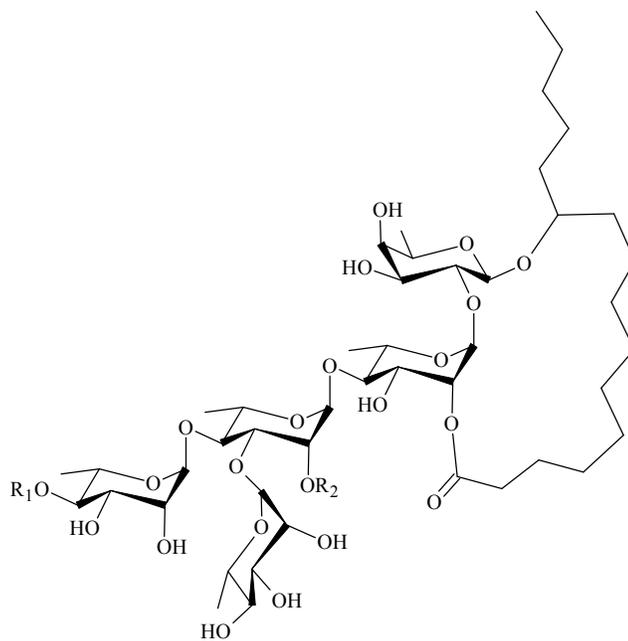
Figura 4. *Flores y semillas de Ipomoea murucoides.*

2.7. Estudios químicos de las resinas glicosídicas de *Ipomoea murucoides*.

La tesis doctoral presentada por Chérigo en 2007 constituye una extensa investigación química del contenido de oligosacáridos de las resinas glicosídicas solubles en cloroformo presentes en las flores de *Ipomoea murucoides* en la que se reportó el aislamiento e identificación de dieciocho glicolípidos novedosos, las murucoidinas **I-XVIII**. Las diferencias encontradas en dichas estructuras comprenden el núcleo oligosacárido, la secuencia de glicosilación, la ubicación de la macrolactonización intramolecular y el número y tipo de residuos acilantes. Los núcleos oligosacáridos aislados e identificados corresponden a los ácidos: operculínico A y simónicos A y B (pentasacáridos) y operculínicos C y D (tetrasacáridos). La macrolactonización intramolecular se establece entre el grupo hidroxilo ubicado en el carbono anomérico de la primera unidad sacárida y el grupo carboxilo ubicado en C-2 o C-3 de la segunda unidad sacárida. Los residuos acilantes identificados son los ácidos 2-metilbutanóico, 2-metilpropanóico, dodecanóico, cinámico, octanóico y 8S-hidroxidodecanóico (Chérigo, 2007) y el número encontrado por molécula varía de uno a tres.

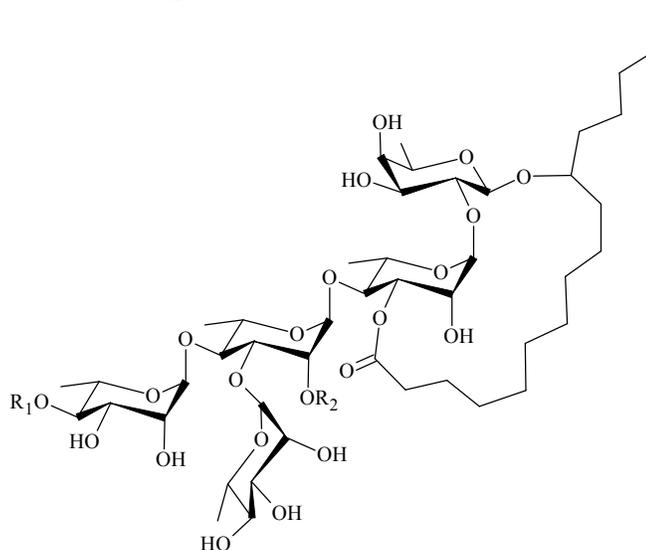
Se evaluó la actividad de las murucoidinas purificadas en células de carcinoma faríngeo, laríngeo y cervical, demostrando que la murucoidina **IV** posee actividad significativa ($CE_{50} = 4.0 \mu\text{g/mL}$) contra la línea celular de carcinoma faríngeo.

Las siguientes figuras ilustran las murucoidinas que poseen el ácido simónico B como núcleo oligosacárido, las murucoidinas **I-III** (**Figura 5**) se encuentran lactonizadas en C-2 de la segunda unidad sacárida en tanto que las murucoidinas **IX, X y XVIII** (**Figura 6**) se encuentran lactonizadas en C-3.



Murucoidina	R ₁	R ₂
I	H	Ácido 2-metilbutanóico
II	Ácido 2-metilpropanóico	Ácido 2-metilbutanóico
III	Ácido 2-metilbutanóico	Ácido 2-metilbutanóico

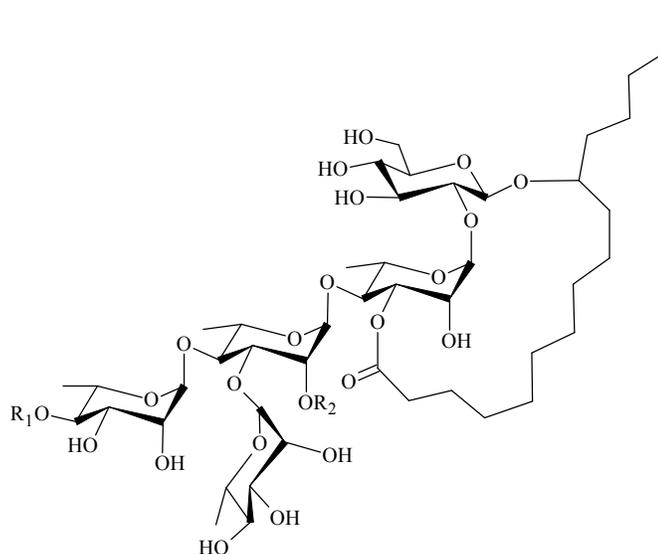
Figura 5. Murucoidinas I-III.



Murucoidina	R ₁	R ₂
IX	Ácido 2-metilpropanóico	Ácido 2-metilbutanóico
X	Ácido 2-metilbutanóico	Ácido 8-hidroxidodecanóico
XVIII	Ácido 2-metilbutanóico	Ácido octanóico

Figura 6. Murucoidinas IX, X y XVIII.

La **Figura 7** muestra la estructura de las murucoidinas **VI-VIII** cuyo núcleo oligosacárido corresponde al ácido simónico A.



Murucoidina	R ₁	R ₂
VI	Ácido 2-metilbutanóico	Ácido dodecanóico
VII	Ácido 2-metilpropanóico	Ácido 2-metilbutanóico
VIII	Ácido 2-metilbutanóico	Ácido 2-metilbutanóico

Figura 7. Murucoidinas **VI-VIII**.

Las siguientes figuras muestran las murucoidinas que poseen el ácido operculínico A como núcleo oligosacárido, la murucoidina **IV** (**Figura 8**) se encuentra lactonizada en C-2 de la segunda unidad sacárida en tanto que las murucoidinas **V**, **XI** y **XVII** (**Figura 9**) se encuentran lactonizadas en C-3.

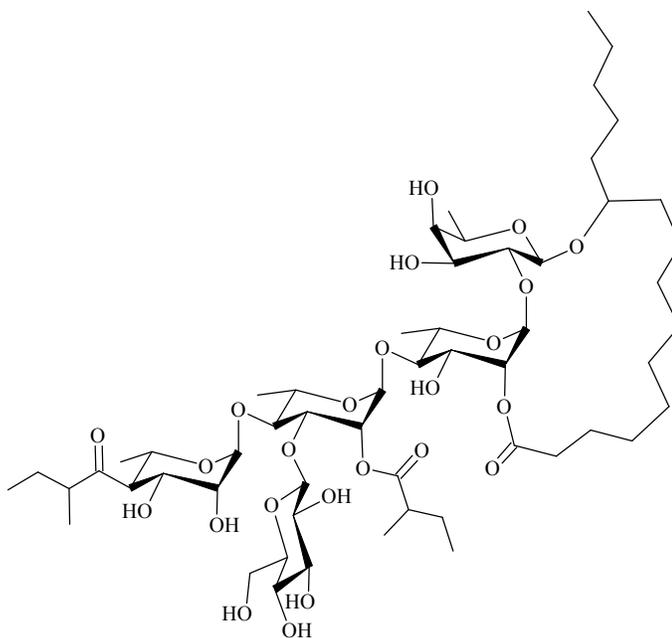
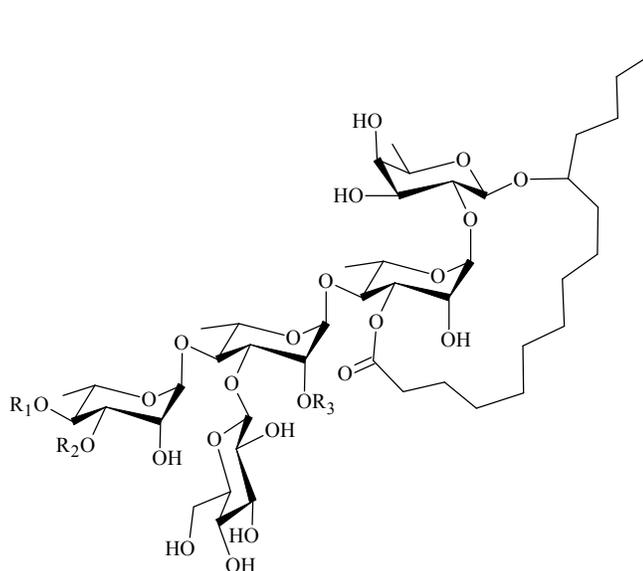


Figura 8. Murucoidina IV.



Murucoidina	R₁	R₂	R₃
V	Ácido 2-metilbutanóico	H	Ácido 2-metilbutanóico
XI	Ácido 2-metilbutanóico	H	Ácido dodecanóico
XVII	Ácido 2-metilbutanóico	Ácido cinámico	Ácido 2-metilbutanóico

Figura 9. Murucoidinas V, XI y XVII.

Las siguientes figuras muestran las murucoidinas que poseen el ácido operculínico C como núcleo oligosacárido, la murucoidina **XIV** (**Figura 10**) se encuentra lactonizada en C-3 de la segunda unidad sacárida en tanto que las murucoidinas **XV** y **XVI** (**Figura 11**) se encuentran lactonizadas en C-2.

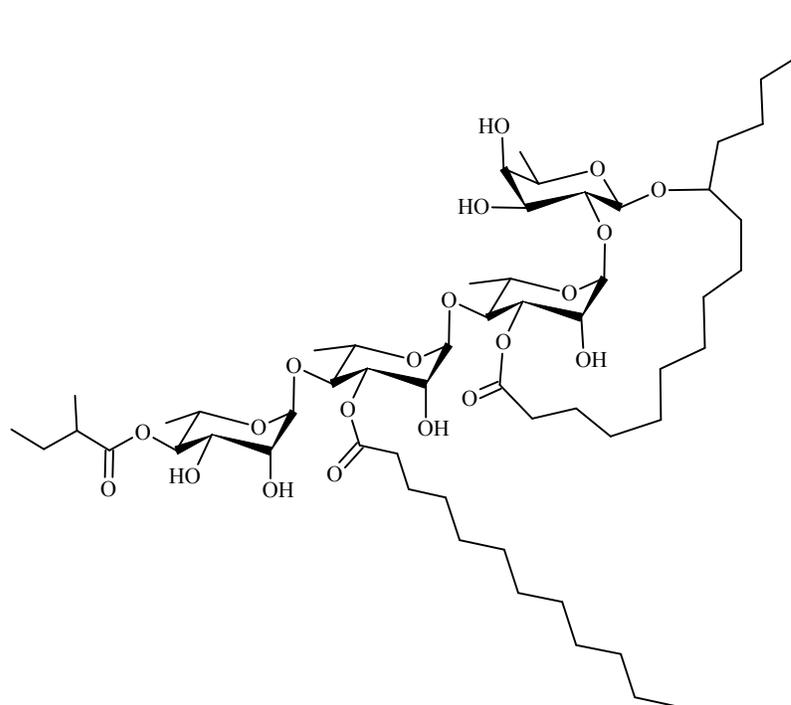
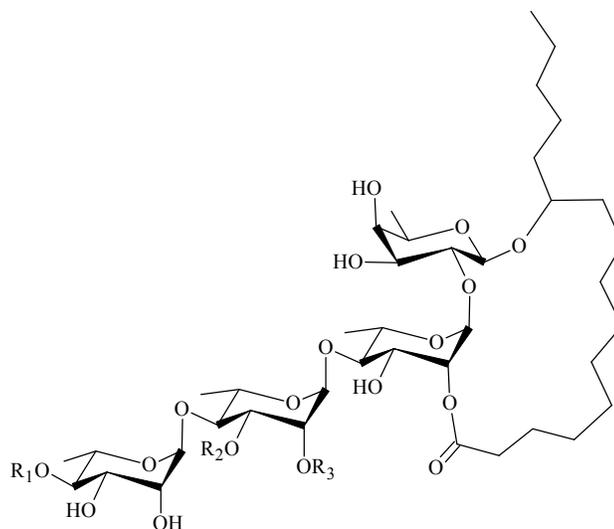


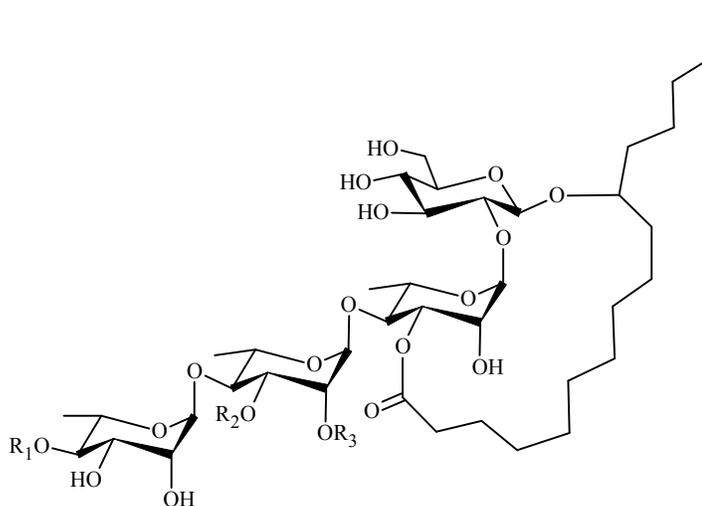
Figura 10. Murucoidina **XIV**.



Murucoidina	R ₁	R ₂	R ₃
XV	Ácido 2-metilbutanóico	Ácido 2-metilbutanóico	H
XVI	Ácido 2-metilbutanóico	H	Ácido 2-metilbutanóico

Figura 11. Murucoidinas XV y XVI.

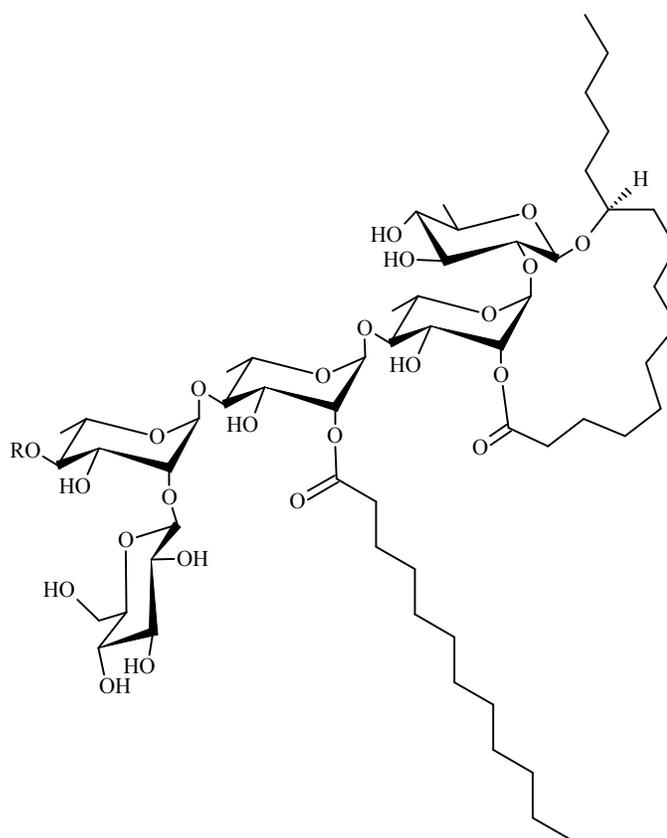
La Figura 12 muestra la estructura de las murucoidinas XII y XIII con ácido operculínico E como núcleo oligosacárido.



Murucoidina	R ₁	R ₂	R ₃
XII	Ácido 2-metilbutanoilo	Ácido dodecanóico	H
XIII	Ácido 2-metilbutanoilo	H	Ácido dodecanóico

Figura 12. Murucoidinas XII-XIII.

Otro grupo de glicolípidos conocido como las murucinas **I–V** (**Figura 13**) fueron aisladas de las raíces de *Ipomoea murucoides* de un ejemplar colectado en Oaxaca y se evaluó su actividad citotóxica (León *et al.*, 2005). Estas resinas están constituidas por un núcleo pentasacárido que difiere de los ramificados descritos previamente para las muestras de cacahuete de Morelos (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006). Sin embargo, estos resultados deben utilizarse con cautela ya que el estado de Oaxaca no representa una región importante para la distribución de este cacahuete y se encuentra limitada a ejemplares aislados, siendo la especie *Ipomoea arborecens* la más abundante.



Murucina	R
I	Acetil
II	Propanoil
III	<i>n</i> -Butanoil
IV	2-Metilbutanoil
V	3-Hidroxi-2-metilbutanoil

Figura 13. Murucinas I-V.

3. Justificación.

El presente trabajo de investigación representa una continuación del trabajo experimental presentado por Chérigo en el año 2007 y contempla el aislamiento, la purificación y la caracterización de algunos glicolípidos individuales minoritarios constitutivos de la jalapina de las flores de *Ipomoea murucoides* con el objetivo de ampliar el conocimiento de la diversidad estructural de este grupo de constituyentes anfipáticos que poseen potencial como agentes moduladores de la resistencia a diversos agentes antibióticos (metecilina, tetraciclina y norfloxacin, entre otros) en cepas de *Staphylococcus aureus* (Chérigo *et al.*, 2008). De tal suerte que los principios oligosacáridos de las convolvuláceas pueden representar agentes que administrados en combinación con los agentes terapéuticos de uso clínico potencien la acción de éstos y vuelvan a ser de utilidad para el tratamiento de las infecciones ocasionadas por las cepas resistentes hospitalarias. Por tal motivo, se pretende explorar la diversidad estructural de las murucoidinas para contribuir al descubrimiento de nuevos productos naturales para explorar su potencial de acción biológica.

4. Objetivos.

4.1. Objetivo general.

Aislar y purificar, mediante el uso de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), algunos glicolípidos constitutivos minoritarios presentes en la mezcla compleja de resinas glicosídicas del extracto clorofórmico de las flores de *Ipomoea murucoides* con la finalidad de ampliar el conocimiento de la diversidad estructural de estos metabolitos.

4.2. Objetivos específicos.

- Establecer las condiciones instrumentales de la cromatografía líquida de alta eficiencia para aislar y purificar algunos constituyentes individuales minoritarios presentes en la jalapina de la especie en estudio.
- Caracterizar las estructuras de los glicolípidos aislados y purificados mediante técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB).

5. Parte experimental.

5.1. Determinación de las constantes físicas.

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y carbono-13 (^{13}C) se determinaron en los equipos Varian VXL-500 y Bruker AMX-500, operando a una frecuencia de 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C . Se utilizó piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y los desplazamientos químicos (δ) se expresan en ppm utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer 241 utilizando metanol como disolvente. Los espectros de masas fueron registrados en un espectrómetro JEOL SX-102A, utilizando como método de ionización el bombardeo rápido de átomos (EM-FAB) en el modo negativo y trietanolamina como matriz. El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher-Johns y no está corregido.

5.2. Métodos cromatográficos.

5.2.1. Cromatografía en capa fina.

El análisis en CCF se efectuó en cromatoplasmas cubiertas de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck, utilizando cloroformo-metanol (98:2 y 9:1) como eluyente; posteriormente se humedecieron con un agente cromógeno (mezcla H_2SO_4 – sulfato cérico) y se revelaron por calentamiento.

5.2.2. Cromatografía en columna abierta.

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 Merck, de tamaño de partícula de 0.063 – 0.200 mm, para realizar el fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.

5.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

El análisis y la separación en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se realizó en un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography División, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de distribución de disolvente y un refractómetro diferencial (Waters 410) integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex GX280, Dell). El control del equipo, la adquisición de datos y el procesamiento de la información cromatográfica se realizó a través del programa Empower 2 (Waters). Una válvula de reciclaje de muestra se adaptó al sistema cromatográfico para la purificación de los compuestos. Las columnas empleadas para la separación y purificación en HPLC fueron:

- Columna analítica fase reversa C-18 Symmetry Waters (4.6 × 300 mm, 5 μm). Se realizaron análisis preliminares para establecer las condiciones instrumentales.
- Columna preparativa fase reversa C-18 Symmetry Waters (19 × 300 mm, 7 μm).

5.3. Colecta del material vegetal.

El material vegetal analizado consistió en flores secas de *Ipomoea murucoides* (426.8 g), colectadas en la Ciudad Universitaria, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos en noviembre de 1996. La identificación del material vegetal fue realizada por el Biólogo Gustavo Soria Rocha.

5.4. Preparación del extracto clorofórmico.

El material vegetal seco y pulverizado se sometió a extracciones sucesivas con cloroformo (Q.P.) mediante un proceso de maceración en periodos de tres días durante dos semanas. Posteriormente, se filtró el disolvente y se concentró a presión reducida. Se obtuvo un rendimiento del 13.82 % (59 g) determinado respecto al peso del material vegetal seco inicial.

5.5. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.

El fraccionamiento primario del extracto clorofórmico se realizó mediante cromatografía en columna abierta empacada con gel de sílice utilizando como sistema de elución cloroformo-metanol (Q.P.) se inició la elución con cloroformo y se aumentó la polaridad con metanol. Se obtuvieron 27 fracciones primarias (I - XXVII). El trabajo experimental se efectuó con las fracciones primarias XXIII y XXV para obtener los glicolípidos constitutivos de las resinas de la planta en estudio.

5.6. Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.

La separación de los glicolípidos individuales de la jalapina de *Ipomoea murucoides* se realizó haciendo cortes de las fracciones primarias, utilizando la cromatografía líquida de alta eficiencia. Las condiciones instrumentales consistieron en:

- Columna: C-18 preparativa Symmetry Waters (19 x 300 mm, 7 μ m).
- Fase móvil: CH₃CN – MeOH (9:1).
- Flujo: 9.0 mL/min.
- Detector: Índice de refracción.
- Volumen de inyección: 500 μ L.
- Concentración de la muestra: 0.1 mg/ μ L.

En todos los casos se aplicó la técnica de reciclaje de muestra. Esta técnica consistió en hacer pasar la muestra problema por la misma columna preparativa (de 11 a 15 ciclos) para obtener la máxima separación y purificación (> 99%) de los constituyentes individuales en cada una de las fracciones secundarias seleccionadas para su purificación.

5.6.1. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XXIII:

Se utilizaron 486 mg de la fracción primaria XXIII empleando las condiciones preparativas indicadas en la sección 5.6. El perfil cromatográfico (**Figura 15**; Resultados y Discusión, sección 6.3.1.) muestra aproximadamente seis picos. La muestra fue sometida a un proceso de fraccionamiento a nivel preparativo para obtener una subfracción de interés (B con $t_R=$

16.47 min), la cual fue reinyectada en la columna C-18 Symmetry utilizando como sistema de elución CH₃CN –H₂O (95:5); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección 500 µL.

5.6.2. Fraccionamiento secundario de la fracción primaria XXV:

Se fraccionaron 185.8 mg de la fracción primaria **XXV**, obteniéndose aproximadamente trece picos (**Figura 17**; Resultados y discusión, sección 6.3.2.) utilizando las condiciones instrumentales descritas en la sección 5.6. Las subfracciones H ($t_R = 30.85$ min) y J ($t_R = 37.40$ min) fueron reinyectadas independientemente en la columna C-18 Symmetry utilizando como sistema de elución CH₃CN –H₂O (85:15); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección 500 µL. Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra para la purificación.

6. Resultados y discusión.

6.1. Estudio químico de las flores.

Del estudio químico de las flores de *Ipomoea murucoides* (Chérigo, 2007) se aislaron e identificaron compuestos tetrasacáridos y pentasacáridos que constituyen el núcleo estructural de las resinas glicosídicas de esta especie: los ácidos operculínicos C y E (tetrasacáridos); el ácido orpeculínico A y los ácidos simónico A y B (pentasacáridos). Se obtuvieron veintiún glicolípidos de los cuales dieciocho son novedosos: las murucoidinas **I – XVIII (Figuras 5 a 12)**. El presente trabajo experimental representa la continuación del estudio químico de las flores de *Ipomoea murucoides* realizado por Chérigo en 2007 y se enfocó a la separación, la purificación y la caracterización de los glicolípidos minoritarios que no fueron caracterizados en dicho estudio.

6.2. Extracción y fraccionamiento.

La preparación del extracto clorofórmico de las flores de *Ipomoea murucoides* permitió la obtención de 59 g de jalapina, la cual fue sometida a un fraccionamiento en columna abierta para lograr una separación preliminar de los constituyentes presentes en el extracto de acuerdo a su polaridad. La **Figura 14** muestra las cromatoplasmas en capa fina que se realizaron durante el monitoreo del fraccionamiento primario según las condiciones descritas en la sección 5.2.1. de la Parte experimental.

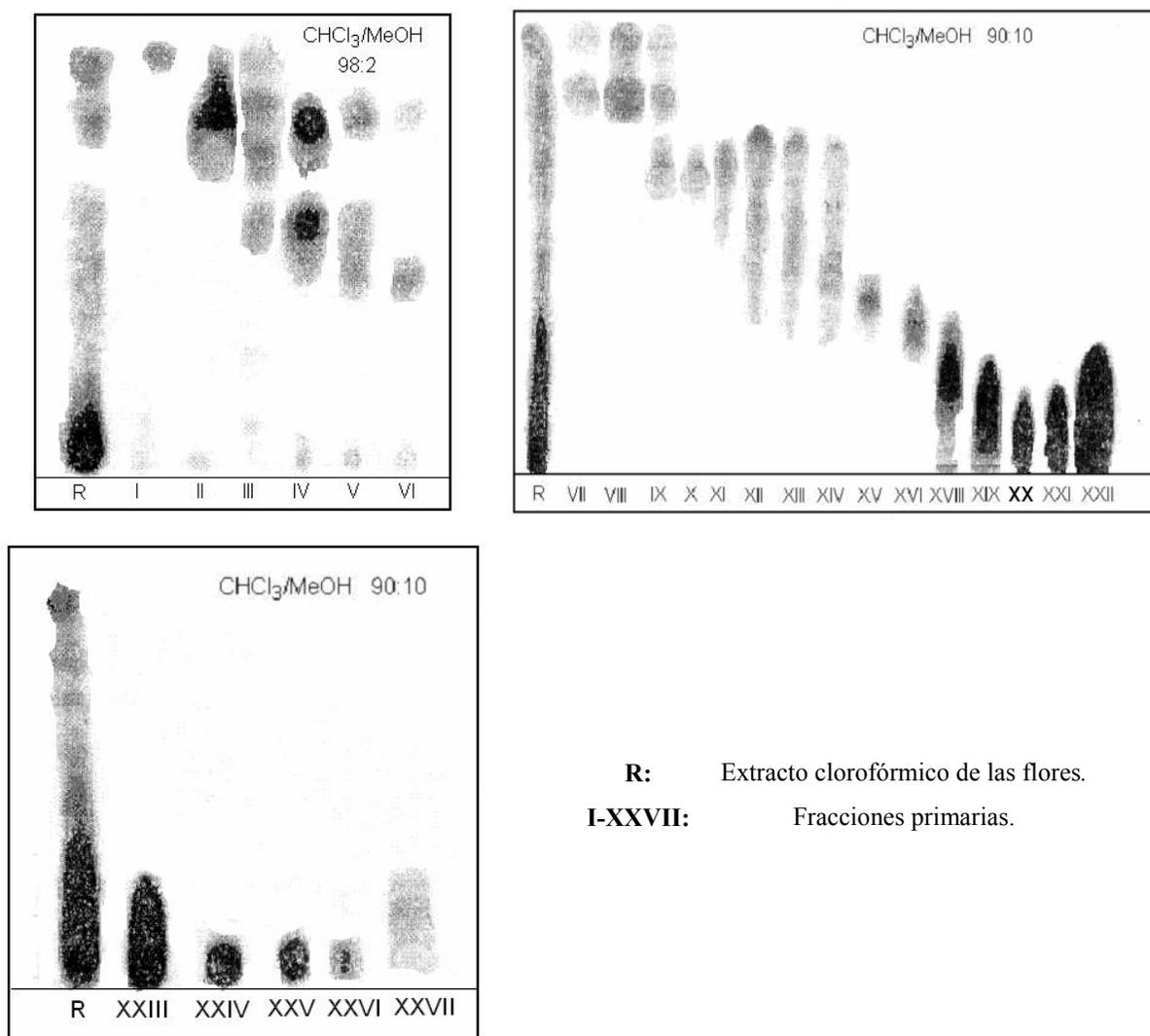


Figura 14. Cromatografía en capa fina de los eluatos obtenidos de fraccionamiento primario de la jalapina de las flores de *Ipomoea murucoides*.

Al revelar las cromatoplasmas con la mezcla de sulfato cérico y ácido sulfúrico, se pudo determinar que las fracciones primarias **XXIII** – **XXV** contenían resinas glicosídicas ya que desarrollaron el color amarillo parduzco característico de estos principios después de su calentamiento. El trabajo experimental se efectuó con las fracciones primarias **XXIII** y **XXV** para obtener algunos glicolípidos minoritarios constitutivos de las resinas de la especie en estudio.

6.3. Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.

La similitud estructural y por lo tanto, el comportamiento cromatográfico de los constituyentes individuales de las mezclas de resinas glicosídicas representan los principales impedimentos para la purificación mediante el uso de técnicas cromatográficas convencionales (por ejemplo, la cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice o el empleo de sephadex), ya que la aplicación de éstas únicamente permite la purificación parcial de las mezclas de oligosacáridos. La purificación total de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas se ha logrado mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Se realizaron pruebas preliminares a nivel analítico para efectuar la separación de los constituyentes presentes en las fracciones primarias **XXIII** y **XXV** en un sistema cromatográfico con detector de índice de refracción. Se utilizó la columna analítica de fase reversa enlazada con dimetiloctadecilsilano (C-18), ya que el uso de estas columnas se ha descrito para la purificación de los productos naturales anfipáticos presentes en las glicorresinas de las convolvuláceas (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

6.3.1. Fraccionamiento de la fracción primaria XXIII:

Cuando se encontraron las condiciones instrumentales a nivel analítico apropiadas para la separación, se procedió a realizar el escalamiento a nivel preparativo para aislar y purificar algunos de los constituyentes individuales presentes en dichas fracciones. Las condiciones instrumentales a nivel preparativo se describen en la Parte Experimental, sección **5.6**. La **Figura 15** muestra el perfil cromatográfico de la fracción primaria **XXIII** empleando las condiciones anteriormente citadas.

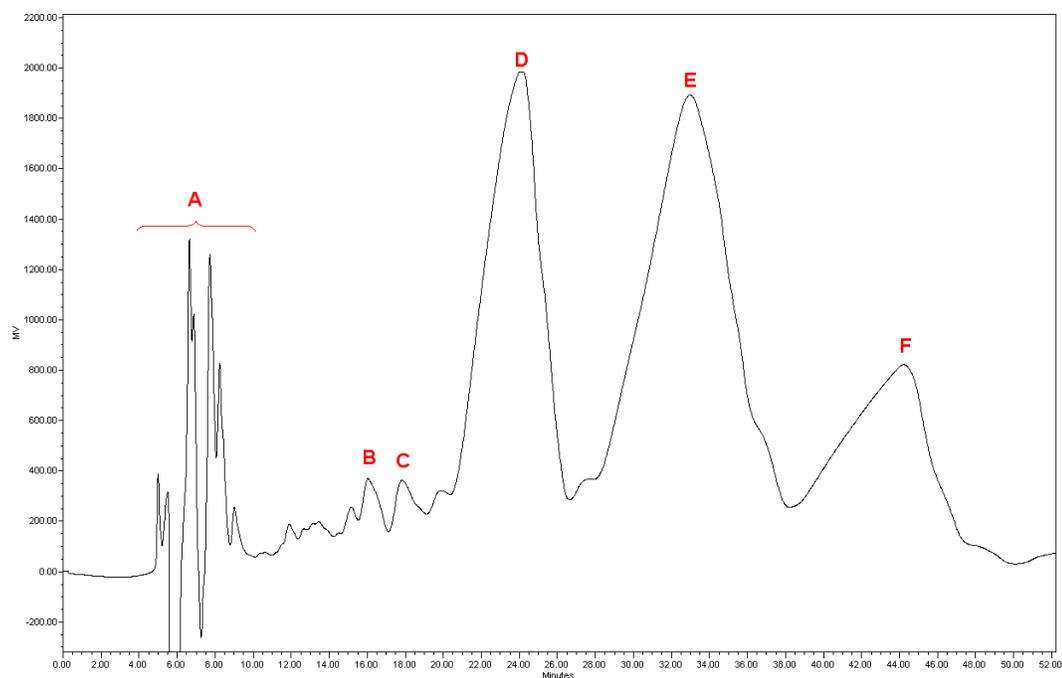


Figura 15. Cromatograma generado mediante HPLC a nivel analítico de la fracción primaria **XXIII**.

El fraccionamiento secundario a nivel preparativo permitió la obtención de mezclas de menor complejidad que permitieron su posterior resolución y purificación. La subfracción B ($t_R = 16.47$ min) obtenida de la fracción primaria **XXIII** fue reinyectada en la columna C-18 Symmetry con el sistema de elución $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ (95:5); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección 500 μL . La **Figura 16** muestra la purificación realizada para dicha subfracción mediante la aplicación de la técnica de reciclaje de la muestra:

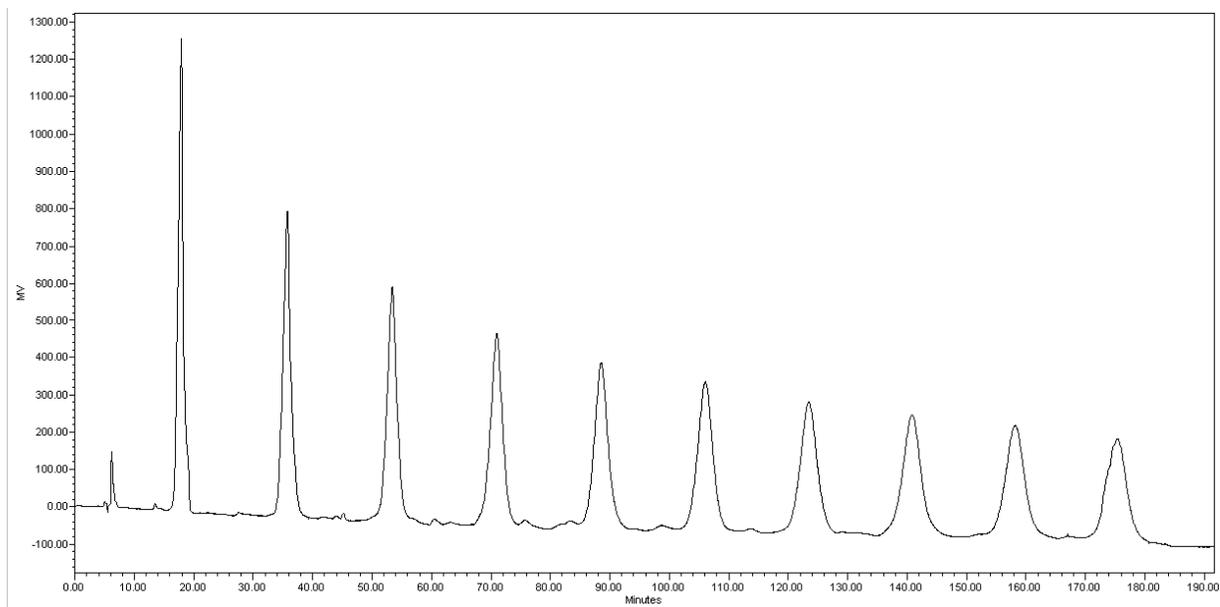


Figura 16. Purificación de la subfracción B utilizando la técnica de reciclaje.

6.3.2. Fraccionamiento de la fracción primaria XXV:

Se utilizaron 185.8 mg de la fracción primaria **XXV**, obteniéndose aproximadamente diez picos (**Figura 17**) con las condiciones instrumentales antes mencionadas para realizar el fraccionamiento.

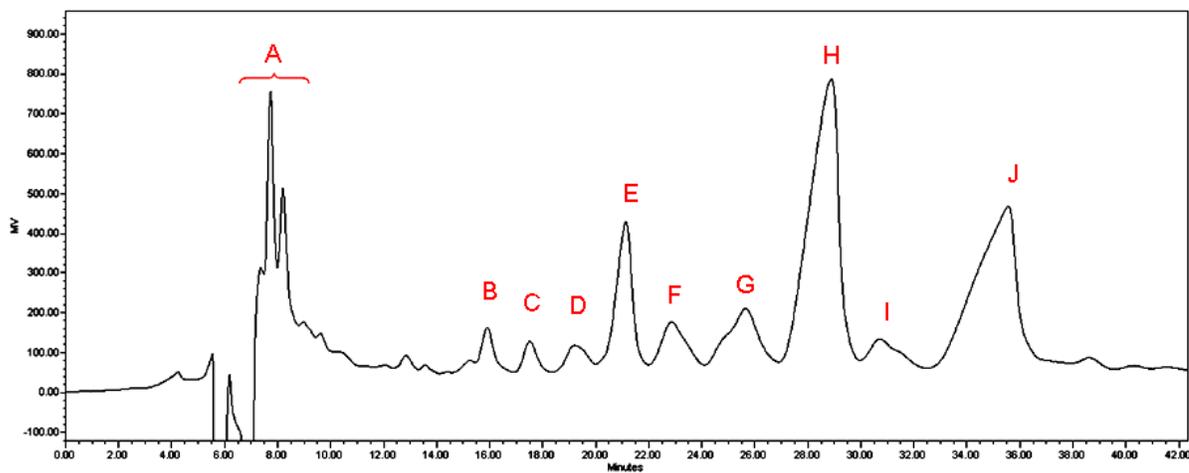


Figura 17. Cromatograma generado mediante HPLC a nivel analítico de la fracción primaria **XXV**.

La subfracción H ($t_R = 28.89$ min) fue reinyectada en la columna C-18 Symmetry con el sistema de elución $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ (85:15); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección 500 μL . Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra para la purificación (**Figura 18**).

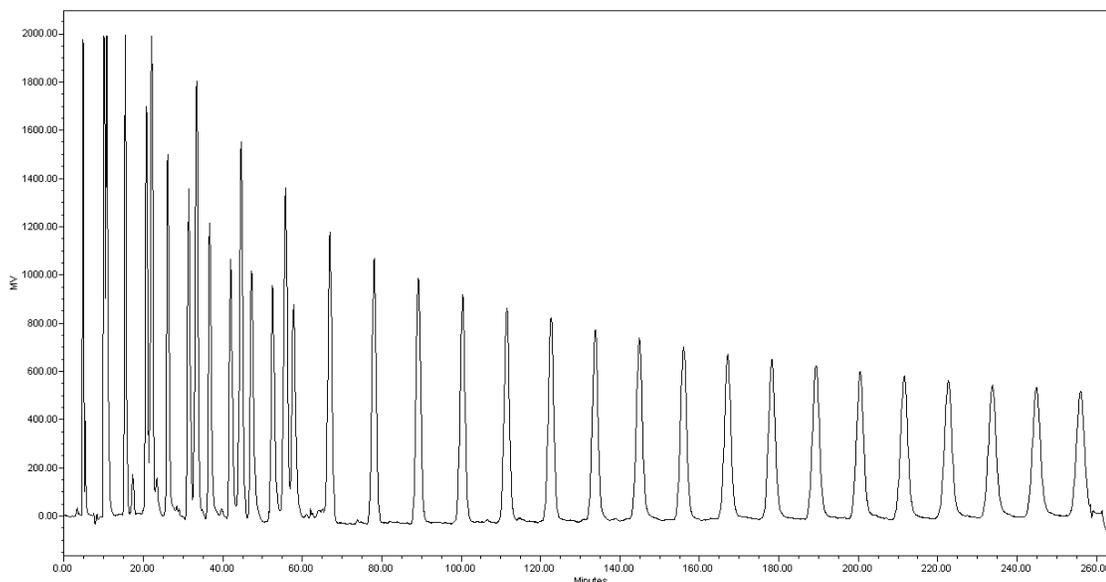


Figura 18. Purificación de la subfracción H utilizando la técnica de reciclaje.

La subfracción J ($t_R = 35.40$ min) fue reinyectada en la columna C-18 Symmetry con el sistema de elución $\text{CH}_3\text{CN} - \text{H}_2\text{O}$ (85:15); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección 500 μL . Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra para la purificación (**Figura 19**).

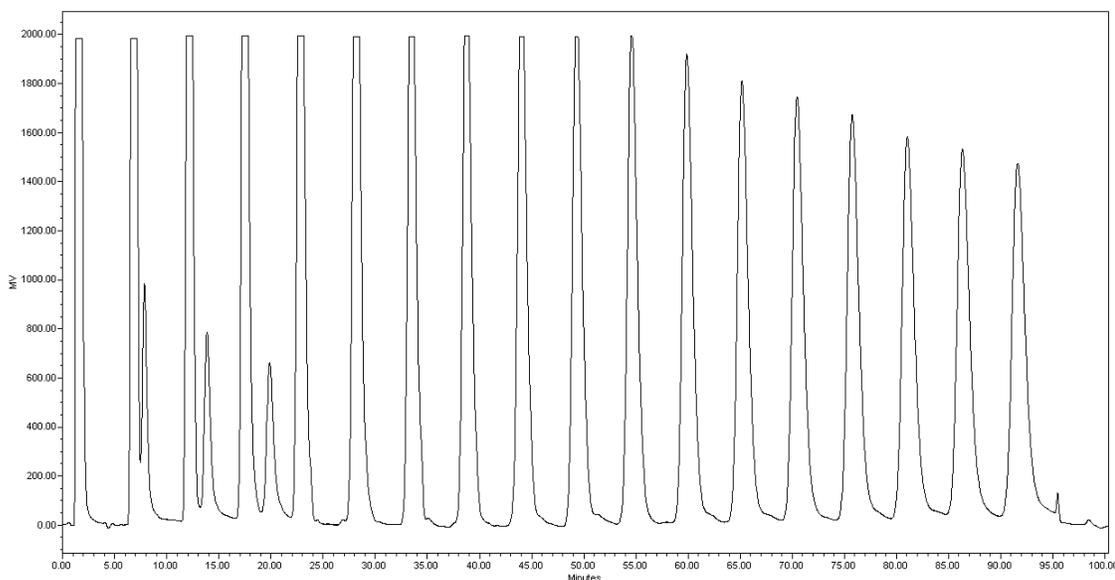


Figura 19. Purificación de la subfracción J utilizando la técnica de reciclaje.

6.4. Caracterización de los glicolípidos.

La caracterización estructural de los glicolípidos purificados se realizó mediante técnicas espectroscópicas unidimensionales (RMN ^1H y ^{13}C) y bidimensionales (RMN HSQC, COSY, TOCSY y HMBC). Se identificaron como núcleos oligosacáridos los ácidos: simónico B (murucoidinas **III** y **XIX**) y operculínico A (murucoidina **V**).

La asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C (**Cuadros 7 y 8**) de los glicolípidos individuales purificados se realizó empleando los espectros unidimensionales de ^1H y ^{13}C (**Figuras 22**) y bidimensionales: homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HSQC) (Duus *et al.*, 2000).

6.4.1. Elucidación estructural de la murucoidina **XIX** (1)

El análisis de los espectros unidimensionales de RMN ^1H (**Figura 20**) y ^{13}C (**Figura 21**) permitió la obtención de información general acerca de la estructura de la murucoidina **XIX**.

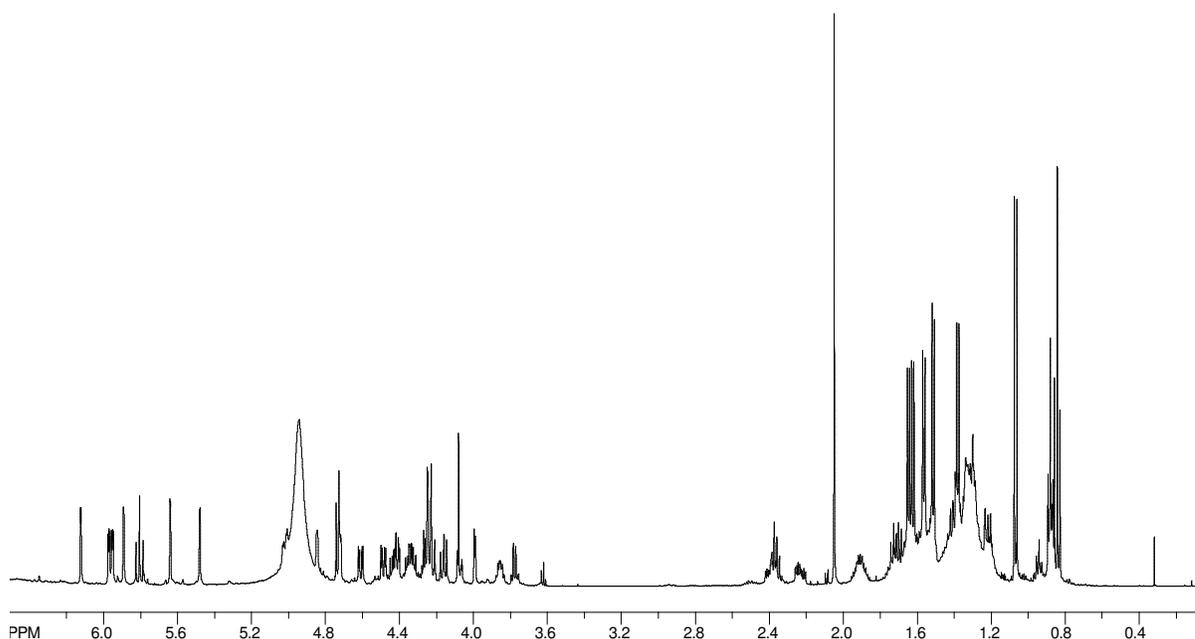


Figura 20. Espectro de RMN ^1H de la murucoidina **XIX** (1).

Del espectro de RMN ^1H , se pueden distinguir las siguientes señales características:

Metilbutirato	Triplete cuarteteado (2.37 ppm): Protón H-2
	Doblete (1.07 ppm): Protón 2-Me
	Triplete (0.84 ppm): Protón 3-Me
Acetato	Singulete (2.05 ppm): Protón H-2.
Núcleo oligosacárido	Cinco dobletes (4.70-6.20 ppm): Protones anoméricos.
	Cinco dobletes (1.36-1.66 ppm): Grupos metilos de las 6-desoxihexosas.
	Desprotección de los metinos Ram'-2 y Ram''-4, por lo que los hidroxilos de estas posiciones deben encontrarse acilados.
	Lactonización en Ram-2.
Aglicona	Dos protones no equivalentes del grupo metileno en posición alfa del grupo carbonilo de la macrolactona: (2.2 - 2.9 ppm).

El número de protones anoméricos estableció la naturaleza pentasacárida del núcleo glicosídico, en tanto que la magnitud de las constantes de acoplamiento de dichos protones indicó la presencia de unidades de ramnosa ($J = 1.5, 2.0$ Hz) y una unidad de fucosa ($J = 7.5$ Hz) que corresponden al ácido simónico B (Duus *et al.*, 2000).

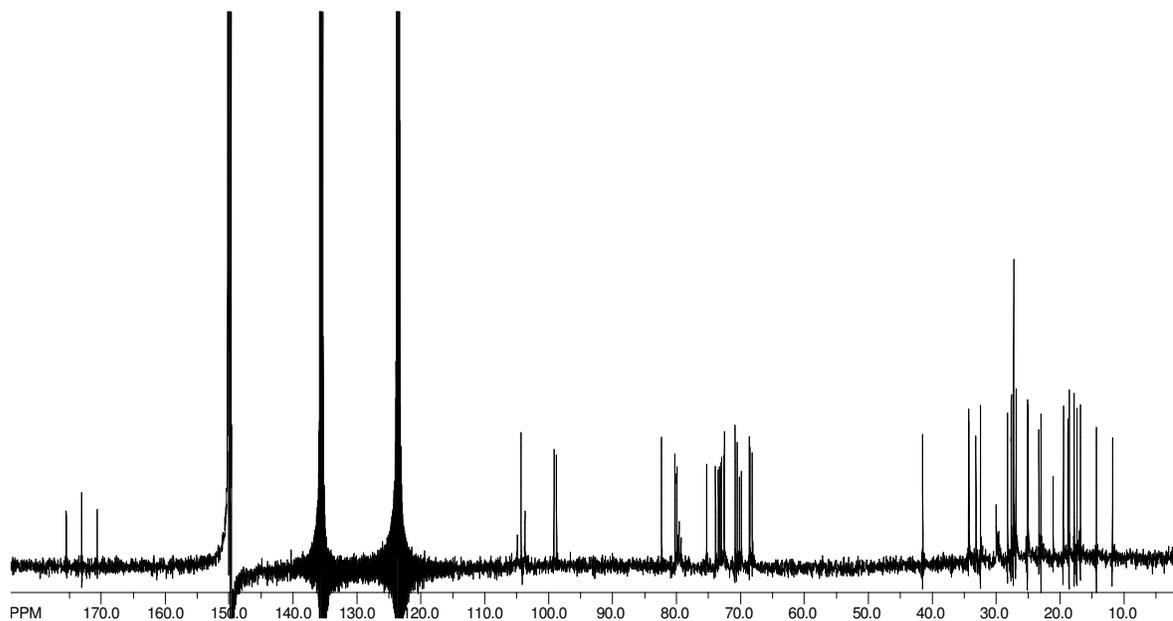


Figura 21. Espectro de RMN ^{13}C de la murucoidina XIX (1).

Tres señales con desplazamientos entre 170 – 176 ppm sugieren la presencia de dos grupos carbonilo de los residuos ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona.

El primer paso para la asignación de las señales consistió en localizar en el espectro heteronuclear HSQC (**Figura 22**) los carbonos anoméricos con desplazamientos químicos entre 98 – 105 ppm y sus respectivos protones cuyos desplazamientos se observan entre 4.5 – 6.5 ppm (Agrawal, 1992; Pereda-Miranda y Bah, 2003).

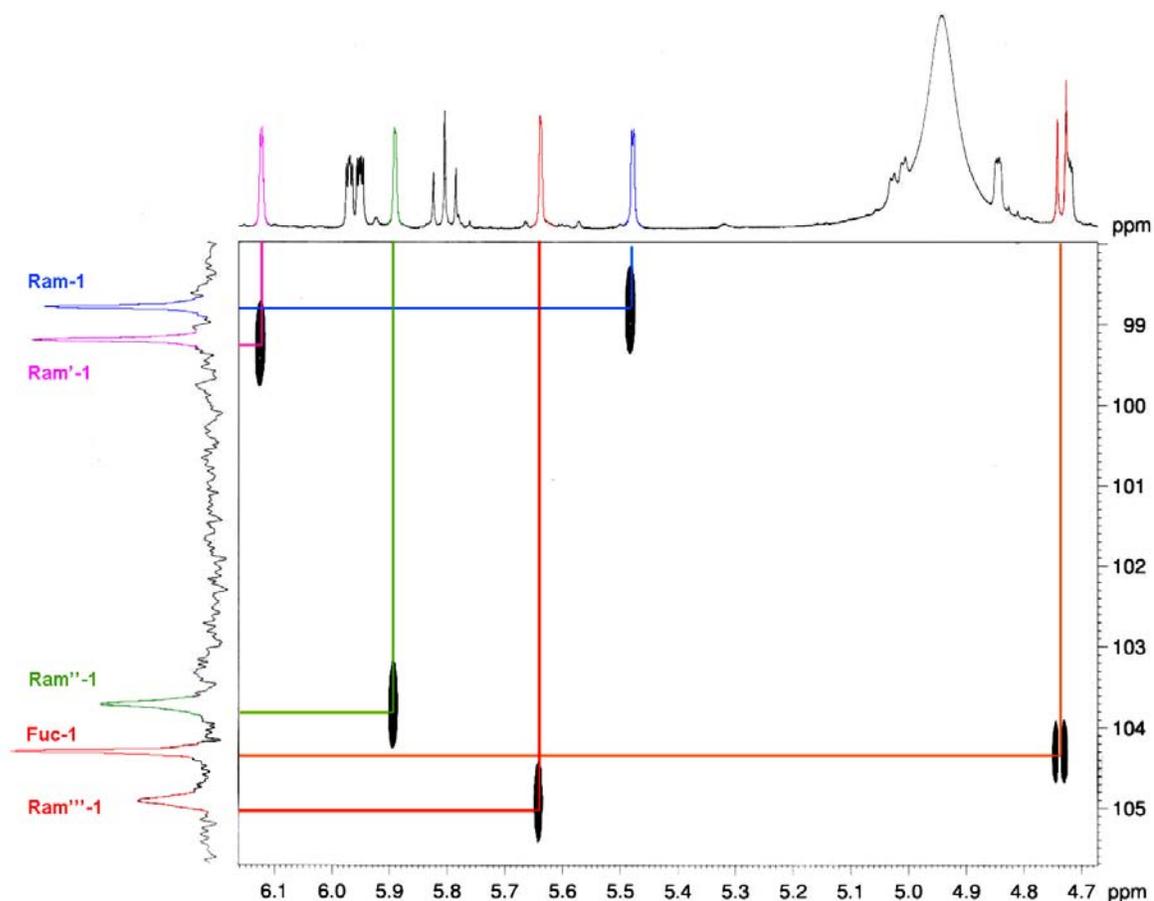


Figura 22. Sección anomérica del espectro heteronuclear HSQC de la murucoidina XIX.

Posteriormente, se asignaron las señales protónicas para cada unidad sacárida del núcleo a partir de los espectros homonucleares bidimensionales COSY y TOCSY. En el espectro COSY (**Figura 23**) se estableció la conectividad para conocer la secuencia J_{H-H} para cada

unidad sacárida iniciando con el protón anomérico que se determinó a partir del espectro HSQC.

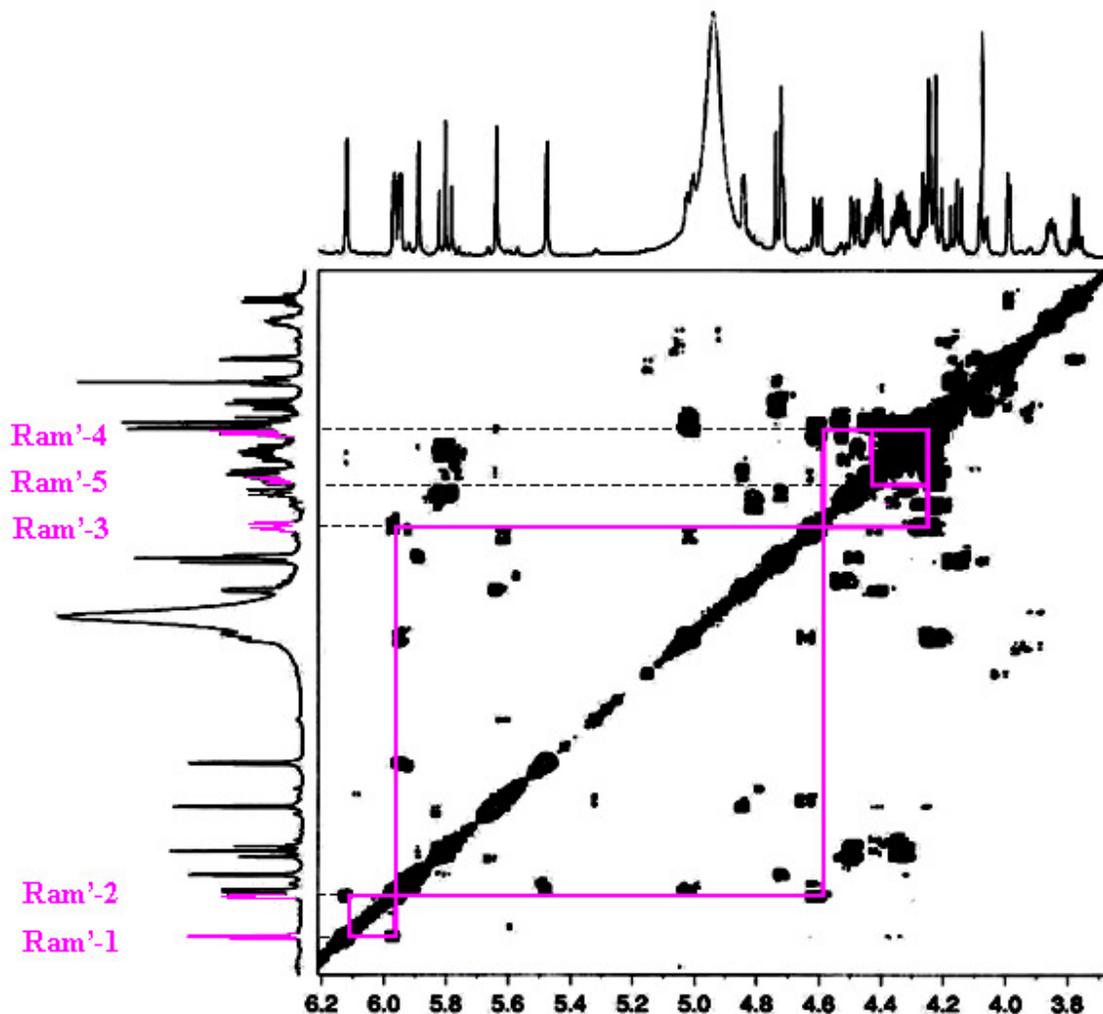


Figura 23. Sección de la porción oligosacárida del espectro homonuclear COSY de la murucoidina XIX en donde se ilustran las conectividades para la ramnosa interna Ram'.

El experimento TOCSY (**Figura 24**) permitió establecer la conectividad a lo largo del sistema de espines de cada unidad del oligosacárido. Este experimento permitió corroborar la asignación inequívoca de cada una de las señales pertenecientes a las unidades monosacáridos individuales del núcleo oligosacárido. Se identificaron los protones anoméricos y se establecieron los protones que tienen interacción con él.

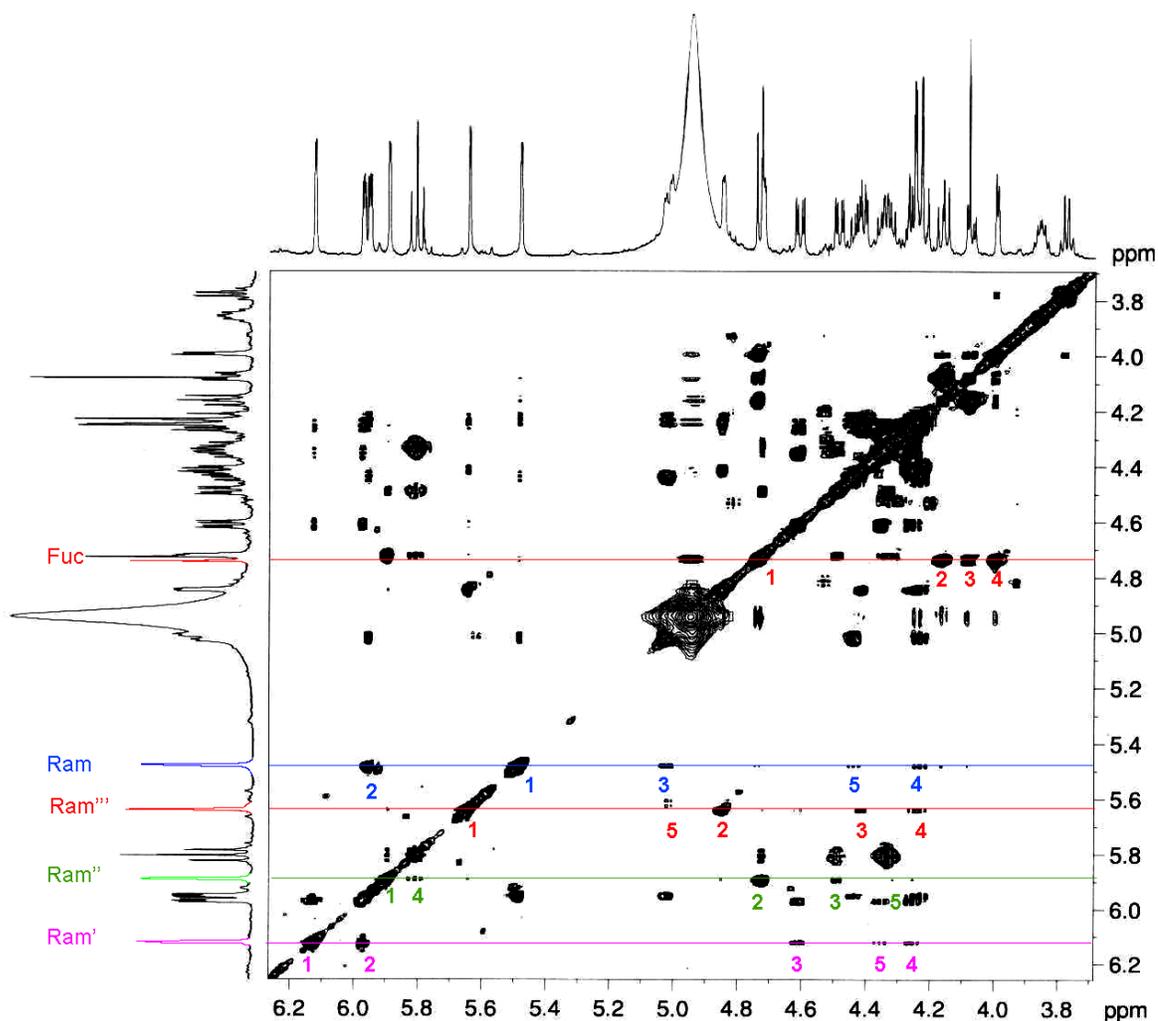


Figura 24. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la murucoidina XIX en donde se ilustran las señales de las unidades sacáridas.

Una vez identificadas las señales de los protones de cada unidad sacárida se procedió a asignar las señales de RMN ^{13}C para cada unidad mediante la técnica HSQC (Duus *et al.*, 2000).

La confirmación de la secuencia de glicosidación y de los sitios de esterificación en el núcleo oligosacárido, que incluyen las posiciones para el establecimiento de la lactonización con la aglicona y la localización de las dos posiciones de acilación, se realizó mediante la secuencia de pulsos HMBC (**Figura 25**) que permite detectar las conectividades ^1H - ^{13}C a dos y tres enlaces ($^{2,3}\text{J}_{\text{C-H}}$) (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

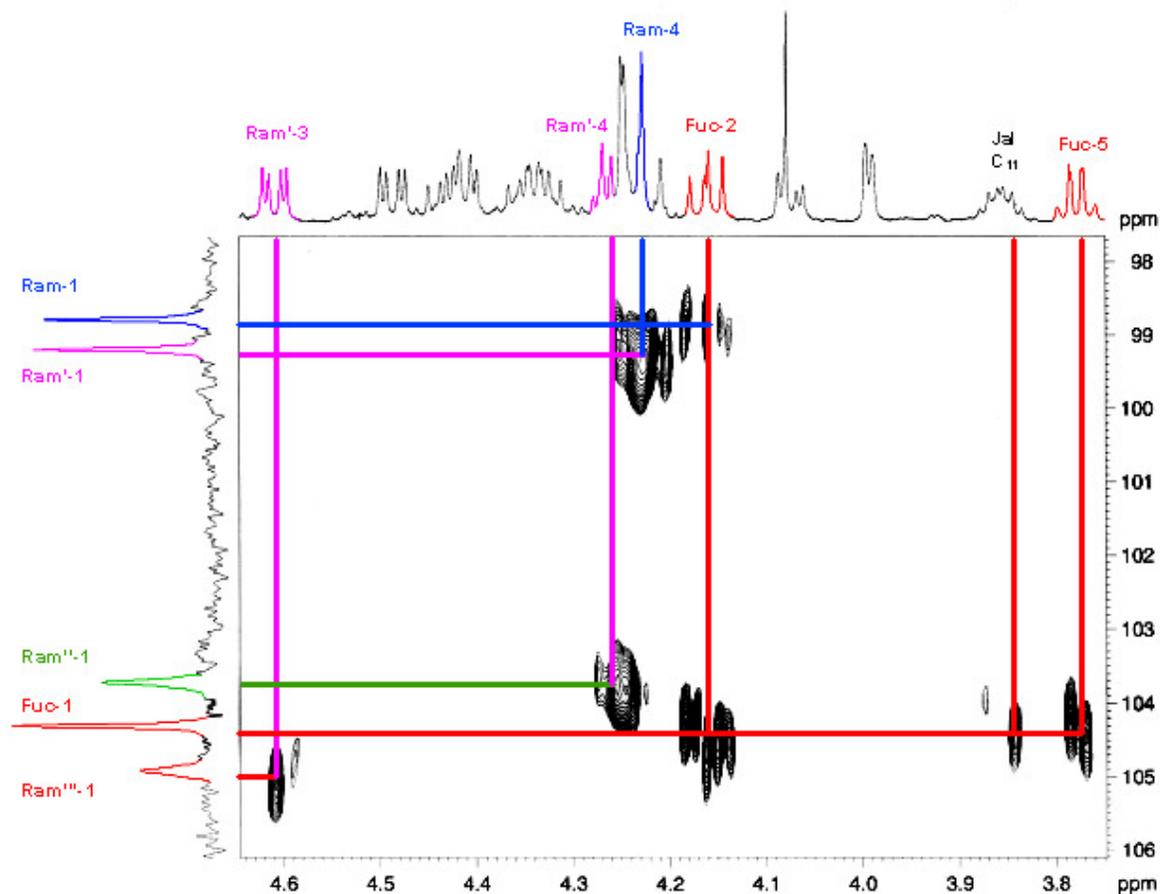


Figura 25. Sección de la región oligosacárida del espectro HMBC de la murucoidina XIX en donde se ilustran las conectividades de los carbonos anoméricos de las unidades sacáridas.

Posterior al establecimiento de la secuencia de glicosidación se asignaron los sitios de esterificación (**Figura 26**) empleando la secuencia de pulsos HMBC a partir del acoplamiento de carbonilos con los hidrógenos α al carbonilo de la aglicona y los metinos H-2 de los residuos de ácido.

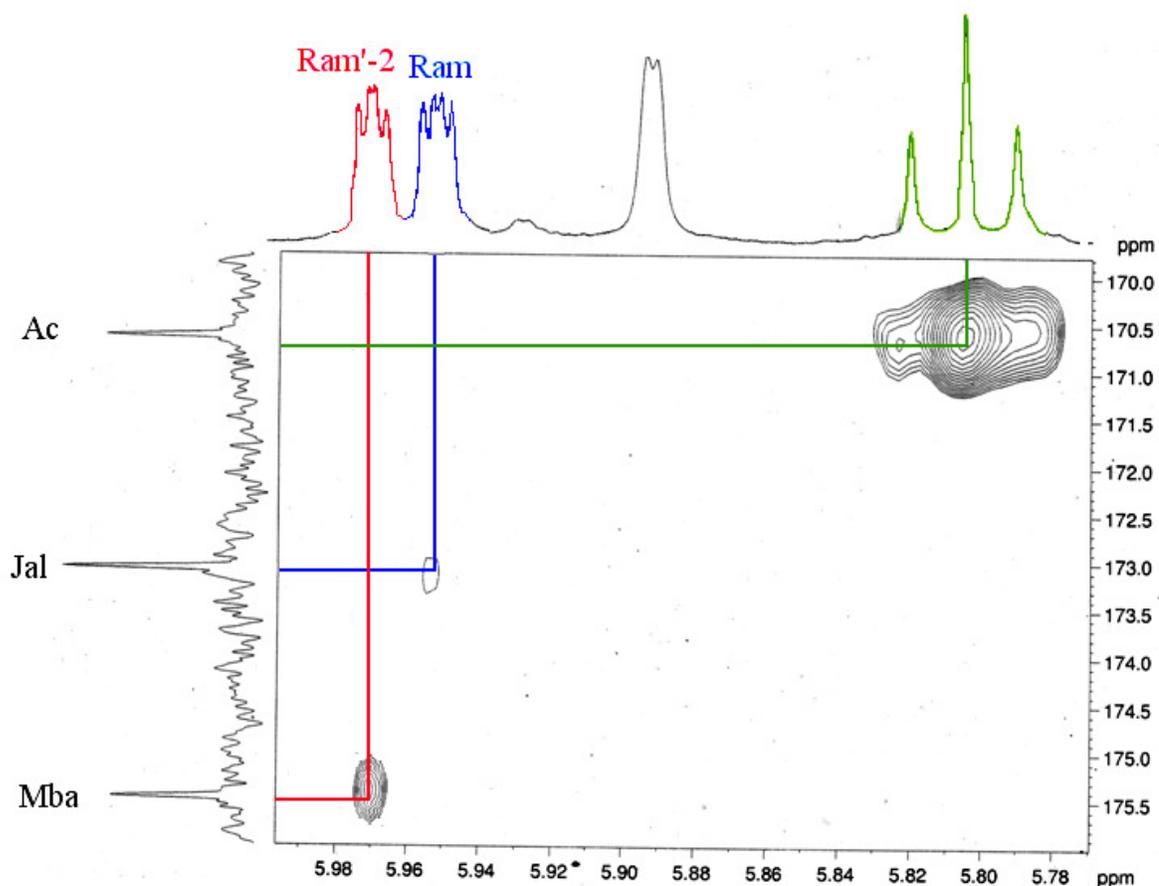


Figura 26. Sección del espectro HMBC de la muruoidina XIX donde se ilustran las correlaciones entre los carbonos de los carbonilos de cada uno de los ésteres (ac, jal y mba) con las señales protónicas geminales a los grupos acilantes.

6.4.2. Elucidación estructural de la muruoidina III (2)

El compuesto puro obtenido a partir de la fracción XXV-H fue identificado como la muruoidina III por comparación de las constantes espectroscópicas de RMN ^1H (Figura 27) y de ^{13}C (Figura 28) con los de una muestra de referencia (Chérigo *et al.*, 2006).

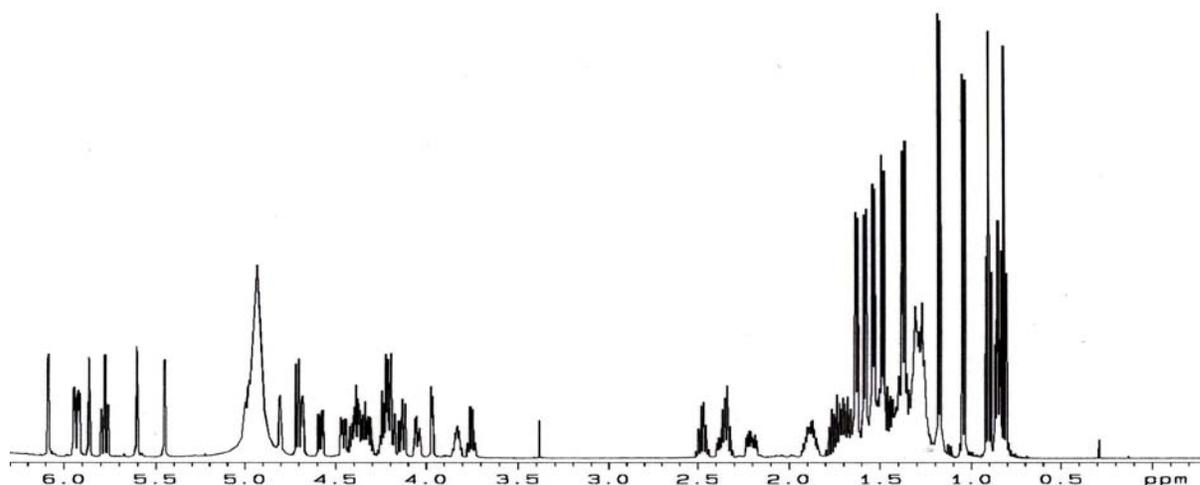


Figura 27. Espectro de RMN ^1H del compuesto **2**.

Del análisis del espectro de RMN ^1H , se observó la presencia de dos residuos de ácido metilbutírico y se estableció la naturaleza pentasacárida del compuesto:

Metilbutirato	Dos tripletes cuarteteados (2.32 y 2.47 ppm): Protón H-2 Dos dobletes (1.04 y 1.18 ppm): Protón 2-Me Dos tripletes (0.82 y 0.91 ppm): Protón 3-Me
Núcleo oligosacárido	Cinco dobletes (4.70-6.08 ppm): Protones anoméricos. Cinco dobletes (1.37-1.62 ppm): Grupos metilos de las 6-desoxihexosas. Desprotección de los metinos Ram ² -2 y Ram ² '-4, por lo que los hidroxilos de estas posiciones deben encontrarse acilados. Lactonización en Ram-2.
Aglicona	Dos protones no equivalentes del grupo metileno en posición alfa del grupo carbonilo de la aglicona: (2.2 - 2.9 ppm).

Las constantes de acoplamiento de los protones anoméricos permitieron determinar que el núcleo oligosacárido corresponde al ácido simónico B, constituido por una unidad de fucosa y cuatro unidades de ramnosa. Los dobletes de los protones anoméricos registraron las siguientes constantes de acoplamiento: fucosa ($J = 7.5$ Hz) y ramnosa ($J = 1.5, 2.0$ Hz).

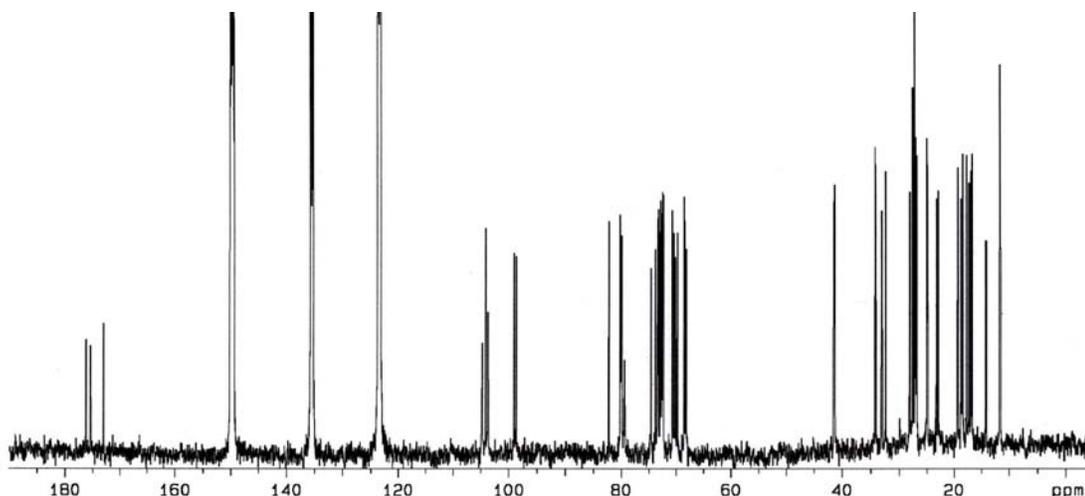


Figura 28. Espectro de RMN¹³C de la muruoidina **III**.

En el espectro de ¹³C del compuesto **2** se observan cinco carbonos anoméricos (desplazamientos entre 98 y 105 ppm) y tres señales características de carbonilos (desplazamientos entre 173 y 177 ppm) que corresponden a los dos residuos de ácido metilbutírico identificado en el espectro de RMN ¹H que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona. La asignación de las señales de ¹H y ¹³C inició con la localización de los carbonos y protones anoméricos en el espectro heteronuclear HSQC (**Figura 29**).

A partir de los espectros homonucleares bidimensionales COSY y TOCSY se realizó la asignación de las señales de los metinos de las cinco unidades sacáridas del núcleo. En el espectro COSY (**Figura 30**) se estableció la secuencia de conectividades J_{HH} iniciando con el protón anomérico. Simultáneamente, se analizó el experimento TOCSY (**Figura 31**) para corroborar la asignación inequívoca de los metinos de las unidades sacáridas del núcleo oligosacárido.

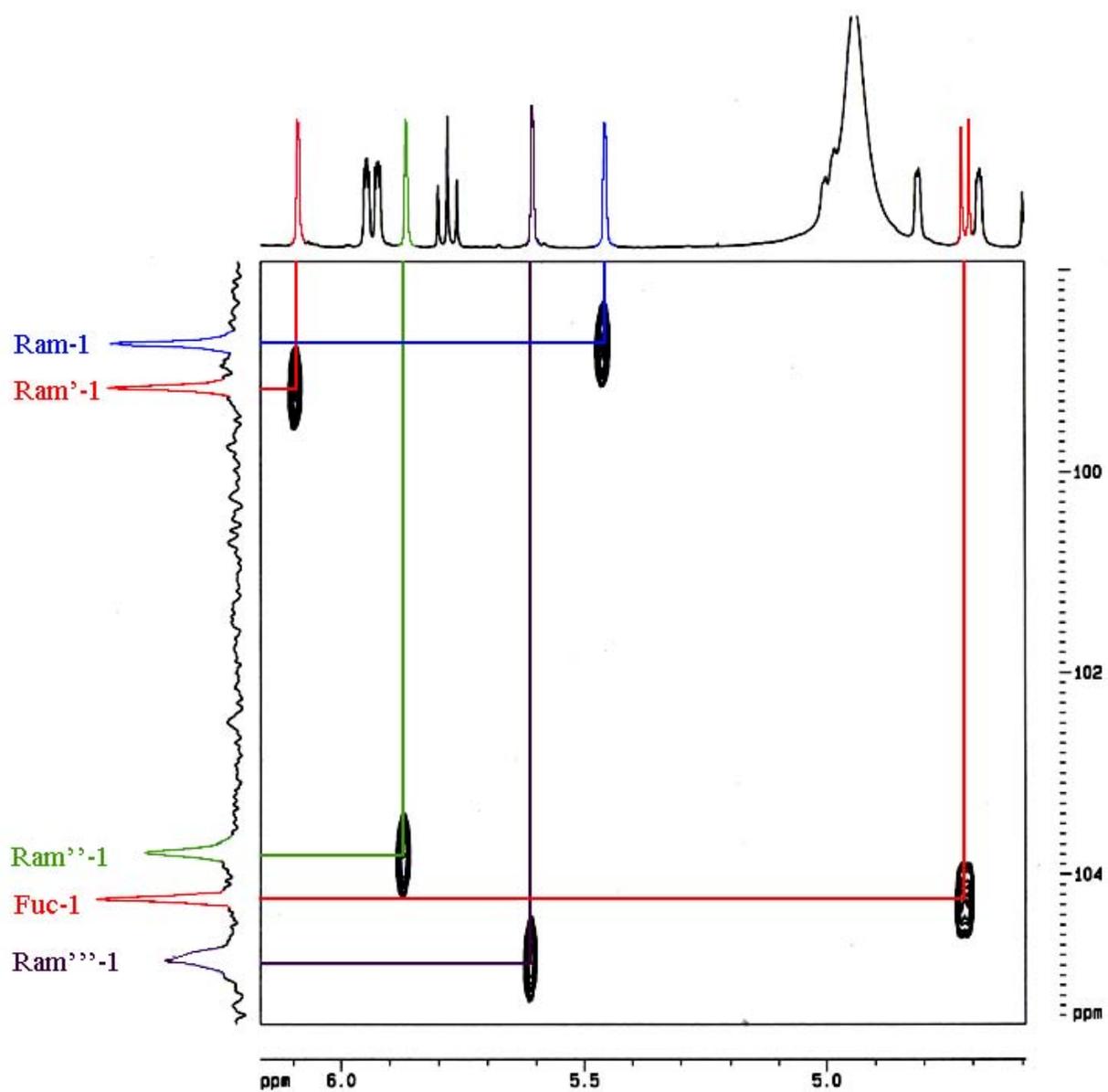


Figura 29. Sección anomérica del espectro HSQC de la murucoidina III.

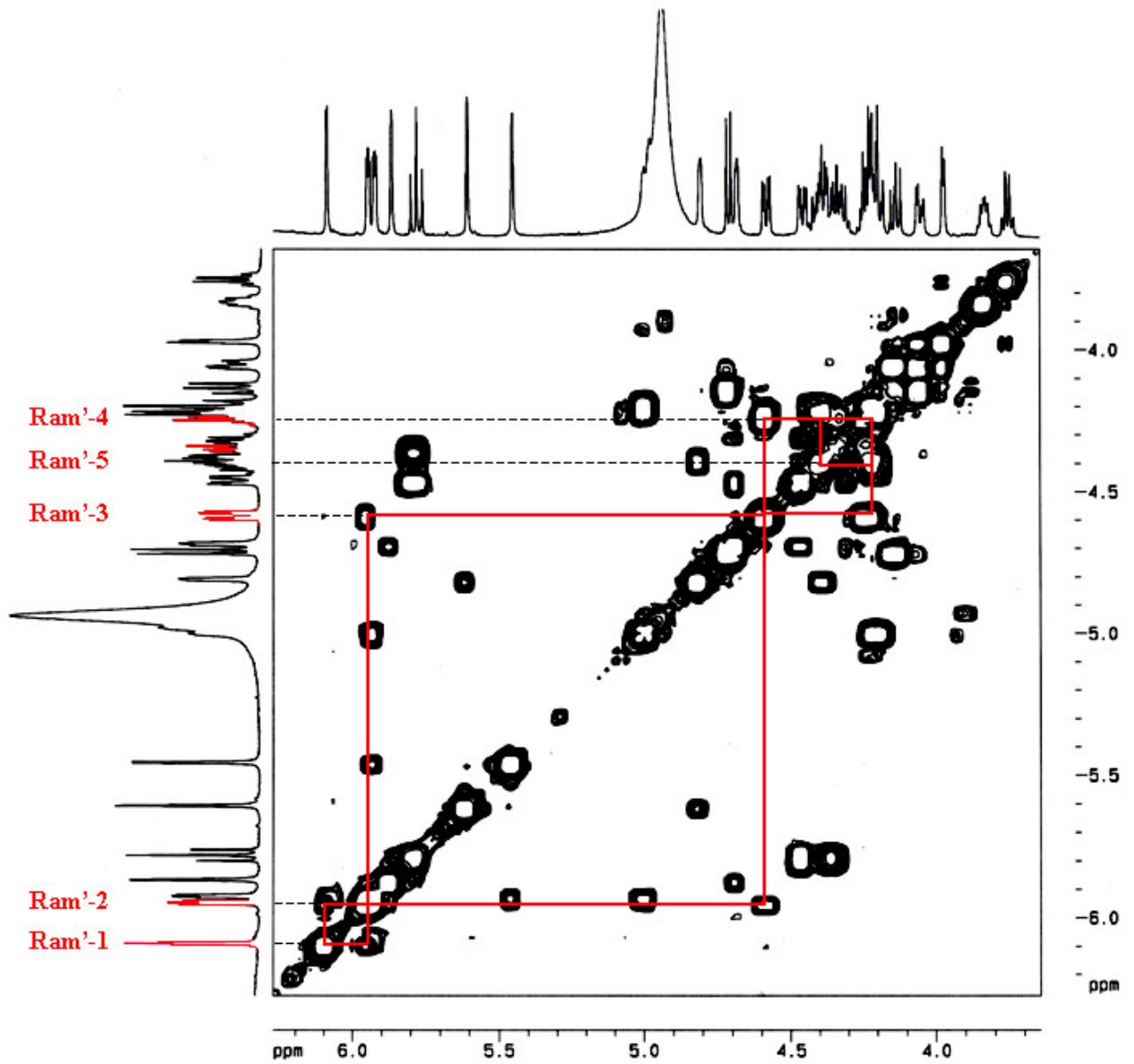


Figura 30. Sección de la porción oligosacárida del espectro COSY de la murucoidina **III** en donde se ilustran las conectividades para la ramnosa interna Ram'.

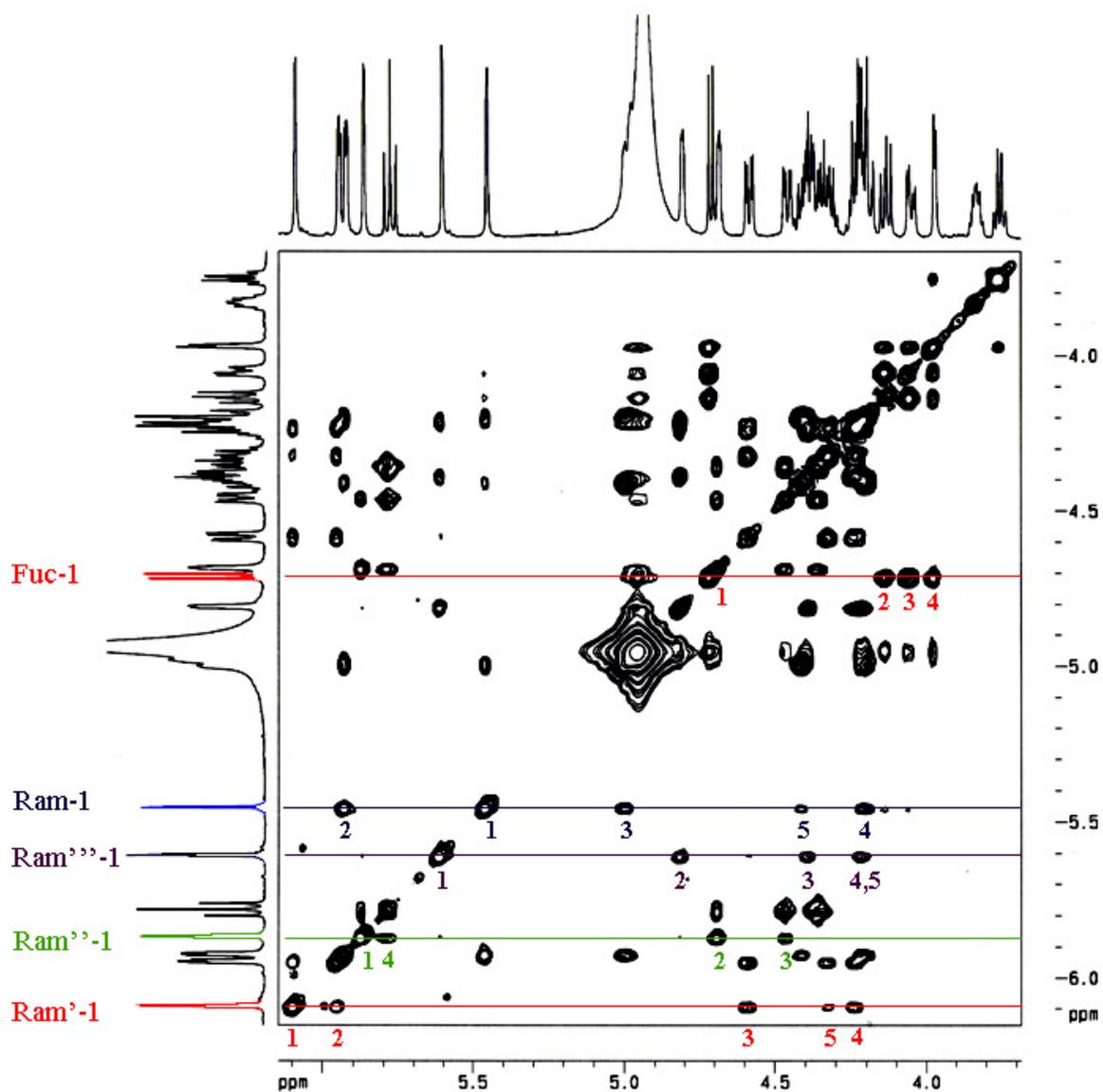


Figura 31. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la murucoidina **III** en donde se ilustran las señales de las unidades sacáridas.

Cuando se identificaron las señales protónicas de los experimentos COSY y TOCSY se asignaron las señales de RMN ^{13}C para cada unidad sacárida mediante la secuencia HSQC (Duis *et al.*, 2000).

La secuencia de pulsos HMBC fue utilizada para confirmar la secuencia de glicosidación de las unidades sacáridas así como las posiciones de esterificación (**Figura 32**) de los residuos de ácido metilbutírico y de la lactona macrocíclica de la aglicona.

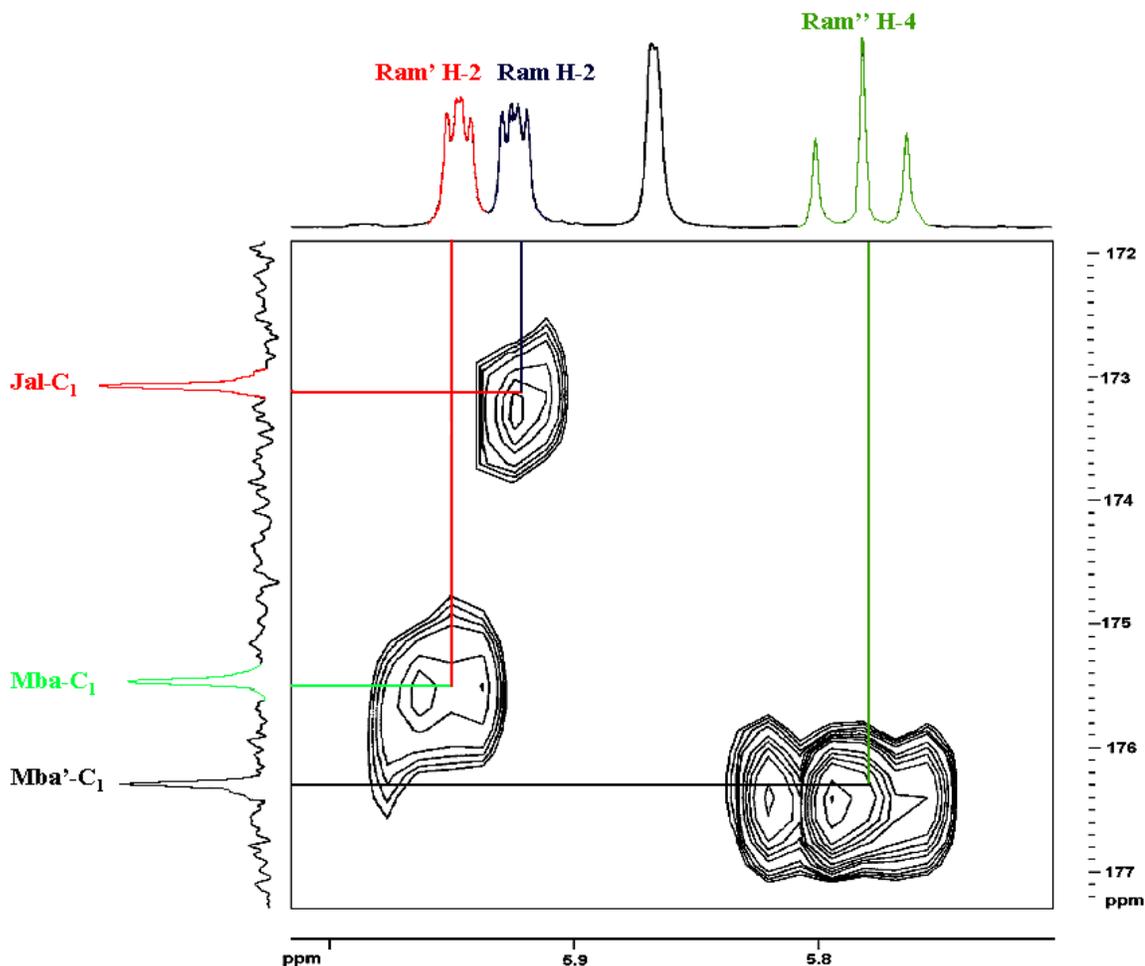


Figura 32. Sección del espectro HMBC de la murucoidina **III** donde se ilustran las correlaciones entre los carbonos de los carbonilos de cada uno de los ésteres (jal, mba y mba') con las señales protónicas geminales a los grupos acilantes.

6.4.3. Elucidación estructural de la murucoidina V (3)

Se identificó el compuesto **XXV-J** como la murucoidina **V** debido a la similitud mostrada al realizar la comparación de sus constantes espectroscópicas de RMN ^1H (**Figura 33**) y de ^{13}C (**Figura 34**) con las de una muestra de referencia (Chérigo *et al.*, 2006).

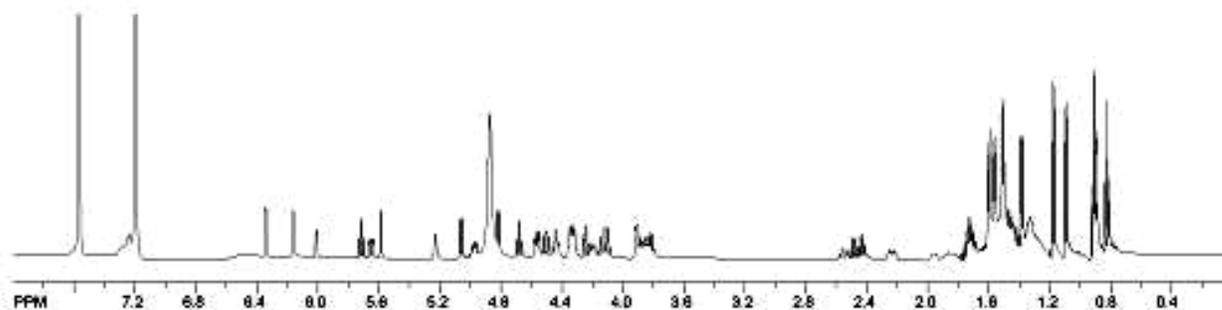


Figura 33. Espectro de RMN ^1H de la murucoidina V.

El espectro de RMN ^1H muestra la presencia de cinco unidades sacáridas y dos residuos de ácido metilbutírico:

Metilbutirato	Dos tripletes cuarteteados (2.44 y 2.48 ppm): Protón H-2
	Dos dobletes (1.10 y 1.18 ppm): Protón 2-Me
	Dos tripletes (0.83 y 0.92 ppm): Protón 3-Me
Núcleo oligosacárido	Cinco dobletes (4.82-6.34 ppm): Protones anoméricos.
	Cuatro dobletes (1.38-1.60 ppm): Grupos metilos de las 6-desoxihexosas.
	Desprotección de los metinos Ram'-2 y Ram''-4, por lo que los hidroxilos de estas posiciones deben encontrarse acilados.
	Lactonización en Ram-3.
Aglicona	Dos protones no equivalentes del grupo metileno en posición alfa del grupo carbonilo de la aglicona: 2.2 - 2.9 ppm.

Las constantes de acoplamiento permitieron determinar que el núcleo oligosacárido corresponde al ácido operculínico A que consta de una unidad de glucosa, una unidad de fucosa y tres unidades de ramnosa. Los dobletes de los protones anoméricos registraron constantes de acoplamiento para glucosa y fucosa ($J = 7.5$ Hz) y ramnosa ($J = 1.5, 2.0$ Hz).

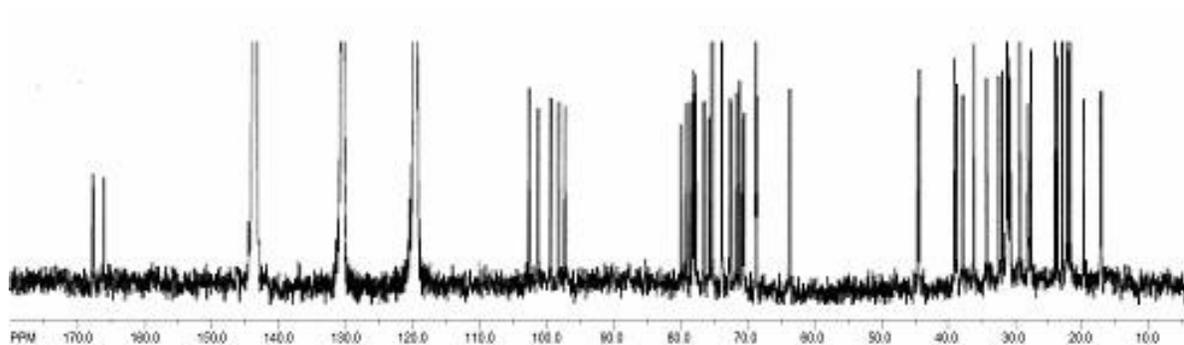


Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C de la muruoidina **V**.

En el espectro de ^{13}C de la muruoidina **V** se puede observar:

- Cinco carbonos anoméricos con desplazamientos entre 99 y 106 ppm que confirmaron la presencia de sus correspondientes unidades sacáridas.
- Tres señales con desplazamientos entre 174 – 177 ppm indican dos grupos carbonilo de ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido y el carbonilo de la lactona macrocíclica formado por la aglicona.
- Carbono del grupo hidroximetileno no sustituido correspondiente a la glucosa en 62.6 ppm.

La asignación de las señales de ^1H y ^{13}C inició con la localización de los carbonos y protones anoméricos en el espectro heteronuclear HSQC (**Figura 35**).

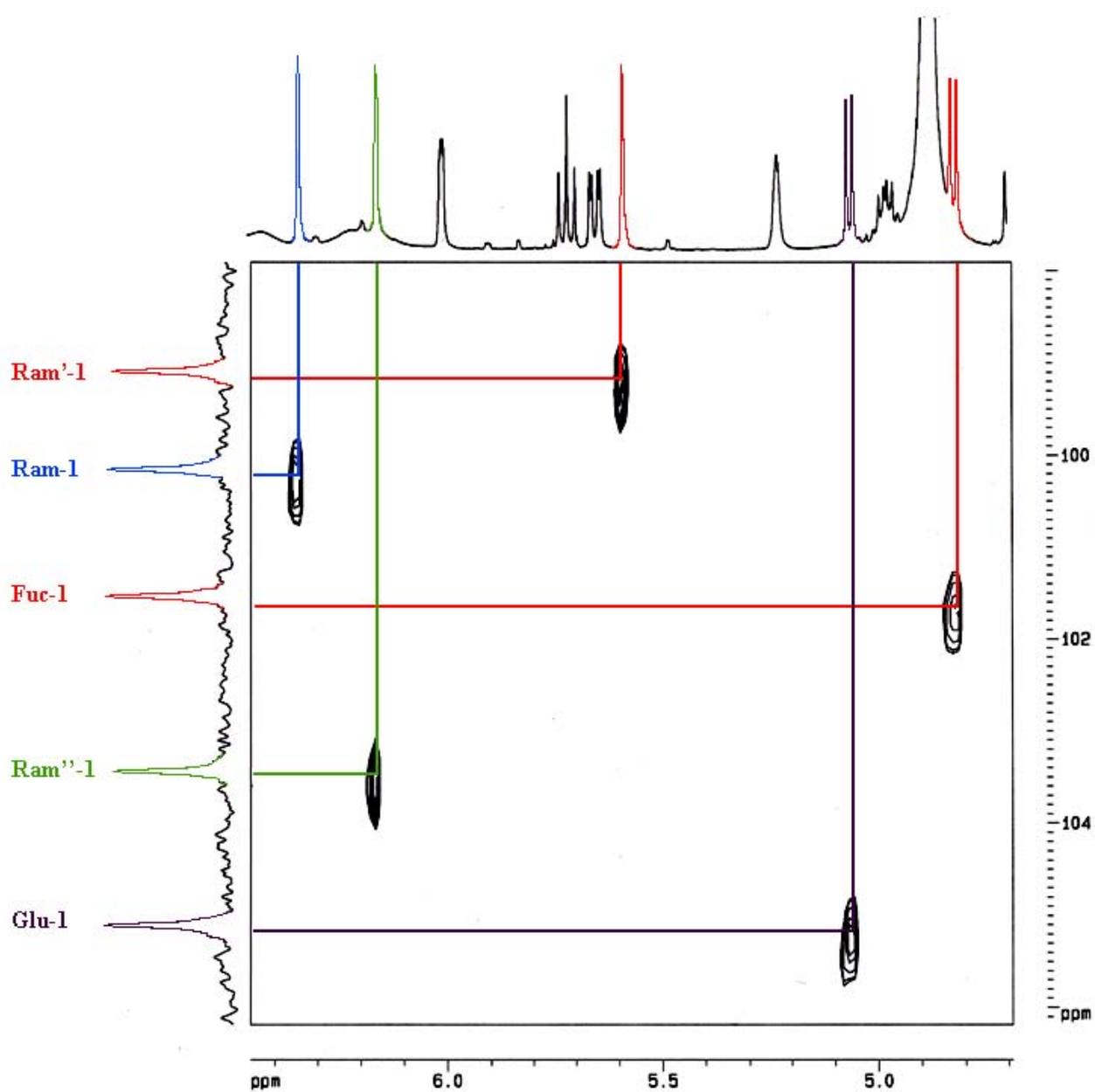


Figura 35. Sección anomérica del espectro heteronuclear HSQC de la murucoidina V.

De los espectros homonucleares bidimensionales COSY y TOCSY se asignaron las señales de los metinos de las cinco unidades sacáridas del núcleo. En el espectro COSY (**Figura 36**) se estableció la secuencia de conectividades J_{HH} iniciando con el protón anomérico.

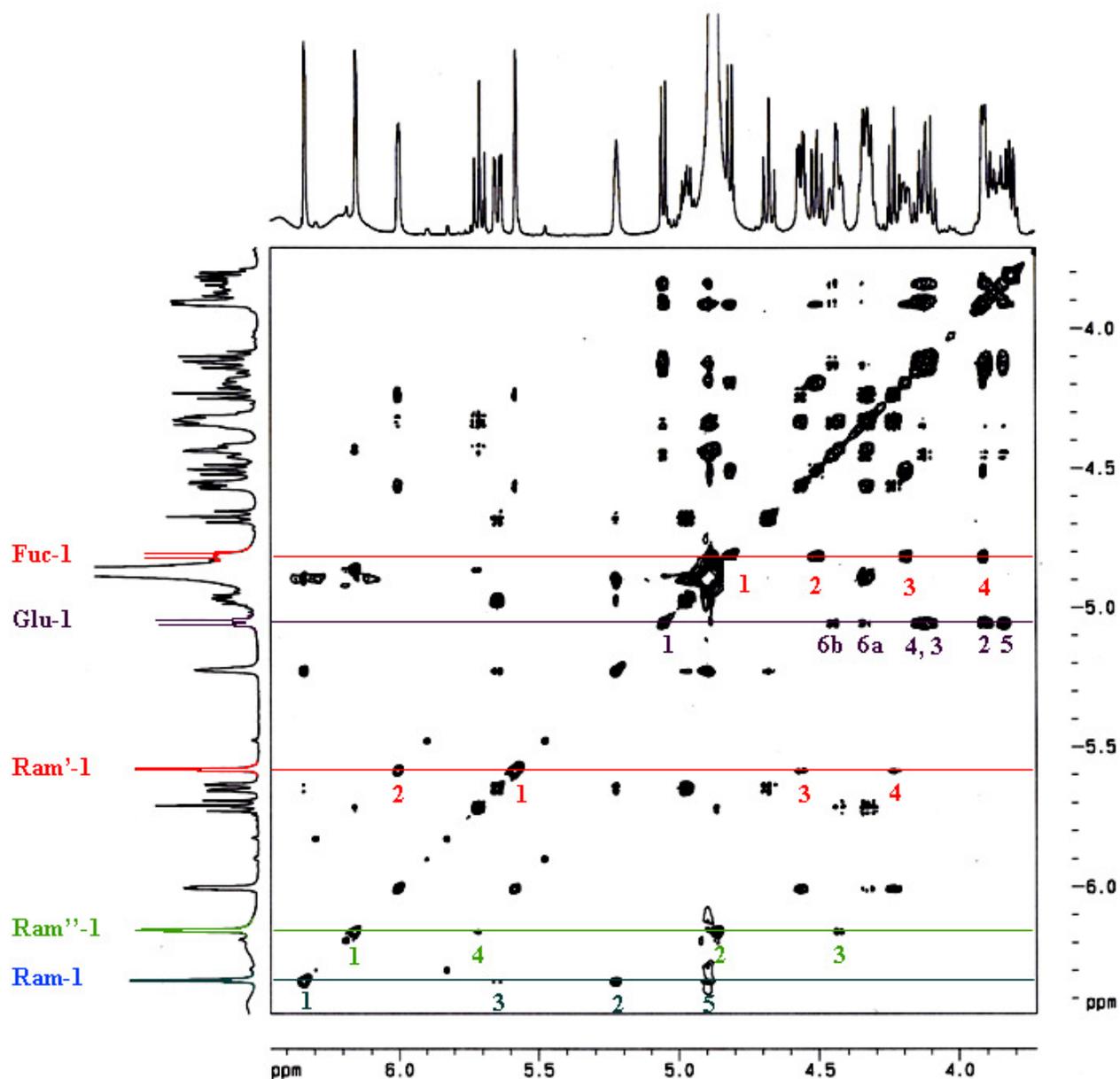


Figura 37. Sección de la porción oligosacárida del espectro TOCSY de la murucoidina V en donde se ilustran las señales de las unidades sacáridas.

El experimento HMBC confirmó la secuencia de glicosidación de las unidades sacáridas y las posiciones de esterificación de los residuos de ácido metilbutírico y de la lactona macrocíclica de la aglicona. La esterificación (**Figura 38**) se asignó a partir del acoplamiento de carbonilos con los hidrógenos α al carbonilo de la aglicona y los metinos H-2 de los residuos de ácido en la secuencia HMBC.

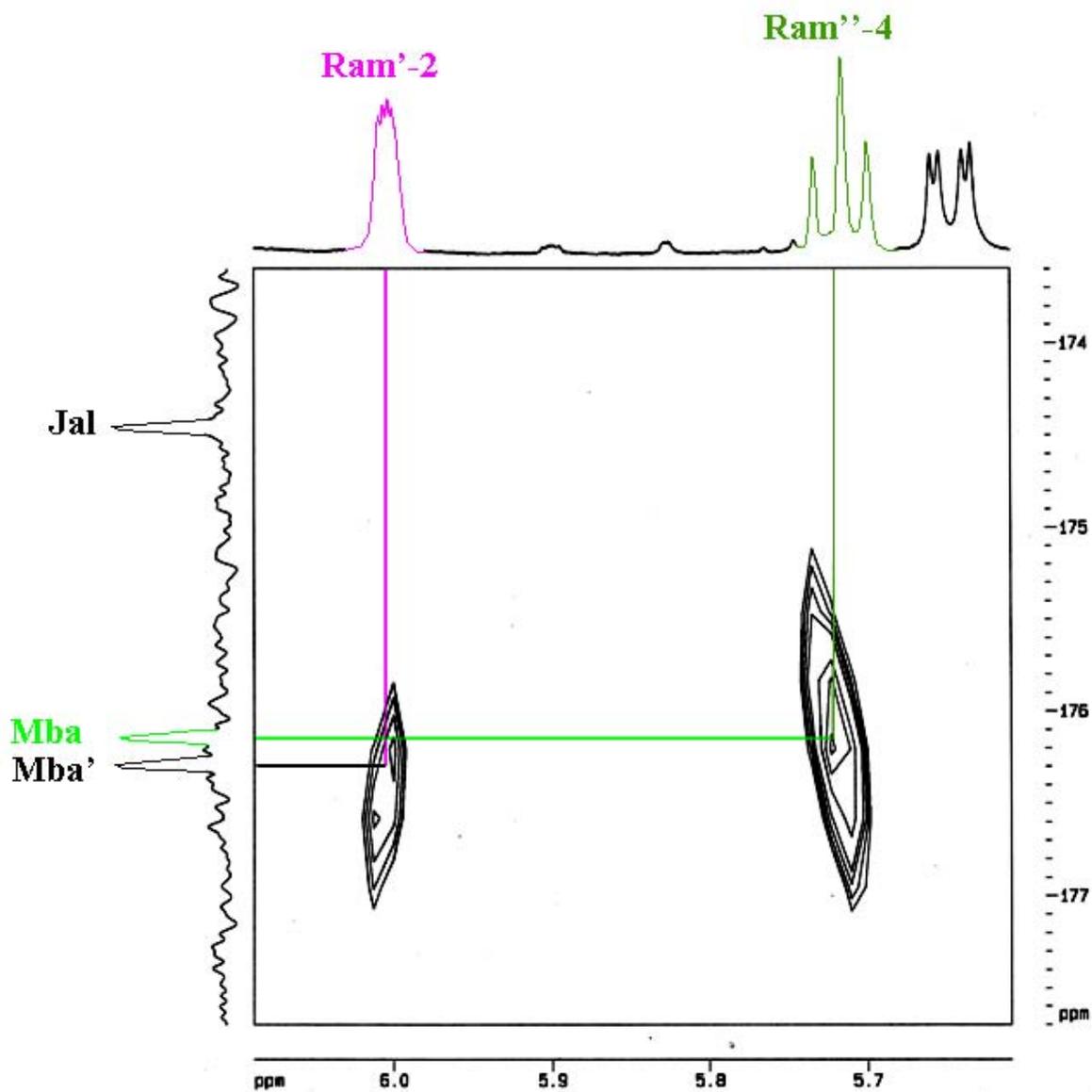


Figura 38. Sección del espectro HMBC de la murucoidina V donde se ilustran las correlaciones entre los carbonos de los carbonilos de cada uno de los ésteres (jal, mba y mba') con las señales protónicas geminales a los grupos acilantes.

Cuadro 7. Desplazamientos químicos en la RMN ¹H de los compuestos 1-3.

Protón ¹	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3
Fuc	1	4.73 d (7.59)	4.82 d (7.9)
	2	4.16 dd (7.5, 9.5)	4.50 dd (7.9, 9.4)
	3	4.07 dd (9.5, 5.5)	4.19 dd (9.4, 2.9)
	4	3.99 d (3.0)	3.90*
	5	3.78 dq (5.5, 6.5)	3.82 dq (0.5, 6.3)
	6	1.51 d (6.0)	1.50 d (6.3)
Ram	1	5.48 d (1.5)	6.34 d (1.3)
	2	5.95 dd (2.0, 3.5)	5.22 sa
	3	5.02 dd (3.0, 9.5)	5.64 dd (2.7, 9.8)
	4	4.23 dd (9.5, 9.5)	4.66 dd (9.7, 9.7)
	5	4.44 d (9.5, 6.0)q	4.88 sa
	6	1.62 d (6.0)	1.60 d (6.1)
Ram'	1	6.12 d (2.0)	5.58 d (1.3)
	2	5.97 dd (2.0, 3.0)	6.00 dd (1.6, 3.3)
	3	4.61 dd (3.0, 9.5)	4.56 dd (3.4, 9.0)
	4	4.26 dd (9.5, 9.5)	4.23 dd (9.2, 9.2)
	5	4.35 dq (9.5, 6.0)	4.32 dq (9.2, 6.2)
	6	1.65 d (6.5)	1.56 d (6.2)
Ram''	1	5.89 d (1.5)	6.16 d (1.7)
	2	4.72 dd (1.5, 3.0)	4.88 sa
	3	4.49 dd (3.0, 9.5)	4.43 dd (3.2, 9.5)
	4	5.81 t (9.5)	5.72 dd (9.3, 9.3)
	5	4.33 dq (9.5, 6.5)	4.32 dq (9.0, 6.6)
	6	1.38 d (6.5)	1.38 d (6.3)
Ram'''	1	5.64 d (1.5)	
	2	4.85 dd (1.5, 3.5)	
	3	4.41 dd (5.5, 8.0)	
	4	4.27 dd (8.0, 9.0)	
	5	4.26 dq (4.5, 9.5)	
	6	1.56 d (5.5)	
Glu	1		5.05 d (7.6)
	2		3.90*
	3		4.12 dd (8.9, 8.8)
	4		4.14 dd (8.8, 9.1)
	5		3.84 ddd (3.4, 6.0, 9.0)
	6a		4.31 dd (6.1, 12.3)
	6b		4.44 dd (3.0, 12.0)
Jal	2a	2.23 ddd (3.5, 9.0, 12.5)	2.23 dd (2.8, 7.2, 14.6)
	2b	2.40 ddd (3.5, 9.0, 12.5)	2.55 d (3.2, 14.6)
	11	3.86 m	3.88 m
	16	0.88 t (7.0)	0.90 t (7.5)
Mba	2	2.37 tq (6.5, 7.0)	2.44 tq (6.9, 7.0)
	2-Me	1.07 d (7.0)	1.10 d (6.9)
	3-Me	0.84 t (7.5)	0.83 t (0.83)
Mba'	2		2.48 tq (6.9, 7.0)
	2-Me		1.18 d (7.0)
	3-Me		0.92 t (7.4)
Ac	2	2.05 s	

* Señales sobrepuestas. Entre paréntesis las constantes de acoplamiento en Hz. sa: singulete ancho, d: doblete, t: triplete, m: multiplete, dq: doblete cuarteteado, sept: septuplete. ¹ Fuc: Fucosa, Ram: Ramnosa, Glu: Glucosa, Jal: Ácido 11-hidroxidodecanóico, Mba: Ácido 2-metilbutanoilo, Iba: Ácido metilpropanóico, Ac: Ácido acético.

Cuadro 8. Desplazamientos químicos en la RMN ¹³C de los compuestos 1-3.

Carbono ¹	Compuesto 1	Compuesto 2	Compuesto 3	
Fuc	1	104.3	104.2	101.5
	2	80.3	80.2	73.6
	3	73.3	73.4	76.6
	4	73.0	73.3	73.6
	5	70.8	70.8	71.3
	6	17.4	17.3	17.2
Ram	1	98.8	98.7	100.1
	2	73.9	73.9	70.0
	3	69.9	69.9	78.3
	4	79.9	79.9	75.7
	5	68.6	68.6	68.0
	6	19.5	19.4	19.2
Ram'	1	99.2	99.2	99.1
	2	73.1	72.9	72.2
	3	79.6	79.5	80.2
	4	80.3	80.1	78.8
	5	68.1	68.2	68.1
	6	18.8	18.8	18.7
Ram''	1	103.7	103.8	103.4
	2	72.6	72.7	72.4
	3	70.2	70.2	70.2
	4	75.3	74.7	75.2
	5	68.5	68.5	68.1
	6	17.8	17.8	18.0
Ram'''	1	104.9	104.8	
	2	72.5	72.5	
	3	72.5	72.6	
	4	73.5	73.4	
	5	70.5	70.5	
	6	18.6	18.5	
Glu	1			105.1
	2			75.2
	3			78.1
	4			70.8
	5			77.8
	6			62.6
Jal	1	173.1	173.1	174.4
	2a	34.3	34.3	34.3
	11	82.3	82.3	79.5
	16	14.3	14.3	14.5
Mba	1	175.5	175.5	176.1
	2	41.5	41.4	41.3
	2-Me	16.8	16.8	16.8
	3-Me	11.8	11.7	11.6
Mba'	1		176.3	176.3
	2		41.5	41.5
	2-Me		16.9	17.0
	3-Me		11.7	11.7
Ac	1	170.6		
	2			

¹ Fuc: Fucosa, Ram: Ramnosa, Glu: Glucosa, Jal: Ácido 11-hidroxidodecanóico, Mba: Ácido 2-metilbutanoilo, Iba: Ácido metilpropanóico, Ac: Ácido acético.

6.5. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas en su modalidad de bombardeo por átomos acelerados (FAB) representa una técnica analítica esencial en la elucidación estructural de los glicolípidos de las convolvuláceas y de sus correspondientes ácidos glicosídicos ya que permite la detección de iones quasi-molecular, tanto en su modalidad positiva, $[M + H]^+$ y/o $[M + Na/K]^+$, como negativa $[M - H]^-$. Estas especies cargadas son de utilidad para el establecimiento de la fórmula molecular (Pereda-Miranda y Bah, 2003). La espectrometría de masas en la modalidad FAB (modo negativo) fue empleada para determinar los pesos moleculares de los glicolípidos **1-3**. En cada espectro se observaron los picos que con mayor frecuencia se generan producto de las fragmentaciones glicosídicas (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

6.5.1. Espectrometría de masas modalidad FAB negativo de las murucoidinas XIX y III.

Estas murucoidinas poseen el núcleo del ácido simónico B, el cual está constituido por una unidad de fucosa y cuatro de ramnosa. Este núcleo muestra el siguiente patrón de fragmentación: iones de m/z 271, 417 y 545 (**Figura 39**):

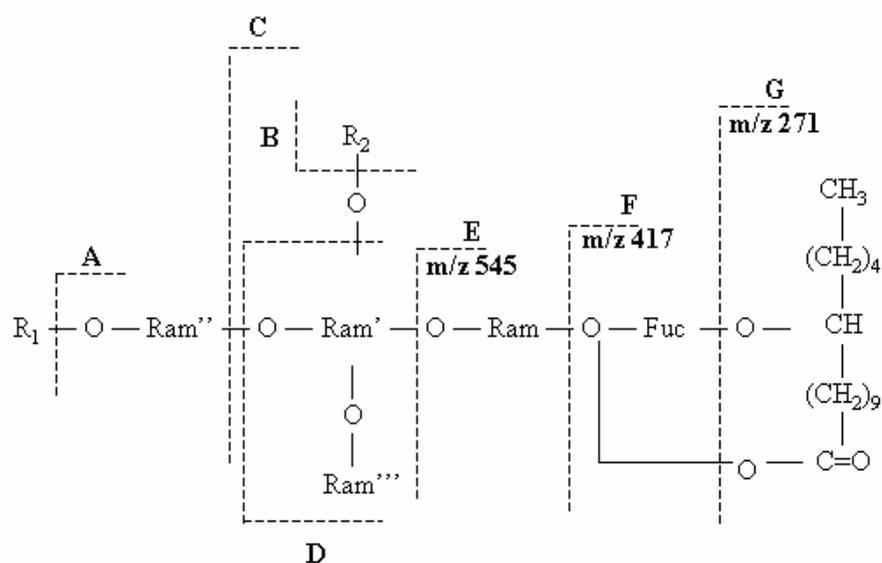


Figura 39. Patrón de fragmentación de los compuestos **1** y **2**.

La espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo del compuesto **1** mostró un ion pseudomolecular $[M - H]^-$ de m/z 1109 (**Figura 41**). Su fórmula molecular se estableció como $C_{53}H_{89}O_{24}$. También, se observaron los picos comunes de fragmentación (**Figura 40**) provocados por las rupturas de los enlaces glicosídicos confirmando la presencia de los residuos que esterifican el núcleo oligosacárido.

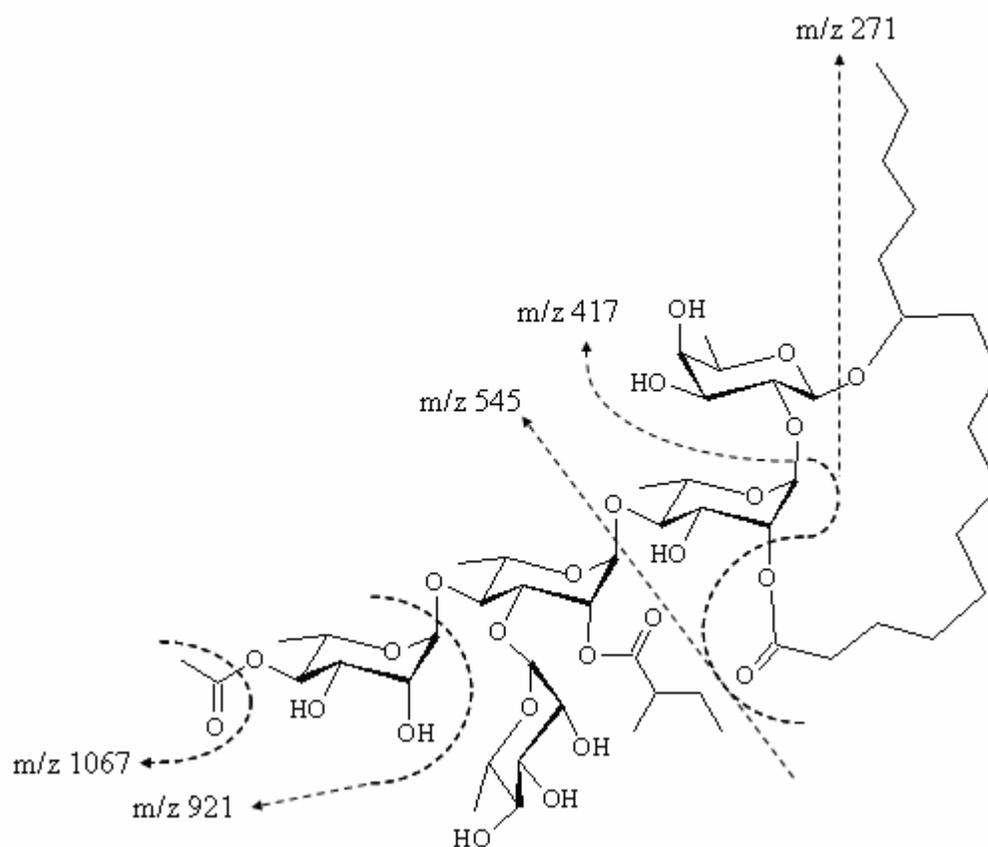


Figura 40. Fragmentación de la murucoidina XIX.

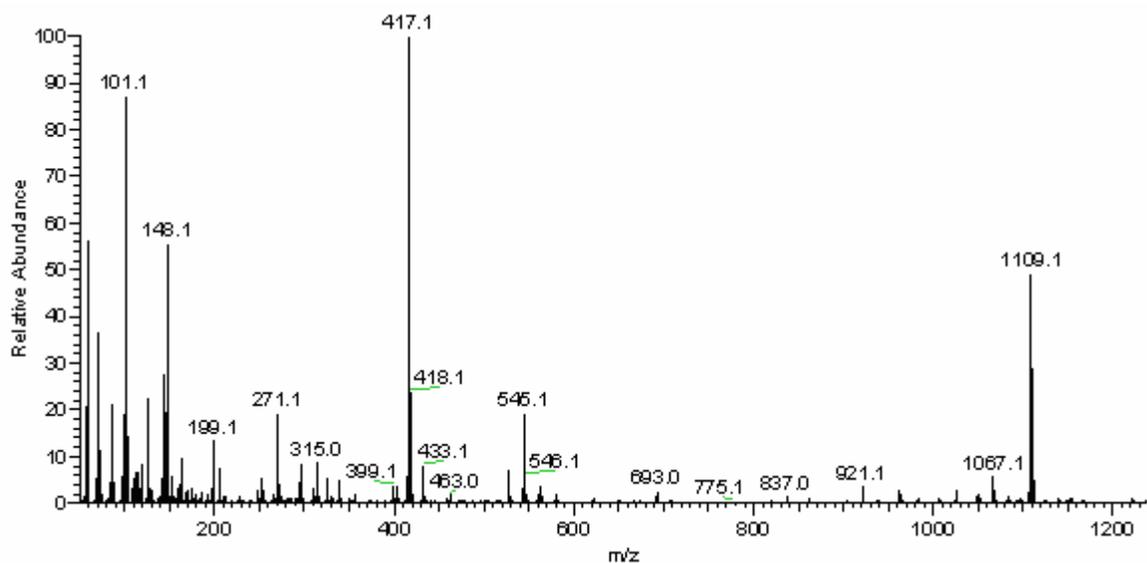


Figura 41. Espectro de masas modo FAB negativo de la murucoidina **XIX**.

La murucoidina **III** (**2**) en la espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo mostró un ion pseudomolecular $[M - H]^-$ de m/z 1151 (**Figura 42**). Su fórmula molecular se estableció como $C_{56}H_{95}O_{24}$. El compuesto **3** presenta el ácido 2-metilbutanoico acilando el oligosacárido por lo que el fragmento de m/z 1067 corresponde a la pérdida del residuo metilbutanoilo con una diferencia de 84 unidades con respecto al ion quasi-molecular $[M - 1]^-$ de m/z 1151 (**Figura 43**).

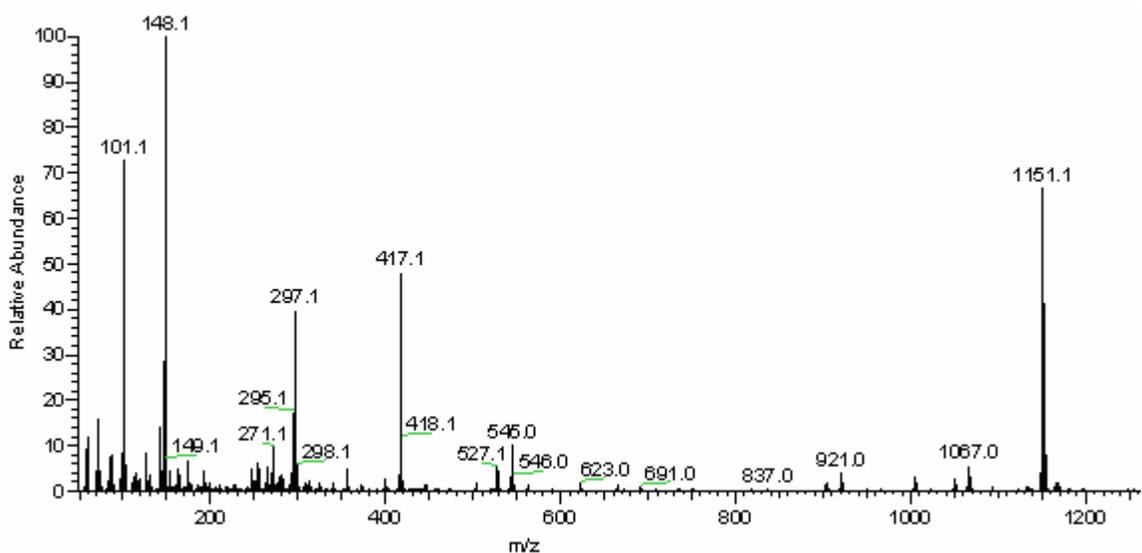


Figura 42. Espectro de masas modo FAB negativo para la murucoidina **III** (**2**).

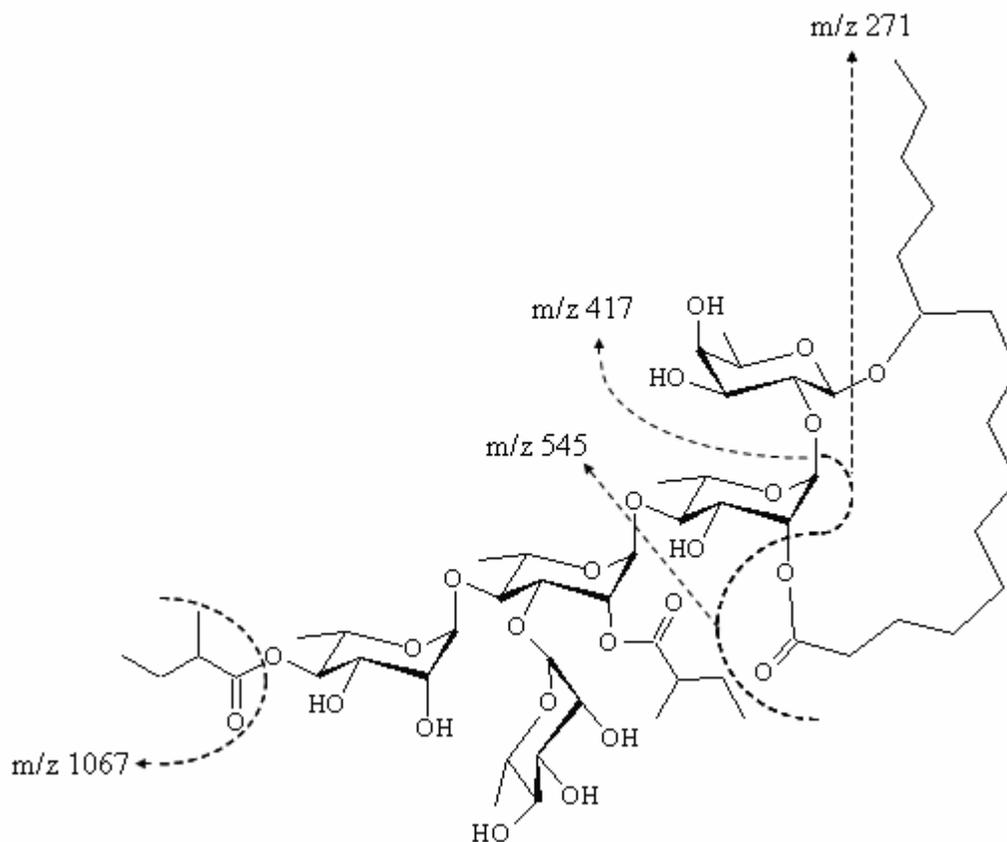


Figura 43. Fragmentación de la muruoidina III.

6.5.2. Espectrometría de masas modalidad FAB negativo de la muruoidina V.

La muruoidina V posee el núcleo del ácido operculínico A, el cual está constituido por una unidad de glucosa, una de fucosa y tres de ramnosa. La **Figura 44**, ilustra el patrón de fragmentación característico que sufren estos compuestos: m/z 271, 417 y 545, este último fragmento que presenta una diferencia de 18 (H_2O) unidades de masa indica que la localización de la esterificación intramolecular en el núcleo oligosacárido se sitúa en la unidad de ramnosa interna superior (Ram).

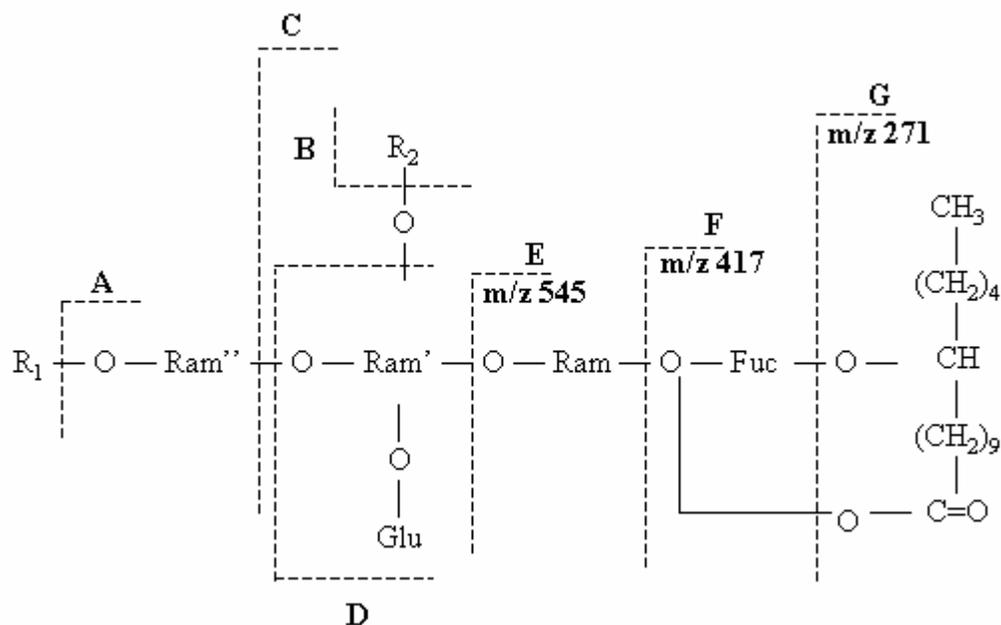


Figura 44. Patrón de fragmentación de la mururoidina V (3).

La espectrometría de masas en la modalidad FAB negativo de la mururoidina V (3) mostró un ion pseudomolecular $[M - H]^-$ de m/z 1167 (**Figura 45**). Su fórmula molecular se estableció como C₅₆H₉₅O₂₅. El ácido 2-metilbutanoico se encuentra esterificando al núcleo oligosacárido por lo que el fragmento A de m/z 1083 $[M - H]^-$ corresponde a la pérdida del residuo de 2-metilbutanoico con una diferencia de 84 unidades con respecto al ion quisi-molecular (**Figura 46**).

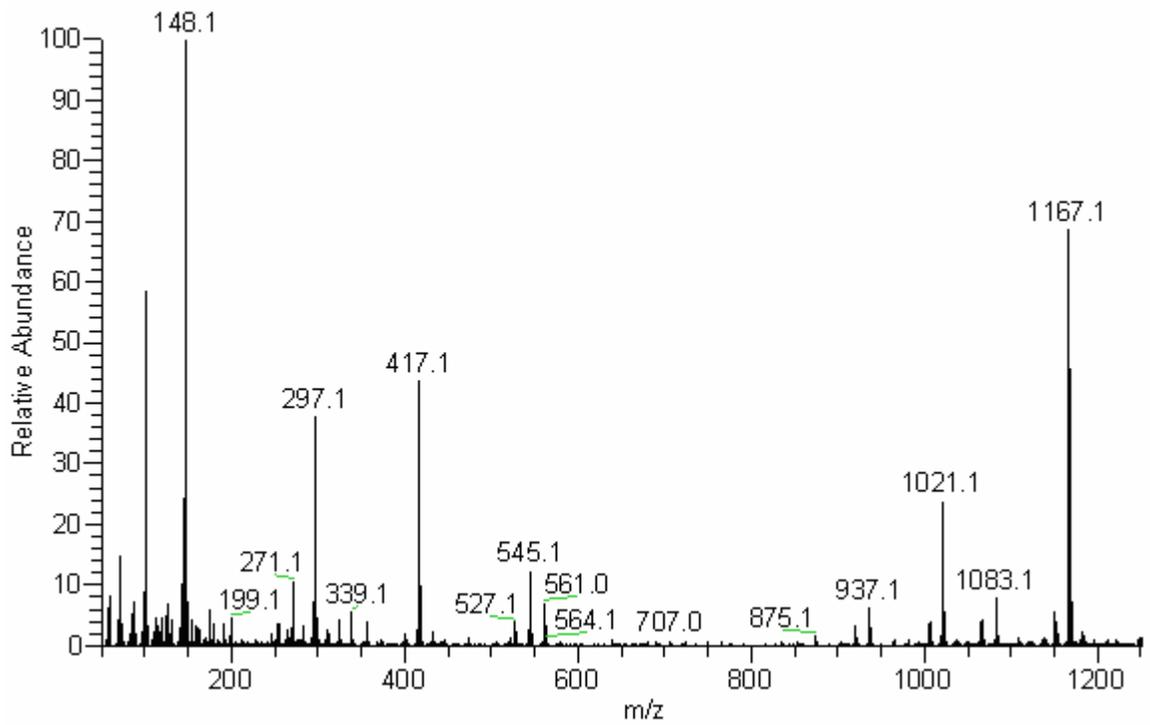


Figura 45. Espectro de masas modo FAB negativo para la murucoidina V (4).

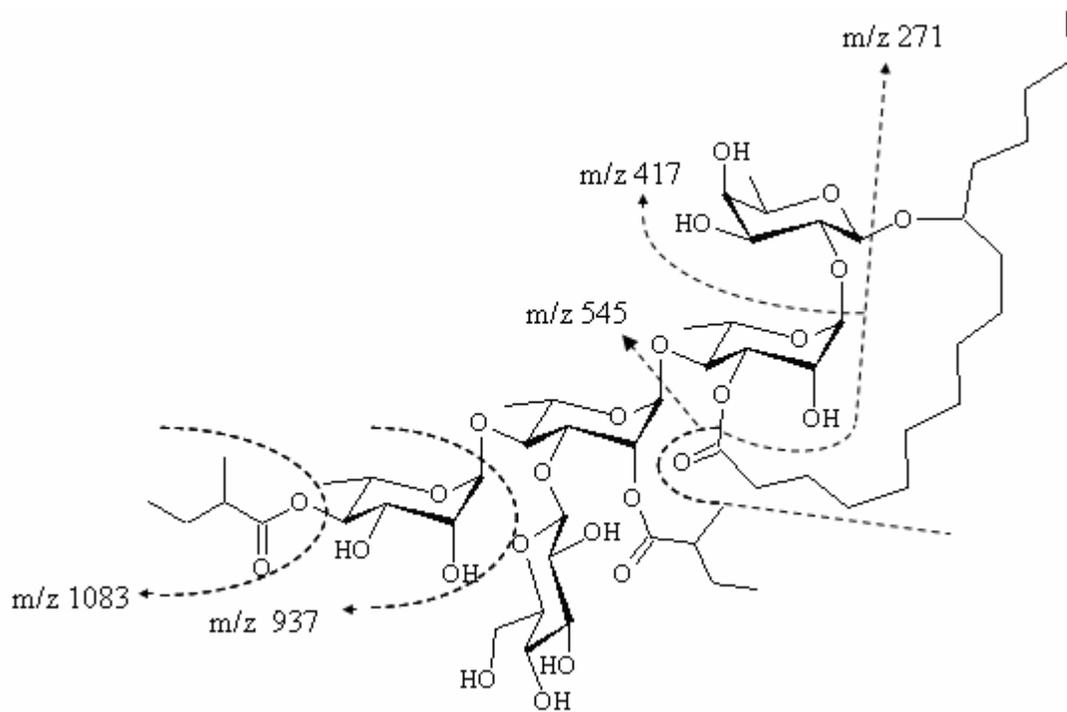


Figura 46. Fragmentación de la murucoidina V.

Las Figuras 47 a 49 muestran las estructuras de las murucoidinas XIX, III y V respectivamente.

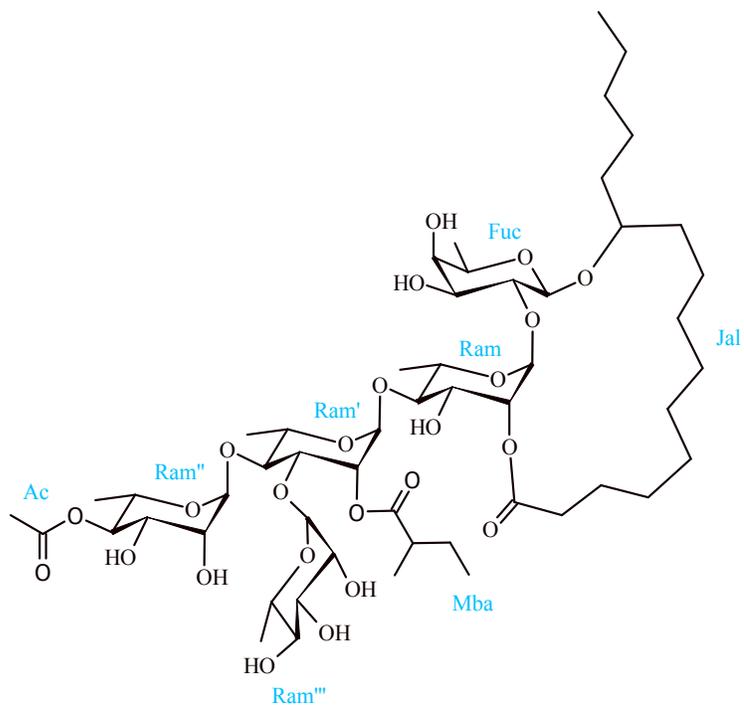


Figura 47. Estructura de la murucoidina XIX (1).

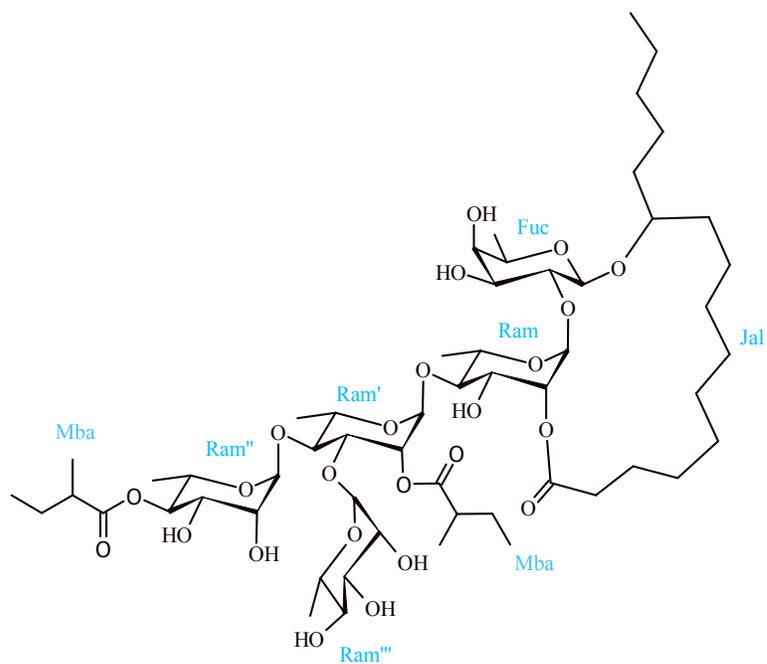


Figura 48. Estructura de la murucoidina III (2).

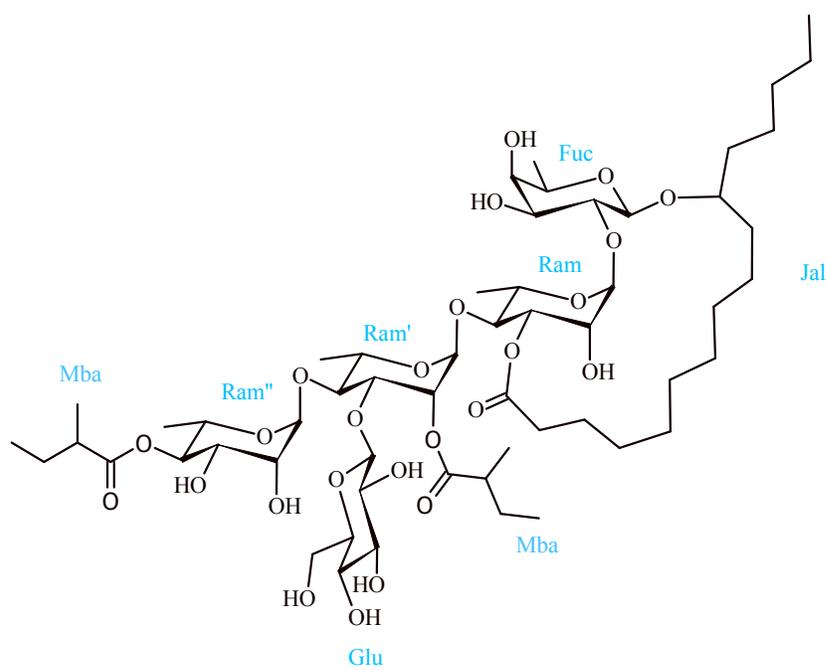


Figura 49. Estructura de la murucoidina V (3).

7. Conclusiones

- a) Se contribuyó al conocimiento de la diversidad estructural de glicolípidos presentes en la jalapina de las flores de *Ipomoea murucoides*, ya que se lograron aislar y purificar mediante la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) tres glicolípidos, de los cuales uno es novedoso: la murucoidina **XIX**.
- b) Se aislaron e identificaron dos núcleos pentasacáridos constitutivos de las murucoidinas **III**, **V** y **XIX**, los cuales se caracterizaron mediante técnicas espectroscópicas (RMN) como:
- Ácido simónico B: *O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico.
- Ácido operculínico A: *O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico.
- c) La acilación de los glicolípidos caracterizados ocurre en las posiciones C2 y C4 de las ramnosas Ram' y Ram'', respectivamente. Estas acilaciones corresponden a los ácidos metilbutírico y acético en el caso de la murucoidina **XIX**, en tanto que las acilaciones de las murucoidinas **III** y **V** corresponden al ácido metilbutírico.

8. Bibliografía

- Agrawal, P. (1992). NMR Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry* **31**, 3307 – 3330.
- Alcántara Ramírez, S. (1980). Contenido de ácidos grasos entre semillas de *Ipomoea murucoides* (Familia *Convolvulaceae*) de diferentes localidades en la República Mexicana. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Argueta, A. (1994) *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México, p. 659.
- Chérigo L, Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Jacobo-Herrera N, Kaatz GW, Gibbons S. (2008). Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* In press.
- Chérigo Rodríguez, L. (2007). Resinas glicosídicas de las flores de *Ipomoea murucoides*. Tesis Doctoral, Facultad de Química, UNAM, México.
- Chérigo, L., Pereda-Miranda R. (2006). Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **69**, 595-599.
- Duus, J. O., Gotfredsen, C. H., Bock, K. (2000). Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. *Chem. Rev.* **100**, 4589 – 4614.
- Fürstner, A., Müller, T. (1999). Efficient total syntheses of resin glycosides and analogues by ring-closing olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7814-7821.
- Hernández-Carlos, B. Bye, R., Pereda-Miranda, R. (1999). Orizabins V-VIII, Tetrasaccharide Glycolipids from the Mexican Scammony Root (*Ipomoea orizabensis*). *J. Nat. Prod.* **62**, 1096-1100.
- Kitagawa, I., Ohashi, K., Baek, N. I., Sakagami, M., Yoshikawa, M., Shibuya, H. (1997) *Indonesian medicinal Plants. XIX*: Chemical structures of four additional resin-glycosides, mammosides A, B, H₁ and H₂, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 786-794.
- León, I., Enríquez, R., Nieto, D., Alonso, D., Reynolds, W., Aranda, E., Villa J. (2005). Pentasaccharide glycosides from the roots of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **68**, 1141-1146.

- MacLeod, J., Ward, A. (1997). Structural Investigation of Resin Glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *J. Nat. Prod.* **60**, 467-471.
- McDonald, A. (1991). Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Inst. Biol. Univ. Autón. México, Sec. Bot.* **62**, 65-82.
- Monroy-Ortíz, C, Castillo España, P. (2000). *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, 104-105.
- Newman, D., Cragg, G., Snader, K. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 – 2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022 – 1037.
- Noda, N., Kobayashi, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1988). Resin glycosides II. Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the crude resin glycoside from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 627-633.
- Noda, N., Kobayashi, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1988). Resin glycosides III. Isolation and structural study of the genuine resin glycosides, muricatins I-VI, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 920-929.
- Noda, N., Nishi, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1988). Resin glycosides IV. Two new resin glycosides, muricatins VII and VIII, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1707-1713.
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., 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., Yoda, S., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992). Resin glycosides XV. Simonins I-V, ether-soluble resin glycosides (Jalapins) from the roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3163-3168.
- Okabe, H., Koshito, N., Tanaka, K., Kawasaki, T. (1971) Studies on resin glycosides. II. Unhomogeneity of “pharbitic acid” and partial structures of pharbitic acids C and D, the major constituents of “pharbitic acid”. *Chem. Pharm. Bull.* **19**, 2394-2403.
- Ono, M., Honda, F., Karahashi, A., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1997) Resin glycosides. XXV. Multifidins I and II, new jalapins from the seed of *Quamoclit x multifida*. *Chem. Pharm. Bull.* **45**, 1955-1960.

- Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1989) Operculin I and II, new ether soluble resin glycosides (“jalapín”) with fatty acid ester groups from *Rhizoma jalapae braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 241-244.
- Ono, M., Nakagawa, K., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1993) Resin glycosides. XIX. Woodrosins I and II, ether-insoluble resin glycosides from the stems of *Ipomoea tuberosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**, 1925-1932.
- Ono, M., Noda, N., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1990) Resin glycosides. VII. Reinvestigation of the component organic and glycosidic acids of pharbitin, the crude ether-insoluble resin glycoside (“convolvulin”) of *Pharbitis Semen* (seeds of *Pharbitis nil*). *Chem. Pharm. Bull.* **38**, 1892-1897.
- Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Escalante-Sanchez E, Hernandez-Carlos B, Linares E, Bye R. (2006). Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *J. Nat. Prod.* **69**, 1460-1466.
- Pereda-Miranda, R., Bah, M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 111-131.
- Pereda-Miranda, R., Escalante-Sánchez, E., Escobedo-Martínez, C. (2005). Characterization of Lipophilic Pentasaccharides from Beach Morning Glory (*Ipomoea pes-caprae*). *J. Nat. Prod.* **68**, 226 –230.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Winckramaratne, D. B.M., Pezuto, J. M., Kinhorn, A. D. (1993) Tricolorin A, major phytochrome inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582.
- Sarin, J.P.S., Hari, G.S., Nandu, K.M., Dhar, M.M. (1973) Ipolearósíde: A new glycoside from *Ipomoea leari*, with anti-cancer activity. *Phytochemistry* **12**, 2461-2468.
- Trease, G.E., Evans, W.C. (2002). *Pharmacognosy*. 15a. ed. WB Saunders, Edinburgo, p. 288.
- Wagner, H., Schwarting, G. (1977) Struktur der microphyllinsäure aus dem harz von *Convolvulus microphyllus*. *Phytochemistry* **16**, 715-717.