



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**CARACTERIZACIÓN DE LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE  
LAS RESINAS GLICOSÍDICAS DE *IPOMOEA ALBA***

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

PRESENTA

M. en C. SARA ROSARIO CRUZ MORALES

TUTOR:  
DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA  
FACULTAD DE QUIMICA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DR. ALFREDO ORTEGA HERNÁNDEZ INSTITUTO DE QUIMICA  
DR. ROBERT BYE BOETTLER INSTITUTO DE BIOLOGIA

MEXICO, D. F. ABRIL 2013



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**

<b>PRESIDENTE</b>	Dr. Alfredo Ortega Hernández
<b>VOCAL</b>	Dr. Leovigildo Quijano
<b>VOCAL</b>	Dra. Rachel Mata Essayag
<b>VOCAL</b>	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
<b>SECRETARIO</b>	Dr. José Fausto Rivero Cruz

### **Sitio donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123, Conjunto E,  
Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

### **Asesor**

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

### **Sustentante**

M. en C. Sara Rosario Cruz Morales

### **Artículos generados por la presente investigación.**

Cruz-Morales S, Castañeda-Gómez J, Figueroa-González G, Mendoza-García A, Lorence A, Pereda-Miranda R (2012). Mammalian multidrug resistance lipopentasaccharide inhibitors from *Ipomoea alba* seeds. *J. Nat. Prod.* **75** (9): 1603-1611.

Cruz-Morales S, Castañeda-Gómez J, Figueroa-González G, Fragoso-Serrano M, Pereda-Miranda, R (2013). Resin glycosides of *Ipomoea alba* seeds as mammalian resistance modifying agents. En proceso.

### **Trabajos presentados en congresos.**

#### ***Modalidad poster:***

- Pentasaccharides from *Ipomoea alba* seeds. Sara Rosario Cruz-Morales, Jhon Fredy Castañeda-Gómez, Alma Delia Mendoza-García and Rogelio Pereda-Miranda. En: International Congress of Natural Products Research, New York, USA, 2012.
- Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de *Ipomoea alba*. Congreso QUIMIUNAM 2011, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lipopentasacáridos inhibidores de la multifármaco resistencia en células de mamíferos. Congreso QUIMIUNAM 2012, Universidad Nacional Autónoma de México.

## AGRADECIMIENTOS

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

- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el periodo de Febrero del 2009 a Enero del 2013 con número de becario 207878, además del apoyo económico brindado a través del proyecto 101380-Q.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (Proyectos: IN217310 y IN212813).
- A la Dra. Isabel Chávez, a la Dra. Beatriz Quiroz, al M. en C. Héctor Ríos del Instituto de Química (UNAM) y a la M. en C. Rosa Isela del Villar de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química (UNAM) por el registro de los espectros de RMN.
- A la M. en C. Georgina Duarte Lisci y a la Q.F.B. Margarita Guzmán Villanueva de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), de la Facultad de Química (UNAM) por el registro de los espectros de masas.
- Al Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la asistencia brindada en la determinación de las rotaciones ópticas.
- A la Dra. Argelia Lorence de la Universidad de Arkansas por la adquisición de las semillas, así como por la identificación de la especie en estudio, junto con el Dr. Robert Bye del Jardín Botánico del Instituto de Biología (UNAM).

- Al Dr. Jhon Fredy Castañeda Gómez por la asesoría en la elucidación estructural de los compuestos y a la Dra. Gabriela Figueroa González por la realización de los ensayos biológicos.
- A los miembros del jurado por sus comentarios y observaciones que permitieron la corrección de este manuscrito.
- A los miembros del comité tutelar, al Dr. Alfredo Ortega Hernández y al Dr. Robert Bye Boettler, por su continuo apoyo y observaciones a mi trabajo experimental durante la realización de esta investigación.
- A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por su apoyo y cooperación en la realización de esta investigación.
- Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por darme la oportunidad y la confianza para realizar este trabajo, por su apoyo, tiempo, dedicación y paciencia en la dirección de esta tesis.
- A la Universidad Nacional Autónoma de México, mi alma máter y a mi querida Facultad de Química por mi formación profesional desde la licenciatura hasta el doctorado.

*A Dios, a mis padres: Sara y Jorge, y a mi hermana: Dra. Georgina Cruz M., por estar siempre a mi lado y por su apoyo incondicional*

## ABSTRACT

The present dissertation describes the isolation, purification, structure elucidation and biological evaluation, as multidrug resistance inhibitors, of individual constituents from the resin glycoside contents of *Ipomoea alba* L. The chloroform-soluble extracts prepared from seeds through high-performance liquid chromatography (HPLC), using the techniques of column overload, peak shaving, and sample recycling, allowed the isolation of eleven oligosaccharides: five oligosaccharides with pentasaccharide core, **albinosides I-V (1-5)**, and six oligosaccharides with tetrasaccharide core **albinosides VI-XI (6-11)**. High-field nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (FAB and ESI) were used for the structural elucidation of the isolated compounds. **Albinosides I-V** are pentaglycosidic lactones while **albinosides VI-XI** are tetraglycosidic macrolactones. Their structural differences are due to the oligosaccharide core, the type of the aglycone forming the macrolactone, and the positions of macrolactonization and esterification by various acylating residues. The isolation and the identification of these compounds demonstrated the complexity of the chemical diversity of the resin glycosides in *Ipomoea alba*.

In addition, the reversal of multidrug resistance by this class of plant metabolites was also evaluated in vinblastine-resistant human breast carcinoma cells (MCF-7/Vin). The noncytotoxic compounds, albinosides III and X, at a concentration of 25  $\mu\text{g/mL}$ , exerted the strongest potentiation effect of vinblastine susceptibility to over 2140-fold as the reversal factor (RF), followed by albinoside VII (RF 190.3-fold), while a moderate activity was observed for the albinosides I (RF 3.1-fold), II (RF 2.6-fold), V (RF 2.3-fold), and VI (RF 2.1-fold). Albinoside IX (RF 1.7-fold) showed a low activity when reserpine was used as a positive control. The albinosides IV and VIII did not reverse the resistant phenotype, while albinoside XI displayed cytotoxicity. Therefore, its reversal activity (RF 351-fold) was considered as an additive synergism.



## RESUMEN

La presente disertación describe el aislamiento, la purificación, la elucidación estructural y la evaluación biológica, como inhibidores de la multifármaco resistencia, de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas presentes en *Ipomoea alba* L. A partir del extracto soluble en cloroformo proveniente de las semillas y mediante la aplicación de la Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) utilizando las técnicas de sobrecarga de columna, corte y rasurado de núcleo y reciclaje de las muestras, se aislaron 11 oligosacáridos: cinco con núcleo pentasacárido, **albinósidos I-V (1-5)** y seis con núcleo tetrasacárido, **albinósidos VI-XI (6-11)**. El empleo de diferentes técnicas de la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (FAB, ESI) permitió la identificación de las estructuras químicas de los compuestos aislados. Así, los **albinósidos I-V (1-5)** son lactonas pentaglicosídicas y los **albinósidos VI-XI (6-11)** corresponden a lactonas tetraglicosídicas que difieren por el núcleo oligosacárido constitutivo, el tipo de aglicona y las posiciones de la macrolactonización y esterificación de los diferentes residuos acilantes. El aislamiento y la identificación de estos compuestos permitió demostrar la complejidad y la amplia diversidad química de las resinas glicosídicas presentes en la especie *Ipomoea alba*.

La reversión de la multifármaco resistencia por esta clase de metabolitos se evaluó en células de cáncer de mama resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin). Los albinósidos III y X, compuestos no citotóxicos, ejercieron una acentuada potenciación de la susceptibilidad a la vinblastina con un factor de reversión (RF) de más de 2140 a una concentración de 25 µg/mL, mientras que el albinósido VII (RF 190.3) desarrolló una excelente actividad de potenciación. Los albinósidos I (RF 3.1), II (RF 2.6), V (RF 2.3) y VI (RF 2.1) mostraron una moderada actividad y el albinósido IX (RF 1.7) demostró una baja potenciación en relación con la actividad de la reserpina que se utilizó como un control positivo. Los albinósidos IV y VIII no mostraron actividad y para el albinósido XI (RF 351.3), al ser un compuesto citotóxico, su actividad se consideró como un sinergismo de tipo aditivo.

# CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS .....	I
ÍNDICE DE FIGURAS .....	II
LISTA DE ABREVIATURAS .....	V
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES .....</b>	<b>4</b>
2.1 Familia Convolvulaceae.....	4
2.2 Género <i>Ipomoea</i> .....	4
2.3 <i>Ipomoea alba</i> L. ....	5
2.3.1 Bioactividad .....	7
2.3.2 Caracterización fitoquímica .....	7
2.3.3 Resinas glicosídicas .....	9
2.3.4 Evaluación de la multifármaco resistencia en células de mamíferos .....	11
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>13</b>
<b>4. JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>14</b>
<b>5. PARTE EXPERIMENTAL .....</b>	<b>15</b>
5.1 Métodos cromatográficos.....	15
5.2 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas .....	16
5.3 Material vegetal.....	17
5.4 Preparación de los extractos del material vegetal .....	17
5.5 Fraccionamiento primario del extracto CHCl <sub>3</sub> de las semillas de <i>I. alba</i> .....	18
5.6 Obtención de los albinósidos I-XI.....	19
5.7 Preparación de los derivados de los albinósidos I-III.....	23
5.7.1 Obtención de los ácidos glicosídicos .....	23
5.7.2 Preparación de los ácidos glicosídicos peracetilados .....	25
5.7.3 Preparación del diazometano .....	25
5.7.4 Preparación de los ésteres metílicos peracetilados .....	26
5.7.5 Purificación de los ésteres metílicos peracetilados.....	26

5.7.6 Análisis de carbohidratos .....	28
5.7.6.1 Hidrólisis ácida.....	28
5.7.6.2 Preparación de los derivados sililados.....	28
5.7.6.3 Preparación de los derivados tiazolidínicos .....	28
5.7.7 Identificación de las agliconas .....	29
5.7.8 Determinación de la configuración absoluta del ácido nílico .....	30
5.8 Evaluación biológica .....	32
5.8.1 Líneas y cultivos celulares .....	32
5.8.2 Ensayos de citotoxicidad.....	32
5.8.3 Ensayos de modulación.....	33
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>34</b>
6.1 Fraccionamiento del extracto clorofórmico .....	34
6.2 Purificación de los glicolípidos individuales .....	34
6.3 Identificación de agliconas.....	36
6.4 Purificación de los ácidos glicosídicos derivatizados.....	37
6.5 Identificación estructural de los derivados de los ácidos albinosínicos A-C.....	37
6.6 Identificación de carbohidratos .....	49
6.7 Caracterización de la estructura química de los albinósidos I-XI.....	51
6.7.1 Albinósidos I-V .....	51
6.7.2 Albinósidos VI y VII .....	70
6.7.3 Albinósidos VIII y X .....	78
6.7.4 Albinósidos IX y XI.....	85
6.8 Ensayos de citotoxicidad y de modulación de la multifármaco resistencia.....	97
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>100</b>
<b>8. REFERENCIAS.....</b>	<b>101</b>
<b>9. ESPECTROS <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C .....</b>	<b>106</b>

## INDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Peso de los extractos.....	17
<b>Cuadro 2.</b> Cantidades obtenidas de los ácidos glicosídicos .....	24
<b>Cuadro 3.</b> Cantidades obtenidas de los compuestos acetilados.....	25
<b>Cuadro 4.</b> Cantidades obtenidas de los ésteres metílicos peracetilados .....	26
<b>Cuadro 5.</b> Cantidades obtenidas de la separacion a escala preparativa .....	34
<b>Cuadro 6.</b> Cantidades obtenidas de los compuestos aislados.....	35
<b>Cuadro 7.</b> Identificación de los ácidos grasos mediante CG-EM.....	36
<b>Cuadro 8.</b> Identificación de los ácidos grasos hidroxilados mediante CG-EM .....	36
<b>Cuadro 9.</b> RMN <sup>1</sup> H de los derivados IA1-HAM, IA2-HAM y IA3-HAM.....	44
<b>Cuadro 10.</b> RMN <sup>13</sup> C de los derivados IA1-HAM, IA2-HAM y IA3-HAM.....	45
<b>Cuadro 11.</b> RMN <sup>1</sup> H de los albinósidos I-V (1-5).....	65
<b>Cuadro 12.</b> RMN <sup>13</sup> C de los albinósidos I-V (1-5).....	66
<b>Cuadro 13.</b> RMN <sup>1</sup> H de los albinósidos VI-XI (6-11).....	92
<b>Cuadro 14.</b> RMN <sup>13</sup> C de los albinósidos VI-XI (6-11).....	93
<b>Cuadro 15.</b> Citotoxicidad de los albinósidos I-III, VI-VII, IX-X .....	97
<b>Cuadro 16.</b> Modulación de la citotoxicidad de la vinblastina en células sensibles y resistentes a vinblastina por los albinósidos de prueba .....	99

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Las hojas, tallos, flores y semillas de <i>Ipomoea alba</i> .....	6
<b>Figura 2.</b>	Alcaloides aislados de <i>Ipomoea alba</i> .....	8
<b>Figura 3.</b>	Resinas glicosídicas obtenidas de las partes aéreas de <i>I. alba</i> .....	10
<b>Figura 4.</b>	Cromatograma del extracto clorofórmico de las semillas de <i>I. alba</i> .....	19
<b>Figura 5.</b>	Cromatograma a nivel semipreparativo del nilato de <i>p</i> -bromo-fenacilo.....	31
<b>Figura 6.</b>	Purificación del albinósido I.....	35
<b>Figura 7.</b>	Espectro de masas FAB modo negativo del compuesto <b>1a</b> (IA1-OH) .....	38
<b>Figura 8.</b>	Espectro de masas FAB modo negativo del compuesto <b>2a</b> (IA2-OH) .....	39
<b>Figura 9.</b>	Espectro de masas FAB modo negativo del compuesto <b>3a</b> (IA3-OH) .....	39
<b>Figura 10.</b>	RMN <sup>1</sup> H del compuestos <b>1a.1</b> (IA1-HAM).....	40
<b>Figura 11.</b>	Región anomérica del espectro HSQC para el compuesto <b>1a.1</b> (IA1.HAM)..	41
<b>Figura 12.</b>	Espectro COSY del compuesto <b>1a.1</b> (IA1-HAM) .....	42
<b>Figura 13.</b>	Espectro TOCSY del compuesto <b>1a.1</b> (IA1-HAM).....	42
<b>Figura 14.</b>	Espectro HMBC del compuesto <b>1a.1</b> (IA1-HAM) .....	46
<b>Figura 15.</b>	Estructuras de los ácidos albinosínicos A-C ( <b>1a-3a</b> ) y sus derivados peracetilados metilados ( <b>1a.1-3a.1</b> ) .....	47
<b>Figura 16.</b>	Cromatogramas de gases de los derivados trimetilsililados .....	49
<b>Figura 17.</b>	Cromatogramas de gases de los derivados tiazolidínicos.....	50
<b>Figura 18.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) del albinósido I ( <b>1</b> ).....	52
<b>Figura 19.</b>	Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, C <sub>5</sub> D <sub>5</sub> N) del albinósido II ( <b>2</b> ) .....	52
<b>Figura 20.</b>	Espectro <sup>1</sup> H- <sup>1</sup> H COSY para la región oligosacárida del albinósido I ( <b>1</b> ).....	53
<b>Figura 21.</b>	Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinósido I ( <b>1</b> ).....	54
<b>Figura 22.</b>	Espectro HSQC del albinósido I ( <b>1</b> ).....	55

<b>Figura 23.</b> Espectro HSQC del albinósido I (1).....	55
<b>Figura 24.</b> Espectro HSQC del albinósido II (2) .....	56
<b>Figura 25.</b> Espectro HMBC del albinósido I (1). Secuencia de glicosidación.....	57
<b>Figura 26.</b> Espectro HMBC del albinósido II (2). Secuencia de glicosidación.....	58
<b>Figura 27.</b> Espectro HMBC del albinósido I (1). Posiciones de esterificación.....	60
<b>Figura 28.</b> Espectro HMBC del albinósido II (2). Posiciones de esterificación.....	60
<b>Figura 29.</b> Espectro HMBC del albinósido III (3). Posiciones de esterificación. ....	61
<b>Figura 30.</b> Espectro de masas (modo negativo) del albinósido I.....	62
<b>Figura 31.</b> Espectro de masas (modo negativo) del albinósido II.....	62
<b>Figura 32.</b> Espectro de masas (modo negativo) del albinósido III .....	63
<b>Figura 33.</b> Espectro de masas (modo negativo) del albinósido IV.....	63
<b>Figura 34.</b> Espectro de masas (modo negativo) del albinósido V. ....	64
<b>Figura 35.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VI (6).....	70
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VII (7).....	71
<b>Figura 37.</b> Espectro HSQC del albinósido VI (6).....	71
<b>Figura 38.</b> Espectro HSQC del albinósido VII (7) .....	72
<b>Figura 39.</b> Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY para la región oligosacárida del albinósido VI (6).....	72
<b>Figura 40.</b> Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinósido VI (6).....	73
<b>Figura 41.</b> Espectro HMBC del albinósido VI (6). Secuencia de glicosidación. ....	53
<b>Figura 42.</b> Espectro HMBC del albinósido VII (7). Secuencia de glicosidación.....	75
<b>Figura 43.</b> Espectro HMBC del albinósido VI (6). Posiciones de esterificación. ....	76
<b>Figura 44.</b> Espectro HMBC del albinósido VII (7). Posiciones de esterificación. ....	76
<b>Figura 45.</b> Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido VI (6).....	77
<b>Figura 46.</b> Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido VII (7).....	77
<b>Figura 47.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VIII (8). ....	78

<b>Figura 48.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VIII (8) .....	79
<b>Figura 49.</b> Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY para la región oligosacárida del albinósido VIII (8) ..	79
<b>Figura 50.</b> Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinósido VIII (8). .....	80
<b>Figura 51.</b> Espectro HSQC del albinósido VIII (8). .....	81
<b>Figura 52.</b> Espectro HMBC del albinósido VIII (8). Secuencia de glicosidación.....	82
<b>Figura 53.</b> Espectro HMBC del albinósido VIII (8). Posiciones de esterificación.....	83
<b>Figura 54.</b> Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido VIII (8).....	84
<b>Figura 55.</b> Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido X (10) .....	84
<b>Figura 56.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido XI (11).....	85
<b>Figura 57.</b> Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125.7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido XI (11).....	86
<b>Figura 58.</b> Espectro $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY para la región oligosacárida del albinósido XI (11)...	86
<b>Figura 59.</b> Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinósido XI (11).....	87
<b>Figura 60.</b> Espectro HSQC del albinósido XI (11).....	88
<b>Figura 61.</b> Espectro HMBC del albinósido XI (11). Secuencia de glicosidación .....	89
<b>Figura 62.</b> Espectro HMBC del albinósido XI (11). Posiciones de esterificación. ....	90
<b>Figura 63.</b> Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido IX (9).....	91
<b>Figura 64.</b> Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido XI (11).....	91
<b>Figura 65.</b> Ensayo de modulación de la vinblastina con el albinósido III (3).....	98

## LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
$\alpha$	Rotación óptica
$J$	Constante de acoplamiento
CG-EM	Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas
CH <sub>3</sub> CN	Acetonitrilo
CH <sub>3</sub> Cl	Cloroformo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
Cm	Centímetros
COSY	Correlation Spectroscopy
$\Delta$	Desplazamiento Químico
D	Doblete
Dd	Doble doblete
Ddd	Doble de doble de doble
Dq	Doble de cuarteto
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Electrospray ionization
Ev	Electrón volts
°C	Grados centígrados
FAB	Bombardeo de átomos acelerados
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
Hz	Hertz
H <sub>2</sub> O	Agua
IR	Índice de Refracción
MALDI	Desorción/ionización láser asistida por matriz
[M-H] <sup>-</sup>	Ión pseudomolecular negativo



$[M+H]^+$	Ión pseudomolecular positivo
$[M+Cl]^-$	Ión negativo aducto con cloro
$[M+Na]^+$	Ión positivo aducto con sodio
L	Litro
Me <sub>2</sub> CO	Acetona
MeOH	Metanol
MDF	Multidrug resistance
Mg	Miligramos
Min	Minutos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
p.f.	Punto de fusión
Ppm	Partes por millón
<i>m/z</i>	Relación de masa-carga
Res	Reserpina
RIU	Refractive Index Unit
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
SFB	Suero Fetal Bovino
SRB	Sulforodamina B
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
T	Triplete
<i>t<sub>R</sub></i>	Tiempo de retención
Vin	Vinblastina

## 1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de las plantas medicinales se extiende a cualquier parte del mundo, donde el hombre tradicionalmente las ha necesitado para curar sus enfermedades. Así, mezcla de magia y religión, necesidad y casualidad, de ensayo y error, permitió, por medio del desarrollo de la civilización, la creación de complejos sistemas terapéuticos a base de remedios naturales que han constituido los cimientos de la medicina moderna.

Uno de los grupos vegetales que se encuentra mejor representado por sus propiedades medicinales (purgativas) y alucinógenas (de uso en rituales religiosos) es la familia de las convolvuláceas, donde los géneros más significativos son *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Exogonium* y *Operculina*. Una de las características más notables de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas en sus tejidos foliares y radiculares. Desde el punto de vista químico, estos metabolitos secundarios son moléculas anfipáticas por tener en su estructura una porción hidrofílica que está compuesta por un núcleo oligosacárido y una porción hidrofóbica correspondiente a la aglicona que está representada por un ácido graso mono o dihidroxilado de 16 ó 14 átomos de carbono y que forma un éster cíclico intramolecular. En la mayoría de los casos el núcleo oligosacárido se encuentra esterificado por ácidos grasos saturados de longitudes de cadena variadas.<sup>1</sup> Esta clase de compuestos presentan una amplia diversidad estructural debido a las variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas, a la secuencia de glicosidación y a los ácidos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido.<sup>1</sup>

En cuanto a las variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas que componen el núcleo oligosacárido, se han podido identificar desde disacáridos hasta heptasacáridos y dímeros constituidos por dos unidades oligoméricas las cuales están unidas mediante el establecimiento de un enlace tipo éster en el grupo carboxilo terminal de una de las agliconas. Los núcleos oligosacáridos se componen principalmente de tres 6-desoxihexosas: D-fucosa, D-quinovosa y L-ramnosa, y la D-glucosa como la única hexosa. También, se ha encontrado D-xilosa en las resinas glicosídicas aisladas en la especie *Ipomoea pescaprae*.<sup>2</sup>

En cuanto a la secuencia de glicosidación se han reportado oligosacáridos lineales o ramificados y los ácidos que con mayor frecuencia forman las macrolactonas son los ácidos (11*S*)-hidroxihexadecanoico (ácido jalapinólico) y el (11*S*)-hidroxitetradecanoico (ácido convolvulinólico). Otras agliconas que se han encontrado en las especies *Pharbitis nil* e *Ipomoea squamosa* son el ácido 3,11-dihidroxitetradecanoico (ácido ipurólico) y el ácido (11*S*)-hidroxi-4-oxotetradecanoico, respectivamente. Los ácidos 12-hidroxipentadecanoico, 12-hidroxihexadecanoico y 12-hidroxihexadecanoico se identificaron en las resinas glicosídicas de *Ipomoea turpethum*.<sup>3</sup>

Los ácidos de cadena corta que, comúnmente se encuentran acilando los núcleos oligosacáridos incluyen a los ácidos acético, propiónico, *n*-butírico, isobutírico, (2*S*)-2-metilbutírico, 3-metilbutírico, (-)-(2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nílico), y (2*E*)-2-metil-2-butenico (tíglico). También, se han encontrado ésteres derivados de ácidos grasos de cadena larga tales como el *n*-hexanoico, *n*-octanoico, *n*-decanoico, *n*-dodecanoico, *n*-hexadecanoico, *n*-octadecanoico y *n*-eicosanoico, así como, ésteres del ácido (2*E*)-3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico).<sup>1</sup>

Las resinas glicosídicas están asociadas a diferentes actividades biológicas tales como la inhibición del crecimiento vegetal y propiedades antifúngicas, antimicrobianas y citotóxicas, estas últimas de posible interés terapéutico para el desarrollo de nuevos fármacos moduladores de la resistencia desarrollada por microorganismos y células tumorales a los agentes terapéuticos.<sup>2,4-10</sup> Investigaciones recientes han demostrado que las variaciones en la potencia de la actividad biológica para dos series de glicolípidos, las tricolorinas<sup>11</sup> y las orizabinas<sup>12</sup> dependen de su grado de lipofilidad y del tamaño del macrociclo lactónico, presentando una mayor actividad antimicrobiana (*Staphylococcus aureus*) y citotóxica (KB), aquellos oligosacáridos anfipáticos con un menor grado de lipofilidad.<sup>4</sup> También, estos metabolitos han sido caracterizados como sustratos de las bombas de eflujo responsables del fenotipo resistente en bacterias Gram-positivas<sup>5</sup> y Gram-negativas,<sup>7</sup> así como también en líneas celulares de cáncer de mama.<sup>8-10</sup> Por ejemplo, se demostró que los pentasacáridos de la serie de las murucoidinas ejercían un efecto

modulador sobre las proteínas membranales Nor-A responsables de la resistencia a diversos antibióticos comerciales en cepas hospitalarias de *S. aureus*.<sup>5</sup>

Se ha postulado que estos glicolípidos provocan perturbaciones en las membranas celulares mediante la formación de poros no selectivos y, por lo tanto, provocan una alteración en el flujo de iones a través de la membrana celular. Un análisis cristalográfico de la tricolorina A,<sup>13</sup> (un tetrasacárido que cristalizó en la interfase entre polietilenglicol 200 (PEG 200)/agua y aceite mineral), demostró que el tamaño de estos cristales hidrofílicos, en conjunto con el arreglo en paralelo de las unidades lipídicas de los oligosacáridos, es compatible con el tamaño de una membrana biológica, lo cual permite racionalizar una explicación para la actividad citotóxica de las resinas glicosídicas. De tal forma, que resulta necesario ampliar el conocimiento relacionado con la diversidad estructural de esta clase de oligosacáridos para establecer si otra clase de prototipos estructurales generarían interacciones de mayor eficacia con sus células blanco para elevar la potencia de las resinas.

Dentro de la diversidad química de estas resinas glicosídicas se han identificado siete grupos basados en el tamaño del núcleo oligosacárido y en las diferencias en la secuencia de glicosidación.<sup>1</sup> Con el propósito de ampliar el conocimiento sobre las variaciones estructurales para este tipo de oligosacáridos, la presente tesis describe el aislamiento, la purificación, la identificación estructural y la evaluación biológica de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de *Ipomoea alba*, planta de vegetación silvestre,<sup>14</sup> a menudo cultivada como una especie ornamental, y cuyo uso tradicional en México, ha sido para el tratamiento de la parálisis e hidropesía.<sup>15</sup> En particular, en este trabajo se hace una descripción detallada sobre el aislamiento de los glicolípidos individuales de *Ipomoea alba* mediante el empleo de técnicas cromatográficas de alta resolución, su identificación estructural por medio de técnicas espectroscópicas y espectrométricas y su evaluación biológica sobre líneas celulares en donde se evaluó su potencial como agentes citotóxicos y como inhibidores de la multifarmaco-resistencia en células de mamíferos.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Familia Convolvulaceae

Dentro de las angiospermas, la familia Convolvulaceae representa una de las más grandes y diversas, estimándose alrededor de 55 géneros y 1650 especies. Su nombre viene del latín *convolvere* que significa entrelazarse, refiriéndose a la forma de su crecimiento característico en forma de enredaderas que se enroscan a un soporte.<sup>1</sup> Los géneros más representativos son *Convolvulus* (250 especies), *Ipomoea* (500 especies) y *Cuscuta* (170 especies). Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, especialmente en las zonas tropicales de Asia y América. En México, se han reportado 15 géneros y aproximadamente 217 especies de convolvuláceas, siendo el género *Ipomoea* uno de los de mayor grado de endemismo con aproximadamente un 65%, es decir, de las 160 especies que conforman este género 104 se encuentran presentes en México.

Las especies pertenecientes a esta familia presentan en sus tejidos foliares y radiculares células que secretan resinas glicosídicas, las cuales ejercen la acción purgante de utilidad en la medicina tradicional. Aunado a estos metabolitos, los alcaloides de tipo ergolina no peptídicos también son principios biodinámicos representativos en las especies de esta familia.

### 2.2 Género *Ipomoea*

El género *Ipomoea* tiene una amplia distribución en zonas tropicales y subtropicales de todo el mundo, abarcando ambos hemisferios. En México, la mayor proporción de especies pertenecientes a este género se encuentran distribuidas en las regiones subtropicales de la costa del Pacífico. La mayoría de las plantas de este género son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Existen algunas especies como *I. phillomega* e *I. santillanii* con un crecimiento en forma de lianas que alcanzan alturas de hasta 15 metros. Otras especies como *I. imperata* e *I. pes-caprae* alcanzan tamaños similares, pero han perdido su capacidad de enroscarse creciendo de manera

tendida para formar cubiertas extensas sobre dunas en arenas costeras. En las zonas semiáridas, *I. stans*, *I. duranguensis* e *I. sescossiana*, forman arbustos perennes leñosos y herbáceos que alcanzan hasta 1 metro de altura. Las especies *I. arborescens* e *I. murucoides* 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.<sup>1</sup>

Este género tiene una gran importancia económica por sus usos alimenticios (*I. batatas*), ornamentales (*I. carnea*, *I. alba*, *I. indica*), medicinales (*I. purga*, *I. orizabensis*, *I. stans*) y como malezas (*I. grandifolia*, *I. nil*, *I. quamoclit*).

### **2.3 *Ipomoea alba* L.**

La especie *Ipomoea alba* L. era formalmente conocida como *Calonyction aculeatum* (L.) y, actualmente, fue clasificada como parte del género *Ipomoea*, subgénero *Quamoclit*, sección *Calonyction*. Otros sinónimos para esta especie son: *Calonyction speciosum* Choisy, *Calonyction bona-nox* (L.), *Convolvulus aculeatus* (L.), *Ipomoea bona-nox* (L.) e *Ipomoea noctiflora* Griff.<sup>9</sup>

*Ipomoea alba* L. es una planta de vegetación silvestre, nativa de América, desde el norte de Argentina hasta México y Florida. Se presenta como una enredadera de una altura de 5-30 m, las hojas son enteras o trilobuladas, de 5-15 cm de largo, con tallos fuertes de 5-20 cm de largo. Las flores son fragantes, blancas, lisas y grandes con un diámetro de 8-14 cm, las semillas son de cubierta dura, ovoides, lisas, asemejándose a una nuez de color marrón.<sup>14</sup>



**Figura 1.** Las hojas, tallos, flores y semillas de *Ipomoea alba*.

### 2.3.1 Bioactividad

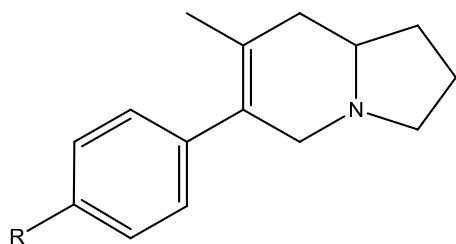
En México, la decocción de las hojas, la corteza y las flores de *I. alba* han sido empleadas desde la época colonial para el tratamiento de la parálisis y la inflamación de los tejidos blandos.<sup>15</sup> En África, las hojas son utilizadas como alimento y como sustituto de jabón. En la India, la planta completa se emplea para tratar la mordedura de serpientes.<sup>16</sup> Otras investigaciones han revelado que esta planta regula el crecimiento vegetal, mediante las giberelinas, fitohormonas que se han aislado previamente de esta especie y que son responsables de la estimulación de la división celular y del crecimiento de los tubérculos, incrementando así el rendimiento de varios cultivos como el ñame, el maní, el frijol y el trigo.<sup>17,18</sup> En Norte América, esta especie es ampliamente utilizada como una planta ornamental. Además se ha reportado el potencial invasivo de esta especie y los problemas que ocasiona en la agricultura.<sup>19</sup>

### 2.3.2 Caracterización fitoquímica

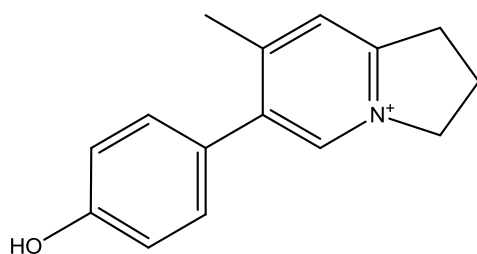
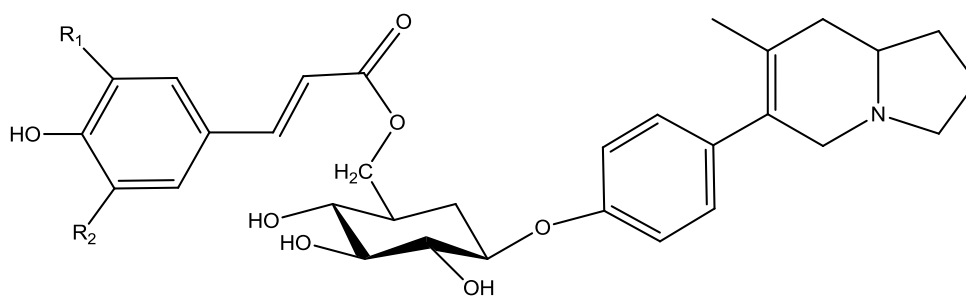
Existen estudios químicos de las semillas de *I. alba* de diversas regiones de Nigeria en África, en las cuales se han aislado alcaloides indolizidínicos que también forman parte del metabolismo secundario de este género, alcaloides como la isoipomina, la metoxi-ipomina, la dimetoxi-ipomina, la ipalbidina, la ipalbina y la ipomina se encontraron en esta especie.<sup>20,21</sup>

Desde los años sesenta, se ha demostrado la presencia de alcaloides ergotínicos en algunos miembros de la familia de las convolvuláceas, así como la acumulación de estos compuestos en cultivo de tejidos de *I. alba* L. e *I. violacea* L. Vivero y colaboradores, indujeron la formación de callos con capacidad de acumulación de ergometrina, la cual tiene gran valor terapéutico, pues es utilizada para la disminución de las hemorragias posparto y como coadyuvante en la contracción del útero de forma más rápida y eficiente.<sup>22</sup>





Compuesto	R
<b>Ipalbidina</b>	OH
<b>Ipalbina</b>	O-Glu

**Ipalbidinio**

Compuesto	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
<b>Ipomina</b>	H	H
<b>Isoipomina</b>	H	H
<b>Metoxi-ipomina</b>	H	OMe
<b>Dimetoxi-ipomina</b>	OMe	OMe

**Figura 2.** Alcaloides aislados de *Ipomoea alba*

### 2.3.3 Resinas glicosídicas

A partir de las hojas secas de *Calonyction aculeatum* (*Ipomoea alba* L.), se llevó a cabo un estudio fitoquímico realizado por el grupo de investigación de Fang y colaboradores debido al efecto que tenían los extractos de la planta en la promoción del crecimiento y en el incremento del rendimiento de diversos cultivos.<sup>18</sup>

El estudio se inició con la preparación de un extracto etanólico para después llevar a cabo un fraccionamiento primario por cromatografía en columna empacada con  $\text{Al}_2\text{O}_3$ , para así obtener una mezcla de resinas glicosídicas denominada calonictina **A**, la cual se sometió a una purificación por HPLC, utilizando una columna de fase reversa ODS, como fase móvil una solución acuosa de MeOH (13%) y un flujo de 2 mL/min. Bajo estas condiciones se obtuvieron dos compuestos puros, las calonictinas **A<sub>1</sub>** y **A<sub>2</sub>**.<sup>18</sup>

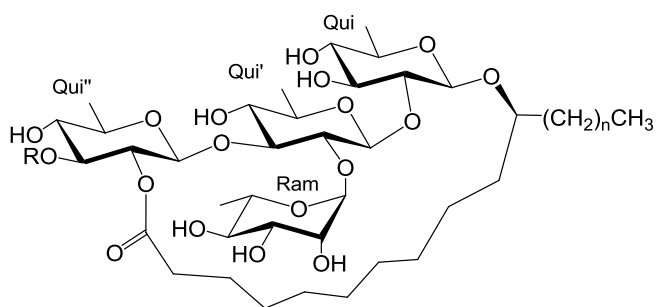
La elucidación estructural de estos oligosacáridos se llevó a cabo mediante el uso de técnicas espectroscópicas y espectrométricas. La espectrometría de masas se empleó para obtener los pesos moleculares a través de los iones pseudomoleculares, además al analizar las diferencias entre éstos y los fragmentos correspondientes a las eliminaciones de los grupos acilos, se estableció la pérdida de un grupo nilato para cada uno de los compuestos. También se observaron las pérdidas de cuatro unidades de metilpentosas. A continuación se muestran los fragmentos observados en los espectros de masas:

**Calonictina A<sub>1</sub>**: LSIMS (modo negativo):  $m/z$  909  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 809  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$  (niloil éster)]<sup>-</sup>, 663  $[809 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 517  $[663 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 389  $[517 + \text{H}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 243  $[389 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>

**Calonictina A<sub>2</sub>**: LSIMS (modo negativo):  $m/z$  937  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 837  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$  (niloil éster)]<sup>-</sup>, 691  $[837 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 545  $[691 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 417  $[545 + \text{H}_2\text{O} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 271  $[389 - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)]<sup>-</sup>

La información preliminar obtenida por los espectros de masas fue corroborada con los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ . Además, el uso de técnicas bidimensionales homonucleares, como COSY, TOCSY y NOESY, permitió la asignación de todas las señales de las unidades monosacáridas, así como la secuencia de glicosidación, encontrando que el núcleo oligosacárido estaba formado por tres unidades de D-quinovosa y una unidad de L-ramnosa. La secuencia de glicosidación se planteó de la siguiente manera:  $\text{H}_1\text{Qui}-\text{C}_{11}\text{aglicona}$ ,  $\text{H}_1\text{Qui}'-\text{C}_2\text{Qui}$ ,  $\text{H}_1\text{Qui}''-\text{C}_3\text{Qui}'$ ,  $\text{H}_1\text{Ram}-\text{C}_2\text{Qui}'$ . El sitio de lactonización se localizó en la posición  $\text{C}_2$  de la tercera unidad de quinovosa. Este ácido glicosídico se describió por primera vez en las resinas glicosídicas aisladas de las semillas de *I. muricata*, como el ácido muricático C.<sup>23</sup>

Adicionalmente, se llevaron a cabo reacciones de derivatización y degradación, así como reacciones de permetilación e hidrólisis, para verificar la secuencia de glicosidación, y una hidrólisis ácida para la obtención de las agliconas y la identificación de los azúcares constitutivos. Esto permitió la caracterización de las agliconas, siendo el ácido 11(S)-hidroxitetradecanoico para la calonictina **A<sub>1</sub>** y el ácido 11(S)-hidroxihexadecanoico para la calonictina **A<sub>2</sub>**, lo cual explica la diferencia de 28 uma que existe entre los compuestos.<sup>19</sup> Estos métodos de degradación han constituido una de las técnicas para lograr la identificación del ácido glicosídico mayoritario distintivo de las especies que lo biosintetizan.



Compuesto	R <sup>1</sup>	n
<b>Calonictina A<sub>1</sub></b>	nla	4
<b>Calonictina A<sub>2</sub></b>	nla	2

**Figura 3. Resinas glicosídicas obtenidas de las partes aéreas de *I. alba***

### 2.3.4 Evaluación de la multifármaco resistencia en células de mamíferos.

Con el fin de revertir la resistencia cruzada a fármacos en células cancerosas, numerosos estudios se han enfocado en inhibir la función de las bombas de eflujo como la glicoproteína P (Gp-P) y, de esta manera, incrementar la acumulación intracelular de los fármacos. Diversos productos naturales de origen vegetal, así como algunos principios farmacéuticos sintéticos, han demostrado un potencial inhibitorio de la función de la Gp-P sin desarrollar un efecto citotóxico, con lo cual surge la necesidad de seleccionar productos seguros para el desarrollo de nuevos y potentes inhibidores de las bombas de eflujo.<sup>8</sup>

Estudios previos sobre el efecto modulador de las resinas glicosídicas microbiológicamente inactivas, evaluadas en bacterias resistentes Gram positivas (*Staphylococcus aureus*)<sup>2,5,6</sup> y Gram negativas (*Escherichia coli* Rosetta-gami, *Salmonella typhi* y *Shigella flexneri*)<sup>7</sup>, así como en líneas celulares de cáncer de mamíferos<sup>8-10</sup>, permitieron caracterizar a estos compuestos como moduladores de las bombas de eflujo, es decir, interactúan con sitios de unión distintos a los de los sustratos, por lo que hay una reducción de unión del sustrato debido a una interacción alostérica negativa. Con esto se pretende disminuir las dosis terapéuticas de los fármacos antineoplásicos y así contrarrestar los efectos secundarios tóxicos en el tratamiento de enfermedades infecciosas refractarias y neoplasias malignas.

La resistencia cruzada a fármacos entonces, abarca un amplio rango de sistemas biológicos desde bacterias, hongos y protozoarios hasta las complejas células cancerosas humanas, donde en cada uno de ellos, se han aislado y caracterizado diversos homólogos de la Gp-P, ya que esta resistencia generalmente es conferida por bombas de eflujo, por lo que se ha sugerido que la multiresistencia a fármacos (MDR) es una variación de una translocasa regular que simplemente ha ampliado su espectro de sustratos proporcionando a la célula una defensa simple contra las toxinas y xenobióticos que siempre se encuentran en el medio ambiente.<sup>24</sup> Por lo tanto, esta similitud en diseño y la alta incidencia en la evolución, fue el fundamento para la evaluación del potencial modulador de las resinas glicosídicas de la familia las convolvuláceas en células humanas de cáncer de mama

resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin) para posteriormente poder desarrollar este tipo de productos naturales como prototipos seguros y eficaces inhibidores de las bombas de eflujo.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GENERALES

- 3.1.1 Establecer la composición química de las resinas glicosídicas de la especie *Ipomoea alba* con la finalidad de evaluar el potencial modulador de los oligosacáridos obtenidos en células humanas aisladas de cáncer de mama resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin) y así ampliar el conocimiento de la diversidad estructural del género.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Realizar la extracción de las resinas glicosídicas solubles en cloroformo de las semillas de *Ipomoea alba*.
- 3.2.2 Establecer las condiciones instrumentales de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) a nivel analítico y preparativo para lograr la separación y purificación de los constituyentes individuales de naturaleza oligosacárida presentes en el extracto clorofórmico.
- 3.2.3 Identificar a los ácidos glicosídicos mayoritarios presentes en las fracciones de resinas glicosídicas mediante hidrólisis alcalina y a los monosacáridos constitutivos mediante hidrólisis ácida.
- 3.2.4 L  
llevar a cabo la elucidación estructural de los constituyentes presentes en el extracto clorofórmico mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas.
- 3.2.5 E  
valuar la citotoxicidad de los glicolípidos aislados sobre las líneas celulares MCF-7 parental y las MCF-7 resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin) por el método de la sulforodamina B.
- 3.2.6 Evaluar el potencial modulador de los glicolípidos sobre la actividad de la glicoproteína P.

## 4. JUSTIFICACIÓN

Las resinas glicosídicas presentes en plantas del género *Ipomoea* han demostrado ser moduladores del transporte transmembranal de los agentes antineoplásicos revirtiendo el fenómeno de la resistencia a fármacos en células humanas aisladas de cáncer de mama. Por tal motivo, surge la necesidad de ampliar la evaluación *in vitro* de las resinas glicosídicas con el objeto de encontrar mejores moduladores de la multifármaco resistencia dentro de la amplia diversidad estructural de este tipo de productos biodinámicos para seleccionar candidatos que puedan ser canalizados a una posterior evaluación preclínica. Así, el presente trabajo de investigación plantea el aislamiento, la purificación, la elucidación estructural y la evaluación del potencial modulador de los glicolípidos individuales a partir del extracto clorofórmico de las semillas de *Ipomoea alba*.

## 5. PARTE EXPERIMENTAL

### 5.1 Métodos cromatográficos

La cromatografía en capa fina se utilizó para la detección de resinas glicosídicas en los extractos obtenidos, para esto se utilizaron cromatoplasmas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> sobre aluminio reveladas con una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sulfato cérico como agente cromógeno y calentadas sobre una parrilla a una temperatura de 80°C.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) fue empleada para lograr la separación de los constituyentes individuales presentes en el extracto clorofórmico de las semillas de la especie en estudio. Inicialmente, se estudiaron las condiciones a nivel analítico para elegir la mejor condición que permitiera una mayor definición y separación de los picos, para esto se empleó la fase estacionaria de sílica octadecilo y como fase móvil mezclas de acetonitrilo, metanol y agua en diferentes proporciones de manera isocrática. Después estas condiciones se extrapolaron a nivel preparativo para lograr cantidades suficientes de los constituyentes individuales que nos permitieran realizar la caracterización espectroscópica y espectrométrica.

La cromatografía de líquidos de alta eficiencia se realizó en un cromatógrafo marca Waters compuesto de un sistema de liberación de disolventes 600 E, equipado con un detector de índice de refracción modelo 410 integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466/Le, Dell). Aunado a esto, el equipo cuenta con una válvula para lograr la recirculación de la muestra y el disolvente en línea. El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de la información se realizaron por medio del software Empower 2 (Waters).



## 5.2 Determinación de las constantes espectroscópicas y espectrométricas

Los experimentos de resonancia magnética nuclear de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ ) se registraron en equipos Varian Innova operando a una frecuencia de 400 y 500 MHz para  $^1\text{H}$  y de 100 y 125 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Las muestras se registraron con piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en ppm. Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns sin corrección. Las rotaciones ópticas se obtuvieron mediante un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizando metanol o cloroformo como disolvente. Los espectros de masas de baja resolución y alta resolución se registraron en un aparato JEOL SXIO mediante el método de ionización por bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) en el modo negativo sobre una matriz de trietanolamina.

Los espectros de masas de alta resolución, para los cuales se utilizó el método de ionización por electrospray, se determinaron en un equipo Bruker MicrOTOF-Q; las muestras se disolvieron en metanol grado HPLC (0.4 mg/mL) e inyectadas directamente a la fuente de electrospray a una velocidad de flujo de 180  $\mu\text{L}/\text{h}$ , usándose nitrógeno como el gas acarreador. Las muestras se procesaron usando un software Bruker para análisis de datos. Para la técnica de ionización por MALDI, se utilizó un equipo Water-Micromass MicroMX MALDI-TOF equipado con un láser de nitrógeno 20 HX (337 nm, pulso 3 ns) y operando en modo reflectrón. La matriz para la desorción por láser fue el ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico con yoduro de sodio 0.001 M en  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  (1:1).

El análisis por cromatografía de gases-masas (CG-EM) para la identificación de los ácidos orgánicos obtenidos por hidrólisis alcalina de las fracciones, así como para el análisis de carbohidratos se llevó a cabo en un equipo marca Thermo-Electron, usándose una columna DB-5MS, 5%-fenil-metilpolisiloxano (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.1  $\mu\text{m}$ ), como fase estacionaria y He como fase móvil, a una velocidad lineal de 30 cm/s, isotérmico a 50  $^\circ\text{C}$  durante 4 min y con un gradiente lineal de 40  $^\circ\text{C}/\text{min}$  hasta 300  $^\circ\text{C}$ , manteniendo la temperatura final durante 20 minutos. Condiciones: energía de ionización 70 eV, temperatura de la fuente de ionización 250  $^\circ\text{C}$ , temperatura de la interface 270  $^\circ\text{C}$ , rango de masas 45-600 uma.

### 5.3 Material vegetal

El material vegetal consistió en semillas de *Ipomoea alba*, var. *Calonytion* (Moon vine, item # 01052-PK-P1), adquiridas de Park Seed (Greenwood SC, EU) en enero del 2008. Para propósitos de autenticación, 20 semillas se germinaron en tierra y 4 plántulas se cultivaron hasta la madurez bajo condiciones de invernadero. Un ejemplar se depositó en la Colección Etnobotánica del Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU 1143969).

### 5.4 Preparación de los extractos del material vegetal

Las semillas secas se trituraron (363.83 g) y se sometieron a maceración exhaustiva a temperatura ambiente con hexano y cloroformo, los extractos se filtraron y concentraron a sequedad a presión reducida (**Cuadro 1**).

**Cuadro 1. Pesos obtenidos de los extractos**

<b>EXTRACTO</b>	<b>PESO (g)</b>
<b>Hexánico</b>	8
<b>Clorofórmico</b>	6

Ambos extractos se compararon por CCF, utilizando una fase móvil de  $\text{CHCl}_3$ -MeOH (4.1), con una solución de referencia de una colección auténtica de *I. orizabensis*, la cual confirmó la presencia de mezclas de resinas glicosídicas lipofílicas en el extracto clorofórmico. Este último se sometió a un proceso de precipitación con MeOH para obtener las resinas glicosídicas que, posteriormente, se filtraron a presión reducida obteniendo un sólido blanco (5 g).

### 5.5 Fraccionamiento primario del extracto CHCl<sub>3</sub> de las semillas de *Ipomoea alba*

Esta mezcla se resolvió mediante HPLC para establecer las condiciones a nivel analítico, las cuales se extrapolaron a nivel preparativo con la finalidad de lograr la mejor separación de la mezcla compleja de glicolípidos.

#### Condiciones a nivel analítico

**Columna:** Fase reversa C<sub>18</sub>, Symmetry Silica Octadecilo (4.6 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud, 5 μm tamaño de partícula, Waters).

**Fase móvil:** CH<sub>3</sub>CN-MeOH-H<sub>2</sub>O (5:4:1)

**Flujo:** 0.2 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 10 μL

**Concentración de la muestra:** 10 mg/mL

**Disolvente:** MeOH

**Sensibilidad:** 256 RIU

**Tipo de elución:** Isocrática

#### Condiciones a nivel preparativo

**Columna:** Fase reversa C<sub>18</sub>, Symmetry Silica Octadecilo (19 mm de diámetro interno × 300 mm de longitud, 7 μm tamaño de partícula, Waters).

**Fase móvil:** CH<sub>3</sub>CN-MeOH-H<sub>2</sub>O (5:4:1)

**Flujo:** 4.0 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 500 μL

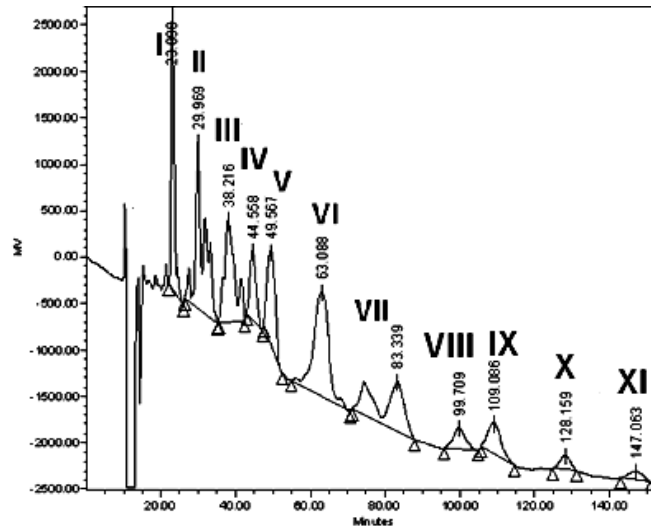
**Concentración de la muestra:** 100 mg/mL

**Disolvente:** MeOH

**Sensibilidad:** 256 RIU

**Tipo de elución:** Isocrática

Los picos generados correspondieron a los siguientes tiempos de retención: **I** ( $t_R=23.1$  min), **II** ( $t_R=29.9$  min), **III** ( $t_R=38.2$  min), **IV** ( $t_R=44.6$  min), **V** ( $t_R=49.6$  min), **VI** ( $t_R=63.1$  min), **VII** ( $t_R=83.3$  min), **VIII** ( $t_R=99.7$  min), **IX** ( $t_R=109.1$  min), **X** ( $t_R=128.2$  min), **XI** ( $t_R=147.1$  min). (**Figura 4**). Cada pico fue colectado utilizándose la técnica de “corte de núcleo” para obtener 11 muestras de menor complejidad.<sup>25</sup> (**Cuadro 2**).



**Figura 4. Cromatograma del extracto clorofórmico de la semillas de *Ipomoea alba* a escala preparativa.** Condiciones instrumentales: Columna  $C_{18}$  ( $19 \times 300$ mm,  $7\mu\text{m}$ ); fase móvil: MeOH- $\text{CH}_3\text{CN}$ - $\text{H}_2\text{O}$  (5:4:1), flujo de elución: 4.0 mL/min; detector: IR, volumen de inyección: 500  $\mu\text{L}$  (0.1 mg/ $\mu\text{L}$ )

## 5.6 Obtención de los albinósidos I-XI

Cada una de las fracciones obtenidas se reinyectaron para su purificación, aplicando la técnica de “rasurado de pico” y “reciclaje” de la muestra a través de la columna utilizando de 10 a 20 ciclos para obtener la máxima separación de los constituyentes que garantizara una pureza del 99%.<sup>25</sup> Se utilizaron dos condiciones para llevar a cabo la purificación de las fracciones:

**Condiciones a nivel preparativo para las fracciones I-IV**

**Columna:** Fase reversa C<sub>18</sub>, Symmetry Silica Octadecilo (19 mm de diámetro interno × 300 mm de longitud, 7 μm tamaño de partícula, Waters).

**Fase móvil:** MeOH-CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O (5:3.5:1.5)

**Flujo:** 9.0 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 500 μL

**Concentración de la muestra:** 100 mg/mL

**Disolvente:** MeOH

**Sensibilidad:** 256 RIU

**Tipo de elución:** Isocrática

**Condiciones a nivel preparativo para las fracciones V-XI**

**Columna:** Fase reversa C<sub>18</sub>, Symmetry Silica Octadecilo (19 mm de diámetro interno × 300 mm de longitud, 7 μm tamaño de partícula, Waters).

**Fase móvil:** MeOH-CH<sub>3</sub>CN (7:3)

**Flujo:** 8.5 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 500 μL

**Concentración de la muestra:** 100 mg/mL

**Disolvente:** MeOH

**Sensibilidad:** 256 RIU

**Tipo de elución:** Isocrática

**Albinósido I (1, pico I):** Sólido amorfo blanco; p.f. 160-165 °C;  $[\alpha]_{589} -38.3$ ,  $[\alpha]_{578} -40.0$ ,  $[\alpha]_{546} -44.16$ ,  $[\alpha]_{436} -75.0$ ,  $[\alpha]_{365} -115.0$  (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Cuadros 11 y 12**); FABMS (modo negativo): *m/z* 1113 [M – H]<sup>–</sup>, 1013 [M – H – C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (niloil éster)]<sup>–</sup>, 971 [1013 – C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (acetil éster)]<sup>–</sup>, 825 [971 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 679 [825 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 533 [679 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 389 [533 + H<sub>2</sub>O – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (hexosa)]<sup>–</sup>, 243 [389 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>; HRESIMS (modo negativo) *m/z* 1149.5129 [M + Cl]<sup>–</sup> (calculada para C<sub>51</sub>H<sub>86</sub>O<sub>26</sub>Cl requiere 1149.5095).

**Albinósido II (2, pico VIII):** Sólido amorfo blanco; p.f. 152-155 °C;  $[\alpha]_{589} -56.0$ ,  $[\alpha]_{578} -58.0$ ,  $[\alpha]_{546} -65.0$ ,  $[\alpha]_{436} -105.0$ ,  $[\alpha]_{365} -146.0$  (*c* 1.0, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Cuadros 11 y 12**); FABMS (modo negativo):  $m/z$  1119  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1037  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_6\text{O}$  (tigloil éster)] $^-$ , 891  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 745  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 663  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_6\text{O}$  (tigloil éster)] $^-$ , 517  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 389  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 243  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ ; HRFABMS  $m/z$  1119.5582  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calculada para  $\text{C}_{54}\text{H}_{87}\text{O}_{24}$  requiere 1119.5587).

**Albinósido III (3, pico X):** Sólido amorfo blanco; p.f. 146-150 °C;  $[\alpha]_{589} -21.6$ ,  $[\alpha]_{578} -22.4$ ,  $[\alpha]_{546} -25.6$ ,  $[\alpha]_{436} -40.8$ ,  $[\alpha]_{365} -57.0$  (*c* 1.0, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Cuadros 11 y 12**); FABMS (modo negativo):  $m/z$  1163  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1081  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_6\text{O}$  (tigloil éster)] $^-$ , 935  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 853  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_6\text{O}$  (tigloil éster)] $^-$ , 707  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 561  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 417  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$  (hexosa)] $^-$ , 271  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ ; HRFABMS  $m/z$  1163.6208  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calculada para  $\text{C}_{57}\text{H}_{95}\text{O}_{24}$  requiere 1163.6213).

**Albinósido IV (4, pico III):** Sólido amorfo blanco; p.f. 143-146 °C  $[\alpha]_{589} -31.4$ ,  $[\alpha]_{578} -32.9$ ,  $[\alpha]_{546} -36.4$ ,  $[\alpha]_{436} -60.0$ ,  $[\alpha]_{365} -90.0$  (*c* 1.0, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Cuadros 11 y 12**); FABMS (modo negativo):  $m/z$  1053  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 971  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_6\text{O}$  (tigloil éster)] $^-$ , 825  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 679  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 679  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 389  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5$  (hexosa)] $^-$ , 243  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ ; HRESIMS  $m/z$  1053. 5139  $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calculada para  $\text{C}_{49}\text{H}_{81}\text{O}_{24}$  requiere 1053.5117).

**Albinósido V (5, pico V):** Sólido amorfo blanco; p.f. 136-140 °C;  $[\alpha]_{589} -17.5$ ,  $[\alpha]_{578} -18.3$ ,  $[\alpha]_{546} -20.8$ ,  $[\alpha]_{436} -32.5$ ,  $[\alpha]_{365} -47.5$  (*c* 1.0, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Cuadros 11 y 12**); FABMS (modo negativo):  $m/z$  1137  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 1037  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$  (niloil éster)] $^-$ , 891  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 809  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_6\text{O}$  (tigloil éster)] $^-$ , 663  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 517  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 389  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ , 243  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$  (metilpentosa)] $^-$ ; HRESIMS 1137.5712  $m/z$   $[\text{M} - \text{H}]^-$  (calculada para  $\text{C}_{54}\text{H}_{89}\text{O}_{25}$  requiere 1137.5692).

**Albinósido VI (6, pico II):** Sólido amorfo blanco; p.f. 148-152 °C;  $[\alpha]_{589} -84.0$ ,  $[\alpha]_{578} -78.0$ ,  $[\alpha]_{546} -87.0$ ,  $[\alpha]_{436} -131.0$ ,  $[\alpha]_{365} -183.0$  (*c* 1.0, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  (**Cuadros 13 y 14**); FABMS (modo negativo):  $m/z$  967  $[\text{M} - \text{H}]^-$ , 867  $[\text{M} - \text{H} - \text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$  (niloil

éster)]<sup>-</sup>, 679 [867 - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (acetil éster) - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 533 [679 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 389 [533 + H<sub>2</sub>O - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (hexosa)]<sup>-</sup>, 243 [389 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>; HRESIMS (modo negativo) *m/z* 991.4726 [M + Na]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>45</sub>H<sub>75</sub>O<sub>22</sub>Na requiere 991.4647).

**Albinósido VII (7, pico IV):** Sólido amorfo blanco; p.f. 142-145 °C; [α]<sub>589</sub>-103.8, [α]<sub>578</sub>-86.9, [α]<sub>546</sub>-99.2, [α]<sub>436</sub>-147.7, [α]<sub>365</sub>-206.2 (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Cuadros 13 y 14**); FABMS (modo negativo): *m/z* 951 [M - H]<sup>-</sup>, 851 [M - H - C<sub>5</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub> (niloil éster)]<sup>-</sup>, 809 [851 - C<sub>2</sub>H<sub>2</sub>O (acetil éster)]<sup>-</sup>, 663 [809 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 517 [663 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 389 [517 + H<sub>2</sub>O - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 243 [389 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>; HRESIMS *m/z* 975.4777 [M + Na]<sup>+</sup> (calculada para C<sub>45</sub>H<sub>75</sub>O<sub>21</sub>Na requiere 975.4698).

**Albinósido VIII (8, pico VI):** Sólido amorfo blanco; p.f. 132-135 °C; [α]<sub>589</sub>-20.0, [α]<sub>578</sub>-21.6, [α]<sub>546</sub>-23.2, [α]<sub>436</sub>-36.8, [α]<sub>365</sub>-53.7 (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Cuadros 13 y 14**); FABMS (modo negativo): *m/z* 989 [M - H]<sup>-</sup>, 907 [M - H - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 825 [907 - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 679 [825 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 533 [679 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 389 [533 + H<sub>2</sub>O - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (hexosa)]<sup>-</sup>, 243 [389 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>; HRESIMS *m/z* 989.4998 [M - H]<sup>-</sup> (calculada para C<sub>48</sub>H<sub>77</sub>O<sub>21</sub> requiere 989.4957).

**Albinósido IX (9, pico VII):** Sólido amorfo blanco; p.f. 128-131 °C; [α]<sub>589</sub>-11.7, [α]<sub>578</sub>-12.0, [α]<sub>546</sub>-13.7, [α]<sub>436</sub>-20.6, [α]<sub>365</sub>-26.2 (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Cuadros 13 y 14**); FABMS (modo negativo): *m/z* 973 [M - H]<sup>-</sup>, 891 [M - H - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 809 [891 - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 663 [809 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 517 [663 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 389 [517 + H<sub>2</sub>O - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 243 [389 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>; HRESIMS *m/z* 973.5081 [M - H]<sup>-</sup> (calculada para C<sub>48</sub>H<sub>77</sub>O<sub>20</sub> requiere 973.5008).

**Albinósido X (10, pico IX):** Sólido amorfo blanco; p.f. 132-135 °C; [α]<sub>589</sub>-9.0, [α]<sub>578</sub>-9.5, [α]<sub>546</sub>-11.3, [α]<sub>436</sub>-15.9, [α]<sub>365</sub>-19.5 (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Cuadros 13 y 14**); FABMS (modo negativo): *m/z* 1017 [M - H]<sup>-</sup>, 935 [M - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 853 [935 - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 707 [853 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 561 [707 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 417 [561 + H<sub>2</sub>O - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (hexosa)]<sup>-</sup>, 271 [417 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub>

(metilpentosa)]<sup>-</sup>; HRFABMS  $m/z$  1017.5265 [M - H]<sup>-</sup> (calculada para C<sub>50</sub>H<sub>81</sub>O<sub>21</sub> requiere 1017.5270).

**Albinósido XI (11, pico XI):** Sólido amorfo blanco; p.f. 138-140 °C;  $[\alpha]_{589} -13.3$ ,  $[\alpha]_{578} -13.8$ ,  $[\alpha]_{546} -15.7$ ,  $[\alpha]_{436} -22.9$ ,  $[\alpha]_{365} -29.5$  (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (**Cuadros 13 y 14**); FABMS (modo negativo):  $m/z$  1001 [M - H]<sup>-</sup>, 921 [M - H - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 837 [919 - C<sub>5</sub>H<sub>6</sub>O (tigloil éster)]<sup>-</sup>, 691 [837 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 545 [691 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 417 [545 + H<sub>2</sub>O - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>, 271 [417 - C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>-</sup>; HRESIMS  $m/z$  1001.5392 [M - H]<sup>-</sup> (calculada para C<sub>50</sub>H<sub>81</sub>O<sub>20</sub> requiere 1001.5321).

## 5.7 Preparación de derivados de los albinósidos I-III

### 5.7.1 Obtención de los ácidos glicosídicos

Entre 8 y 9.5 mg de **1-3** se trataron con 0.5-0.75 mL de KOH al 5% de manera independiente bajo condiciones de reflujo a 95°C durante tres horas. Al final de la reacción, la mezcla se aciduló con HCl 4N hasta un pH de 5.0 y se extrajo con cloroformo (2 × 20 mL) y acetato de etilo (2 × 20 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua destilada, se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se concentraron a presión reducida, proporcionando una mezcla de ácidos grasos que se analizó por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Por otra parte, las fases acuosas se extrajeron con *n*-butanol (2 × 20 mL), las fases orgánicas se secaron con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y se evaporaron a vacío para proporcionar los ácidos glicosídicos correspondientes (**Cuadro 2**), los cuales se analizaron por espectrometría de masas mediante bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) en el modo negativo.



**Cuadro 2. Cantidades obtenidas de los ácidos glicosídicos**

Compuesto	Cantidad hidrolizada (mg)	Fracción butanólica (mg)
<b>1</b>	8	7
<b>2</b>	9	8.5
<b>3</b>	9.5	8.5

**Ácido albinosínico A (1a, albinósido I):** Sólido amorfo blanco; p.f. 148-150 °C;  $[\alpha]_{589} -27.6$ ,  $[\alpha]_{578} -29.2$ ,  $[\alpha]_{546} -33.0$ ,  $[\alpha]_{436} -54.6$ ,  $[\alpha]_{365} -83.0$  (*c* 1.0, MeOH); FABMS (modo negativo): *m/z* 989 [M – H]<sup>–</sup>, 843 [989 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 697 [843 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 551 [697 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 389 [551 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (hexosa)]<sup>–</sup>, 243 [389 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>; HRFABMS *m/z* 989.4799 [M – H]<sup>–</sup> (calculada para C<sub>44</sub>H<sub>77</sub>O<sub>24</sub> requiere 989.4804).

**Ácido albinosínico B (2a, albinósido II):** Sólido amorfo blanco; p.f. 146-148 °C;  $[\alpha]_{589} -25.0$ ,  $[\alpha]_{578} -26.6$ ,  $[\alpha]_{546} -30.0$ ,  $[\alpha]_{436} -46.6$ ,  $[\alpha]_{365} -71.6$  (*c* 1.0, MeOH); FABMS (modo negativo): *m/z* 973 [M – H]<sup>–</sup>, 827 [973 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 681 [827 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 535 [681 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 389 [535 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 243 [389 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>; HRFABMS *m/z* 973.4850 [M – H]<sup>–</sup> (calculada para C<sub>44</sub>H<sub>77</sub>O<sub>23</sub> requiere 973.4855).

**Ácido albinosínico C (3a, albinósido III):** Sólido amorfo blanco; p.f. 142-144 °C;  $[\alpha]_{589} -36.4$ ,  $[\alpha]_{578} -37.5$ ,  $[\alpha]_{546} -42.1$ ,  $[\alpha]_{436} -69.2$ ,  $[\alpha]_{365} -106.0$  (*c* 1.0, MeOH); FABMS (modo negativo): *m/z* 1017 [M – H]<sup>–</sup>, 871 [1017 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 725 [871 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 579 [725 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>, 417 [579 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub> (hexosa)]<sup>–</sup>, 271 [417 – C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>4</sub> (metilpentosa)]<sup>–</sup>; HRFABMS *m/z* 1017.5112 [M – H]<sup>–</sup> (calculada para C<sub>46</sub>H<sub>81</sub>O<sub>24</sub> requiere 1017.5117).

### 5.7.2 Preparación de los ácidos glicosídicos peracetilados

Los productos de hidrólisis alcalina de los compuestos **1a** (IA1-OH), **2a** (IA2-OH) y **3a** (IA3-OH) se sometieron a una reacción de acetilación, utilizando anhídrido acético y piridina (2:1). Las mezclas de reacción permanecieron en agitación por 48 horas y se monitorearon mediante cromatografía en capa fina. A continuación, se realizó el siguiente tratamiento para cada una de las mezclas de reacción. Se adicionaron 5 mL de agua fría, luego se realizó una extracción con acetato de etilo ( $3 \times 10$  mL). La fase orgánica se sometió a un proceso de extracción con una solución de ácido clorhídrico (0.1 N,  $2 \times 5$  mL), seguido de un tratamiento alcalino con una solución de bicarbonato de sodio ( $\text{NaHCO}_3$ ,  $2 \times 5$  mL). Adicionalmente, la fase orgánica se lavó con agua ( $2 \times 5$  mL), se secó con  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y se concentró a presión reducida. (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3. Cantidades obtenidas de los compuestos acetilados**

Compuesto	Cantidad (mg)	Producto (mg)
<b>1a</b>	5	6.5
<b>2a</b>	6	7.0
<b>3a</b>	6.5	7.5

### 5.7.3 Preparación de diazometano

5 g de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida (Diazald) en 45 mL de éter se adicionaron lentamente a una solución de 5 g de KOH, 8 mL de agua y 10 mL de etanol (95 %). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación y con calentamiento a 60 °C. A medida que se adicionaba la diazald se generaba el diazometano mediante destilación, colectándose en un matraz que contenía 5 mL de éter en baño de hielo.

#### 5.7.4 Preparación de los ésteres metílicos peracetilados

6.5 mg de IA1-OHA, 7.0 mg de IA2-OHA y 7.5 mg de IA3-OHA se disolvieron en 5 mL de metanol, luego se adicionó gota a gota un exceso de la solución etérea de diazometano manteniendo la temperatura a 0 °C. El agente alquilante se adicionó hasta que cesó la emisión del gas nitrógeno en la mezcla de reacción. A continuación, la reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina. Por último, cuando se observó la completa desaparición del color amarillo, el disolvente se concentró a sequedad (**Cuadro 4**).

**Cuadro 4. Cantidades obtenidas de los ésteres metílicos peracetilados**

Compuesto	Cantidad (mg)	Producto (mg)
<b>1a</b>	6.5	8
<b>2a</b>	7.0	9
<b>3a</b>	7.5	8.5

#### 5.7.5 Purificación de los ésteres metílicos peracetilados

Para lograr la purificación de los ácidos glicosídicos peracetilados y metilados (IA1-HAM, IA2-HAM y IA3-HAM) se hizo uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, de tal manera que fue necesario encontrar las condiciones a nivel analítico y semipreparativo que permitieran la obtención de los productos a través de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje en cantidades suficientes para su identificación espectroscópica y espectrométrica.

##### Condiciones a nivel analítico

**Columna:** Fase reversa C<sub>18</sub>, Symmetry Silica Octadecilo (4.6 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud, 5 μm tamaño de partícula, Waters)

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

**Flujo:** 0.4 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 10  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 10 mg/mL

**Disolvente:** Acetonitrilo

**Sensibilidad:** 128 RIU

**Tipo de elución:** Isocrático

### Condiciones a nivel semipreparativo

**Columna:** Fase reversa C<sub>18</sub>, Symmetry Silica Octadecilo (19 mm de diámetro interno  $\times$  150 mm de longitud, 7  $\mu$ m tamaño de partícula, Waters)

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

**Flujo:** 4.0 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 100  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 80 mg/mL

**Disolvente:** Acetonitrilo

**Sensibilidad:** 128 RIU

**Tipo de elución:** Isocrático

**Peracetato del éster metílico del ácido albinosínico A (1a.1):** Sólido amorfo blanco; p.f. 99-101 °C;  $[\alpha]_{589} -5.7$ ,  $[\alpha]_{578} -5.7$ ,  $[\alpha]_{546} -7.1$ ,  $[\alpha]_{436} -10.0$ ,  $[\alpha]_{365} -15.0$  (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Cuadros 9 y 10); MALDIMS (modo positivo): *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> 1531.

**Peracetato del éster metílico del ácido albinosínico B (2a.1):** Sólido amorfo blanco; p.f. 89-92 °C;  $[\alpha]_{589} -2.5$ ,  $[\alpha]_{578} -2.5$ ,  $[\alpha]_{546} -5.0$ ,  $[\alpha]_{436} -10.0$ ,  $[\alpha]_{365} -18.7$  (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Cuadros 9 y 10); MALDIMS (modo positivo): *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> 1473.

**Peracetato del éster metílico del ácido albinosínico C (3a.1):** Sólido amorfo blanco; p.f. 78-80 °C;  $[\alpha]_{589} -4.0$ ,  $[\alpha]_{578} -6.0$ ,  $[\alpha]_{546} -8.0$ ,  $[\alpha]_{436} -8.0$ ,  $[\alpha]_{365} -12.0$  (*c* 1.0, MeOH); RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C (Cuadros 9 y 10). MALDIMS (modo positivo): *m/z* [M + Na]<sup>+</sup> 1559.

## 5.7.6 Análisis de carbohidratos

### 5.7.6.1 Hidrólisis ácida

Las fracciones I, VIII y X (15 mg de cada una, correspondientes a las fracciones donde se obtuvieron los albinósidos I-III) se sometieron a hidrólisis ácida. Se adicionaron 10 mL de HCl 4N, las mezclas se calentaron a reflujo a 90 °C durante 2 horas. Posteriormente, se diluyeron con 5 mL de agua y se extrajeron con éter etílico (3 × 10 mL). Las fases acuosas se neutralizaron con KOH 1N y se extrajeron con *n*-butanol (3 × 10 mL). Las fases butanólicas se lavaron con agua (2 × 5 mL) y se concentraron hasta sequedad para obtener 13 mg de una mezcla de monosacáridos.

### 5.7.6.2 Preparación de los derivados sililados

La sililación de las mezclas de monosacáridos (1.5 mg) se realizó mediante un tratamiento con 0.1 mL del reactivo SIGMA SIL-A, una mezcla de trimetilclorosilano-hexametildisilazano-piridina (1:3:9), a una temperatura de 70 °C durante 5 minutos.<sup>26</sup> De manera adicional, se prepararon los derivados *O*-sililados (éteres de TMS) de muestras estándares (0.5 mg) de L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa y D-glucosa (Sigma) siguiendo el mismo procedimiento. Los tiempos de retención en la cromatografía de gases para estos derivados sililados correspondieron a 5.25 min para la ramnosa, 5.47 min para la fucosa, 6.17 min para la quinovosa y 7.15 min para la glucosa.

### 5.7.6.3 Preparación de los derivados tiazolidínicos

La mezcla de monosacáridos fue derivatizada con L-cisteína para formar las tiazolidinas correspondientes, las cuales se obtuvieron mediante la reacción de 1.5 mg de la mezcla de monosacáridos con 150 µL de clorhidrato de L-cisteína en piridina durante 1 hora a 60 °C.<sup>27</sup> Una vez transcurrido ese tiempo, se llevó a cabo la reacción de sililación siguiendo el procedimiento descrito anteriormente (Inciso 5.7.6.2).<sup>26</sup> De la misma manera, se prepararon los derivados de tiazolidinas de mezclas de estándares de L-ramnosa, D-

quinovosa, D-glucosa y D-fucosa (Sigma) que se analizaron mediante CG-EM después de su derivatización como éteres de TMS.

### 5.7.7 Identificación de las agliconas

Las fases orgánicas de cada una de las fracciones hidrolizadas, se derivatizaron con  $\text{CH}_2\text{N}_2$  para después ser sometidas a una purificación por HPLC en fase normal.

#### Condiciones a nivel semipreparativo

**Columna:** Fase normal, ISCO (21.2 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, 10  $\mu\text{m}$  de diámetro interno)

**Fase móvil:** Hexano- $\text{CHCl}_3$ - $\text{ME}_2\text{CO}$  (6.3.1)

**Flujo:** 6.0 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 100  $\mu\text{L}$

**Concentración de la muestra:** 50 mg/mL

**Disolvente:**  $\text{CHCl}_3$

**Sensibilidad:** 128 RIU

**Tipo de elución:** Isocrático

Se obtuvieron 3.0 mg (fracción I) y 3.5 mg (fracción VIII) del metil-11S-hidroxitetradecanoato (metil éster del ácido convolvulinólico) respectivamente y 2.0 mg (fracción X) del metil-11S-hidroxihexadecanoato (metil éster del ácido jalapinólico). Estos se caracterizaron por RMN y posteriormente derivatizados con SIGMA SIL-A, una mezcla de trimetilclorosilano-hexametildisilazano-piridina (1:3:9), durante 5 min a 70 °C.<sup>28</sup>

**Metil-(11S)-hidroxitetradecanoato (metil éster del ácido convolvulinólico):**  $t_R$  18.6 min; p.f. 27–29 °C;  $[\alpha]_{589} +1.5$  (c 2.0,  $\text{CHCl}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR 174.4, 71.7, 51.5, 39.6, 37.5, 34.1, 29.6, 29.5, 29.3, 29.2, 29.1, 25.6, 24.9, 18.8, 14.1.

**Metil-(11S)-hidroxihexadecanoato (metil éster del ácido jalapinólico):**  $t_R$  16.4 min; p.f. 42–44 °C;  $[\alpha]_{589} +7.3$  (c 2.0,  $\text{CHCl}_3$ );  $^{13}\text{C}$  NMR 174.4, 72.0, 51.4, 37.5, 37.4, 34.1, 31.9, 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1, 25.6, 25.3, 24.9, 22.6, 14.1.

### 5.7.8 Determinación de la configuración absoluta del ácido nílico

La fase orgánica producto de la hidrólisis alcalina de **1** se trató con trietilamina (2 gotas) y 25 mg de bromuro de *p*-bromo-fenacilo en 5 mL de acetona seca durante dos horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se concentró a sequedad y se resuspendió en 10 mL de H<sub>2</sub>O para después extraerse con 20 mL Et<sub>2</sub>O. La fase orgánica resultante se analizó por HPLC.<sup>25</sup> Este procedimiento fue usado para confirmar la configuración absoluta del ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico. Nilato de *p*-bromo-fenacilo,  $t_R = 16.2$  min (Figura 5).

#### Condiciones a nivel analítico

**Columna:** Fase normal, sílice  $\mu$ porasil (3.9 mm de diámetro interno  $\times$  300 mm de longitud, 10  $\mu$ m tamaño de partícula, Waters)

**Fase móvil:** Hexano-Acetato de etilo (7:3)

**Flujo:** 0.4 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

**Volumen de inyección:** 10  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 10 mg/mL

**Disolvente:** Acetato de etilo

**Sensibilidad:** 128 RIU

**Tipo de elución:** Isocrático

#### Condiciones a nivel semi-preparativo

**Columna:** Fase normal, sílice  $\mu$ porasil (19 mm de diámetro interno  $\times$  150 mm de longitud, 10  $\mu$ m tamaño de partícula, Waters)

**Fase móvil:** Hexano-Acetato de etilo (7:3)

**Flujo:** 4.75 mL/min

**Detector:** Índice de refracción

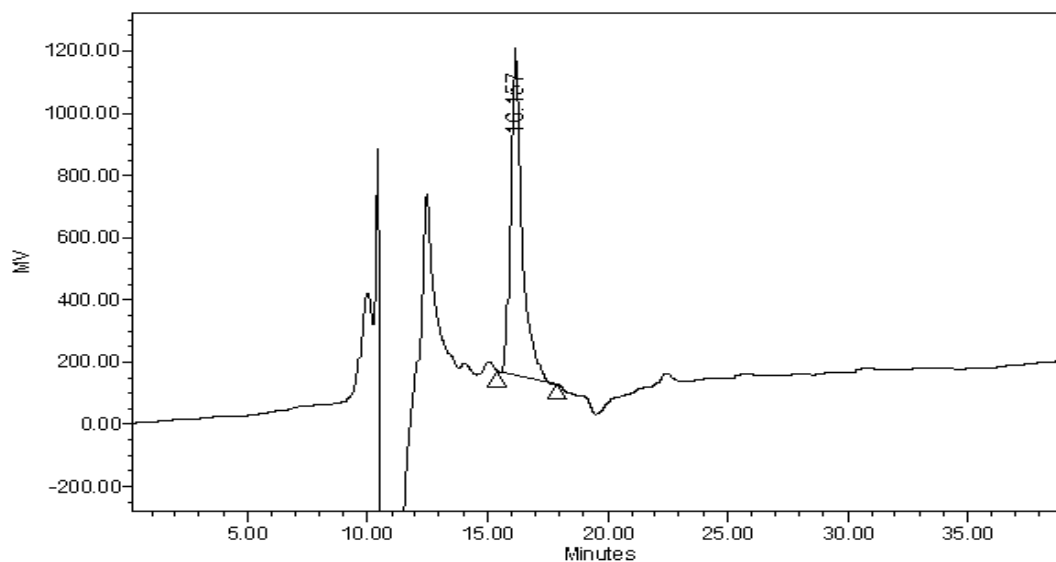
**Volumen de inyección:** 100  $\mu$ L

**Concentración de la muestra:** 100 mg/mL

**Disolvente:** Acetato de etilo

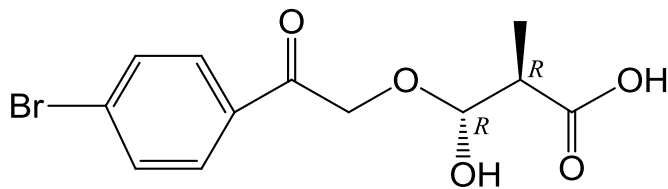
**Sensibilidad:** 128 RIU

**Tipo de elución:** Isocrático



**Figura 5. Cromatograma a nivel semipreparativo del nilato de *p*-bromo-fenacilo**

**(2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutirato-4-bromo-fenacilo:** Sólido cristalino blanco. p.f. 56-59 °C;  $[\alpha]_{589} -6.0$ , (c 1.0 CHCl<sub>3</sub>): CG-EM  $m/z$  118 (2.0), 115 (10), 101 (20), 84 (12), 73 (70), 60 (100).





## 5.8 Evaluación biológica

### 5.8.1 Líneas y cultivos celulares

El medio RPMI 1640 y el SFB se adquirieron en Gibco®, mientras que la Sulforodamina B, reserpina y vinblastina en Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La línea celular MCF-7 parental derivada de cáncer de mama se obtuvo de la American Type Culture Collection (ATCC HTB-22). La contraparte resistente MCF-7/Vin se desarrolló a través de exposición continua y creciente del agente citotóxico vinblastina durante tres años consecutivos.<sup>8</sup> Todas las células se mantuvieron en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en aire y 100% de humedad. Para mantener la resistencia a vinblastina, las células MCF-7/Vin<sup>+</sup> se cultivaron en medio conteniendo 0.192 µg/mL vinblastina. Al mismo tiempo, se mantuvieron células MCF-7/Vin<sup>-</sup> en medio libre de vinblastina.<sup>8</sup>

### 5.8.2 Ensayos de citotoxicidad

La citotoxicidad y el factor de reversión de los glicolípidos evaluados (**1-11**) se determinaron con el método de la SRB. Las células se cosecharon hasta la fase logarítmica de su ciclo de crecimiento y se trataron por triplicado con varias concentraciones de los compuestos de prueba (0.2 – 25 µg/mL) y se incubaron por 72 h a 37 °C en atmósfera de 100% humedad y 5% de CO<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos se expresaron como la concentración que inhibe el 50% del control de crecimiento después del periodo de incubación (CI<sub>50</sub>). Los valores se estimaron a partir de una curva semilogarítmica de la concentración del fármaco (µg/mL) contra el porcentaje de inhibición de crecimiento. La vinblastina se utilizó como un control positivo.<sup>8</sup>

### 5.8.3 Ensayos de modulación

Los efectos de modulación se determinaron con el mismo método que para los ensayos de citotoxicidad. Las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin se sembraron en placas de 96 pozos y se trataron con varias concentraciones de vinblastina (0.00064 – 10  $\mu\text{g/mL}$ ) en presencia o ausencia de glicolípidos a 25 y 5  $\mu\text{g/mL}$  por 72 h. La actividad de los glicolípidos como potenciadores de la citotoxicidad de la vinblastina se midió a partir de la obtención de la  $\text{CI}_{50}$ . En estos experimentos se utilizó reserpina (5  $\mu\text{g/mL}$ ) como control positivo. El factor de reversión (FR, como un parámetro de potencia) se calculó dividiendo la  $\text{CI}_{50}$  de la vinblastina entre la  $\text{CI}_{50}$  de la vinblastina en presencia del compuesto de prueba.<sup>8</sup>

## 6. RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 Fraccionamiento del extracto clorofórmico

El extracto clorofórmico de las semillas de *Ipomoea alba* se sometió a una precipitación con MeOH para lograr una fracción de resinas glicosídicas, la cual se resolvió mediante HPLC en fase reversa. A través de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje de la muestra a nivel preparativo se logró la obtención de once compuestos denominados albinósidos I-XI (**1-11**), que representan resinas glicosídicas de estructura novedosa. (**Cuadro 5**).

**Cuadro 5. Cantidades obtenidas de la separación a escala preparativa**

Fracciones	Cantidad (mg)
I	58.3
II	307.3
III	260.6
IV	151.1
V	214.6
VI	325.6
VII	297.0
VIII	74.0
IX	112.9
X	68.7
XI	21.3

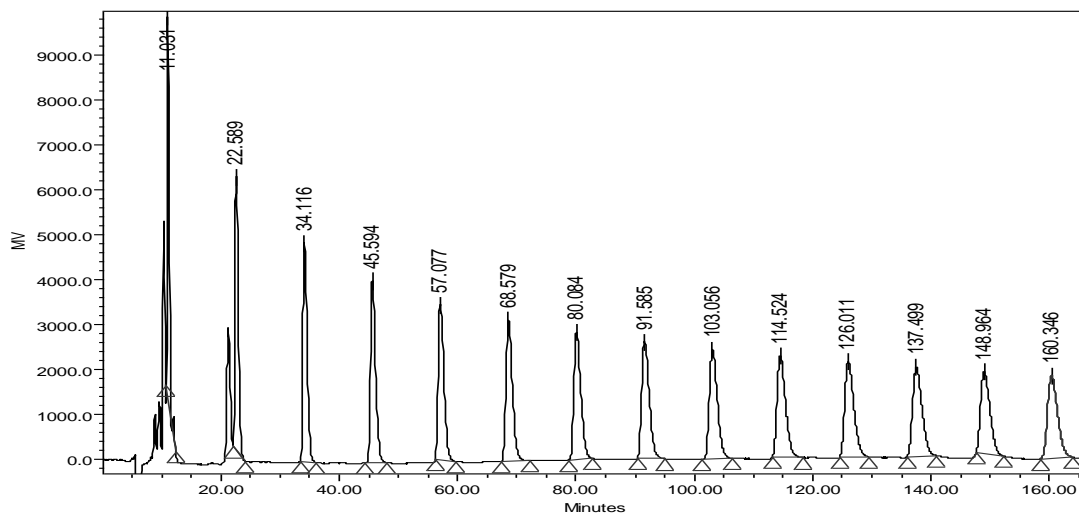
### 6.2 Purificación de los glicolípidos individuales

El reciclaje de las fracciones I-XI permitió la purificación de los compuestos **1-11**. La **figura 6** ilustra la purificación de la fracción I mediante el empleo de la cromatografía de líquidos, a través de la técnica de “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra” para la purificación del albinósido I. Cabe mencionar que las condiciones descritas (Parte Experimental, inciso 5.6) se aplicaron para la adecuada purificación de cada una de las subfracciones. Para las subfracciones más lipofílicas, se decidió eliminar el agua de la fase móvil y aumentar la velocidad de flujo con la finalidad de disminuir el tiempo de retención.

En el **Cuadro 6** se enumeran las cantidades obtenidas para cada uno de los compuestos purificados.

**Cuadro 6. Cantidades obtenidas de los compuestos aislados**

Fracción	Clave	Nombre Compuesto	Cantidad (mg)
<b>I</b>	IA-1	<b>Albinósido I</b>	19
<b>II</b>	IA-2	Albinósido VI	16.3
<b>III</b>	IA-3	Albinósido IV	10
<b>IV</b>	IA-4	Albinósido VII	28
<b>V</b>	IA-5	Albinósido V	10
<b>VI</b>	IA-6	Albinósido VIII	23.4
<b>VII</b>	IA-7	Albinósido IX	18.5
<b>VIII</b>	IA-8	<b>Albinósido II</b>	18.1
<b>IX</b>	IA-9	Albinósido X	39.1
<b>X</b>	IA-10	<b>Albinósido III</b>	16.1
<b>XI</b>	IA-11	Albinósido XI	11.5



**Figura 6. Purificación del albinósido I.** Condiciones instrumentales: Columna C<sub>18</sub> (19 × 300 mm, 7 μm); fase móvil: MeOH- CH<sub>3</sub>CN -H<sub>2</sub>O (5:3.5:1.5), flujo de elución: 9.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: 500 μL (0.1 mg/μL).

### 6.3 Identificación de las agliconas

Mediante la reacción de hidrólisis alcalina de los albinósidos I-III (**1-3**), se liberaron los ácidos grasos que se encuentran esterificando los núcleos oligosacáridos de las resinas glicosídicas originales (ácido acético y ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico en **1** y ácido tíglico en **2** y **3**), los cuales se analizaron mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas. Este análisis se realizó a través de la comparación de los patrones de fragmentación obtenidos para cada uno de los picos eluidos con los patrones de fragmentación de muestras auténticas (**Cuadro 7**).<sup>28</sup>

**Cuadro 7. Identificación de los ácidos grasos mediante CG-EM**

Ácido Orgánico	$t_R$ (min)	$m/z$
Ácido acético	2.81	[M] <sup>+</sup> 60 (65), 45 (80), 43 (100), 29 (19), 15 (25)
Ácido 3-hidroxi-2-metilbutírico	7.95	[M] <sup>+</sup> 118 (2.0), 115 (10), 101 (20), 84 (12), 73 (70), 60 (100)
Ácido tíglico	6.95	[M] <sup>+</sup> 100 (30), 83 (18), 79 (38), 77 (40), 73 (100), 65 (9), 55 (22)

Mediante la reacción de hidrólisis ácida de las fracciones I, VIII y X, se liberaron los ácidos grasos hidroxilados que forman las macrolactonas en las resinas glicosídicas, los cuales se recuperaron de la fase orgánica para ser derivatizados con CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> y ser analizados mediante HPLC (Parte Experimental, inciso 5.7.7). Posteriormente se llevó a cabo la obtención de los derivados sililados, con el objetivo de analizarlos mediante la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (**Cuadro 8**).<sup>28</sup>

**Cuadro 8. Identificación de los ácidos grasos hidroxilados mediante CG-EM**

Derivado Sililado	$t_R$ (min)	$m/z$
Ácido convolvulinólico	7	[M] <sup>+</sup> 330 (0.3), 315 (3.5), 287 (66.8), 145 (100), 73 (35.4)
Ácido jalapinólico	12.8	[M] <sup>+</sup> 358 (0.3), 343 (0.5), 311 (10.5), 287 (59.7), 173 (100), 73 (46.3)

#### 6.4 Purificación de los ácidos glicosídicos derivatizados

Se llevó a cabo la derivatización de los productos obtenidos de la hidrólisis alcalina de los albinósidos I-III (**1-3**), para facilitar la purificación y caracterización estructural de cada uno de los ácidos glicosídicos constitutivos. Con este propósito, se prepararon los derivados peracetilados **1a-3a** a través de la reacción con anhídrido acético y piridina (Parte experimental, inciso 5.7.2). Posteriormente, se realizó la reacción de metilación del grupo carboxilo de la aglicona con diazometano. Una vez obtenidos los productos peracetilados-metilados (**1a.1-3a.1**) de los ácidos glicosídicos correspondientes, se empleó de la técnica de cromatografía de líquidos para su purificación. Las condiciones instrumentales a nivel analítico (Parte experimental, inciso 5.7.5) permitieron determinar los tiempos de retención de los productos obtenidos. Las condiciones más adecuadas se extrapolaron a nivel preparativo (Parte experimental, inciso 5.7.5) con la finalidad de lograr la separación y purificación de los derivados.

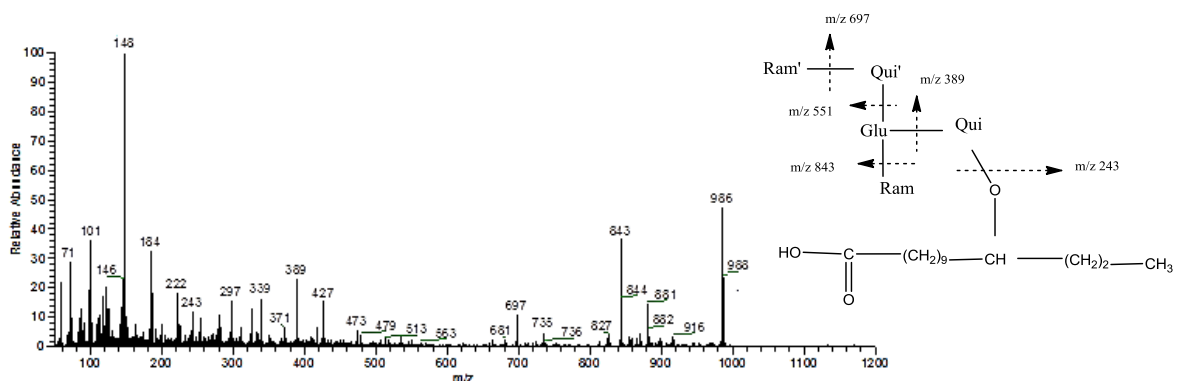
Así en la escala preparativa, se generaron los siguientes picos correspondientes a los ésteres metílicos peracetilados de los ácidos albinosínicos A-C (**1a.1-3a.1**):  $t_R = 18.43$  min, 18.98 min y 21.14 min, respectivamente. Los picos mayoritarios se purificaron a través de las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo, en combinación con el rasurado y el reciclaje del pico<sup>25</sup> durante 5-9 ciclos.

#### 6.5 Identificación estructural de los derivados peracetilados-metilados de los ácidos albinosínicos A-C (**1a.1-3a.1**)

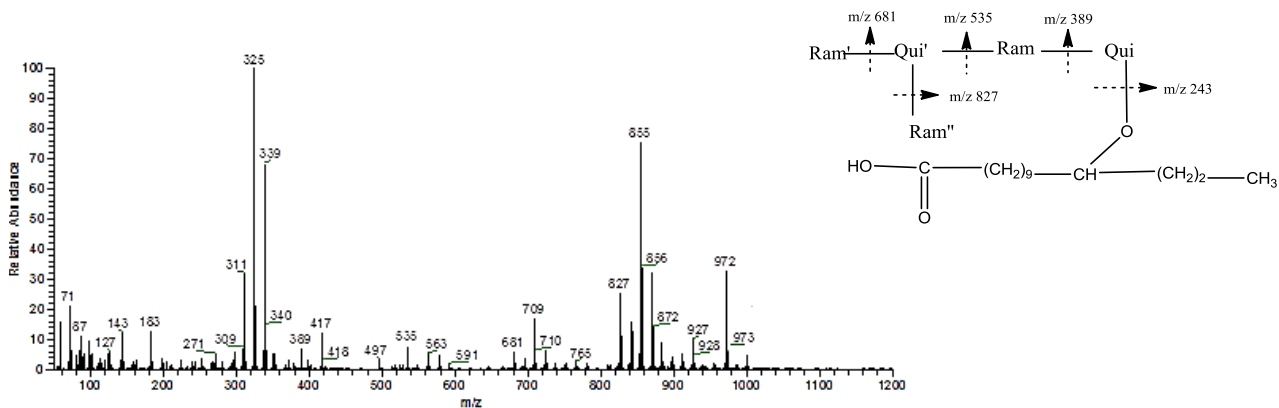
Las técnicas de espectrometría de masas por bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) y electrospray (EM-ESI) han sido herramientas útiles para el establecimiento de la fórmula molecular de glicolípidos, a través de la detección de los iones pseudomoleculares  $[M - H]^-$ ,  $[M + Na]^+$  y  $[M + Cl]^-$ , además permite confirmar sus estructuras mediante la identificación de los fragmentos correspondientes a las rupturas de los enlaces glicosídicos.<sup>1,29-33</sup> Mediante la comparación entre cada uno de los iones pseudomoleculares  $[M - H]^-$  y los los picos correspondientes a las fragmentaciones

atribuibles a las eliminaciones de los grupos acetato se puede establecer la identidad de los mismos.

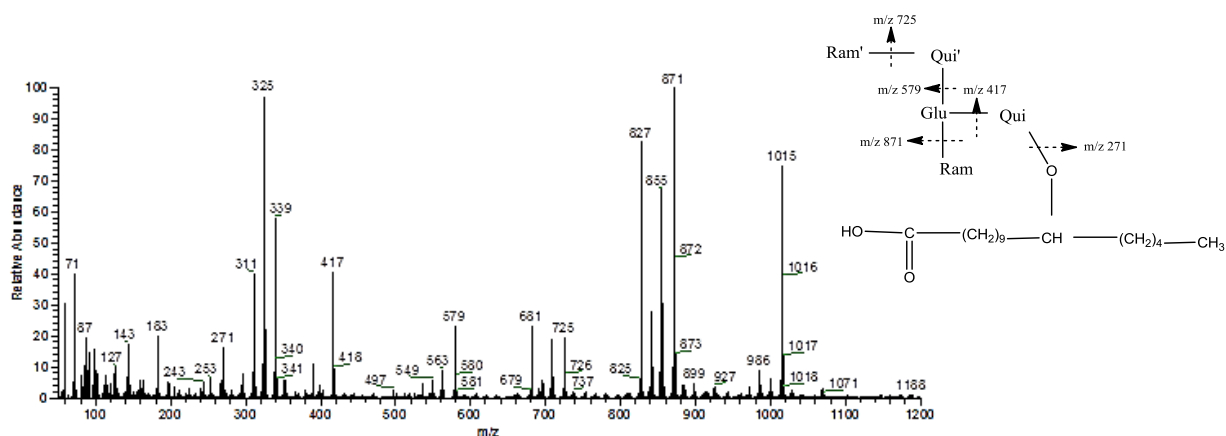
En primer lugar, se llevó a cabo el análisis de los espectros de masas FAB en modo negativo de cada uno de los ácidos glicosídicos **1a-3a**. Para el compuesto **1a**, se observó un ion pseudomolecular de  $m/z$  989  $[M - H]^-$  que permitió calcular su fórmula molecular como  $C_{44}H_{78}O_{24}$ , para **2a** un ion pseudomolecular de  $m/z$  973  $[M - H]^-$  correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{44}H_{78}O_{23}$  y para **3a** un ion pseudomolecular de  $m/z$  1017  $[M - H]^-$  correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{46}H_{82}O_{24}$ . También se observaron fragmentos comunes generados por las rupturas de los enlaces glicosídicos en los tres compuestos, lo cual confirmó la naturaleza pentasacárida de los núcleos.<sup>28-32</sup> En el compuesto **1a**, la eliminación consecutiva de las unidades de azúcar produjeron los picos de  $m/z$  843  $[989 - C_6H_{10}O_4 \text{ (metilpentosa)}]^-$ , 697  $[843 - C_6H_{10}O_4 \text{ (metilpentosa)}]^-$ , 551  $[697 - C_6H_{10}O_4 \text{ (metilpentosa)}]^-$ , 389  $[551 - C_6H_{10}O_5 \text{ (hexosa)}]^-$  y 243  $[389 - C_6H_{10}O_4 \text{ (metilpentosa)}]^-$ , el cual es un fragmento característico de la presencia del ácido 11-hidroxitetradecanoico o convolvulinólico como la aglicona (**Figura 7**). La diferencia de 28 unidades de masa, correspondientes a dos grupos metilenos, entre los compuestos **1a** y **3a**, así como el mismo patrón de fragmentación por las rupturas glicosídicas de cada unidad de azúcar, i.e.,  $m/z$  1017, 871, 725, 579, 417 y 271 confirmó el mismo núcleo pentasacárido y la presencia del ácido 11-hidroxihexadecanoico o jalapínico como la aglicona para **3a** (**Figura 9**). Para el compuesto **2a**, los fragmentos  $m/z$  827, 681, 535, 389 y 243 representan la pérdida de cinco unidades de metilpentosa y el fragmento  $m/z$  243 indica la presencia del ácido 11-hidroxitetradecanoico o convolvulinólico como la aglicona (**Figura 8**).



**Figura 7.** Espectro de masas FAB modo negativo del compuesto **1a** (IA1-OH)



**Figura 8. Espectro de masas FAB modo negativo del compuesto 2a (IA2-OH)**



**Figura 9. Espectro de masas FAB modo negativo del compuesto 3a (IA3-OH)**

El análisis de los espectros unidimensionales (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) de los compuestos **1a.1-3a.1** permitió obtener información general acerca de la estructura de los núcleos oligosacáridos constitutivos de estas resinas glicosídicas. Así, por la técnica de correlación heteronuclear ( $^1J_{\text{C-H}}$ ) HSQC se confirmaron cinco señales correspondientes a los protones anoméricos en la región entre  $\delta_{\text{H}}$  4.67– 5.71 que se encuentran correlacionando con las señales de carbono entre  $\delta_{\text{C}}$  98.6 y 102.8 ppm (**Figura 11**). De acuerdo a las constantes de acoplamiento observadas, se logró establecer la naturaleza de los monosacáridos. Así, las señales desplazadas a  $\delta_{\text{H}}$  4.67 y  $\delta_{\text{H}}$  4.68 ppm que aparecen como dobletes ( $^3J_{\text{H-H}} = 8.0$  y 7.5 Hz), son características de una D-quinovosa.<sup>34,35</sup> Adicionalmente, las señales a  $\delta_{\text{H}}$  5.59 y  $\delta_{\text{H}}$



5.61 ppm se presentan en forma de dobletes ( $^3J_{H-H} = 8.5$  y  $7.5$  Hz) con el desplazamiento químico característico de una D-glucosa.<sup>34,35</sup> Finalmente, las señales centradas entre  $\delta_H$  5.02 ppm y  $\delta_H$  5.82 ppm que se presentaron como singuletes anchos son generados por los protones anoméricos de las unidades de L-ramnosa.<sup>34,35</sup> Otra característica importante, fue el número de señales dobles observadas entre  $\delta_H$  1.4-1.7 ppm en el espectro de RMN  $^1H$  y que corresponden a los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas. Así, cuatro dobletes se observaron en esta región indicando la presencia de cuatro metilpentosas para los compuestos **1a.1** (Figura 10) y **3a.1** y para el compuesto **2a.1** se observaron cinco dobletes debido a la presencia de cinco metilpentosas en el núcleo pentasacárido.

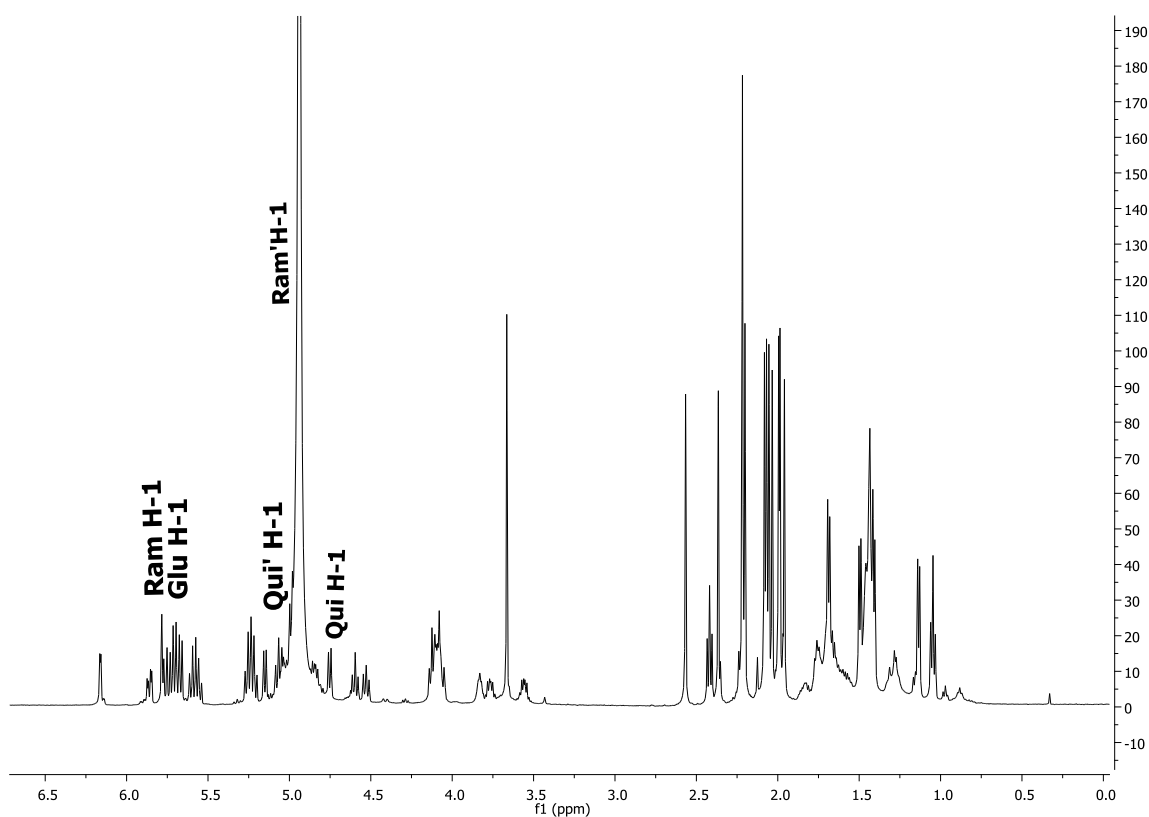
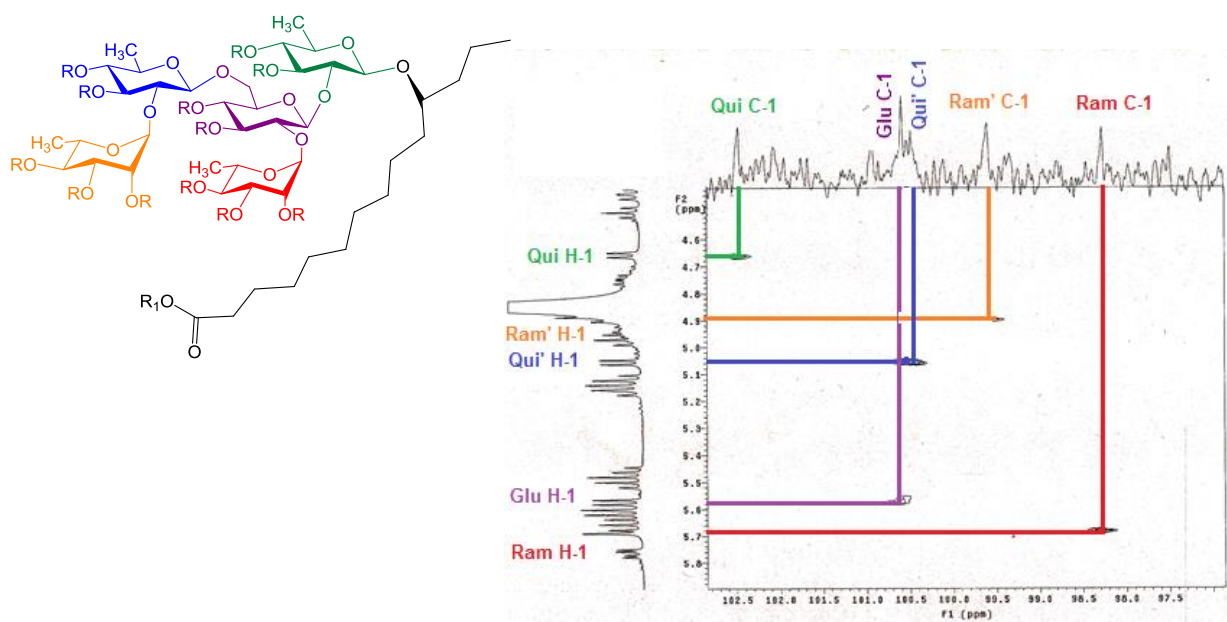


Figura 10. RMN  $^1H$  del compuesto **1a.1** (IA1-HAM)



**Figura 11. Región anomérica del espectro HSQC para el compuesto 1a.1 (IA1-HAM)**

Mediante el uso de las técnicas espectroscópicas bidimensionales, como  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY, se llevó a cabo la asignación de las señales para los metinos centrados entre  $\delta_{\text{H}}$  4.0-6.0, atribuibles a cada unidad monosacárida.<sup>34,35</sup> A través de los patrones de acoplamiento ( $J_{\text{H-H}}$ ) observados en cada unidad monosacárida se confirmó la presencia de tres tipos de azúcares, la D-quinovosa, D-glucosa y L-ramnosa para los compuestos **1a.1** y **3a.1**, mientras que para el compuesto **2a.1**, se confirmó la presencia de la D-quinovosa y la L-ramnosa. Este procedimiento se inició con la identificación de las cinco señales correspondientes a los protones anoméricos y su correlación con las señales para H<sub>2</sub> observadas a través de los cuadros de conectividad en el espectro COSY (**Figura 12**). La identificación de estas señales se confirmó con los espectros de correlación homonuclear a larga distancia (TOCSY). De esta manera, se realizaron las secuencias de interacciones vecinales restantes: H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub> y H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub> en cada unidad monosacárida (**Figura 13**).

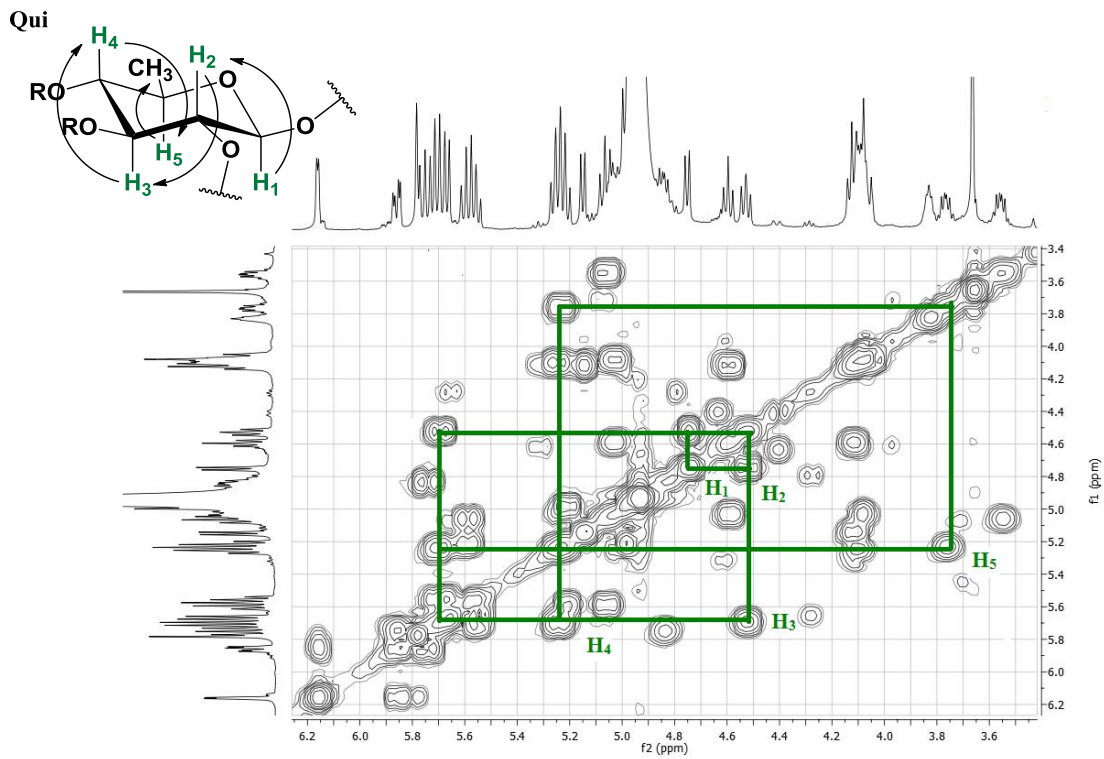


Figura 12. Espectro COSY del compuesto 1a.1 (IA1-HAM)

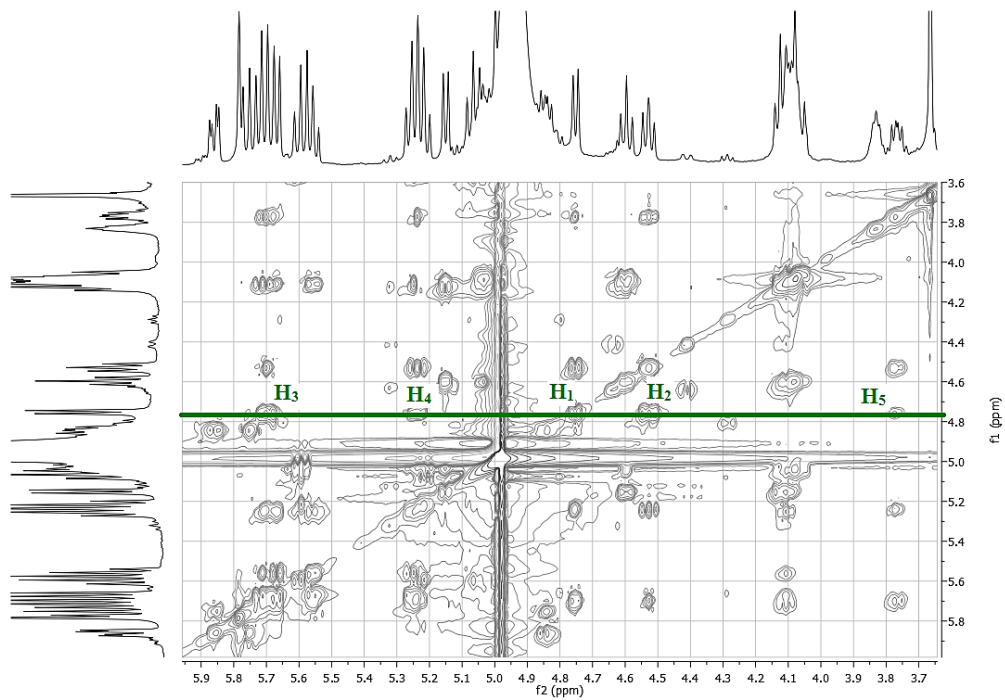


Figura 13. Espectro TOCSY del compuesto 1a.1 (IA1-HAM)

De los cinco azúcares que constituyen el núcleo pentasacárido, para los compuestos **1a.1** y **3a.1**, cuatro de ellos corresponden a metilpentosas o 6-desoxihexosas: dos unidades de D-quinovosa y dos unidades de L-ramnosa. La D-glucosa fue la única hexosa que se encontró constituyendo estos núcleos pentasacáridos. Para el compuesto **2a.1**, el núcleo está constituido por dos unidades de D-quinovosa y tres unidades de L-ramnosa. La correspondencia entre cada uno de los protones con su átomo de carbono geminal se realizó a través del experimento de correlación heteronuclear HSQC ( $^1J_{C-H}$ ).

En los **Cuadros 9** y **10**, se enlistan los datos espectroscópicos de  $^1H$  y  $^{13}C$  de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida de los derivados peracetilados-metilados IA1-HAM (**1a.1**), IA2-HAM (**2a.1**) y IA3-HAM (**3a.1**).

**Cuadro 9. RMN <sup>1</sup>H de los derivados IA1-HAM, IA2-HAM y IA3-HAM<sup>a</sup>**

Posición <sup>b</sup>	1a.1	2a.1	3a.1
Qui-1	4.67 d (8.0)	4.68 d(7.5)	4.68 d (7.5)
2	4.45 dd (8.0,8.0)	4.14 dd (9.5,8.0)	4.19 dd (10.0,7.5)
3	5.61 dd (9.0,8.5)	5.54 t (9.5)	5.54 t (9.5)
4	5.16 dd (9.5,9.5)	5.08 t (9.5)	5.06 t (9.5)
5	3.68 dq (9.5,6.0)	4.12 dq (9.5,6.5)	4.08 dq (9.5,6.5)
6	1.42 d (6.0)	1.35 d (6.0)	1.35 d (6.5)
Glu-1	5.59 d (8.5)		5.61 d (7.5)
2	5.16 dd (9.5,9.5)		5.82 t (10.5)
3	5.67 t (10.0)		5.64 t (10.5)
4	5.50 dd (9.0,9.0)		5.83 t (10.5)
5	4.01 ddd (9.0,5.0,3.0)		4.13 m*
6 <sup>a</sup>	3.99 dd (10.0,5.0)		4.33 dd (12.5,5.0)
6b	3.98 dd (10.0,3.0)		4.62 dd (12.0,4.5)
Ram-1	4.89 brs	5.82 brs	5.82 brs
2	5.16 brs	6.12 brs	6.12 dd (3.0,1.5)
3	5.5 dd (8.5,2.0)	5.99 dd (10.0,3.0)	5.99 dd (10.0,3.0)
4	4.97 dd (9.5,9.5)	5.64 dd (10.0,9.0)	5.63 t (9.5)
5	3.48 dq (10.0,6.0)	4.36 dq (9.5,6.5)	4.33 m*
6	1.06 d (6.0)	1.35 d (6.0)	1.36 d (6.5)
Ram'-1	5.71 brs	5.48 brs	5.50 brs
2	6.08 dd (4.0, 1.6)	4.81 brs	5.47 dd (3.5,1.5)
3	5.78 dd (9.0,4.0)	4.35 dd (9.5,3.0)	4.77 dd (9.5,4.0)
4	5.66 dd (10.0,10.0)	4.55 dd(10.0,9.5)	4.41 t (9.0)
5	4.76 dq (10.0,6.5)	4.54 dq (9.5,6.5)	4.53 dq (9.5,6.0)
6	1.61 d (6.0)	1.80 d (6.0)	1.80 d (6.0)
Qui'-1	5.07 d (7.5)	5.02 d (7.5)	5.09 d (8.0)
2	4.05 t (8.5)	4.18 dd (8.0,8.0)	4.18 dd (10.0,8.0)
3	4.52 t (9.0)	5.65 dd (10.0,9.0)	5.75 t (9.5)
4	4.93 dd (9.0,8.0)	5.04 dd (9.5,7.5)	5.36 t (10.0)
5	3.98 dq (8.0,6.0)	4.12 dq (8.0,6.5)	4.1 dq (10.5,6.5)
6	1.33 d (6.0)	1.12 d (6.5)	1.12 d (6.5)
Ram''-1		5.64 s	
2		5.85 dd (2.8,2.4)	
3		5.65 dd (9.0,3.0)	
4		5.03 dd (9.5,9.0)	
5		3.77 dq (10.0,6.0)	
6		1.29 d (6.0)	
conv-2	2.34 t (7.5)	2.35 t (7.5)	
11	3.75 m*	3.65 m*	
14	0.96 t (7.5)	0.93 t (7.5)	
jal-2a			2.36 t (7.5)
11			3.65 m*
16			0.90 t (7.0)
OCH <sub>3</sub>	3.58 m*	3.62 s	3.62 s

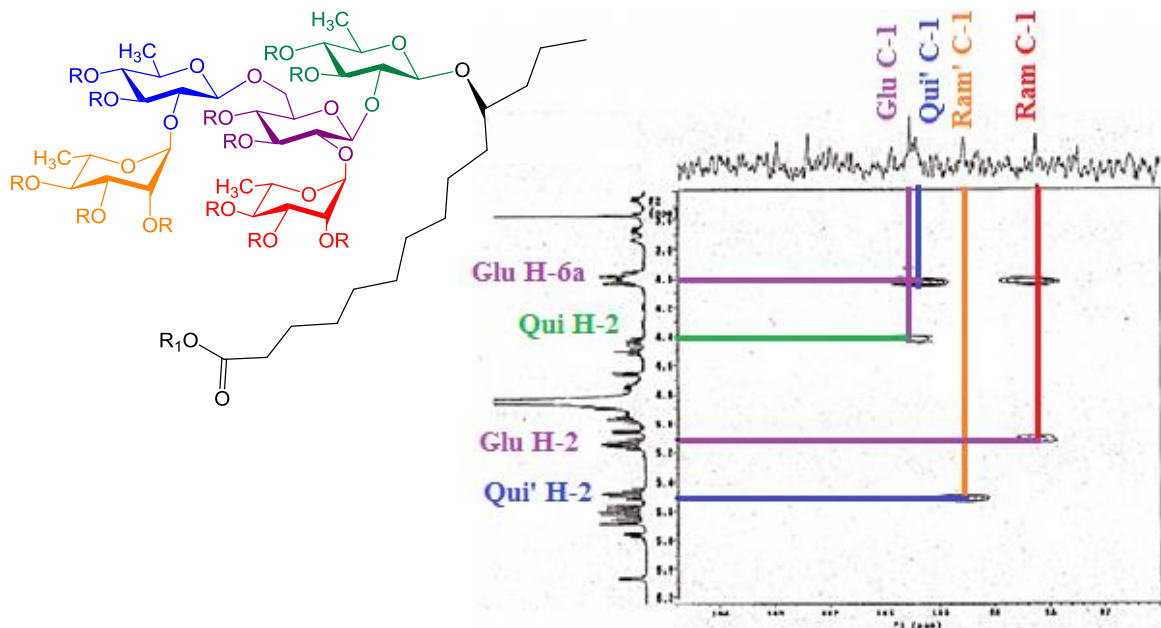
<sup>a</sup>Datos registrados a 500 MHz en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están en ppm relativas a TMS. Las constantes de acoplamiento ( $J$ ) están dadas en Hz. Las asignaciones están basadas en los experimentos <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY y TOCSY. <sup>b</sup>Abreviaciones: qui = quinovosa; ram = ramnosa; glu = glucosa; conv = 11-hidroxitetradecanoilo; Jal = 11-hidroxihexadecanoilo.

**Cuadro 10. RMN <sup>13</sup>C de los derivados IA1-HAM, IA2-HAM y IA3-HAM<sup>a</sup>**

Posición <sup>b</sup>	1a.1	2a.1	3a.1
Qui-1	102.8	101.0	101.0
2	75.6	74.5	73.5
3	76.2	76.1	75.9
4	74.5	74.2	73.9
5	70.4	69.8	69.5
6	17.3	17.7	17.6
Glu-1	100.9		101.3
2	74.6		69.8
3	74.4		71.2
4	73.5		71.8
5	76.1		69.6
6	67.9		63.0
Ram-1	99.8	98.0	99.7
2	73.4	74.2	70.5
3	73.3	76.6	70.4
4	74.1	71.1	71.2
5	70.6	68.8	68.5
6	17.9	17.7	17.6
Ram'-1	98.6	98.5	97.2
2	70.1	71.1	72.8
3	70.4	74.8	79.0
4	71.1	76.7	76.2
5	67.9	67.7	68.0
6	18.0	18.8	18.7
Qui'-1	100.8	99.9	101.0
2	78.1	77.5	77.0
3	81.6	78.7	75.9
4	74.3	71.7	69.8
5	69.9	69.8	72.6
6	17.6	16.8	16.0
Ram''-1		99.7	
2		71.0	
3		73.0	
4		78.8	
5		70.7	
6		17.6	
conv-1	171.4	171.2	
2	34.4	35.0	
11	83.1	83.9	
14	14.9	14.9	
jal-1			174.2
2			34.3
11			81.0
16			14.3
OCH <sub>3</sub>	51.5	51.5	51.5

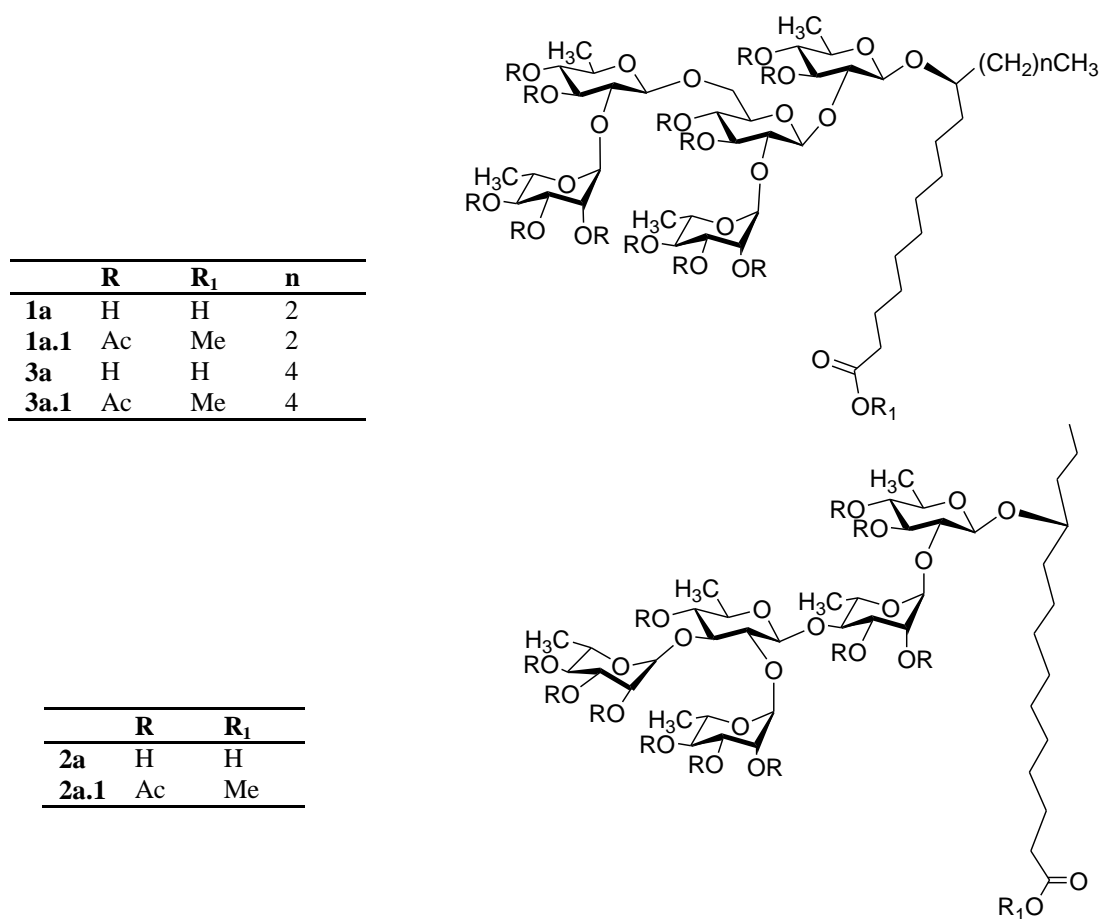
<sup>a</sup>Datos registrados a 125.7 MHz en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) están en ppm relativas a TMS. Las asignaciones están basadas en los experimentos <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H COSY and TOCSY. <sup>b</sup>Abreviaciones: qui = quinovosa; ram = ramnosa; glu = glucosa; conv = 11-hidroxitetradecanoilo; Jal = 11-hidroxihexadecanoilo.

La secuencia de glicosidación se estableció a través de las correlaciones heteronucleares C-H ( $^3J_{C-H}$ ) mediante el experimento HMBC (**Figura 14**). Este procedimiento se realizó considerando aquellas señales de protones desplazadas a campo bajo, por arriba de  $\delta_H$  5.3 ppm que indicaban la acetilación de los grupos hidroxilo del núcleo oligosacárido, las cuales fueron 12 posiciones acetiladas del núcleo oligosacárido, además de 12 señales correspondientes a los metilos del grupo acetilo entre  $\delta_H$  2.0–2.2 ppm. La secuencia de glicosidación se estableció a partir de las principales conectividades observadas en el espectro HMBC, para el compuesto **1a.1** se observaron las siguientes conexiones: Qui H-2 ( $\delta_H$  4.45) con Glu C-1 ( $\delta_C$  100.9), Glu H-2 ( $\delta_H$  5.16) con Ram' C-1 ( $\delta_C$  98.6), Glu H-6 ( $\delta_H$  3.99) con Qui' C-1 ( $\delta_C$  100.8), Ram H-1 ( $\delta_H$  4.89) con Qui' C-2 ( $\delta_C$  78.1) y Qui H-1 ( $\delta_H$  4.67) con C-11 ( $\delta_C$  83.1) del ácido convolvulinólico, la misma secuencia de glicosidación se encontró en el compuesto **3a.1** pero éste contiene al ácido jalapinólico como la aglicona. Para el compuesto **2a.1**, se observaron las siguientes conectividades observamos Qui H-2 ( $\delta_H$  4.14) con Ram C-1 ( $\delta_C$  98.0), Ram H-4 ( $\delta_H$  5.64) con Qui' C-1 ( $\delta_C$  99.9), Ram' H-1 ( $\delta_H$  5.48) con Qui' C-3 ( $\delta_C$  78.7), Qui' H-2 ( $\delta_H$  4.18) con Ram'' C-1 ( $\delta_C$  99.7) y Qui H-1 ( $\delta_H$  4.68) con C-11 ( $\delta_C$  83.9) del ácido convolvulinólico.



**Figura 14. Espectro HMBC del compuesto 1a.1 (IA1-HAM)**

La estructura del ácido albinosínico **A** fue caracterizado como: 11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico. La estructura del ácido albinosínico **B** fue caracterizado como: 11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico; y la estructura del ácido albinosínico **C** como: 11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico.



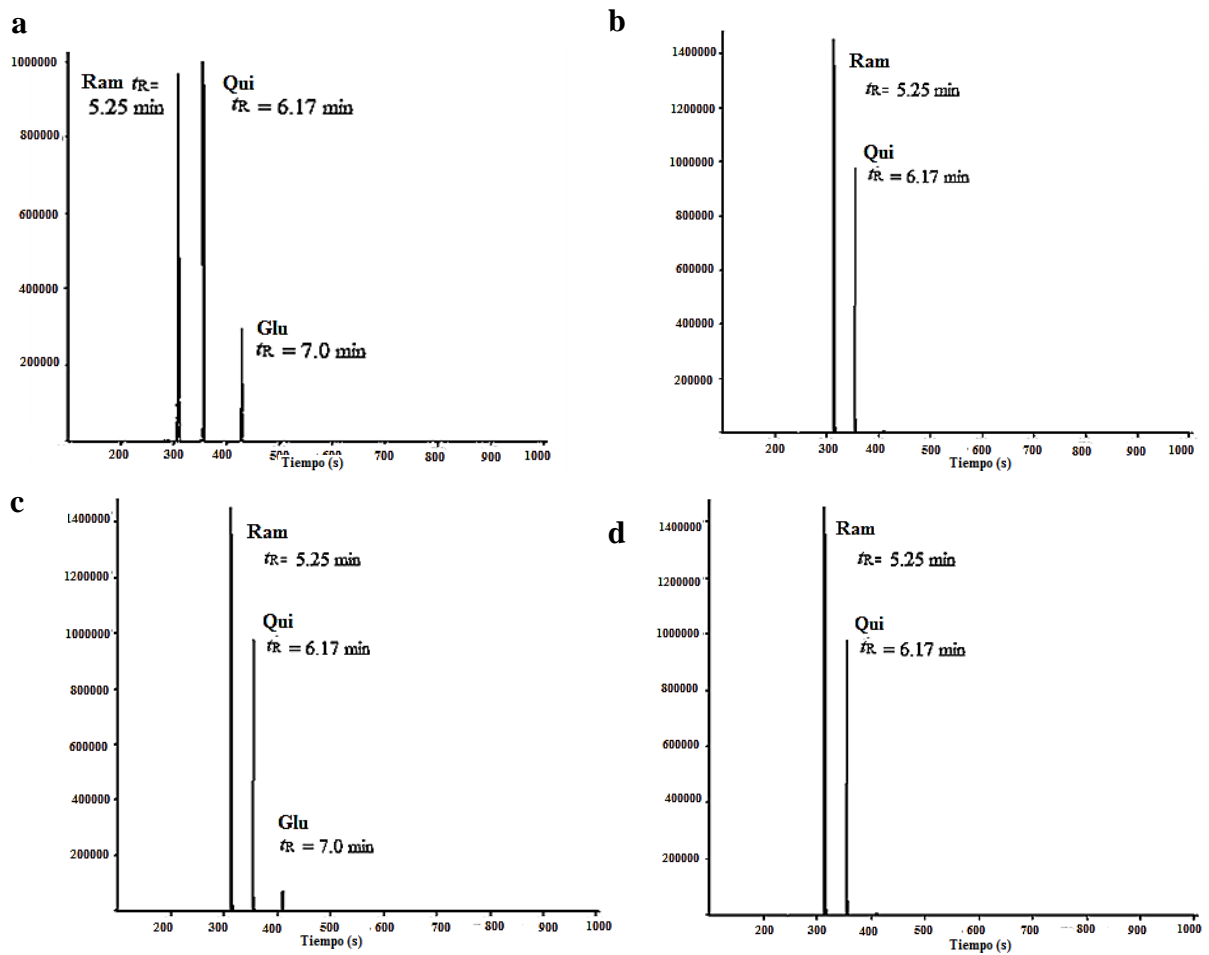
**Figura 15. Estructuras de los de los ácidos albinosínicos A-C (1a-3a) y sus derivados peracetilados-metilados (1a.1-3a.1)**



Los derivados peracetilados-metilados de los ácidos albinosínicos A-C (**1a.1-3a.1**) se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en modo positivo. Los espectros de masas permitieron confirmar una fórmula molecular de  $C_{69}H_{104}O_{36}$ , como lo establece el ion pseudomolecular  $[M + Na]^+$  de  $m/z$  1531, para el compuesto **1a.1**,  $C_{67}H_{102}O_{34}$  por la presencia del ion pseudomolecular  $[M + Na]^+$  de  $m/z$  1473 para el compuesto **2a.1** y  $C_{71}H_{108}O_{36}$  por el ion pseudomolecular  $[M + Na]^+$  de  $m/z$  1559 para el compuesto **3a.1**.

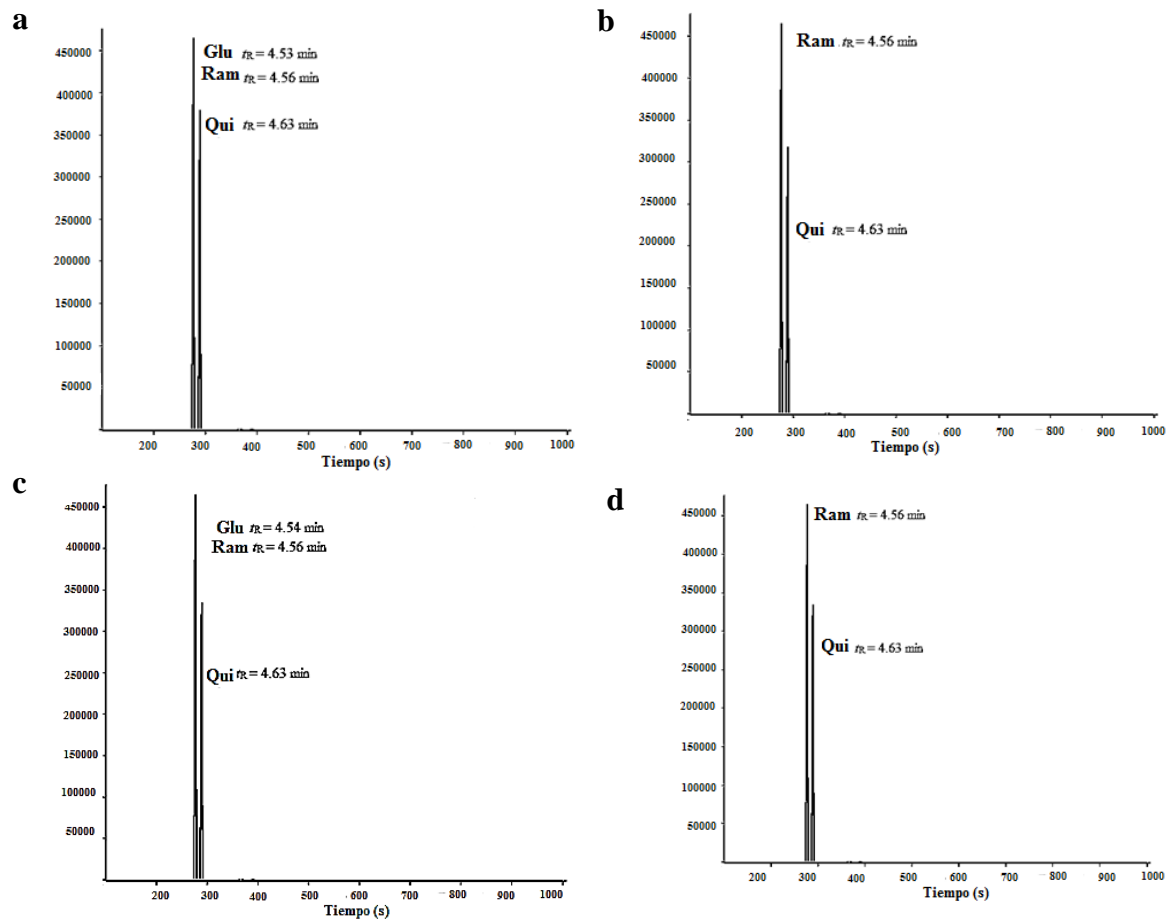
## 6.6 Identificación de carbohidratos

El análisis mediante CG-MS de las mezclas de monosacáridos obtenidas en cada una de las hidrólisis ácidas, en forma de derivados del trimetilsilano (TMS)<sup>26,27</sup> utilizando experimentos de coelución con muestras estándares (identificación del tiempo de retención), permitieron la identificación de la L-ramnosa, la D-quinovosa y la D-glucosa en una proporción aproximada de 2:2:1 en las fracciones I y X. Una proporción de 3:2 para ramnosa-quinovosa se encontró en la fracción VIII (**Figura 16**).



**Figura 16. Cromatogramas de gases (CG) de los derivados trimetilsililados. a.** Mezcla de estándares formada por Glu/Qui/Ram (1:2:2), **b.** Mezcla de estándares formada por Qui/Ram (2:3), **c.** Mezcla de monosacáridos obtenida tanto para la fracción I, como para la fracción X, **d.** Mezcla de monosacáridos de la fracción VIII.

Mediante la preparación de los derivados tiazolidínicos con L-cisteína<sup>27</sup> y el análisis de sus tiempos de retención en la CG, se confirmó la configuración absoluta de todos los monosacáridos como la serie L- para la ramnosa y la serie D- para la quinovosa y la glucosa (Figura 17).



**Figura 17. Cromatogramas de gases de los derivados tiazolidínicos. a.** Mezcla de estándares formada por Glu/Qui/Ram (1:2:2), **b.** Mezcla de estándares formada Qui/Ram (2:3), **c.** Mezcla de monosacáridos obtenida tanto para la fracción I, como para la fracción X, **d.** Mezcla de monosacáridos de la fracción VIII.

## 6.7 Caracterización de la estructura química de los albinósidos I-XI

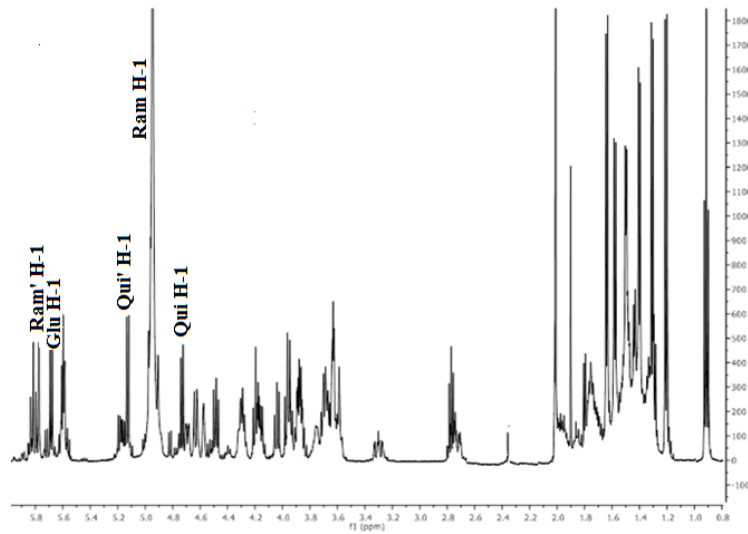
A continuación, se discutirá el procedimiento que se llevó a cabo mediante los experimentos de RMN y EM para la elucidación de los compuestos **1-5** con núcleo pentasacárido y, posteriormente, se ejemplificará la elucidación estructural de los compuestos **6-11**, con núcleo tetrasacárido.

### 6.7.1 Albinósidos I-V

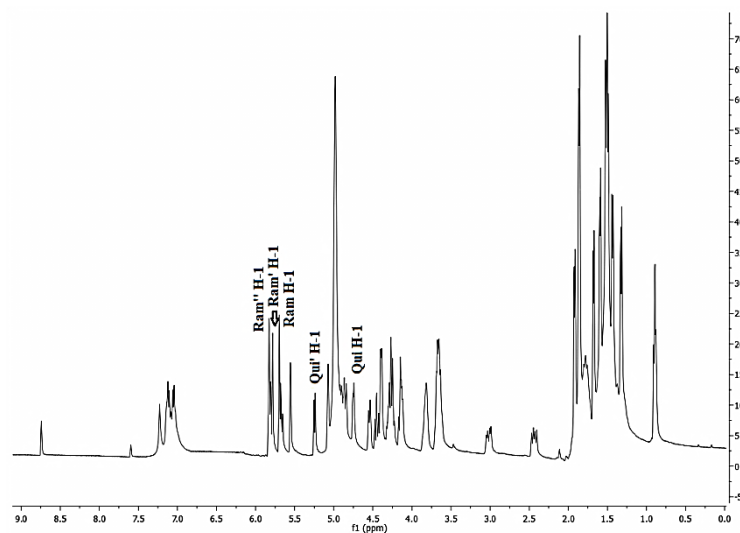
Los espectros unidimensionales de protón RMN  $^1\text{H}$  y carbono RMN  $^{13}\text{C}$  proporcionaron una información general acerca de las estructuras químicas de los compuestos. El análisis de los espectros por RMN  $^{13}\text{C}$  permitió determinar el número de señales correspondientes a los carbonos anoméricos en la región comprendida entre  $\delta_{\text{C}}$  95-110, que indicaron el número de monosacáridos que se encuentran constituyendo el núcleo oligosacárido. El experimento HSQC permitió la correlación C-H a un enlace ( $^1J_{\text{CH}}$ ) y la identificación de las señales de los protones anoméricos en el espectro RMN  $^1\text{H}$ . Una vez identificadas, se analizaron las constantes de acoplamiento para identificar el tipo de azúcar mediante los patrones de acoplamiento.<sup>34,35</sup> Las señales de los protones anoméricos que se presentaron como singuletes anchos se atribuyeron a las unidades monosacáridas de L-ramnosa. En tanto que, los dobletes con constantes de acoplamiento de 7.5 Hz ( $^3J_{\text{H-H}}$ ) se atribuyeron a la unidad de D-quinovosa y D-glucosa. Las señales vecinales a los protones anoméricos de estas unidades presentaron patrones de acoplamiento como dobletes de dobletes con constantes de acoplamiento aproximadamente de 9.5 Hz ( $^3J_{\text{H-H}}$ ).

Por lo tanto, los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN  $^1\text{H}$ ) para los compuestos **1 (Figura 18)**, **3** y **4**, mostraron dos señales correspondientes a dos unidades de quinovosa, dos señales para dos unidades de ramnosa y una señal atribuida a una unidad de glucosa. Mientras que para **2 (Figura 19)** y **5** se presentó una señal de una unidad de ramnosa adicional, en lugar del doblete de la glucosa. Además, se observaron cuatro dobletes localizados entre  $\delta_{\text{H}}$  1.4–1.6 correspondientes a los metilos de las unidades de metilpentosa en **1, 3** y **4**, mientras que para **2** y **5** se pudieron observar cinco dobletes.

El núcleo oligosacárido para **1**, **3** y **4** está constituido por cinco unidades de azúcar, cuatro metilpentosas (dos quinovosas y dos ramnosas) y una hexosa (glucosa); mientras que para **2** y **5**, el núcleo oligosacárido está formado por cinco metilpentosas (dos quinovosas y tres ramnosas).



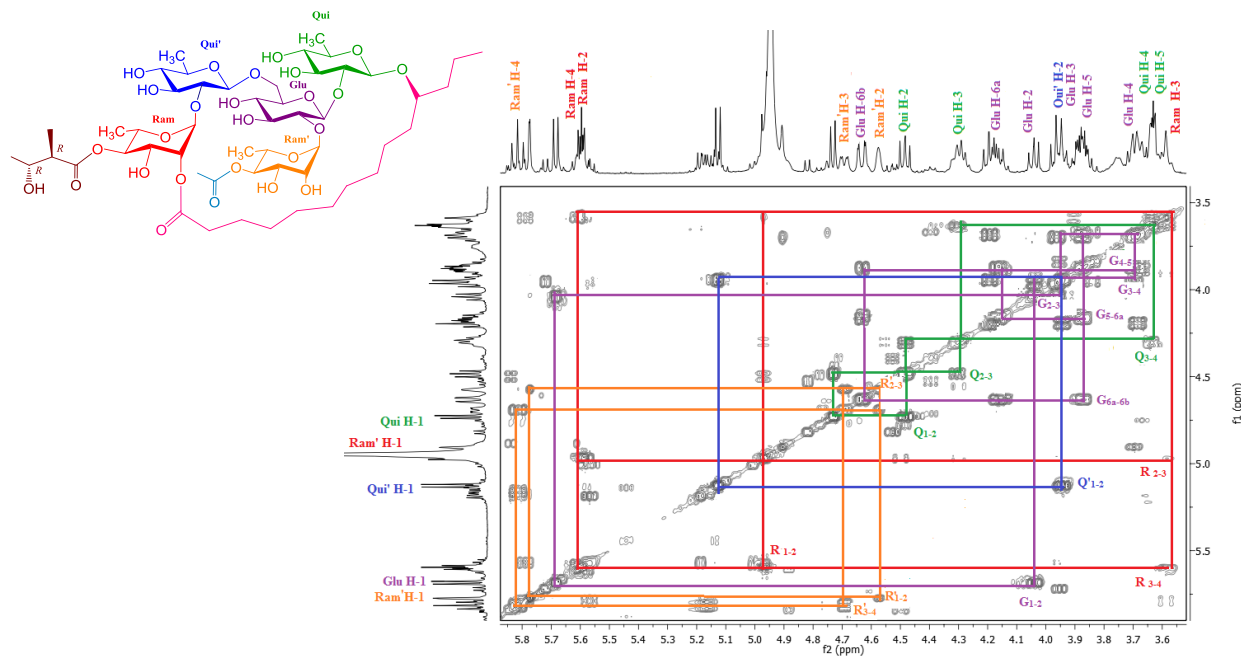
**Figura 18.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido I (1)



**Figura 19.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido II (2)

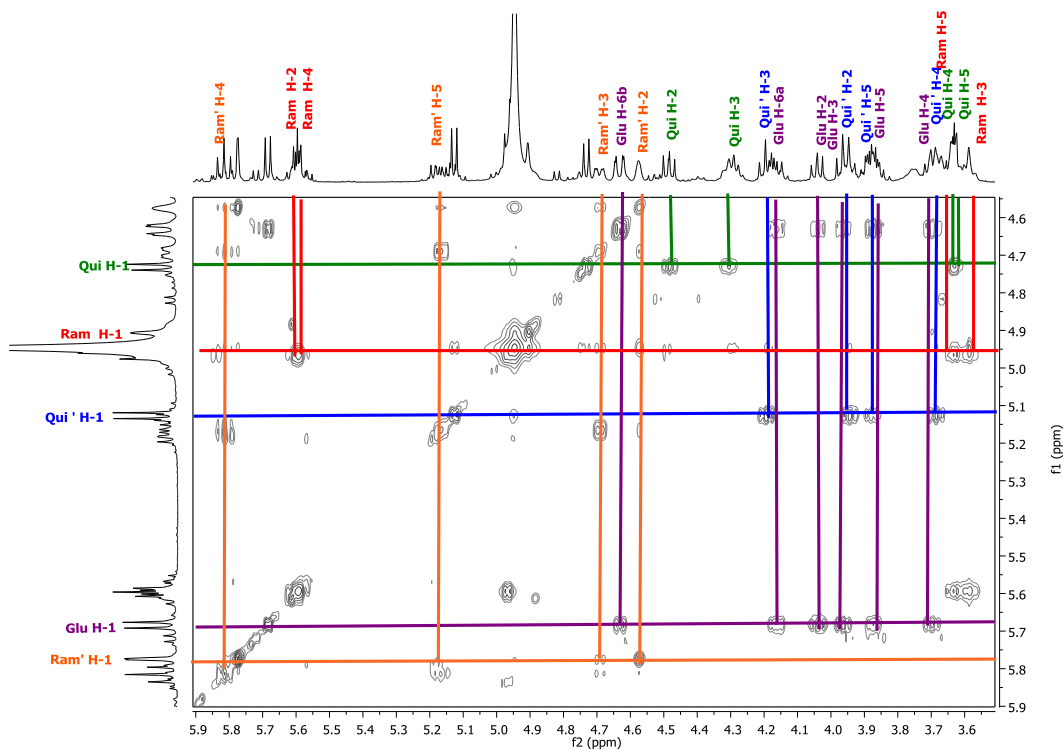
Mediante el uso de las técnicas bidimensionales en la RMN ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY) se llevó a cabo la asignación de las señales de los metinos restantes en cada monosacárido.

Este procedimiento se inició con la localización de los protones anoméricos y el establecimiento de los cuadros de conectividad de cada uno de los protones con su metino vecinal a lo largo de toda la unidad sacárida. En los casos, donde se observa un desplazamiento de protón por arriba de  $\delta_{\text{H}}$  5.5 ppm, se identificó como una posición de esterificación en el carbono correspondiente. Así, en el espectro mostrado en la **figura 20** atribuido al albinósido I (**1**), se observa que el protón anomérico  $\text{H}_1$  ( $\delta_{\text{H}}$  4.94 ppm) de la unidad de ramnosa terminal (Ram) establece su cuadro de conectividad con el  $\text{H}_2$ , cuyo desplazamiento se encuentra en  $\delta_{\text{H}}$  5.6 ppm, indicando claramente una posición de esterificación en el  $\text{C}_2$  de esta unidad de azúcar. Siguiendo el mismo procedimiento, se localizaron los sitios restantes de acilación en las posiciones  $\text{C}_4$  de la unidad de ramnosa terminal (Ram) y en la posición  $\text{C}_4$  de la unidad de ramnosa intermedia (Ram').



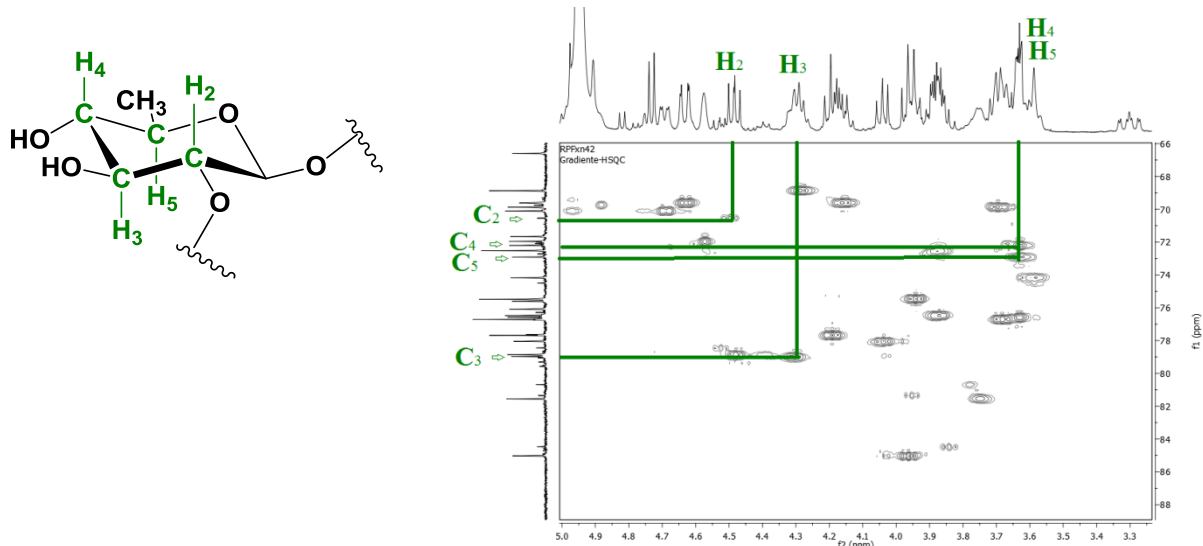
**Figura 20.** Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para la región oligosacárida del albinósido I (**1**). Correlaciones ( $^3J_{\text{H-H}}$ ): Q1-2; Qui H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, Q<sub>2-3</sub>; Qui H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, Q<sub>3-4</sub>; Qui H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, Q'<sub>1-2</sub>; Qui' H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, R<sub>1-2</sub>; Ram H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, R<sub>2-3</sub>; Ram H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, R<sub>3-4</sub>; Ram H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, R'<sub>1-2</sub>; Ram' H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, R'<sub>2-3</sub>; Ram' H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, R'<sub>3-4</sub>; Ram' H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, G<sub>1-2</sub>; Glu H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, G<sub>2-3</sub>; Glu H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, G<sub>3-4</sub>; Glu H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, G<sub>4-5</sub>; Glu H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>, G<sub>5-6a</sub>; Glu H<sub>5</sub>-H<sub>6a</sub>, G<sub>6a-6b</sub>; Glu H<sub>6a</sub>-H<sub>6b</sub>. Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Qui'**= quinovosa intermedia, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram** = ramnosa terminal, **Glu**= glucosa.

El experimento TOCSY nos permite el establecimiento de la secuencia total de las interacciones vecinales entre los hidrógenos de cada unidad monosacárida. El análisis se puede realizar mediante el trazo de una línea horizontal o vertical a partir del protón anomérico para identificar los desplazamientos químicos de las resonancias de todos los metinos en cada unidad sacárida. En la **figura 21** se indican las señales, las cuales coinciden con las obtenidas por medio del análisis del experimento COSY.



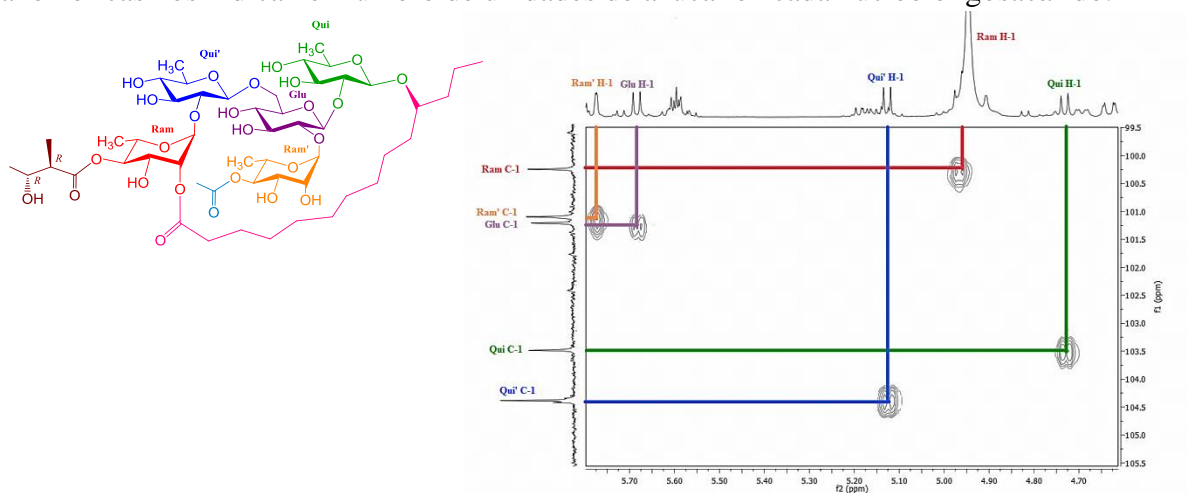
**Figura 21. Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinosido I (1).** Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Qui'**= quinovosa intermedia, **Ram**= ramnosa intermedia, **Ram'**= ramnosa terminal, **Glu**= glucosa.

Una vez realizada la identificación de los protones correspondientes a las unidades sacáridas, se procedió con la asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes mediante la técnica heteronuclear  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  HSQC ( $^1J_{\text{C-H}}$ ) (**Figura 22**).



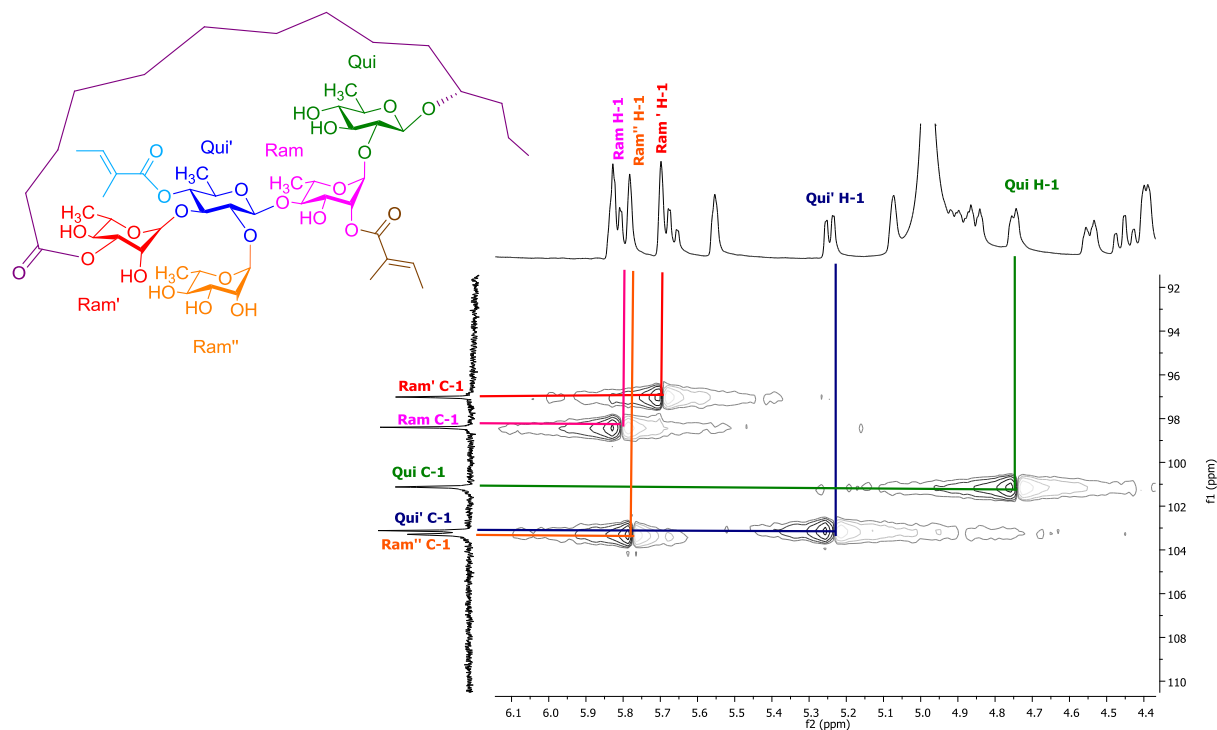
**Figura 22.** Espectro HSQC del albinosido I (1). Región oligosacárida para la identificación de los carbonos correspondientes a cada protón del núcleo oligosacárido. Correlaciones ( $^1J_{C-H}$ ) mostradas para la unidad de quinovosa (Qui).

En las regiones correspondientes a los protones y carbonos anoméricos del espectro HSQC para los albinosidos I y II (**Figuras 23-24**) se pueden observar las conectividades entre cada carbono anomérico con su correspondiente protón. Así, las cinco señales anoméricas nos indican el número de unidades de azúcar en cada núcleo oligosacárido.



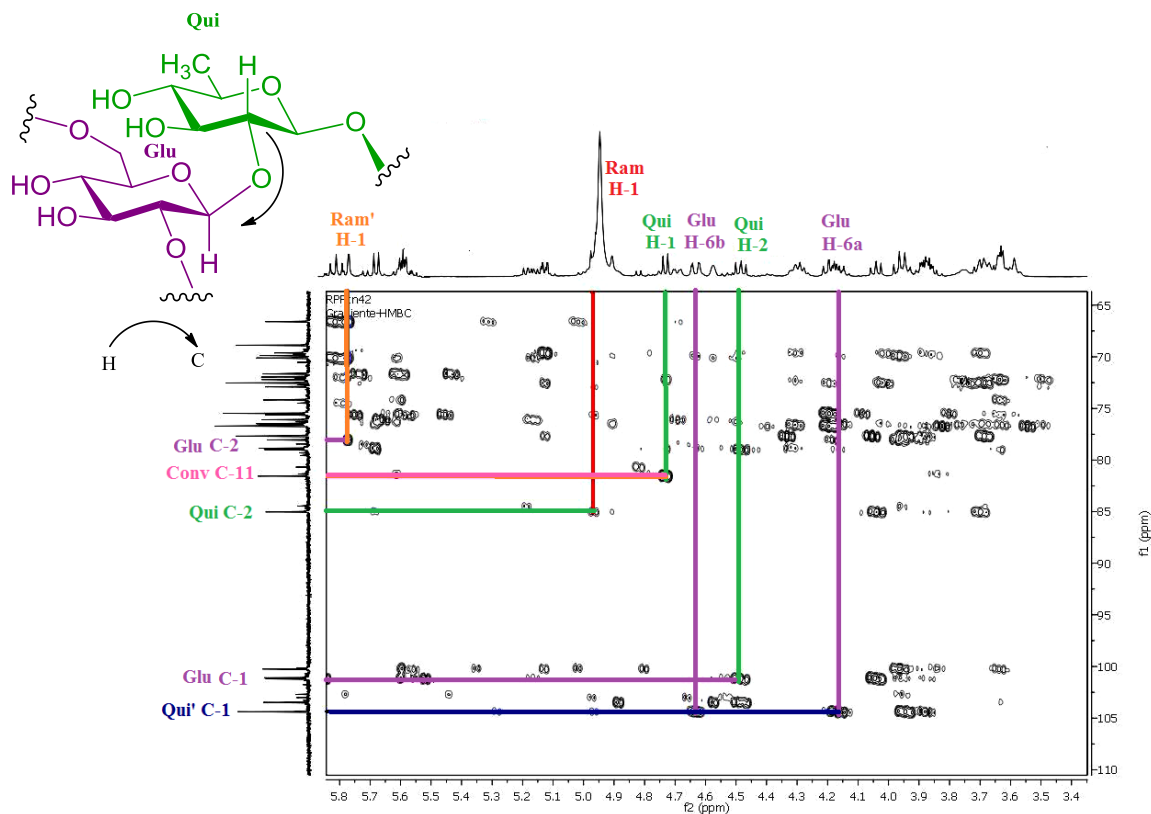
**Figura 23.** Espectro HSQC del albinosido I (1). Correlaciones ( $^1J_{C-H}$ ) observadas en la región anomérica. Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Qui'**= quinovosa intermedia, **Glu**= glucosa, **Ram'**= ramnosa intermedia, **Ram** = ramnosa terminal.





**Figura 24. Espectro HSQC del albinosido II (2).** Correlaciones ( $^1J_{C-H}$ ) observadas en la región anomérica. Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Qui'**= quinovosa intermedia, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'**= ramnosa inferior, **Ram''** = ramnosa intermedia.

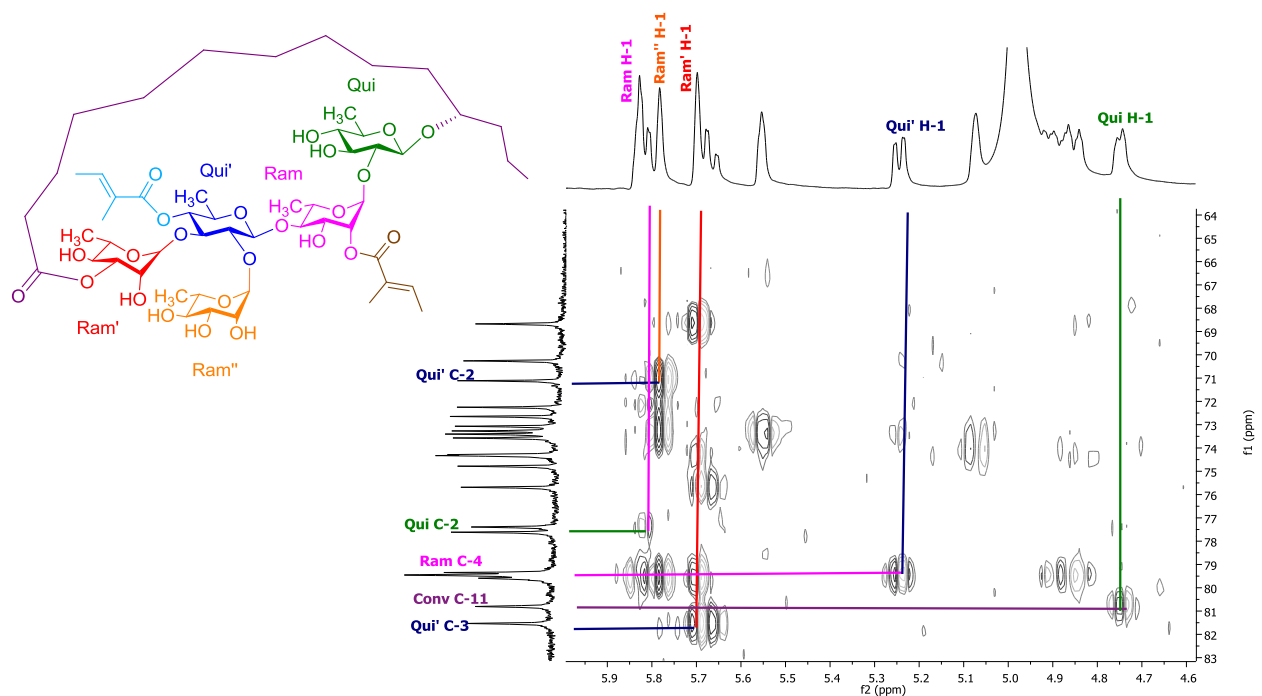
A través de la técnica HMBC se procedió a la determinación de las correlaciones  $^{13}C-^1H$  a tres enlaces de distancia ( $^3J_{C-H}$ ) para el establecimiento de los enlaces glicosídicos,<sup>1</sup> identificando las conectividades C-H entre los protones anoméricos y los carbonos enlazados directamente a la posición donde se establece el enlace glicosídico entre dos unidades sacáridas. De esta manera, se establecieron los núcleos oligosacáridos constitutivos de las estructuras de los albinosidos I-V (**1-5**). Esta técnica permitió confirmar las secuencias de glicosidación de los compuestos **1** y **4**, que corresponden a las descritas anteriormente para el ácido albinosínico A, para los compuestos **2** y **5** que corresponden a la del ácido albinosínico B y para el compuesto **3** que corresponden a la del ácido albinosínico C.



**Figura 25.** Espectro HMBC del albinósido I (1). Correlaciones  $^3J_{C-H}$  para la identificación de la secuencia de glicosidación.

Por lo tanto, la secuencia de azúcares en el núcleo oligosacárido de los albinósidos I, III y IV se estableció de la siguiente manera: la primera unidad sacárida del núcleo glicosídico corresponde a la quinovosa ya que se encuentra enlazada a la posición C<sub>11</sub> de la aglicona, Qui H<sub>1</sub> ( $\delta_H$  4.67 ppm)/Conv C<sub>11</sub> ( $\delta_C$  83.1 ppm); la segunda unidad corresponde a una glucosa (Glu) que se encuentra enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la quinovosa, Qui H<sub>2</sub> ( $\delta_H$  4.45 ppm)/Glu C<sub>1</sub> ( $\delta_C$  ~ 100.9 ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una quinovosa (Qui') enlazada a la posición H<sub>6</sub> de la segunda unidad monosacárida (Glu), Glu H<sub>6</sub> ( $\delta_H$  3.99 ppm)/Qui' C<sub>1</sub> ( $\delta_C$  100.8 ppm); la cuarta unidad del oligosacárido corresponde a una unidad de ramnosa terminal (Ram) enlazada a la posición C<sub>2</sub> de la segunda unidad de quinovosa (Qui'), Ram H<sub>1</sub> ( $\delta_H$  4.89 ppm)/Qui' C<sub>2</sub> ( $\delta_C$  78.1 ppm); y una unidad de ramnosa intermedia enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la segunda unidad de azúcar (Glu), Glu H<sub>2</sub> ( $\delta_H$  5.16 ppm)/Ram' C<sub>1</sub> ( $\delta_C$  98.6 ppm). La **figura 25** ilustra una expansión del espectro HMBC del albinósido I que ejemplifica la determinación de la secuencia oligosacárida.

Para los albinósidos II (2) (**Figura 26**) y V (5) se observaron las siguientes correlaciones: la primera unidad sacárida del núcleo glicosídico corresponde a la quinovosa ya que se encuentra enlazada a la posición C<sub>11</sub> de la aglicona, Qui H<sub>1</sub> ( $\delta_H$  4.68 ppm)/Conv C<sub>11</sub> ( $\delta_C$  83.9 ppm); la segunda unidad corresponde a una ramnosa (Ram) que se encuentra enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la primera unidad de quinovosa (Qui), Qui H<sub>2</sub> ( $\delta_H$  4.39ppm)/Ram C<sub>1</sub> ( $\delta_C$  98.0 ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una quinovosa (Qui') enlazada a la posición H<sub>4</sub> de la unidad de ramnosa (Ram), Qui' H-1 ( $\delta_H$  5.24 ppm)/Ram C<sub>4</sub> ( $\delta_C$  77.5 ppm); la cuarta unidad del oligosacárido corresponde a una unidad de ramnosa inferior (Ram') enlazada a la posición C<sub>3</sub> de la segunda unidad de quinovosa (Qui'), Ram' H<sub>1</sub> ( $\delta_H$  5.48 ppm)/Qui' C<sub>3</sub> ( $\delta_C$  78.7 ppm); y una unidad de ramnosa intermedia enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la tercera unidad de azúcar (Qui'), Ram' H<sub>1</sub> ( $\delta_H$  5.69 ppm)/Qui' C<sub>2</sub> ( $\delta_C$  71.4 ppm).



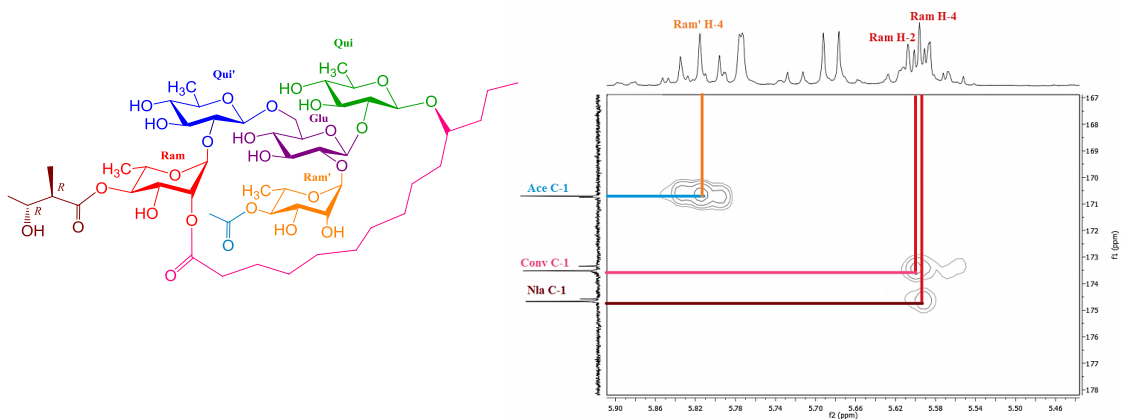
**Figura 26. Espectro HMBC del albinósido II (2).** Correlaciones  $^3J_{C-H}$  para la identificación de la secuencia de glicosidación.

Mediante los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  también se identificaron los ácidos de cadena corta como ácido acético para el compuesto **1**, el ácido (2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutanoico (nílico) para los compuestos **1** y **5**, y el ácido 2-metil-2-butenoico (tíglico) para los compuestos **2** – **5**. La presencia de estos residuos se confirmó mediante el análisis mediante CG-EM de las agliconas obtenidas durante la saponificación de las resinas glicosídicas (Parte Experimental, inciso 6.3).

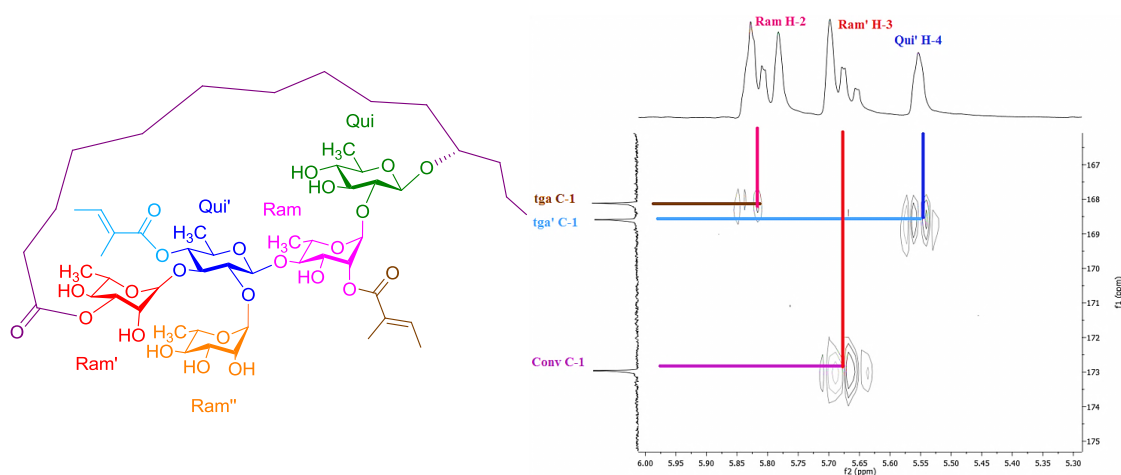
En el espectro de RMN  $^1\text{H}$ , el residuo éster acético genera un singulete en  $\delta_{\text{H}}$  1.90 ppm, el desplazamiento para  $\text{C}_1$  se localiza en  $\delta_{\text{C}}$  170.7 ppm; en tanto que el residuo éster 3-hidroxi-2-metilbutanoico genera dos señales atribuibles a los protones  $\text{H}_2$  y  $\text{H}_3$  como dobletes de cuartetos en  $\delta_{\text{H}}$  2.8 ( $J = 7.2, 7.1$  Hz) y 4.3 ppm ( $J = 7.0, 6.5$  Hz), respectivamente. Adicionalmente, las señales dobles que se localizan alrededor de  $\delta_{\text{H}}$  1.3 ( $J=7.0$ ) y 1.2 ppm ( $J=7.0$ ) son atribuibles a los protones  $\text{H}_4$  y  $\text{H}_5$ . En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , la señal para el carbonilo aparece en  $\delta_{\text{C}}$  174.6 ppm, las señales para  $\text{C}_2$  y  $\text{C}_3$  se localizan en  $\delta_{\text{C}}$  48.7 y 68.9 ppm, y las señales para  $\text{C}_4$  y  $\text{C}_5$  se presentan en  $\delta_{\text{C}}$  13 y 20 ppm respectivamente. El éster del ácido 2-metil-2 butenoico genera en el espectro de RMN  $^1\text{H}$  una señal atribuible al proton  $\text{H}_3$  como doblete de cuarteto o multiplete en 7.04 ppm ( $J=6.0$  y 1.2) y dos señales para  $\text{H}_4$  y  $\text{H}_5$  en  $\delta_{\text{H}}$  1.5 ( $J = 7.2$  Hz) como doblete y 1.85 ppm como singulete, respectivamente. En el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , la señal para el carbonilo aparece en  $\delta_{\text{C}}$  166.2, la señal vinílica para  $\text{C}_3$  se localiza en  $\delta_{\text{C}}$  136 ppm, y las señales alifáticas para  $\text{C}_4$  y  $\text{C}_5$  se presentan en  $\delta_{\text{C}}$  10 y 14 ppm, respectivamente.

Las posiciones de esterificación se identificaron mediante la asignación correcta de los carbonos correspondientes a cada uno de los grupos carbonilo.<sup>28-32</sup> Posteriormente se realizó el análisis de las interacciones  $^{2,3}J_{\text{CH}}$  en los espectros HMBC, entre los carbonos del carbonilo de cada uno de los ácidos con las señales de protones geminales a estos grupos acilantes. Para el albinósido I, la acilación se identificó en la posición  $\text{C}_4$  de las dos unidades de ramnosa: la cuarta unidad monosacárida (Ram) se encontraba esterificada por el residuo de nilato, en tanto que la unidad sacárida de ramificación (Ram') por el acetato (**Figura 27**). Para el albinósido II, las posiciones de esterificación se localizaron en el  $\text{C}_4$  de la tercera unidad monosacárida (Qui') y en el  $\text{C}_2$  de la unidad de ramnosa (Ram). Ambas

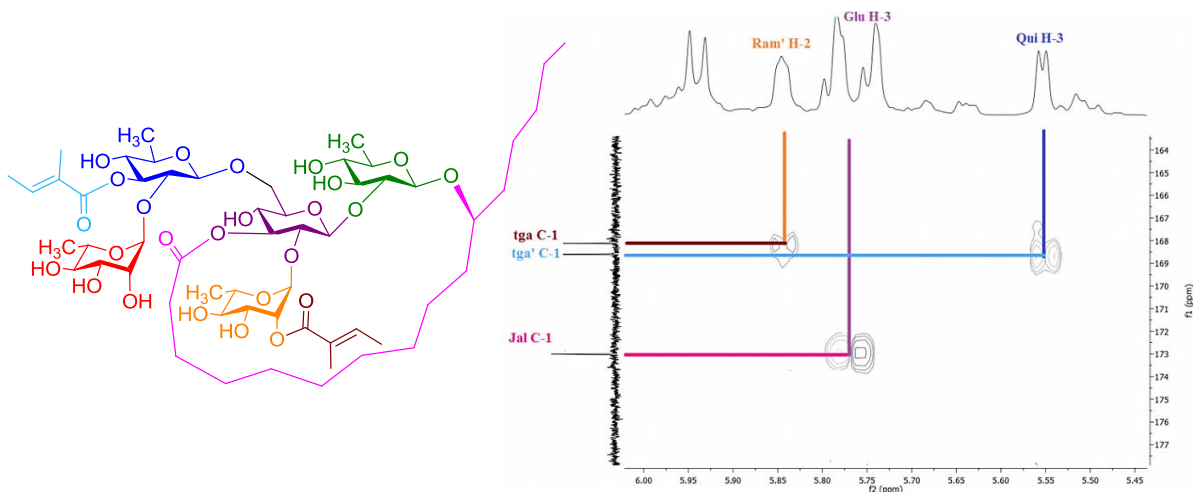
sustituciones correspondieron a ésteres de tigloilo (**Figura 28**). La acilación del albinósido III se identificó en las posiciones C<sub>3</sub> de la tercera unidad monosacárida (Qui') y C<sub>2</sub> de la unidad de ramnosa de ramificación (Ram'), también esterificadas por residuos de tigloilo (**Figura 29**). El albinósido IV presenta en la posición C<sub>2</sub> de la unidad sacárida de ramificación (Ram') una esterificación por un residuo de tigloilo y por último, el albinósido V presenta en las posiciones C<sub>2</sub> de la segunda unidad sacárida (Ram) y de la unidad de ramificación (Ram'') esterificaciones con los ésteres de tigloilo y niloilo, respectivamente.



**Figura 27.** Espectro HMBC del albinósido I (1). Correlaciones ( ${}^3J_{C-H}$ ) para la determinación de las posiciones de esterificación. Abreviaciones: **ace**= acetato, **conv** = 11-hidroxitetradecanoilo, **nla** = niloilo.



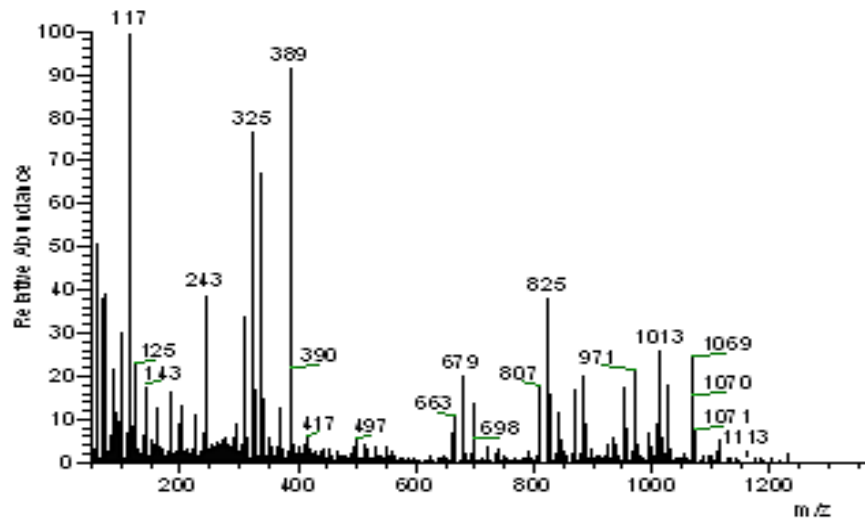
**Figura 28.** Espectro HMBC del albinósido II (2). Correlaciones ( ${}^3J_{C-H}$ ) para la determinación de las posiciones de esterificación. Abreviaciones: **tga**= tigloilo, **conv** = 11-hidroxitetradecanoilo.



**Figura 29. Espectro HMBC del albinósido III (3).** Correlaciones ( $^3J_{C-H}$ ) para la determinación de las posiciones de esterificación. Abreviaciones: **tga**= tiglioilo, **jal** = 11-hidroxihexadecanoilo.

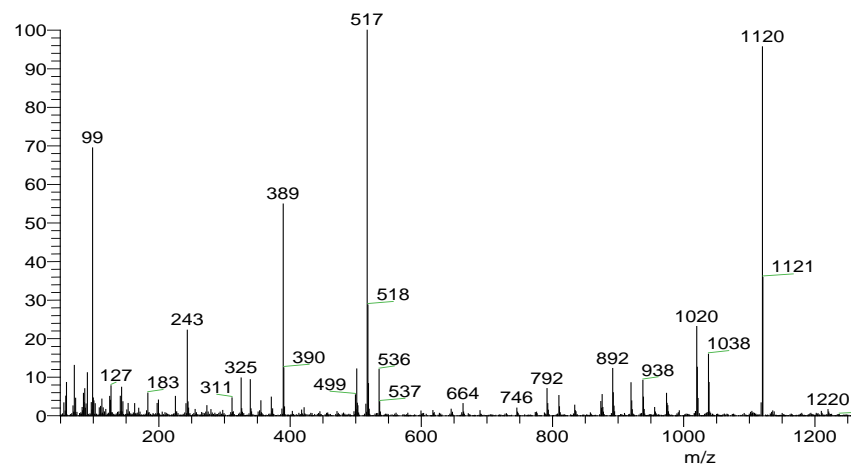
De la misma forma se determinaron las posiciones de la macrolactonización en los albinósidos I-V (**1-5**), siendo para los albinósidos I y V, la posición C<sub>2</sub> de la cuarta unidad monosacárida (Ram), mientras que para el albinósido II y V la posición C<sub>3</sub> de la cuarta unidad monosacárida (Ram') y para el albinósido III la posición C<sub>3</sub> pero la segunda unidad monosacárida (Glu).

Mediante la espectrometría de masas, se obtuvo un ion pseudomolecular  $m/z$  1113  $[M - H]^-$  para el albinósido I (**1**), correspondiente a una fórmula molecular C<sub>51</sub>H<sub>85</sub>O<sub>26</sub>. También se observaron los fragmentos de la eliminación consecutiva de un residuo de niloilo a  $m/z$  1013  $[M - H - 100 (C_5H_8O_2)]^-$  y un acetilo a  $m/z$  971  $[1013 - 42 (C_2H_2O)]^-$  (**Figura 30**).

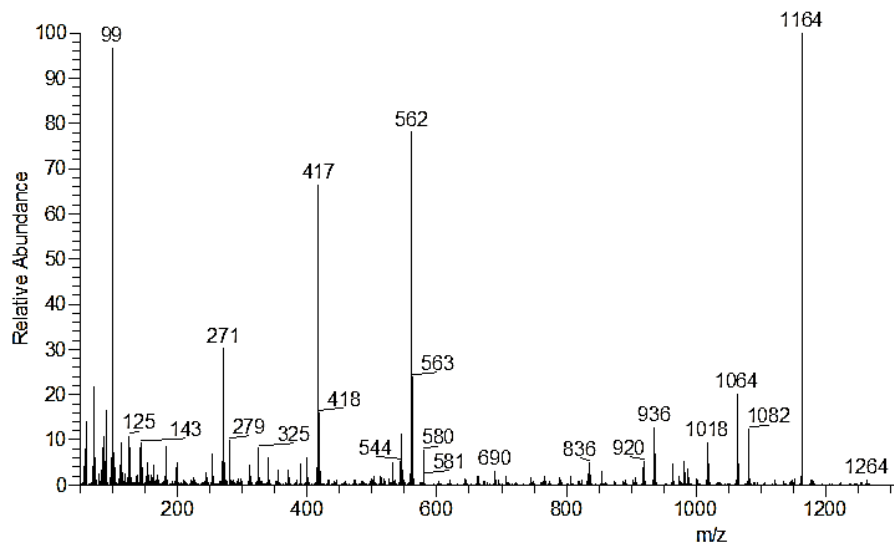


**Figura 30. Espectro de masas (modo negativo) del albinósido I**

Para el albinósido II (**2**), el espectro de masas reveló un ion pseudomolecular  $m/z$  1119  $[M - H]^-$ , correspondiente con la fórmula molecular  $C_{54}H_{87}O_{24}$ , en contraste con el ion pseudomolecular  $m/z$  1163  $[M - H]^-$  correspondiente a la fórmula molecular  $C_{57}H_{95}O_{24}$  para el albinósido III (**3**). Las pérdidas iniciales de los residuos de tigloilo lograron la generación de los fragmentos  $m/z$  1037 para **2** (**Figura 31**) y  $m/z$  1081 para **3** (**Figura 32**), además del pico  $m/z$  663  $[1037 - C_6H_{10}O_4 - C_6H_{10}O_4 - 82 (C_5H_6O)]^-$ , que corresponden a la pérdida de dos unidades de metilpentosa y un residuo de tigloilo para **2** y el fragmento  $m/z$  853  $[1081 - C_6H_{10}O_4 - 82 (C_5H_6O)]^-$ , que corresponde a la pérdida de una unidad de metilpentosa y un residuo de tigloilo para **3**.

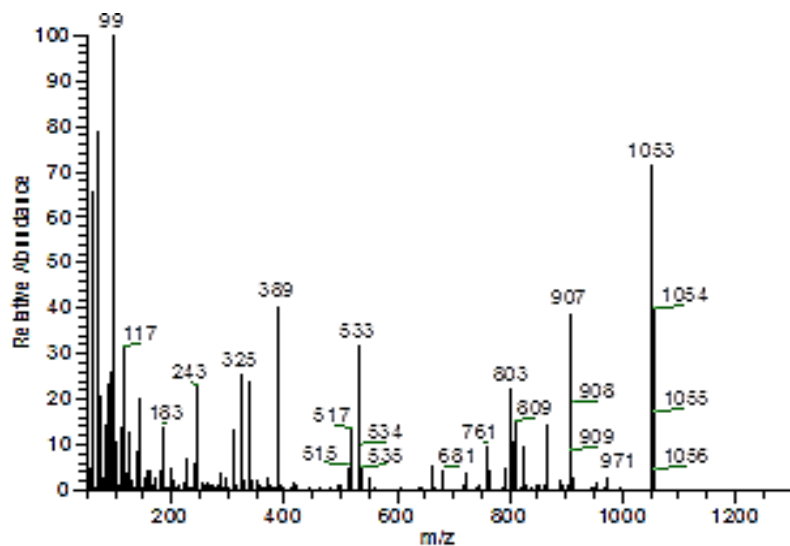


**Figura 31. Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido II**



**Figura 32. Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido III**

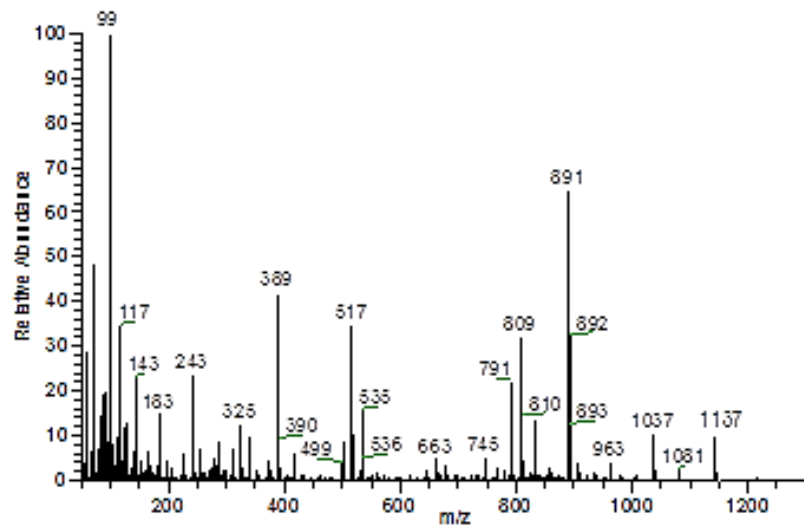
Para el albinósido IV (4), el espectro de masas mostró un ion pseudomolecular  $m/z$  1053  $[M - H]^-$  correspondiente a una fórmula molecular  $C_{49}H_{81}O_{24}$ . El fragmento  $m/z$  971 nos indica la pérdida inicial de un residuo de tigloilo. El resto de los fragmentos corresponden a las pérdidas características debidas a las rupturas de los enlaces glicosídicos.<sup>1, 29-33</sup>



**Figura 33. Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido IV**



Para el albinósido V (**5**), el espectro de masas mostró un ion pseudomolecular  $m/z$  1137  $[M - H]^-$  correspondiente con la fórmula molecular  $C_{54}H_{89}O_{25}$ . El fragmentos  $m/z$  1037 indica la pérdida de un residuo de niloilo y  $m/z$  809, la pérdida de una metilpentosa y un residuo de tigloilo. En los **Cuadros 11** y **12** se enumeran las constantes espectroscópicas en la RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  para los albinósidos I-V.



**Figura 34.** Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido V

**Cuadro 11. Datos espectroscópicos en la RMN <sup>1</sup>H para los albinósidos I-V (1-5)<sup>a</sup>**

Posición <sup>b</sup>	1	2	3	4	5
Qui-1	4.73 d (7.7)	4.75d (4.8)	4.77 d (7.6)	4.78 d (7.6)	4.77 d (7.6)
2	4.48 dd (9.2,7.8)	4.39 dd (9.2, 4.8)	4.44 dd (10.0,8.0)	4.44 dd (9.2,7.8)	4.42 dd (8.8, 8.0)
3	4.26-4.30 m*	3.66 dd (9.2,9.2)	4.44 dd (10.0,9.0)	4.26 m*	4.27 dd (8.8, 8.8)
4	3.63 m*	4.39 dd (9.2,9.2)	3.55 dd (9.0,8.4)	3.69 m*	4.27 dd (8.8,8.0)
5	3.63 m*	3.66 dq (9.2,5.6)	3.64 dq (8.0,6.0)	3.57 m*	3.66 dq (8.0,5.6)
6	1.50 d (5.7)	1.59 d (6.0)	1.59 d (6.0)	1.49 d (5.7)	1.59 d (5.6)
Glu-1	5.68 d (7.7)		5.94 d (7.2)	5.99 d (7.7)	
2	4.04 dd (9.0,7.8)		4.22 t (7.6)	4.18 dd (9.0,7.8)	
3	3.95 dd (9.1,8.9)		5.78 dd (9.6,8.0)	4.07 dd (9.1,8.9)	
4	3.68 dd (8.9,8.9)		3.83 m*	3.68 m*	
5	3.88 ddd (9.0, 6.0,3.0)		4.28 ddd (9.6,5.2,3.0)	3.81 ddd (9.0, 6.0,3.0)	
6 <sup>a</sup>	4.15-4.20 m*		4.30 dd (9.6,5.2)	4.20 m*	
6b	4.63 dd (11.7,2.0)		4.27 dd (9.6,2.0)	4.20 m*	
Ram-1	4.94 brs	5.83 s	5.78 s	5.64 brs	5.61 brs
2	5.60 dd (3.2, 2.1)	5.80 brs	5.09 brs	5.81 brs	5.77 brs
3	3.58 dd (8.4, 2.3)	4.92 dd (9.0, 2.4)	4.38 dd (8.8,2.8)	4.07 dd (9.8,2.8)	4.07 dd (9.0, 2.0)
4	5.58 dd (10.0,8.8)	4.45 dd (9.0, 9.0)	4.36 dd (8.8,8.8)	3.99 dd (9.8, 9.8)	3.53 dd (9.2, 9.2)
5	3.63 m*	4.86 dq (9.0,6.8)	3.69 dq (9.2,6.0)	5.10 dq (9.9,6.4)	3.64 m*
6	1.40 d (5.9)	1.91 d (6.5)	1.32 d (6.0)	1.59 d (6.5)	1.50 d (6.5)
Ram'-1	5.77 d (1.5)	5.69 s	5.74 s	5.82 brs	5.85 brs
2	4.57 brs	4.15 dd (3.0, 1.6)	5.85 brs	5.98 dd (3.2, 2.1)	4.13 m*
3	4.69 dd (9.8,2.8)	5.66 dd (9.0, 2.0)	4.88 dd (9.2,3.2)	4.65 dd (8.4, 2.3)	5.50 dd (9.0, 3.0)
4	5.81 dd (9.8, 9.8)	3.81 dd (9.2,9.0)	4.46 dd (9.2,9.0)	4.44 dd (8.8,10.0)	4.36 m*
5	5.18 dq (9.9,6.4)	3.66 dq (9.2, 6.0)	4.85 dq (9.0,6.4)	4.37 m*	4.32 m*
6	1.58 d (6.5)	1.50 d (6.5)	1.92 d (6.0)	1.82d (5.9)	1.95 d (6.5)
Qui'-1	5.13 d (7.8)	5.24 d (6.0)	5.24 d (7.6)	5.29 d (8.0)	5.33 d (8.0)
2	3.96 dd (9.0,8.0)	4.24 dd (9.2,7.0)	4.12 dd (9.2,7.0)	3.96 dd (9.0,8.0)	4.05 brs
3	4.19 dd (9.0,8.9)	4.14 dd (9.6,9.2)	5.55 dd (9.2,9.2)	4.19 dd (9.0,8.9)	3.79 dd (9.0, 2.4)
4	3.68 dd (9.0,8.9)	5.55 brs	4.13 dd (9.2,9.2)	3.68 m*	3.79 dd (9.0, 9.0)
5	3.88 dq (9.2, 6.0)	3.66 dq (9.2,6.0)	4.28 dq (9.2,5.2)	3.88 dq (9.2, 6.0)	3.71 dq (9.0,6.8)
6	1.64 d (6.1)	1.32 d (6.5)	1.68 d (5.6)	1.59 d (6.1)	1.61 d (6.5)
Ram''-1		5.78 s			5.73 brs
2		5.07 brs			5.85 m*
3		4.54 dd (9.0, 3.0)			4.54 dd (9.0, 3.0)
4		4.31 dd (9.6,9.2)			4.30 m*
5		4.25 dq (9.6,6.0)			4.25 m*
6		1.67 d (6.5)			1.87 d (6.5)
conv 2a	2.64 m*	3.02 dd (10.0,7.2)		2.64 m*	2.90 dd (9.6,7.6)
2b		2.44 dd (10.0,7.2)			2.43 dd (9.2,7.6)
11	3.72-3.80 m*	3.82 brs		3.72-3.80 m*	3.83-3.88 m*
14	0.91 t (7.4)	0.89 t (7.2)		0.91 t (7.4)	0.90 t (7.2)
jal 2a			3.0 dd (8.8,7.6)		
2b			2.43 dd (8.8,8.0)		
11			3.83 m*		
16			0.86 t (6.8)		
nla-2	2.76 dq (7.2,7.1)				2.82 dq (7.2,6.8)
3	4.28 dq (7.0,6.5)				4.26-4.30 m*
4	1.32 d (7.0)				1.32 d (5.2)
5	1.20 d (7.0)				1.25 d (7.2)
ace-2	1.90 s				
tga-3		7.09 dq (6.0,1.2)	7.04 dq (6.8,0.8)	7.12 dq (7.2,1.2)	7.12 dq (7.2, 1.2)
4		1.51 t (7.2,6.4)	1.49 d (7.2)	1.40 d (7.2)	1.49 d (7.2)
5		1.85 s	1.84 s	1.91 brs	1.85 brs
tga'-3		7.10 dq (6.0,0.8)	7.08 dq (7.2,0.9)		
4		1.44 d (6.4)	1.41d (7.2)		
5		1.87 s	1.86 s		

<sup>a</sup>Datos registrados a 500 MHz para **1** y 400 MHz para **2-5** en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos (δ) se encuentran en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en paréntesis y están expresadas en Hz. Los desplazamientos químicos marcados con un asterisco (\*) indican señales sobrepuestas. s = señal singulete, brs = señal ancha, d = señal doble, t = señal triple, m = señal múltiple. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY, TOCSY) y heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMQC, HMBC).

<sup>b</sup>Abreviaciones: TMS = tetrametilsilano, fuc = fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, conv= 11-hidroxitetradecanoilo, jal = 11-hidroxihexadecanoilo, ace= acetilo, nla = niloilo, tga = tigloilo.

**Cuadro 12. Datos espectroscópicos en la RMN <sup>13</sup>C para los albinósidos I-V (1-5)<sup>a</sup>**

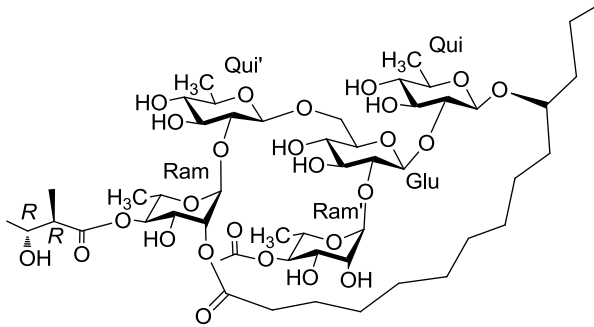
Position <sup>b</sup>	1	2	3	4	5
Qui-1	103.5	101.1	103.2	103.5	102.9
2	78.8	77.4	79.6	69.5	69.3
3	78.9	75.7	77.6	78.9	80.8
4	76.6	75.5	77.8	76.6	79.3
5	72.9	71.2	72.8	72.3	77.7
6	18.2	17.1	18.9	18.2	18.6
Glu-1	101.2		100.5	101.2	
2	77.9		81.2	77.9	
3	75.4		79.6	75.4	
4	70.0		77.4	70.0	
5	76.5		74.2	76.5	
6	69.6		62.5	63.2	
Ram-1	100.2	98.4	105.2	100.2	99.9
2	71.7	72.4	72.6	71.7	74.1
3	74.2	77.6	71.3	74.2	72.9
4	75.6	77.5	79.3	77.6	75.7
5	72.2	66.7	70.3	67.3	72.3
6	17.4	17.8	17.5	17.4	18.7
Ram'-1	101.1	97.0	98.9	101.1	100.1
2	71.9	71.7	74.3	71.9	73.4
3	70.1	77.8	79.4	70.1	72.2
4	76.1	73.8	79.5	76.1	85.5
5	66.5	70.3	68.6	70.0	68.6
6	18.1	16.7	19.7	18.1	19.8
Qui'-1	104.4	103.1	105.1	104.4	106.6
2	81.3	71.4	77.5	81.3	70.5
3	77.7	79.7	74.8	77.7	81.5
4	76.7	72.9	73.2	76.7	77.1
5	72.5	68.3	71.2	72.5	72.9
6	18.4	15.6	18.9	18.4	18.6
Ram''-1		103.3			99.7
2		70.7			73.6
3		71.5			72.4
4		72.4			79.4
5		69.2			70.5
6		17.1			18.2
conv-1	173.5	171.1		173.5	172.9
2	33.2	33.8		33.2	34.1
11	81.5	78.8		81.5	81.6
14	14.3	14.3		14.3	14.6
jal-1			173.0		
2			35.0		
11			81.5		
16			14.7		
nla-1	174.6				174.5
2	48.7				48.9
3	68.9				69.3
4	20.4				19.6
5	13.0				12.7
ace-1	170.7				
2	25.2				
tga-1		166.2	168.1	167.7	167.9
3		136.0	137.9	138.4	138.4
4		12.2	14.5	14.6	14.7
5		10.9	12.7	12.6	12.7
tga'-1		166.7	168.6		
3		136.7	138.7		
4		12.6	14.5		
5		10.8	12.7		

<sup>a</sup>Datos registrados a 125.7 MHz para **1** y 100 MHz para **2** y **3** en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm en relación al TMS. Las asignaciones se basaron en los experimentos HSQC.

<sup>b</sup>Abreviaciones: qui= quinovosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, conv = 11-hidroxitetradecanoilo, jal = 11-hidroxihexadecanoilo, nla = niloilo, ace = acetilo, tga = tigloilo.

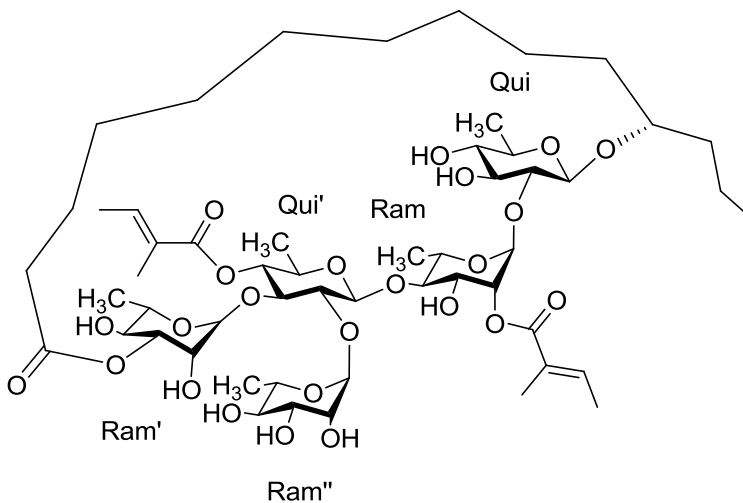
De acuerdo al análisis de los espectros por RMN y espectrometría de masas de los compuestos **1-5**, se propusieron las siguientes estructuras químicas para los albinósidos I-V:

### Albinósido I (1)

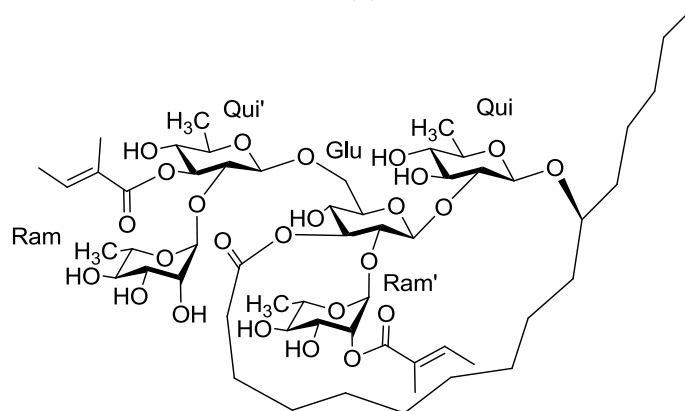


Éster intramolecular **1,2''''**-11-*O*-4-*O*-(acetil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[4-*O*-(niloil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.

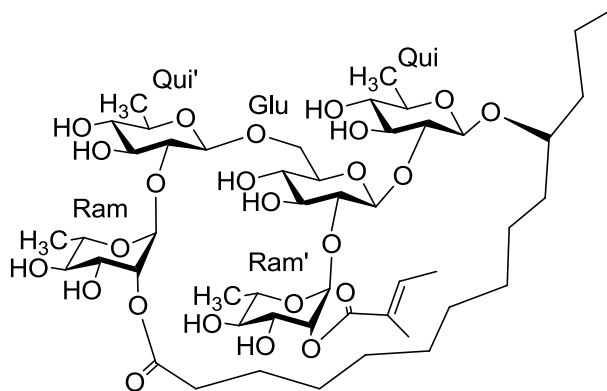
### Albinósido II (2)



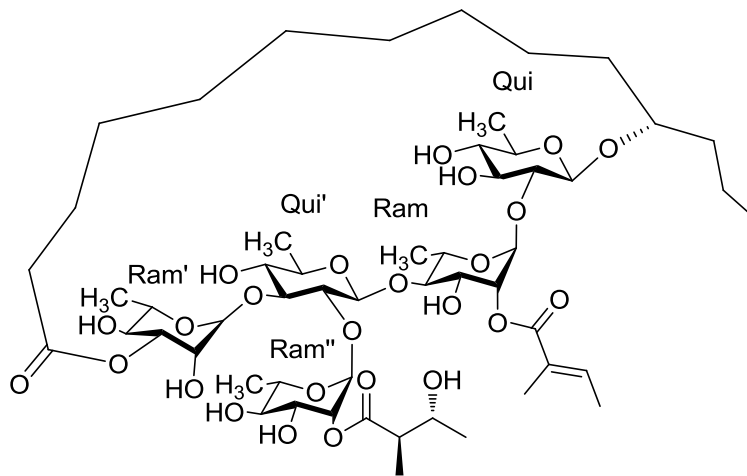
Éster intramolecular **1,3''''**-11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*-[4-*O*-(tigloil)-*O*-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]-*O*-[2-*O*-(tigloil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.

**Albinósido III (3)**

Éster intramolecular **1,3''**-11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[3-*O*-(tigloil)-6-deoxy- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]-[2-*O*-(tigloil)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-6-deoxy- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico.

**Albinósido IV (4)**

Éster intramolecular **1,2''''**-11-*O*-2-*O*-(tigloil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxy- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxy- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.

**Albinósido V (5)**

Éster intramolecular **1,3'''**-11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[2-*O*-(niloil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-[2-*O*-(tigloil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.

### 6.7.2 Albinósidos VI y VII

Mediante el análisis de los espectros por RMN  $^{13}\text{C}$  se logró determinar el número de señales de carbonos anoméricos en la región comprendida entre  $\delta_{\text{C}}$  95-110, que indicaron el número de monosacáridos que se encuentran constituyendo al núcleo oligosacárido. Así mismo, el experimento HSQC permitió identificar las señales de protones anoméricos en el espectro RMN  $^1\text{H}$ . Al igual que para los albinósidos I-V, se analizaron las constantes de acoplamiento para la identificación de las unidades monosacáridas, con lo cual se determinó la presencia de dos unidades de D-quinovosa, una D-glucosa y una L-ramnosa para el albinósido VI (**6**) y la presencia de tres unidades de D-quinovosa y una L-ramnosa para el albinósido VII (**7**).<sup>34,35</sup>

La presencia de las metilpentosas se corroboró con los dobletes localizados entre  $\delta_{\text{H}}$  1.4–1.6 asignables a los metilos de tres unidades de metilpentosa en **6**, y de cuatro para **7**. Posteriormente se recurrió al uso de las técnicas bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY y TOCSY) para la asignación de las señales restantes de cada uno de los metinos en cada monosacárido.

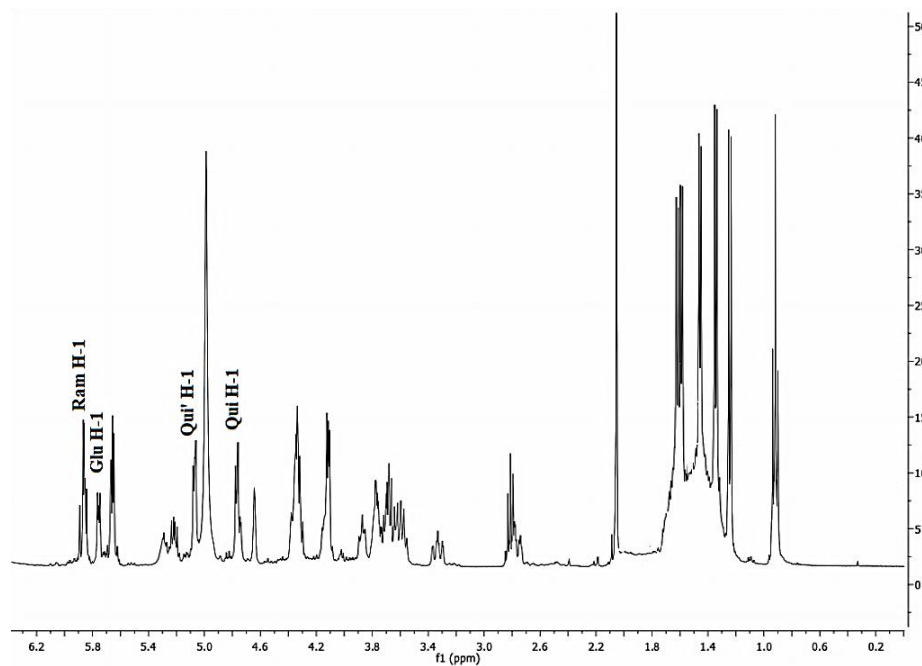


Figura 35. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VI (**6**)

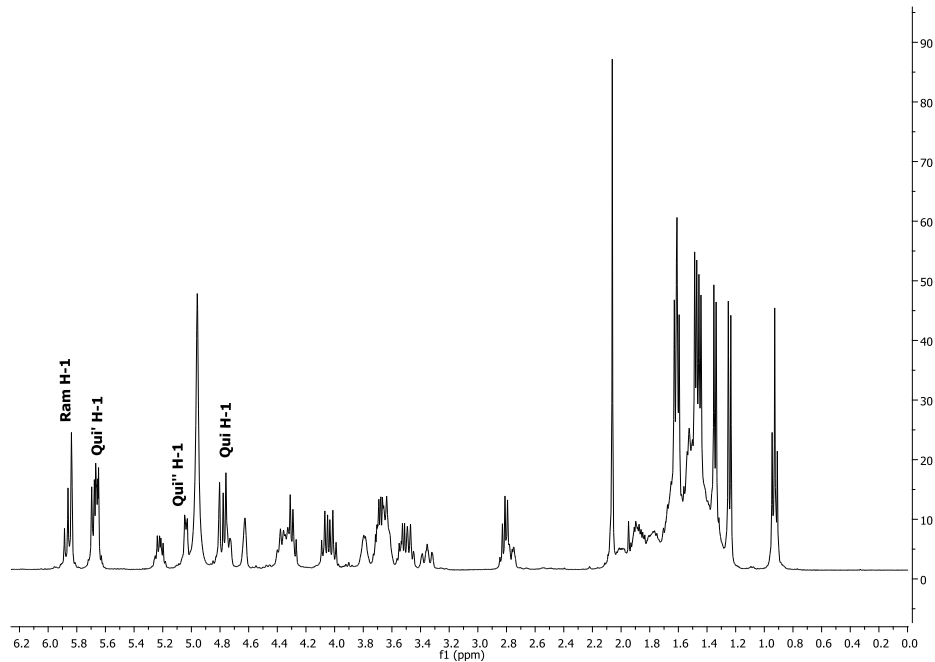


Figura 36. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VII (7)

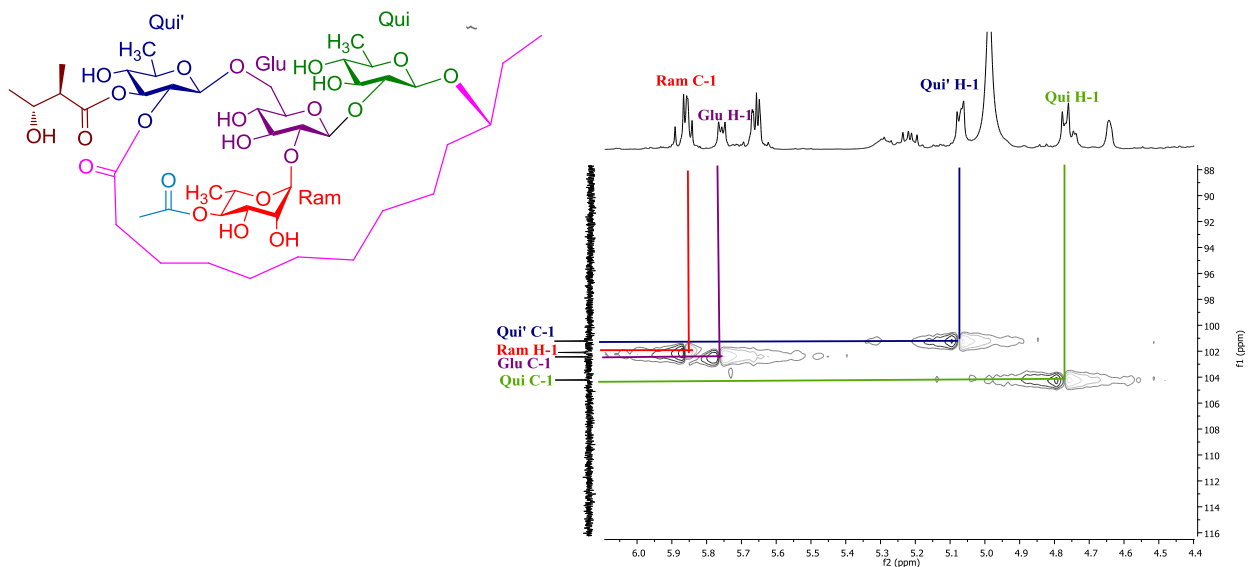
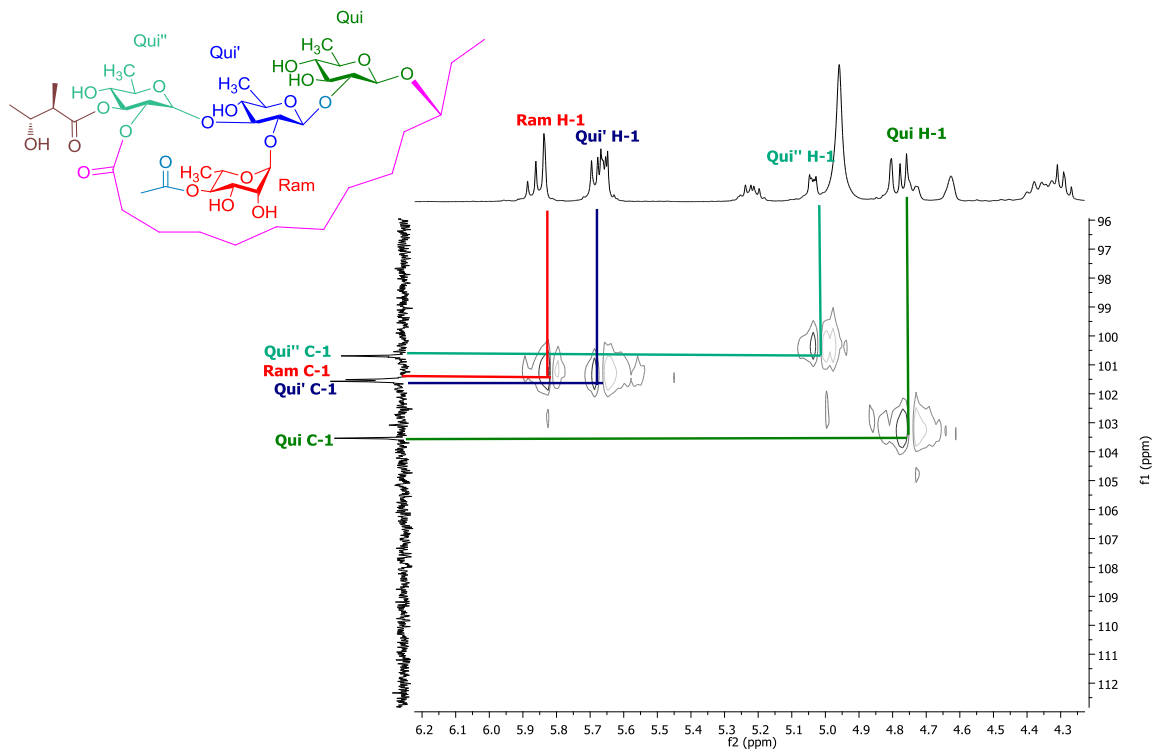
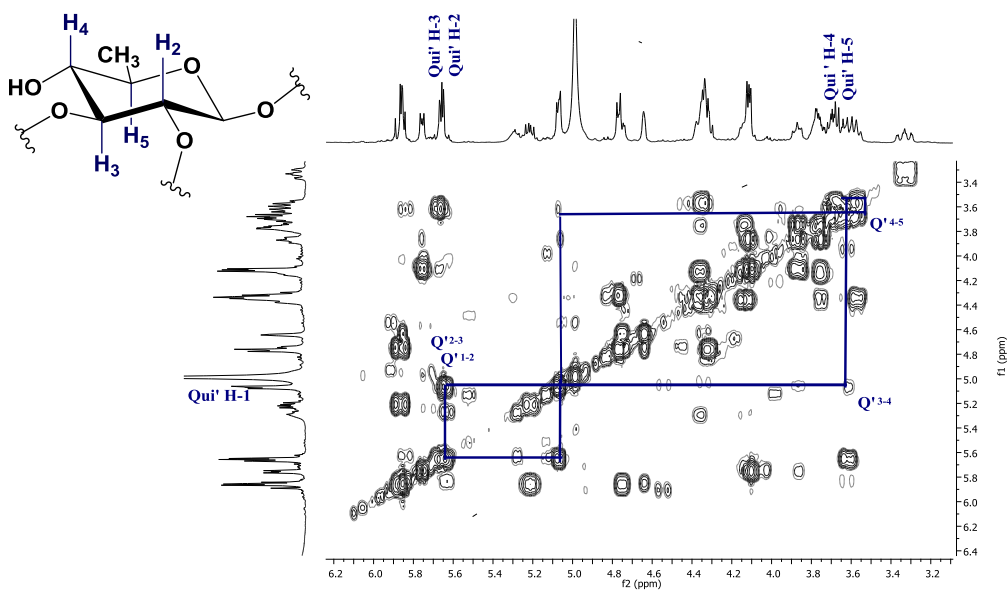


Figura 37. Espectro HSQC del albinósido VI (6). Correlaciones ( $^1J_{\text{C-H}}$ ) observadas en la región anomérica. Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Qui'**= quinovosa intermedia, **Glu**= glucosa, **Ram** = ramnosa intermedia.

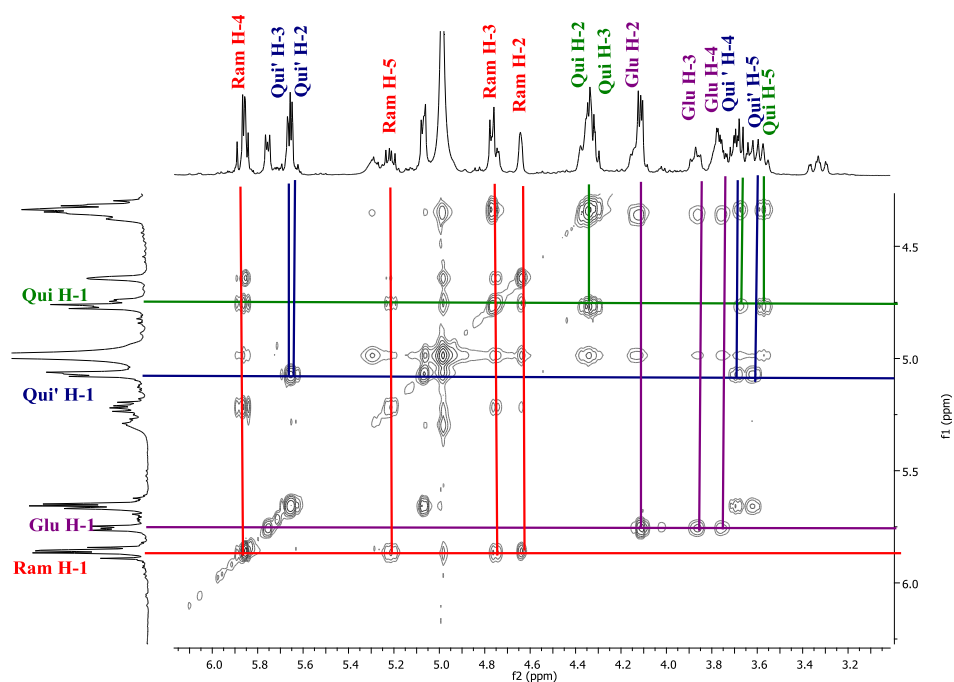




**Figura 38.** Espectro HSQC del albinósido VII (7). Correlaciones ( $^1J_{C-H}$ ) observadas en la región anomérica. Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Qui'**= quinovosa intermedia, **Qui''**= quinovosa terminal, **Ram** = ramosa intermedia.



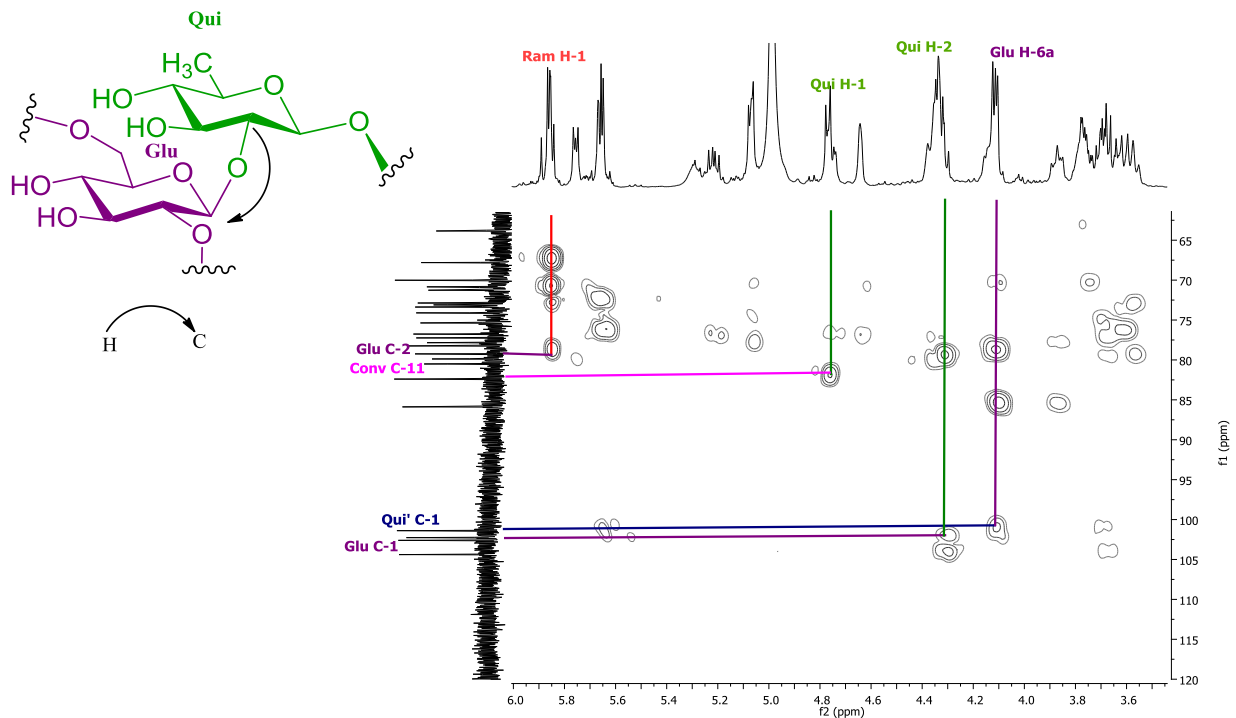
**Figura 39.** Espectro  $^1H$ - $^1H$  COSY para la región oligosacárida del albinósido VI (6). Correlaciones ( $^3J_{H-H}$ ): **Qui'** (**Q'**)= quinovosa intermedia. Abreviaciones: **Q'**<sub>1-2</sub>; Qui' H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, **Q'**<sub>2-3</sub>; Qui' H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, **Q'**<sub>3-4</sub>; Qui' H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, **Q'**<sub>4-5</sub>; Qui' H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>.



**Figura 40. Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinósido VI (6).** Abreviaciones: Qui= quinovosa, Glu= glucosa, Qui'= quinovosa intermedia, Ram= ramnosa intermedia.

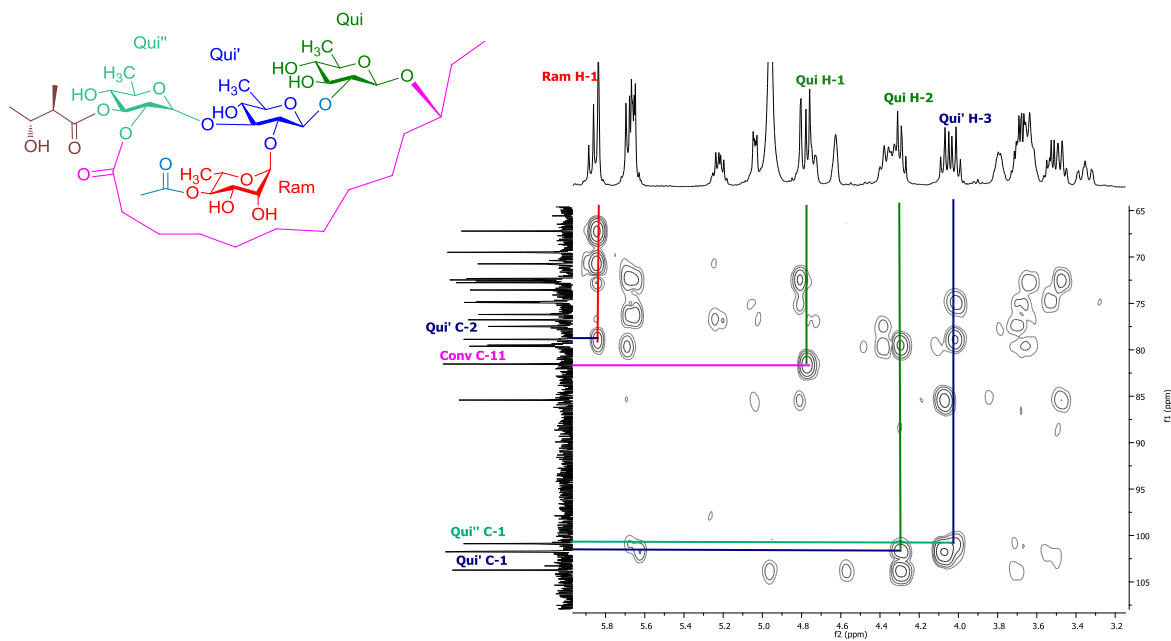
La asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los protones oligosacáridos se llevó a cabo mediante la técnica heteronuclear HSQC  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  ( $^1J_{\text{C-H}}$ ).

Con la técnica HMBC se procedió a la determinación de las correlaciones a tres enlaces de distancia ( $^3J_{\text{C-H}}$ ) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación. Por tanto, la secuencia de azúcares en el núcleo oligosacárido del albinósido VI se estableció de la siguiente manera: la primera unidad sacárida del núcleo glicosídico corresponde a la quinovosa que se encuentra enlazada a la posición  $\text{C}_{11}$  de la aglicona, Qui H<sub>1</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  4.77 ppm)/Conv  $\text{C}_{11}$  ( $\delta_{\text{C}}$  81.4 ppm); la segunda unidad corresponde a una glucosa (Glu) que se encuentra enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la quinovosa, Qui H<sub>2</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  4.30 ppm)/Glu C<sub>1</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  102.4 ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una quinovosa (Qui') enlazada a la posición H<sub>6</sub> de la segunda unidad monosacárida (Glu), Glu H<sub>6</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  4.12 ppm)/Qui' C<sub>1</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  101.3 ppm); la cuarta unidad del oligosacárido corresponde a una unidad de ramnosa intermedia enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la segunda unidad de azúcar (Glu), Ram H<sub>1</sub> ( $\delta_{\text{H}}$  5.85 ppm)/Gluc C<sub>2</sub> ( $\delta_{\text{C}}$  79.3 ppm). La **figura 41** muestra una expansión del espectro HMBC del albinósido VI que ejemplifica la determinación de la secuencia oligosacárida.



**Figura 41. Espectro HMBC del albinósido VI (6).** Correlaciones  $^3J_{C-H}$ , para la identificación de la secuencia de glicosidación.

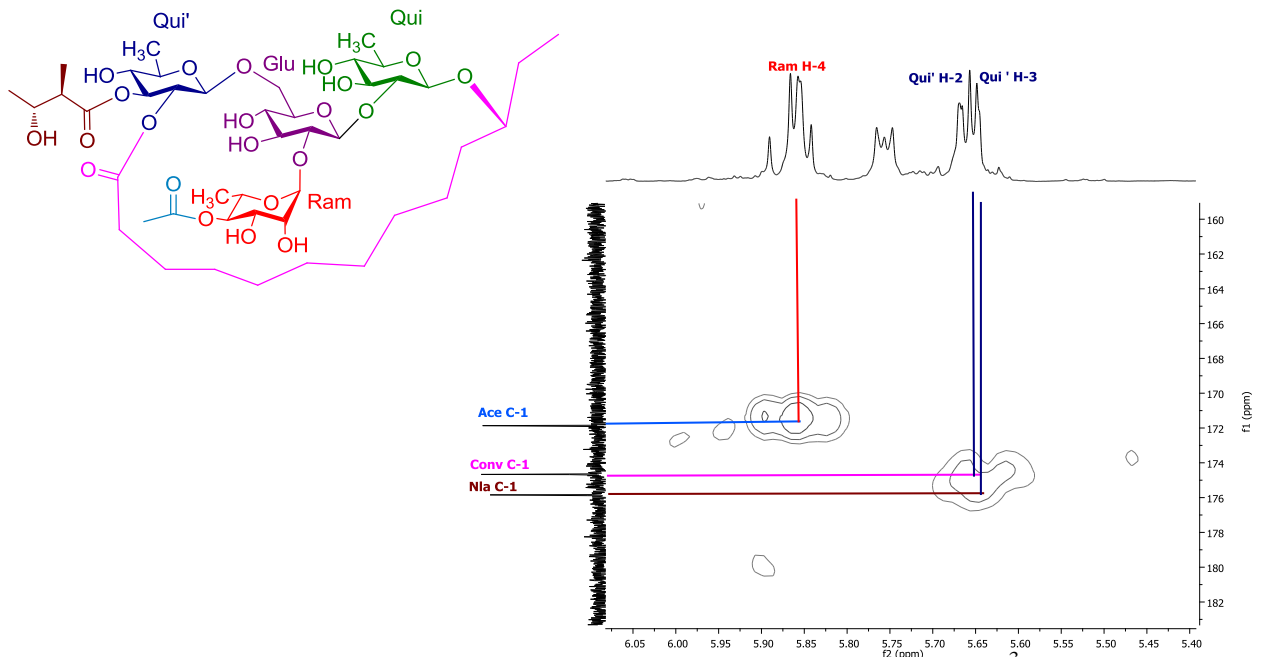
Para el albinósido VII, la secuencia de glicosidación se estableció de la siguiente manera: la primera unidad sacárida del núcleo oligosacárido corresponde a la quinovosa ya que se encuentra enlazada a la posición C<sub>11</sub> de la aglicona, Qui H<sub>1</sub> ( $\delta_H$  4.78 ppm)/Conv C<sub>11</sub> ( $\delta_C$  82.4 ppm); la segunda unidad corresponde a otra unidad quinovosa (Qui') que se encuentra enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la quinovosa, Qui H<sub>2</sub> ( $\delta_H$  4.28 ppm)/Qui' C<sub>1</sub> ( $\delta_C$  102.6 ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una tercera quinovosa (Qui'') enlazada a la posición H<sub>3</sub> de la segunda unidad monosacárida (Qui'), Qui' H<sub>3</sub> ( $\delta_H$  4.03 ppm)/Qui'' C<sub>1</sub> ( $\delta_C$  101.4 ppm); la cuarta unidad del oligosacárido corresponde a una unidad de ramnosa intermedia enlazada a la posición H<sub>2</sub> de la segunda unidad de azúcar (Qui'), Ram H<sub>1</sub> ( $\delta_H$  5.83 ppm)/ Qui' C<sub>2</sub> ( $\delta_C$  78.8 ppm). La **figura 42** muestra una expansión del espectro HMBC del albinósido VII que ejemplifica la determinación de la secuencia oligosacárida.



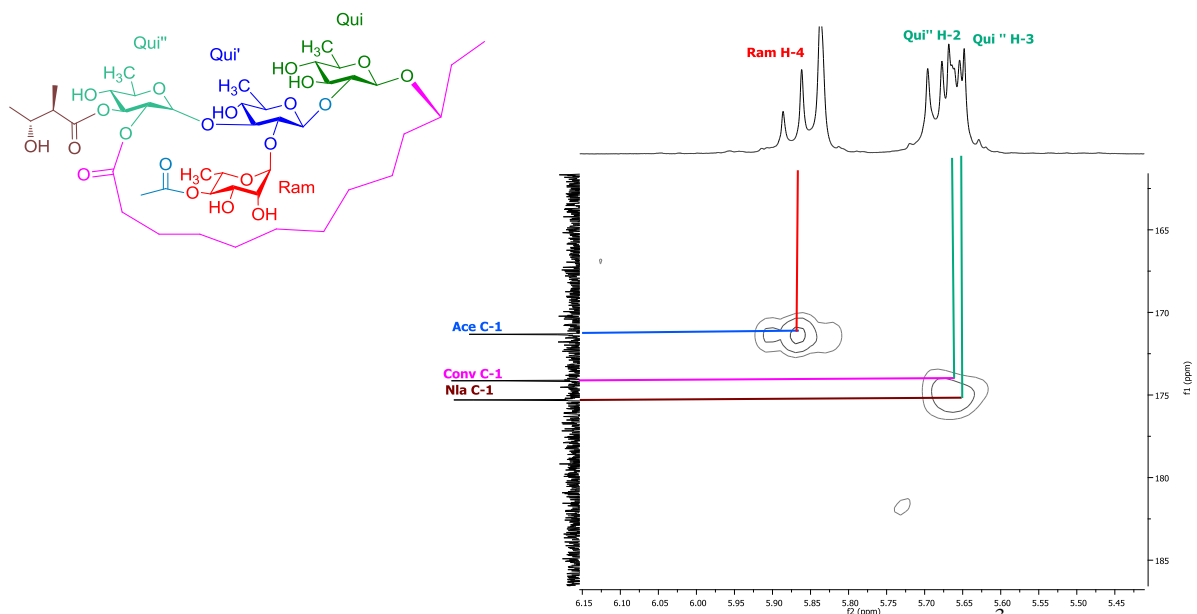
**Figura 42. Espectro HMBC del albinósido VII (7).** Correlaciones  ${}^3J_{C-H}$ , para la identificación de la secuencia de glicosidación.

Al igual que en los casos anteriores, se identificaron los ácidos de cadena corta mediante los espectros de RMN  ${}^1H$ , RMN  ${}^{13}C$  y espectrometría de masas como los ácidos acético y (2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutanoico (nílico). La posición de lactonización de la macrolactona en los compuestos **6** y **7** correspondió a la posición  $C_2$  de la tercera unidad monosacárida (Qui' y Qui'', respectivamente) y se estableció mediante las correlaciones C-H a tres enlaces de distancia mediante el espectro HMBC.

El análisis de las interacciones  ${}^{13}C$ - ${}^1H$  a dos enlaces de distancia entre el carbono de los grupos carbonilo y los protones  $H_2$  de cada sustituyente mediante el espectro HMBC permitió identificar a cada uno de los carbonilos. Las posiciones de esterificación se determinaron a partir de las correlaciones ( ${}^3J_{C-H}$ ) entre los carbonos del carbonilo de cada uno de los ácidos con las señales protónicas geminales a estos grupos, siendo para los albinósidos VI y VII, en el  $C_3$  de las terceras unidades monosacáridas (Qui' y Qui'' respectivamente) esterificadas por el residuo de niloilo, y en el  $C_4$  de las unidades monosacáridas intermedias (Ram) aciladas por el éster acetilo. (**Figuras 43-44**).

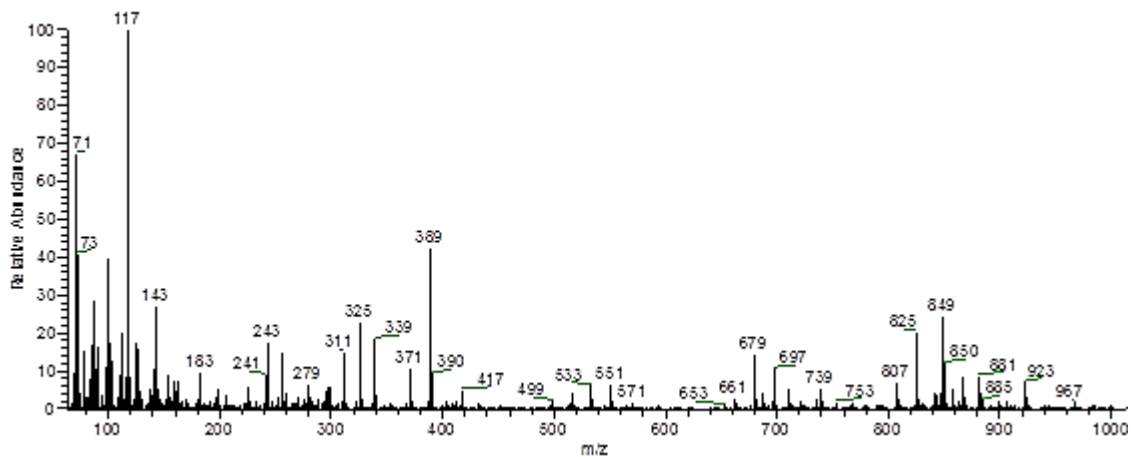


**Figura 43.** Espectro HMBC del albinósido VI (6). Correlaciones ( ${}^3J_{C-H}$ ) para la determinación de las posiciones de esterificación. Abreviaciones: **ace** = acetilo, **nla** = niloilo, **conv** = 11-hidroxitetradecanoilo.

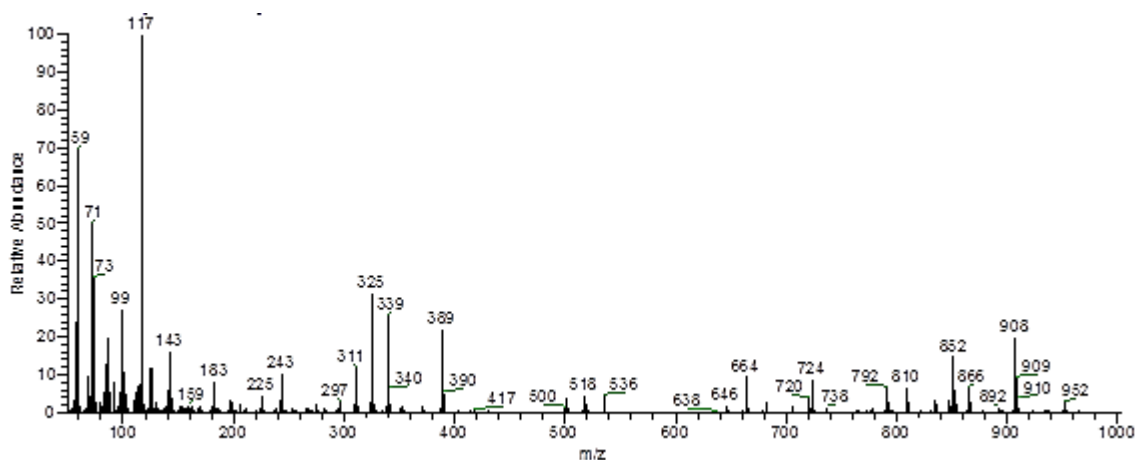


**Figura 44.** Espectro HMBC del albinósido VII (7). Correlaciones ( ${}^3J_{C-H}$ ) para la determinación de las posiciones de esterificación. Abreviaciones: **ace** = acetilo, **nla** = niloilo, **conv** = 11-hidroxitetradecanoilo.

En cuanto al espectro de masas para el albinósido VI (**6**), se observó un ion pseudomolecular  $m/z$  967  $[M - H]^-$ , correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{45}H_{75}O_{22}$ , mientras que para el albinósido VII (**7**) el ion pseudomolecular correspondió a  $m/z$  951  $[M - H]^-$  para una fórmula molecular de  $C_{45}H_{75}O_{21}$ . Los fragmentos  $m/z$  867 y  $m/z$  825  $[867 - 42 (C_2H_2O)]^-$  para **6** (**Figura 45**), correspondieron a las pérdidas de los residuos de niloilo y acetilo respectivamente. Para **7** (**Figura 46**), el fragmento  $m/z$  851 correspondió a la pérdida inicial del residuo de niloilo y el fragmento  $m/z$  809  $[851 - 42 (C_2H_2O)]^-$  a la pérdida de un residuo acetilo. También se pueden observar las pérdidas correspondientes a tres metilpentosas y una hexosa para **6**, mientras que para **7**, se registraron las pérdidas de cuatro metilpentosas.



**Figura 45.** Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido VI



**Figura 46.** Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido VII

### 6.7.3 Albinósidos VIII y X

Los albinósidos VIII y X son tetrasacáridos cuyo núcleo oligosacárido está constituido por una unidad de D-quinovosa, D-glucosa, L-ramnosa y D-fucosa. El análisis de los espectros por RMN  $^{13}\text{C}$  permitió determinar cuatro señales correspondientes a los carbonos anoméricos en la región comprendida entre  $\delta_{\text{C}}$  95–110, así mismo, el experimento HSQC permitió una correlación C-H a un enlace de distancia ( $^1J_{\text{CH}}$ ) para identificar las señales correspondientes a los protones anoméricos en el espectro RMN  $^1\text{H}$ . Además, se analizaron las constantes de acoplamiento para la identificación de las unidades monosacáridas. Los tres dobletes localizados entre  $\delta_{\text{H}}$  1.4–1.6 correspondieron a los metilos de las unidades de metilpentosa. Posteriormente, se recurrió al uso de las técnicas bidimensionales en la RMN ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY) (Figuras 49-50).

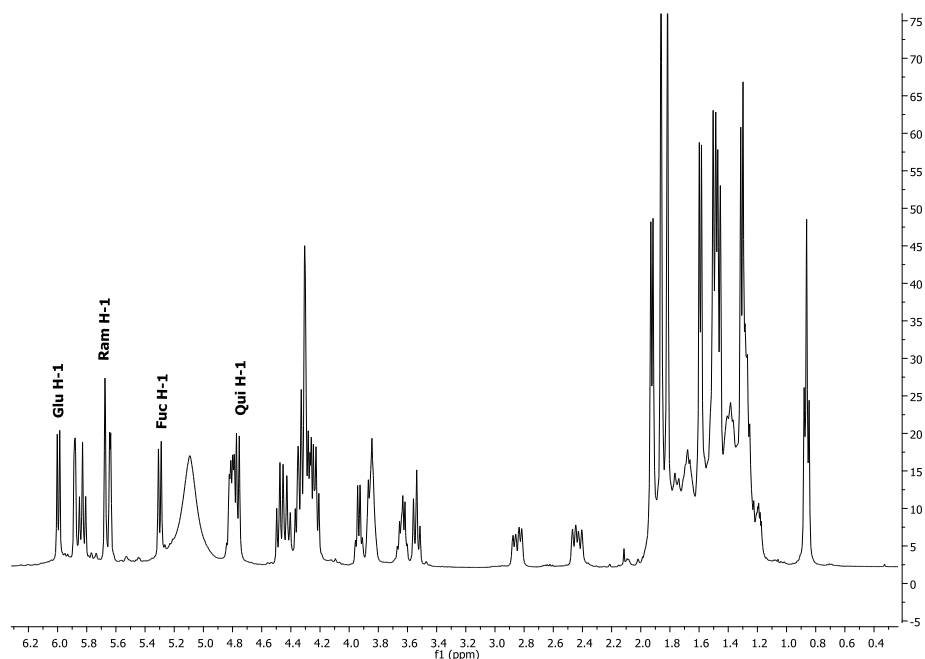


Figura 47. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VIII (8)

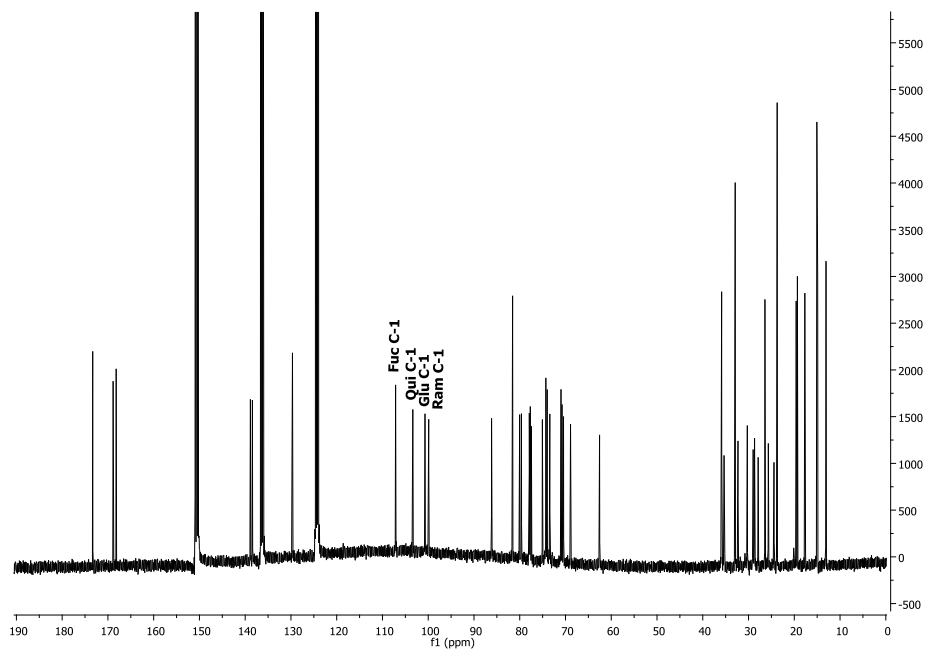


Figura 48. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VIII (8)

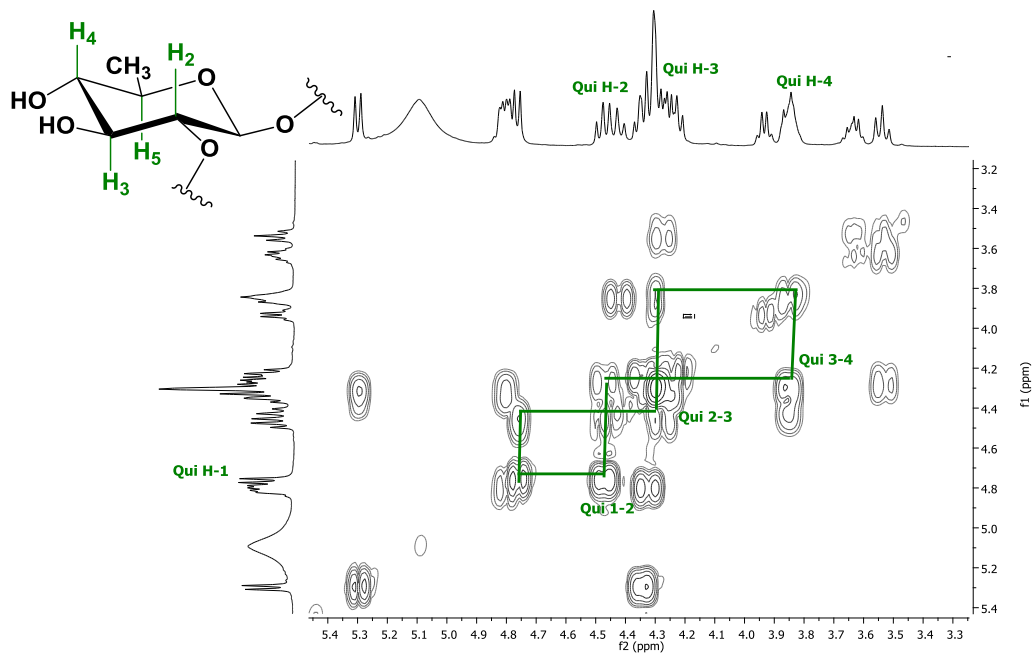
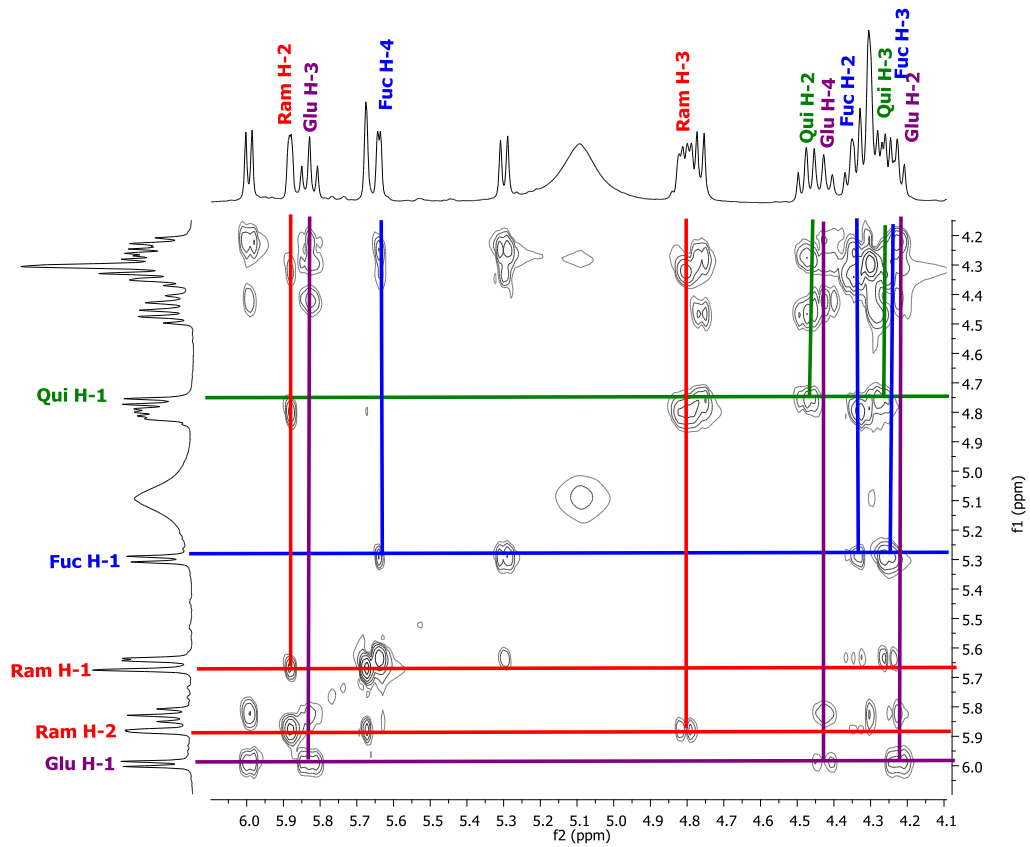


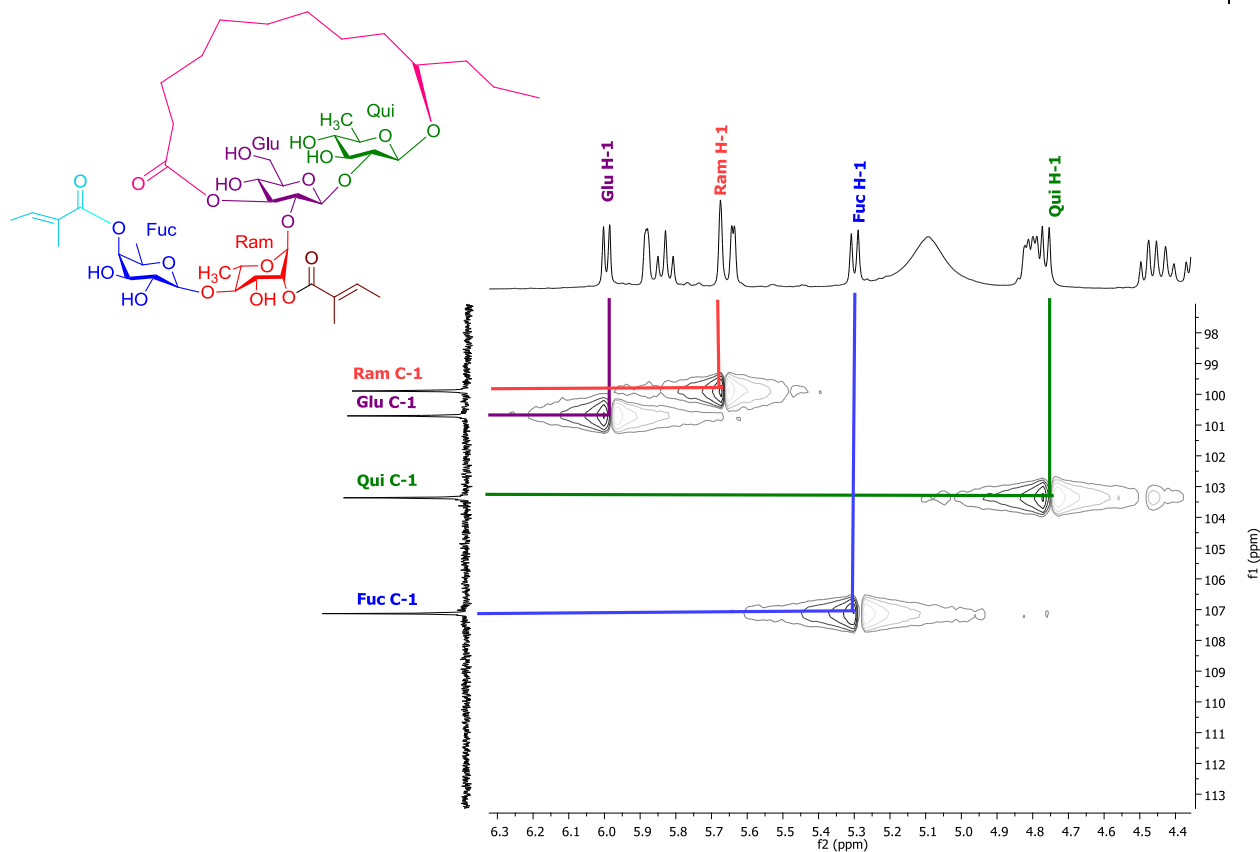
Figura 49. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para la región oligosacárida del albinósido VIII (8). Correlaciones ( $^3J_{\text{H-H}}$ ): **Qui**= quinososa. Abreviaciones: **Q**<sub>1-2</sub>; Qui H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, **Q**<sub>2-3</sub>; Qui H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, **Q**<sub>3-4</sub>; Qui H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>,





**Figura 50. Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinosido VIII (8).** Abreviaciones: Qui= quinovosa, Glu= glucosa, Fuc= fucosa, Ram= ramnosa.

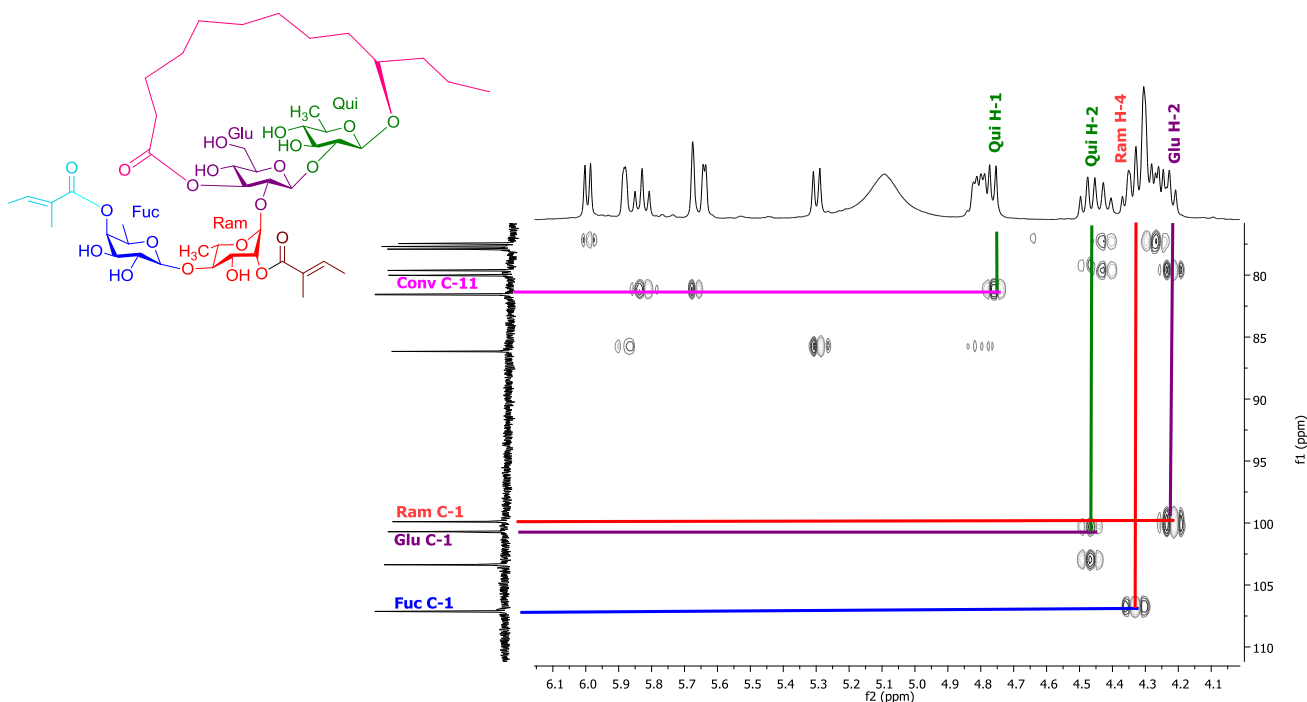
La asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los protones oligosacáridos se llevó a cabo mediante la técnica heteronuclear HSQC  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  ( $^1J_{\text{C-H}}$ ) (Figura 51).



**Figura 51. Espectro HSQC del albinósido VIII (8).** Correlaciones ( $^1J_{C-H}$ ) observadas en la región anomérica. Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Fuc**= fucosa, **Glu**= glucosa, **Ram** = ramnosa.

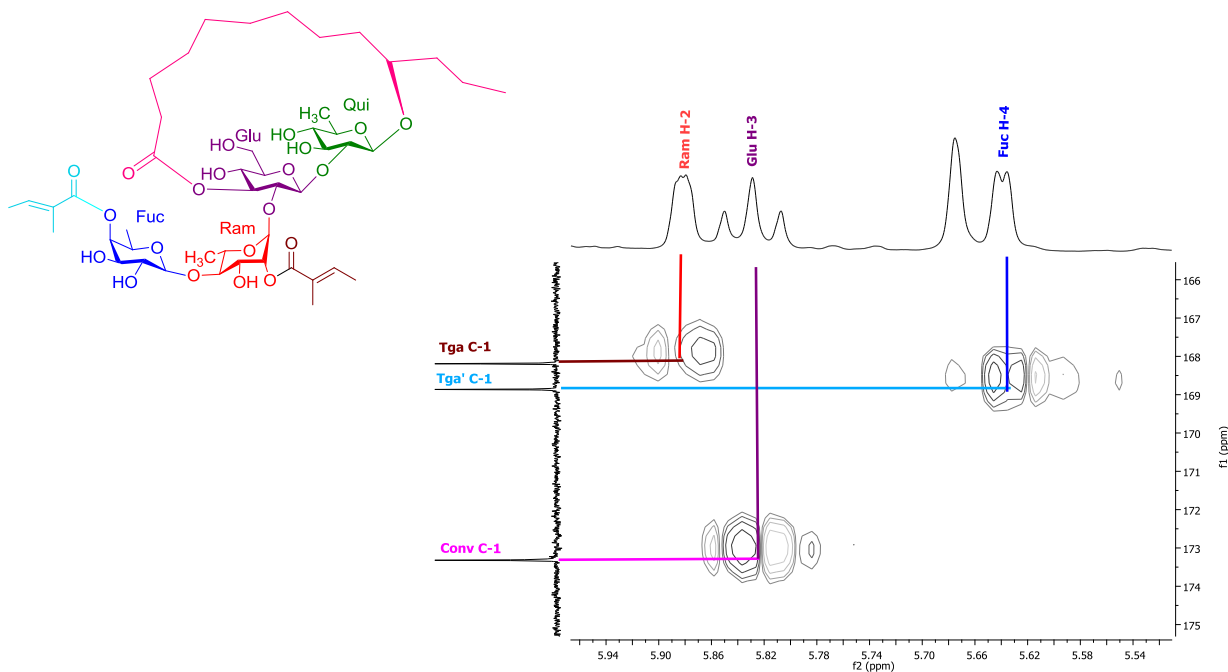
Con la técnica HMBC se procedió a la determinación de las correlaciones  $^{13}C-^1H$  a tres enlaces de distancia ( $^3J_{C-H}$ ) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación. Por tanto, la secuencia de azúcares en el núcleo oligosacárido para **8** y **10** se estableció de la siguiente manera: la primera unidad sacárida del núcleo oligosacárido corresponde a la quinovosa ya que se encuentra enlazada a la posición  $C_{11}$  de la aglicona, Qui  $H_1$  ( $\delta_H$  4.75 ppm)/Conv  $C_{11}$  ( $\delta_C$  173.3 ppm); la segunda unidad corresponde a una glucosa (Glu) que se encuentra enlazada a la posición  $H_2$  de la quinovosa, Qui  $H_2$  ( $\delta_H$  4.45 ppm)/Glu  $C_1$  ( $\delta_C$  100.6 ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una ramnosa (Ram) enlazada a la posición  $H_2$  de la segunda unidad monosacárida (Glu), Glu  $H_2$  ( $\delta_H$  4.21 ppm)/Ram  $C_1$  ( $\delta_C$  99.8 ppm); la cuarta unidad del oligosacárido corresponde a una unidad de fucosa enlazada a la posición  $H_4$  de la tercera unidad de azúcar (Ram), Ram  $H_4$  ( $\delta_H$  4.36 ppm)/Fuc  $C_1$  ( $\delta_C$  107.1 ppm). La **figura 52** muestra una expansión del espectro HMBC del albinósido VIII

que ejemplifica la determinación de la secuencia oligosacárida. También, se identificaron los ácidos de cadena corta mediante los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , RMN  $^{13}\text{C}$  y espectrometría de masas como residuos del ácido tíglico para ambos compuestos.



**Figura 52. Espectro HMBC del albinósido VIII (8).** Correlaciones  $^3J_{\text{C-H}}$ , para la identificación de la secuencia de glicosidación.

La posición de lactonización de la macrolactona para la aglicona correspondió a la posición  $\text{C}_3$  de la segunda unidad monosacárida (Glu), mediante las correlaciones C-H a tres enlaces de distancia mediante el espectro HMBC. El análisis de las interacciones  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  a dos enlaces de distancia entre el carbono de los grupos carbonilo y los protones  $\text{H}_2$  de cada sustituyente mediante el espectro HMBC permitió identificar a cada uno de los carbonilos. Las posiciones de esterificación se determinaron a partir de las correlaciones ( $^3J_{\text{C-H}}$ ) entre los carbonos del carbonilo de cada uno de los ácidos con las señales protónicas geminales a estos grupos, siendo para los albinósidos VIII y X, en el  $\text{C}_2$  de la tercera unidad monosacárida (Ram) y en el  $\text{C}_4$  de la cuarta unidad monosacárida (Fuc) esterificadas por el residuo de tíglico (**Figura 53**).



**Figura 53.** Espectro HMBC del albinósido VIII (**8**). Correlaciones ( $^3J_{C-H}$ ) para la determinación de las posiciones de esterificación. Abreviaciones: **tga**= tiglioilo, **conv** = 11-hidroxitetradecanoilo.

En el espectro de masas se observó, para el albinósido VIII (**8**), un ion pseudomolecular  $m/z$  989  $[M - H]^-$ , correspondiente con la fórmula molecular  $C_{48}H_{77}O_{21}$ , en contraste con el ion pseudomolecular  $m/z$  1017  $[M - H]^-$  con una fórmula molecular  $C_{50}H_{81}O_{21}$  para el albinósido X (**10**). Las pérdidas iniciales de los residuos de tiglioilo lograron la generación de los fragmentos  $m/z$  907 y  $m/z$  825 para **8** (Figura 54), y de  $m/z$  935 y  $m/z$  853 para **10** (Figura 55). De esta manera, se identificó que la diferencia entre estos dos compuestos correspondía a la aglicona que establece la macrolactonización puesto que para el compuesto **8** el fragmento  $m/z$  243 confirmó la presencia del ácido 11S-hidroxitetradecanoico (convolvulinólico) y para el compuesto **10** el fragmento  $m/z$  271 la presencia del ácido 11S-hidroxihexadecanoico (jalapinólico).

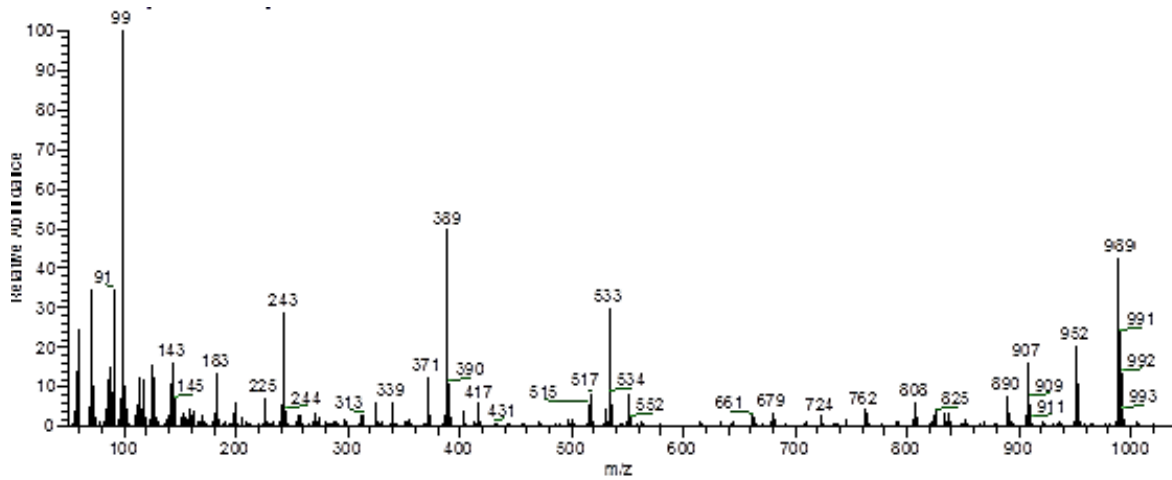


Figura 54. Espectro de masas FAB (modo negativo) del albínosido VIII

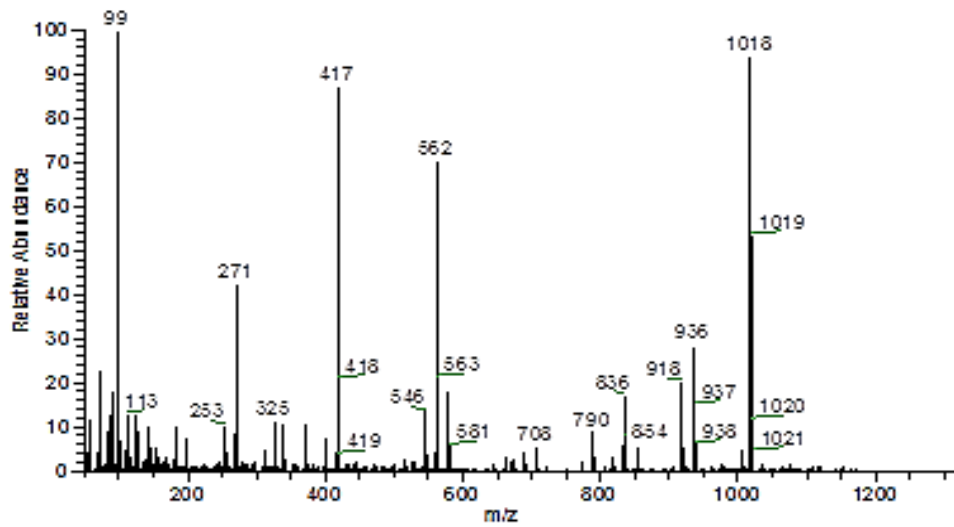


Figura 55. Espectro de masas FAB (modo negativo) del albínosido X

### 6.7.4 Albinósidos IX y XI

Los albinósidos IX y XI son tetrasacáridos constituidos por un núcleo oligosacárido formado por una unidad de D-quinovosa, dos unidades de L-ramnosa y una unidad de D-fucosa. El análisis de los espectros por RMN  $^{13}\text{C}$  permitió determinar cuatro señales de carbonos anoméricos en la región comprendida entre  $\delta_{\text{C}}$  95–110, así mismo, el experimento HSQC ( $^1J_{\text{CH}}$ ) permitió identificar las señales correspondientes a los protones anoméricos en el espectro RMN  $^1\text{H}$ . Los cuatro dobletes localizados entre  $\delta_{\text{H}}$  1.4–1.6 correspondieron a los metilos de las unidades de metilpentosa. Como en los casos anteriores, se recurrió al uso de las técnicas bidimensionales en la RMN ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY) (Figuras 58-59).

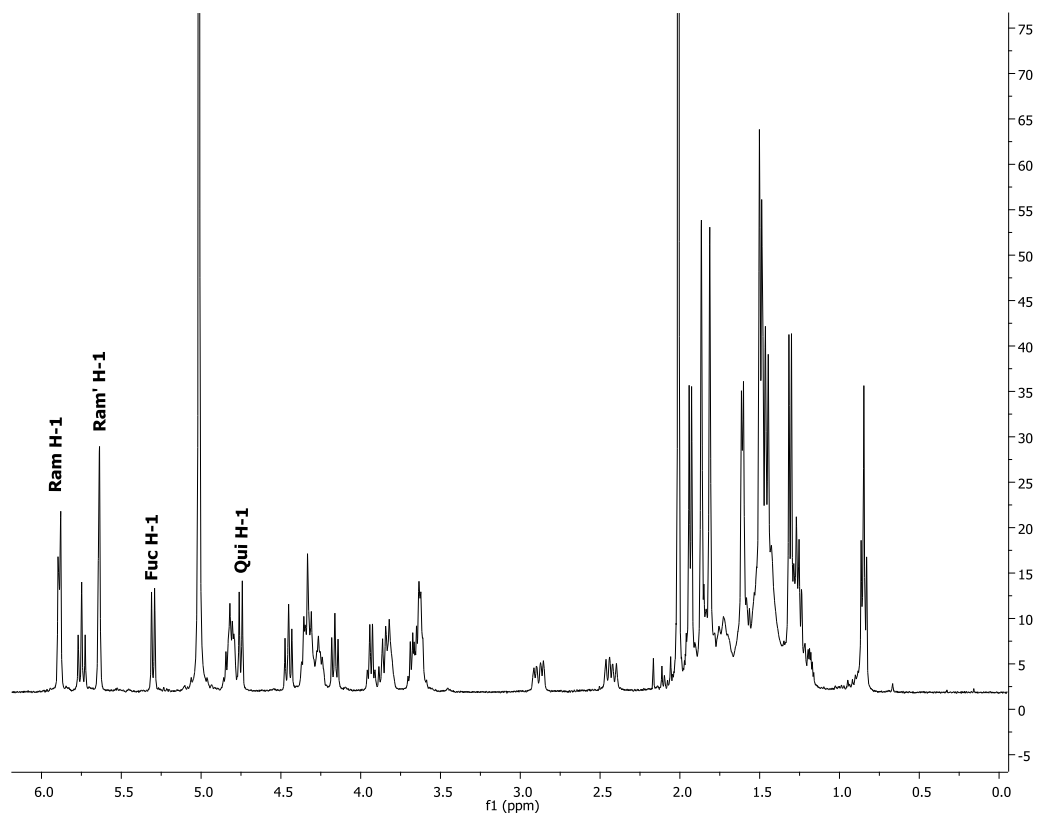


Figura 56. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido XI (11)

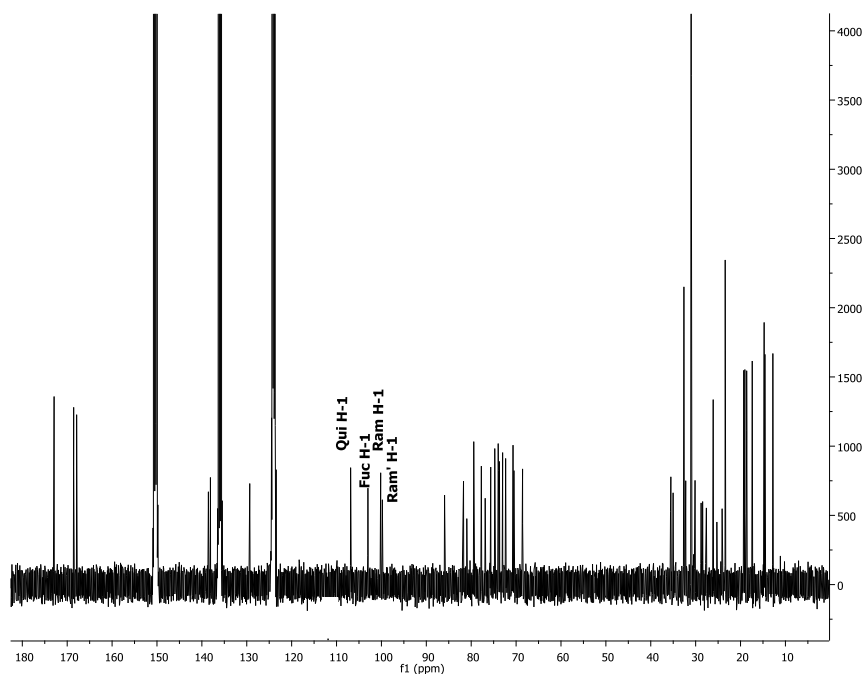


Figura 57 Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido XI (11)

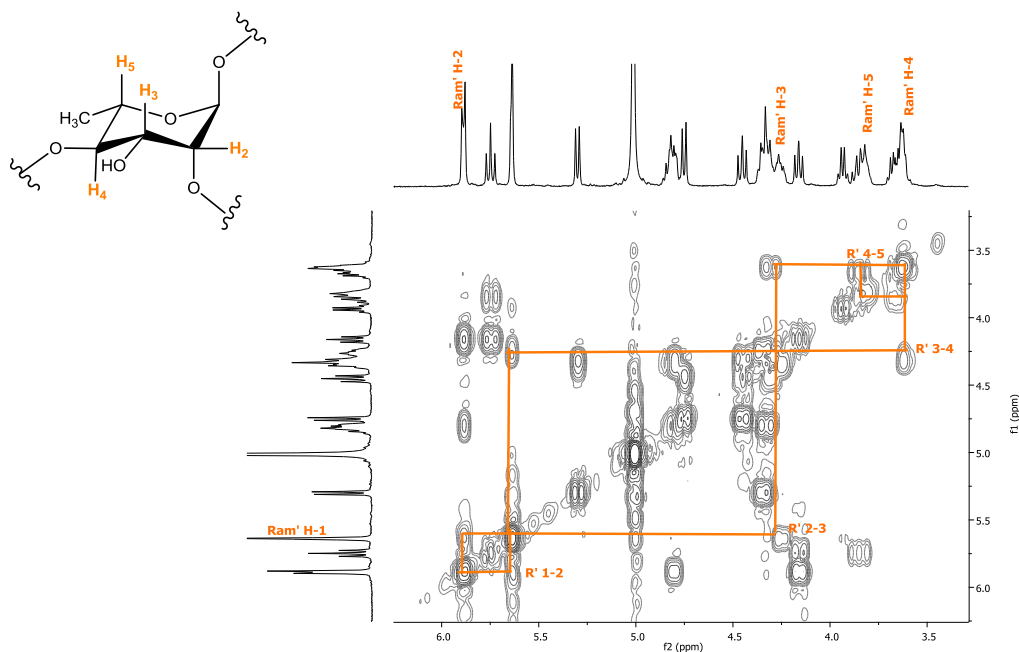
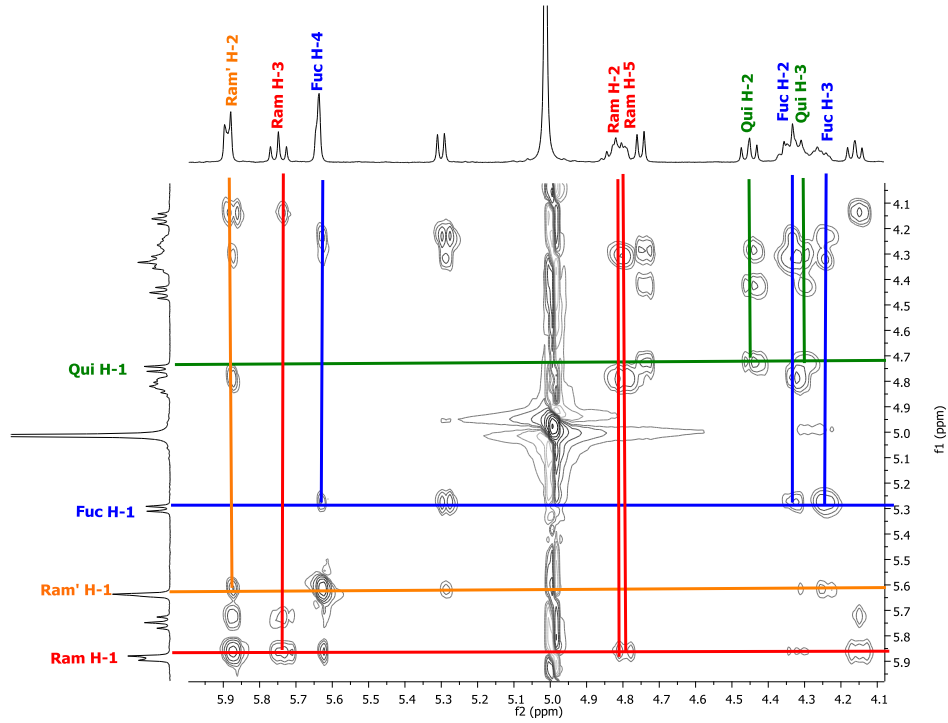


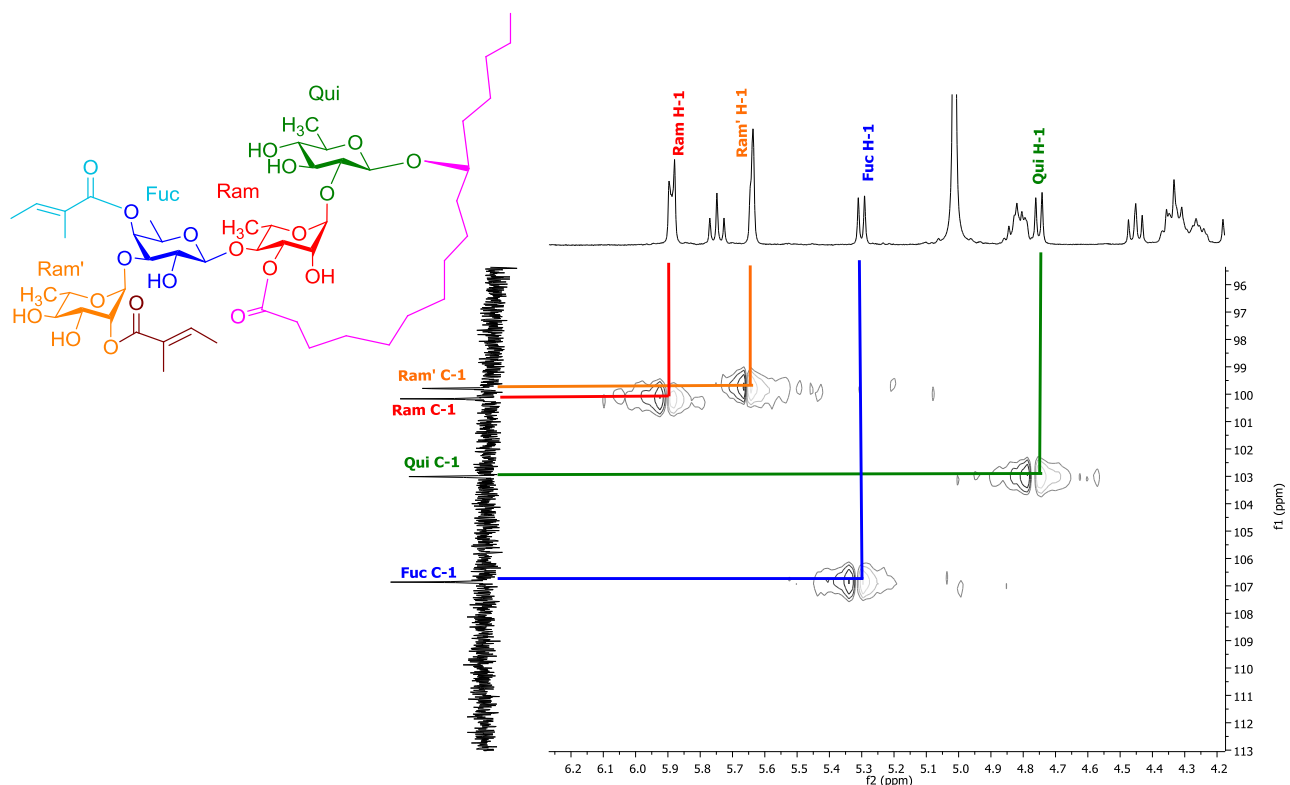
Figura 58. Espectro  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY para la región oligosacárida del albinósido XI (11). Correlaciones ( $^3J_{\text{H-H}}$ ):  $\text{Ram}'(\text{R}')$  = ramnosa terminal. Abreviaciones:  $\text{R}'_{1-2}$ ;  $\text{Ram}' \text{H}_1\text{-H}_2$ ,  $\text{R}'_{2-3}$ ;  $\text{Ram}' \text{H}_2\text{-H}_3$ ,  $\text{R}'_{3-4}$ ;  $\text{Ram}' \text{H}_3\text{-H}_4$ ,  $\text{R}'_{4-5}$ ;  $\text{Ram}' \text{H}_4\text{-H}_5$ .



**Figura 59. Espectro TOCSY para la región oligosacárida del albinósido XI (11).**  
 Abreviaciones: Qui= quinovosa, Fuc= fucosa, Ram= ramnosa, Ram'= ramnosa terminal

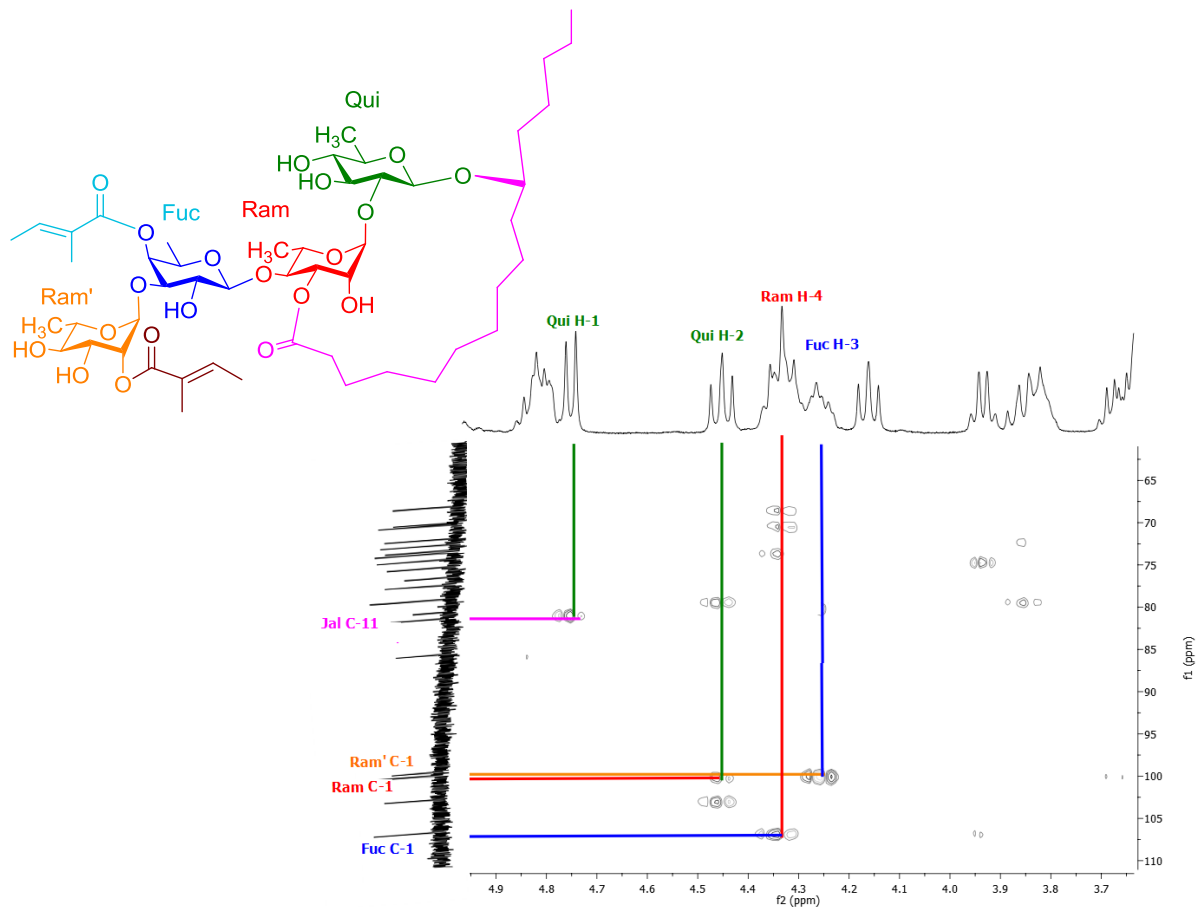
La asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los protones oligosacáridos se llevó a cabo mediante la técnica heteronuclear HSQC  $^{13}\text{C}$ - $^1\text{H}$  ( $^1J_{\text{C-H}}$ ).





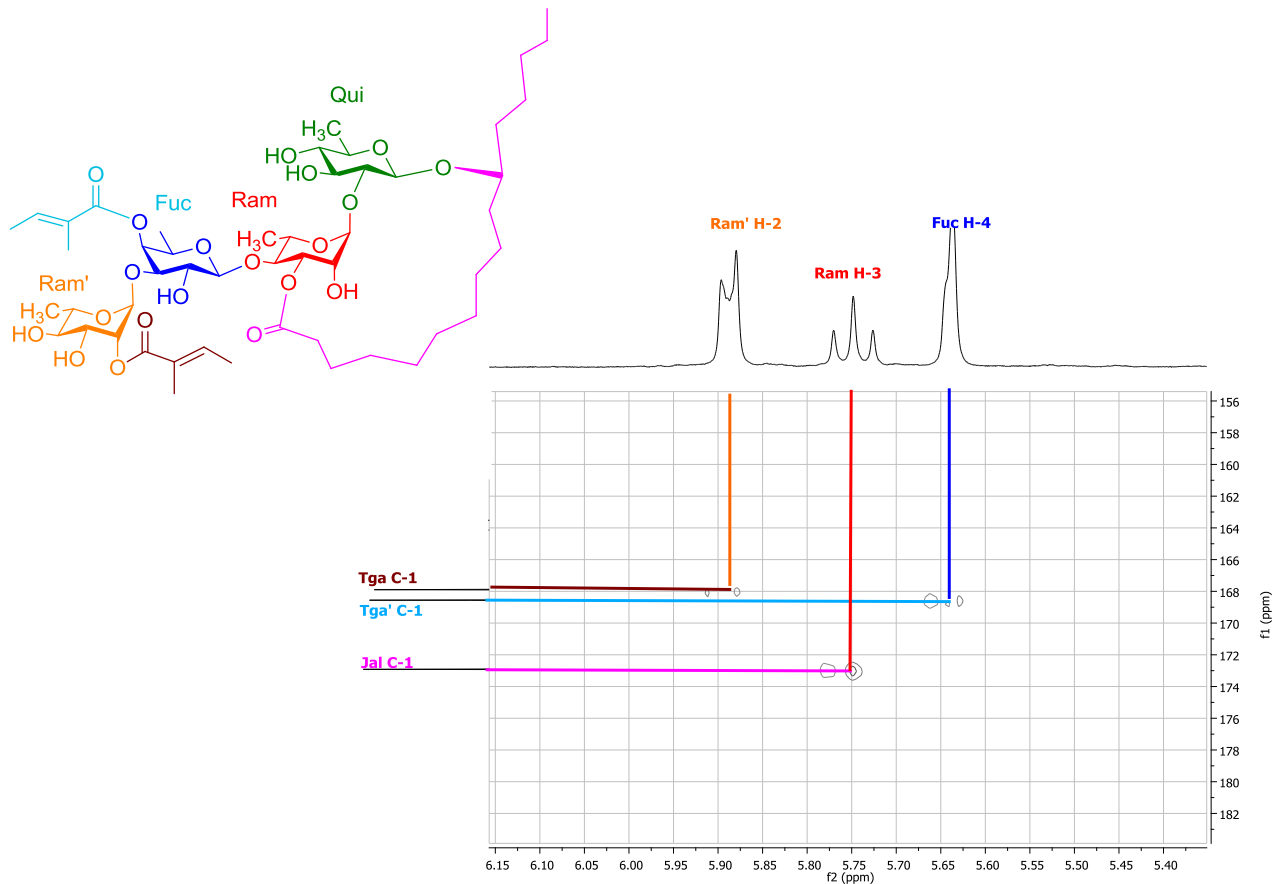
**Figura 60. Espectro HSQC del albinósido XI (11).** Correlaciones ( $^1J_{C-H}$ ) observadas en la región anomérica. Abreviaciones: **Qui**= quinovosa, **Fuc**= fucosa, **Glu**= glucosa, **Ram** = ramnosa.

Con la técnica HMBC se procedió a la determinación de las correlaciones  $^{13}C-^1H$  a tres enlaces de distancia ( $^3J_{C-H}$ ) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación. Por tanto, la secuencia de azúcares en el núcleo oligosacárido para **9** y **11** se estableció de la siguiente manera: la primera unidad sacárida del núcleo oligosacárido corresponde a la quinovosa ya que se encuentra enlazada a la posición  $C_{11}$  de la aglicona, Qui  $H_1$  ( $\delta_H$  4.75 ppm)/Conv  $C_{11}$  ( $\delta_C$  172.9 ppm); la segunda unidad corresponde a una ramnosa (Ram) que se encuentra enlazada a la posición  $H_2$  de la quinovosa, Qui  $H_2$  ( $\delta_H$  4.45 ppm)/Ram  $C_1$  ( $\delta_C$  100.2 ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una fucosa (Fuc) enlazada a la posición  $H_4$  de la segunda unidad monosacárida (Ram), Ram  $H_4$  ( $\delta_H$  4.33 ppm)/Fuc  $C_1$  ( $\delta_C$  106.9 ppm); la cuarta unidad del oligosacárido corresponde a una unidad de ramnosa enlazada a la posición  $H_3$  de la tercera unidad de azúcar (Fuc), Fuc  $H_3$  ( $\delta_H$  4.25 ppm)/Ram'  $C_1$  ( $\delta_C$  99.8 ppm). La **figura 61** muestra una expansión del espectro HMBC del albinósido XI que ejemplifica la determinación de la secuencia oligosacárida.



**Figura 61. Espectro HMBC del albinósido XI (11).** Correlaciones  ${}^3J_{C-H}$ , para la identificación de la secuencia de glicosidación.

También, la identificación de los ácidos de cadena corta que esterifican al núcleo oligosacárido se realizó mediante los espectros de RMN  ${}^1H$  y  ${}^{13}C$ , al igual que la espectrometría de masas, caracterizando para ambos compuestos la presencia de residuos del ácido tíglico. La posición de lactonización de la macrolactona correspondió a la posición  $C_3$  de la segunda unidad monosacárida (Ram'), mediante las correlaciones C-H a tres enlaces de distancia mediante el espectro HMBC. Las posiciones de esterificación se determinaron a partir de las correlaciones ( ${}^3J_{C-H}$ ) entre los carbonos del carbonilo de cada uno de los ácidos con las señales protónicas geminales a estos grupos, siendo para los albinósidos IX y X, en el  $C_4$  de la tercera unidad monosacárida (Fuc) y en el  $C_2$  de la cuarta unidad monosacárida (Ram') y esterificadas por el residuo de tigloilo (**Figura 62**).



**Figura 62.** Espectro HMBC del albinósido XI (11). Correlaciones ( $^3J_{C-H}$ ) para la determinación de las posiciones de esterificación. Abreviaciones: **tga**= tiglioilo, **jal** = 11-hidroxihexadecanoilo.

Para el albinósido IX (9), el espectro de masas indicó un ion pseudomolecular  $m/z$  975  $[M - H]^-$ , correspondiente a una fórmula molecular de  $C_{48}H_{78}O_{20}$ , mientras que para el albinósido XI (11) el ion pseudomolecular correspondió a  $m/z$  1001  $[M - H]^-$  para una fórmula molecular de  $C_{50}H_{82}O_{20}$ . Las pérdidas iniciales de los residuos de tiglioilo se observaron por la presencia de los fragmentos  $m/z$  891 y  $m/z$  809 para 9 (Figura 63),  $m/z$  919 y  $m/z$  837 para 11 (Figura 64). El resto de los fragmentos son característicos de las rupturas glicosídicas; al igual que en el caso anterior, la diferencia radica en la longitud de la cadena hidrocarbonada de la aglicona presente en cada uno de los compuestos.

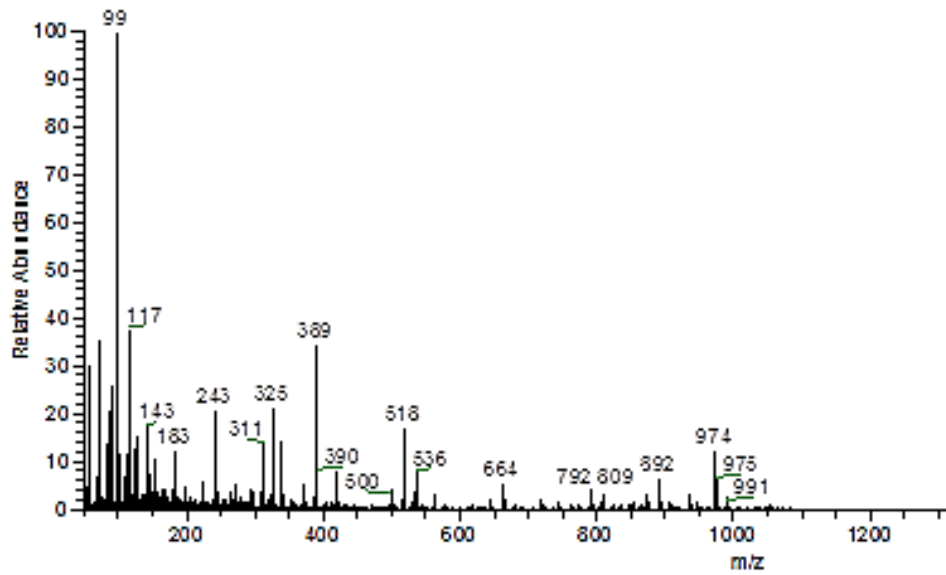


Figura 63. Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido IX

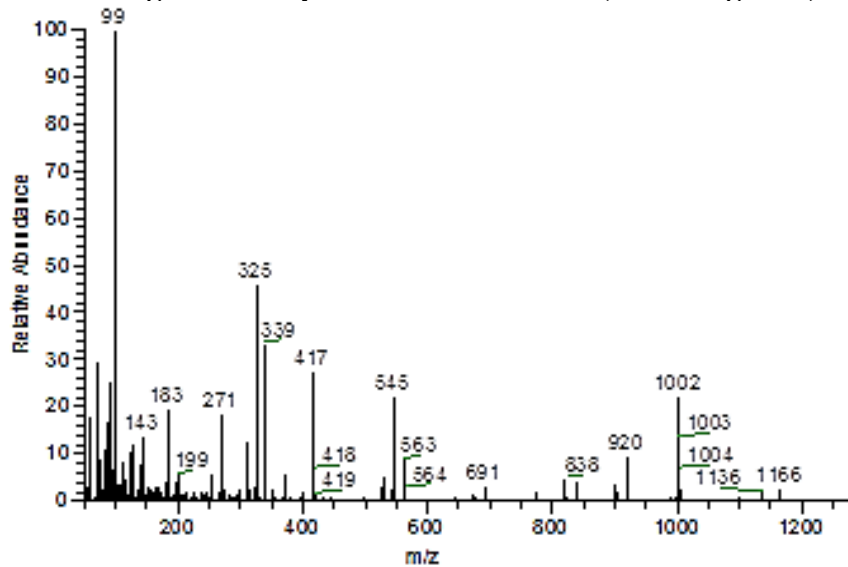


Figura 64. Espectro de masas FAB (modo negativo) del albinósido XI

En los **Cuadros 13** y **14** se enumeran las constantes espectroscópicas en la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para los albinósidos VI-XI.

**Cuadro 13. Datos espectroscópicos en la RMN <sup>1</sup>H para los albinósidos VI-XI (6-11)<sup>a</sup>**

Protón <sup>b</sup>	Albinósido VI (6)	Albinósido VII (7)	Albinósido VIII (8)	Albinósido IX (9)	Albinósido X (10)	Albinósido XI (11)
Qui-1	4.77 d (7.0)	4.78 d (8.0)	4.75 d (8.0)	4.77 d (7.6)	4.76 d (7.6)	4.75 d (7.6)
2	4.31 dd (8.8, 7.0)	4.28 dd (8.8, 8.0)	4.45 dd (9.2, 8.0)	4.44 dd (9.2, 7.6)	4.44 dd (8.8, 7.6)	4.45 t (8.8, 7.6)
3	4.13 dd (8.8, 8.8)	4.28 dd (8.8, 8.0)	4.27 m*	4.33 dd (9.2, 9.2)	4.28 dd (9.2, 9.2)	4.33 t (9.6, 9.6)
4	3.76 dd (8.8, 8.0)	3.62 m*	3.70 dd (9.6, 9.0)	3.63 dd (9.6, 9.0)	3.85 dd (9.2, 9.0)	3.65 dd (10.8, 9.6)
5	3.68 dq (8.8, 5.6)	3.66 dq (9.1, 5.8)	3.54 dq (9.2, 6.0)	3.67 dq (9.2, 6.0)	3.63 dq (9.0, 6.0)	3.67 dq (9.6, 6.0)
6	1.46 d (6.0)	1.62 d (6.5)	1.58 d (5.6)	1.59 d (5.6)	1.59 d (5.6)	1.61 d (5.2)
Glu-1	5.75 d (7.6)		5.98 d (7.6)		5.99 d (6.8)	
2	4.11 t (8.0)		4.21 dd (9.2, 7.6)		4.21 dd (9.2, 7.6)	
3	3.87 m*		5.82 dd (9.2, 8.8)		5.84 dd (9.2, 8.8)	
4	3.67 dd (9.6, 8.0)		4.44 dd (9.2, 9.2)		4.50 dd (9.6, 8.8)	
5	3.78 ddd (9.2, 4.0, 2.4)		3.84 dd (9.2, 6.0)		3.86 dd (9.2, 6.0)	
6a	4.14m*		4.25 dd (10.0, 6.4)		4.26 dd (9.2, 6.4)	
6b	4.36 dd (12.4, 2.8)		4.25 dd (10.0, 2.4)		4.26 dd (9.2, 3.0)	
Qui <sup>1</sup> -1	5.07 d (7.6)	5.64 d (8.0)				
2	5.66 dd (8.0, 7.6)	4.05 dd (9.0, 8.0)				
3	5.66 dd (8.0, 8.0)	4.05 t (9.0)				
4	4.33 dd (8.8, 8.0)	3.49 m*				
5	3.64 dq (8.8, 6.0)	3.69 dq (9.2, 5.8)				
6	1.59 d (6.4)	1.44 d (5.8)				
Qui <sup>2</sup> -1		5.04 d (8.0)				
2		5.66 dd (8.0, 7.5)				
3		5.66 dd (8.0, 7.5)				
4		3.67 m*				
5		3.49 dq (9.1, 6.1)				
6		1.47 d (6.1)				
Ram-1	5.8 d (1.2)	5.83 brs	5.67 brs	5.89 brs	5.67 brs	5.88 brs
2	4.64 brs	4.62 brs	5.88 m*	4.79 dd (3.6, 2.4)	5.88 d (1.6)	4.80 dd (3.6, 2.0)
3	4.78 dd (8.8, 3.2)	4.75 dd (8.0, 2.4)	4.81 dd (9.2, 3.0)	5.76 m*	4.23 dd (9.2, 3.0)	5.75 t (8.8)
4	5.87 t (9.6)	5.86 t (8.0)	4.36 dd (9.2, 8.8)	4.32 dd (9.6, 9.2)	4.34 dd (9.6, 8.8)	4.33 dd (9.6, 9.2)
5	5.21 dq (10.0, 6.0)	5.19-5.23 m*	4.78 dq (8.8, 6.4)	4.83 dq (9.6, 6.4)	4.78 dq (8.8, 6.4)	4.84 dq (9.6, 5.6)
6	1.62 d (6.4)	1.60 d (6.1)	1.92 d (6.4)	1.92 d (6.4)	1.92 d (6.0)	1.93 d (6.0)
Ram <sup>1</sup> -1				5.64 brs		5.64 brs
2				5.88 dd (3.2, 2.4)		5.88 dd (3.0, 2.4)
3				4.15 m*		4.34 dd (9.2, 3.6)
4				3.66 dd (9.2, 8.8)		3.68 dd (9.2, 9.2)
5				3.86 dq (9.2, 6.0)		3.85 dq (9.2, 5.6)
6				1.49 d (6.0)		1.49 d (6.0)
Fuc-1			5.28 d (7.6)	5.29 d (7.6)	5.29 d (7.6)	5.30 d (7.6)
2			4.34 dd (9.2, 7.6)	4.33 dd (9.2, 7.6)	4.32 dd (9.2, 7.6)	4.33 dd (9.6, 7.6)
3			4.23 dd (9.2, 3.5)	4.25 dd (9.2, 3.5)	4.31 dd (9.2, 3.0)	4.25 dd (9.2, 3.5)
4			5.65 d (3.5)	5.63 brs	5.64 d (3.0)	5.64 brs
5			3.95 q (6.0)	3.93 q (6.0)	3.92 q (6.0)	3.93 q (6.4)
6			1.31 d (6.4)	1.32 d (5.6)	1.31 d (6.4)	1.31 d (6.4)
conv 2a	2.75 m*	2.74-2.75 m*	2.83 ddd (10.4, 7.6, 2.0)	2.82 dd (9.2, 6.8)		
2b			2.44 ddd (9.2, 7.6, 3.2)	2.43 dd (9.2, 8.8)		
11	3.87 m*	3.78-3.80 m*	3.85 m*	3.79-3.82 m*		
16	0.92 t (7.2)	0.93 t (7.3)	0.88 t (7.2)	0.90 t (7.0)		
jal- 2a					2.84 dd (9.2, 7.2)	2.88 dd (10.4, 6.0)
2b					2.43 dd (9.0, 8.0)	2.43 dd (9.9, 8.8)
11					3.80-3.86 m*	3.82-3.88 m*
16					0.86 t (6.8)	0.85 t (6.8)
ace-2	2.05 brs	2.06 brs				
nla-2	2.83 dq (7.2, 6.8)	2.79 dq (7.2, 7.1)				
3	4.14 m*	4.26-4.30 m*				
4	1.34 d (6.4)	1.33 d (6.2)				
5	1.24 d (7.2)	1.24 d (7.0)				
tga-2			6.97 dq (6.2, 1.6)	6.99 dq (6.2, 1.6)	6.99 dq (8.0, 1.6)	6.99 dq (7.2, 1.6)
3			1.46 d (7.2)	1.49 d (6.0)	1.49 d (6.8)	1.49 d (6.0)
5			1.79 brs	1.85 brs	1.81 brs	1.81 brs
tga <sup>1</sup> -2			7.12 dq (7.2, 1.2)	7.13 dq (7.2, 1.2)	7.12 dq (8.4, 1.2)	7.13 dq (8.0, 1.2)
3			1.49 d (7.2)	1.47 d (7.2)	1.46 d (7.2)	1.45 d (7.2)
5			1.82 brs	1.87 brs	1.86 brs	1.86 brs

<sup>a</sup>Datos registrados a 400 MHz en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en paréntesis y están expresadas en Hz. Los desplazamientos químicos marcados con un asterisco (\*) indican señales sobrepuestas. s = señal singulete, brs = señal ancha, d = señal doble, t = señal triple, m = señal múltiple. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY, TOCSY) y heteronuclear <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C (HMQC, HMBC). <sup>b</sup>Abreviaciones: TMS = tetrametilsilano, qui = quinovosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, conv= 11-hidroxitetradecanoilo, jal = 11-hidroxihexadecanoilo, ace= acetilo, nla = niloilo, tga = tigloilo.

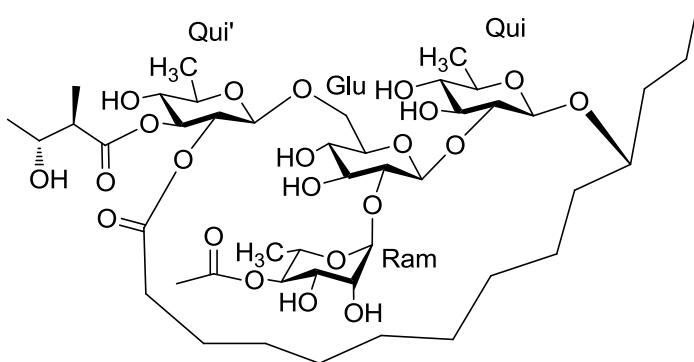
**Cuadro 14. Datos espectroscópicos en la RMN <sup>13</sup>C para los albinósidos VI-XI (6-11)<sup>a</sup>**

Carbono <sup>b</sup>	Albinósido VI (6)	Albinósido VII (7)	Albinósido VIII (8)	Albinósido IX (9)	Albinósido X (10)	Albinósido XI (11)
Qui-1	101.4	103.7	103.2	103.2	103.2	103.01
2	69.8	69.5	77.5	77.1	77.5	76.8
3	85.7	79.6	79.3	79.6	79.6	79.4
4	78.2	77.5	77.8	78.0	77.7	77.7
5	77.9	72.7	73.4	73.2	73.4	72.9
6	18.5	18.9	19.5	19.7	19.2	19.1
Glu-1	102.6		100.6		100.6	
2	79.1		79.6		79.6	
3	70.6		80.1		79.9	
4	75.2		70.4		70.5	
5	77.5		77.9		77.8	
6a	63.2		62.5		62.6	
6b						
Qui'-1	104.4	101.8				
2	72.3	78.9				
3	76.5	86.9				
4	80.3	74.8				
5	73.9	74.9				
6	19.2	18.8				
Qui''-1		100.9				
2		72.4				
3		76.1				
4		72.6				
5		72.3				
6		18.0				
Ram-1	102.3	101.7	99.8	100.4	99.8	100.2
2	72.9	72.5	74.3	70.7	73.4	70.5
3	71.1	70.7	78.1	79.7	81.6	79.5
4	77.0	76.8	86.2	86.1	86.2	85.9
5	67.6	67.2	68.9	68.9	68.8	68.6
6	19.0	18.7	19.9	19.3	19.5	19.3
Ram'-1				99.9		99.8
2				74.3		73.9
3				81.9		79.4
4				75.9		75.6
5				72.6		72.3
6				18.8		18.6
Fuc-1			107.1	107.1	107.1	106.9
2			74.5	74.2	74.2	73.7
3			79.9	80.9	79.9	81.7
4			75.1	74.9	75.1	74.7
5			71.0	70.9	70.4	70.7
6			17.9	17.7	17.7	17.4
conv -1	174.6	174.3	173.3	173.2		
2a	34.3	48.9	35.4	35.2		
11	82.1	81.3	81.1	81.7		
14	15.3	14.3	15.2	14.8		
jal-1					173.3	172.9
2					35.4	35.6
11					81.6	80.9
14					14.7	14.7
ace-1	171.7	171.3				
2	21.9	21.3				
nla-1	175.7	175.2				
2	49.5	49.0				
3	69.1	69.3				
4	21.4	21.7				
5	13.9	14.8				
tga-1			168.2	168.2	168.1	167.9
2			138.4	138.3	138.4	138.0
3			14.8	14.9	14.9	14.6
5			13.1	13.1	13.1	12.7
tga'-1			168.8	168.9	168.8	168.6
2			138.7	138.8	138.8	138.5
3			14.9	15.1	14.8	14.5
5			13.1	13.0	13.1	12.7

<sup>a</sup>Datos registrados a 100 MHz en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm en relación al TMS. Las asignaciones se basaron en los experimentos HSQC. <sup>b</sup>Abreviaciones: qui= quinovosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, conv= 11-hidroxitetradecanoílo, jal = 11-hidroxihexadecanoílo, ace= acetilo, nla = niloilo, tga = tigloilo.

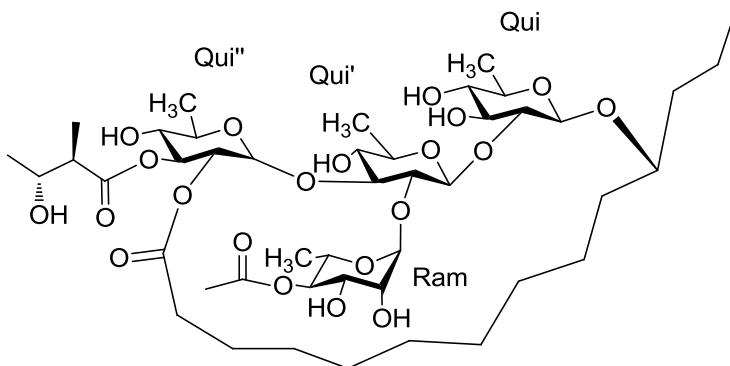
De acuerdo al análisis de los espectros por RMN y espectrometría de masas de los compuestos **6-11**, se propusieron las siguientes estructuras químicas para los albinósidos **VI-XI**:

**Albinósido VI (6)**

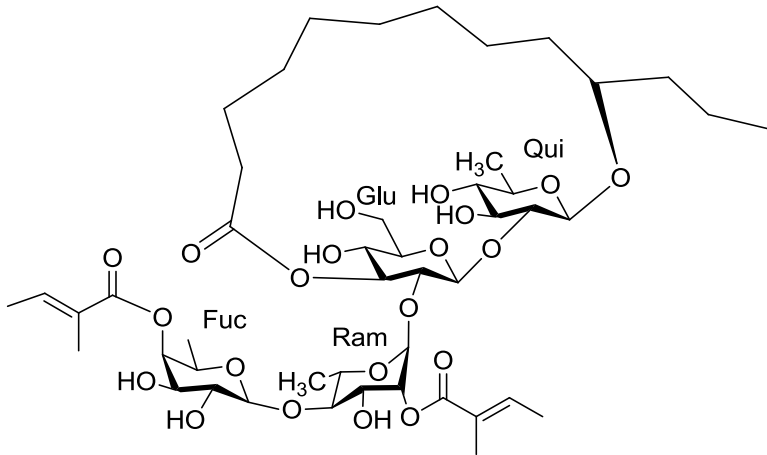


Éster intramolecular **1,2'''**-11-*O*-4-*O*-(acetil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[3-*O*-(niloil)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)]-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.

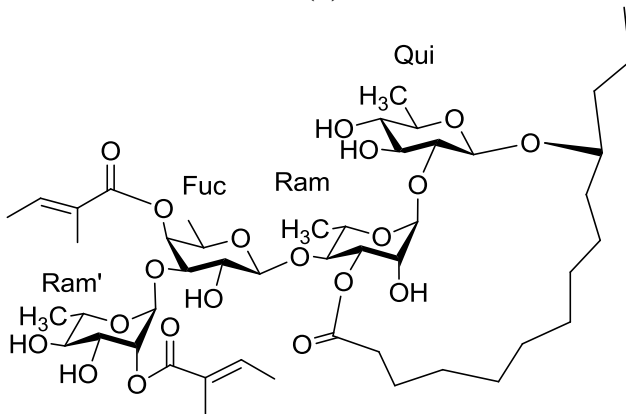
**Albinósido VII (7)**



Éster intramolecular **1,2'''**-11-*O*-4-*O*-(acetil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-*O*-[3-*O*-(niloil)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.

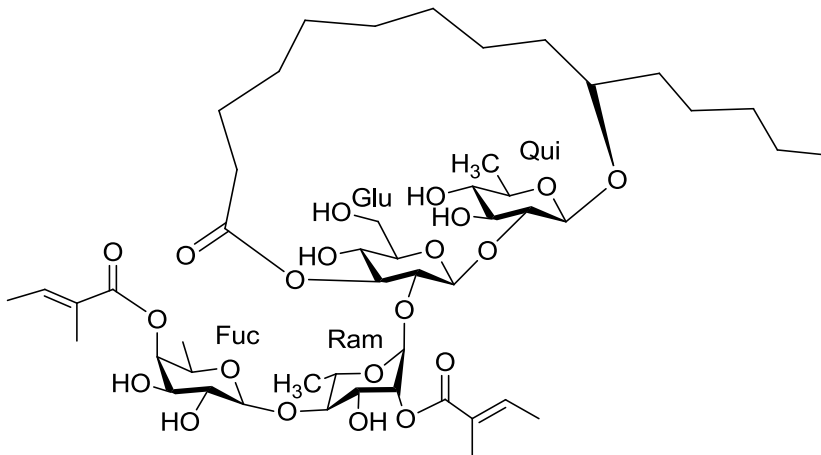
**Albinósido VIII (8)**

Éster intramolecular **1,3''**-11-*O*-4-*O*-(tigloil)-  $\beta$ - D -fucopiranosil - (1 $\rightarrow$ 4)-*O*-[2-*O*-(tigloil)- $\alpha$ - L -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- $\beta$ - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi-  $\beta$ - D -glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.

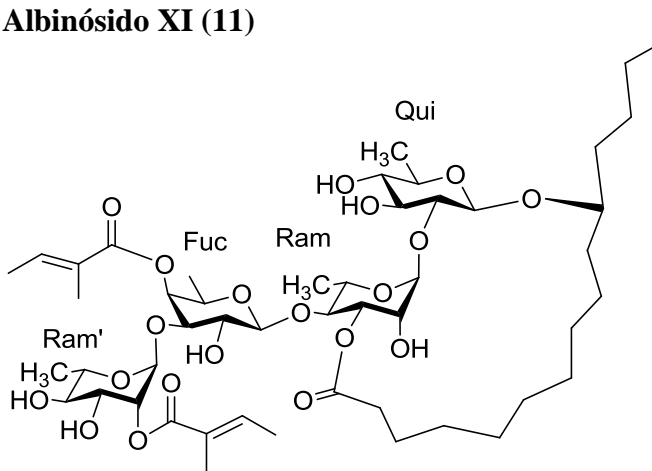
**Albinósido IX (9)**

Éster intramolecular **1,3''**-11-*O*-[2-*O*-(tigloil)-  $\alpha$ - L -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*-[4-*O*-(tigloil)-  $\beta$ - D -fucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]-*O*-  $\alpha$ - L -ramnopiranosil - (1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ - D -glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico.



**Albinósido X (10)**

Éster intramolecular **1,3''**-11-*O*-4-*O*-(tigloil)-  $\beta$ - D -fucopiranosil - (1 $\rightarrow$ 4)-*O*-[2-*O*-(tigloil)- $\alpha$ - L -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)]-*O*- $\beta$ - D -glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi-  $\beta$ - D -glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico.

**Albinósido XI (11)**

Éster intramolecular **1,3''**-11-*O*-[2-*O*-(tigloil)-  $\alpha$ - L -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)]-*O*-[4-*O*-(tigloil)-  $\beta$ - D -fucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)]-*O*-  $\alpha$ - L -ramnopiranosil - (1 $\rightarrow$ 2)-6-deoxi- $\beta$ - D -glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico.

### 6.8 Ensayos de citotoxicidad y de modulación de la multifármaco resistencia

En los ensayos de citotoxicidad para todos los oligosacáridos probados, se identificaron aquellos compuestos no citotóxicos ( $CI_{50} > 25 \mu\text{g/mL}$ ) que, posteriormente, se evaluaron como inhibidores de las bombas de eflujo en las células resistentes (**Cuadro 15**).

**Cuadro 15. Citotoxicidad de los albinósidos I-XI**

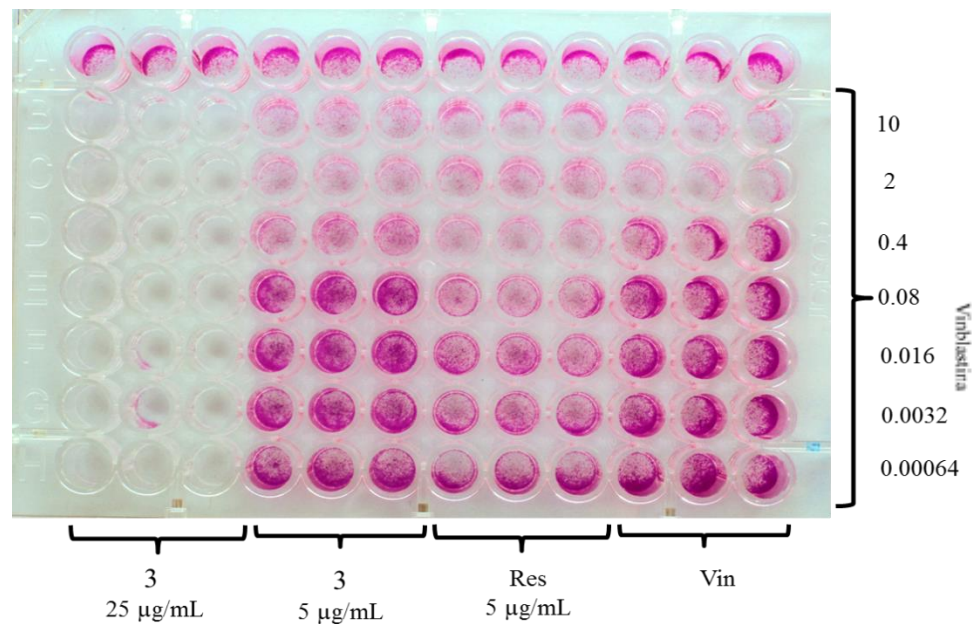
Clave	Compuesto	MCF7 sens	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	
			MCF-7/Vin <sup>-</sup>	MCF-7/Vin <sup>+</sup>
IA-1	Albinósido I	>25	>25	>25
IA-8	Albinósido II	>25	>25	>25
IA-10	Albinósido III	12.02 ± 1.1	24.27 ± 0.08	24.63 ± 0.11
IA-3	Albinósido IV	>25	>25	>25
IA-5	Albinósido V	>25	>25	>25
IA-2	Albinósido VI	>25	>25	>25
IA-4	Albinósido VII	>25	>25	>25
IA-6	Albinósido VIII	15.4 ± 0.4	>25	>25
IA-7	Albinósido IX	>25	>25	>25
IA-9	Albinósido X	3.12 ± 0.05	14.19 ± 1.6	13.24 ± 1.9
IA-11	Albinósido XI	1.5 ± 0.3	4.3 ± 0.7	4.8 ± 1.4
control	vinblastina	0.047 ± 0.01	1.02 ± 0.18	1.22 ± 0.14

<sup>a</sup>Cada valor representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes

La ausencia de citotoxicidad ( $CI_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$ ) es un requisito importante e indispensable para realizar los ensayos de modulación y distinguir claramente cualquier efecto de potenciación (por inhibición de las bombas de eflujo) de un posible sinergismo entre un compuesto activo y la vinblastina,<sup>18,22</sup> por lo que se considera como el principal criterio de selección para ensayos posteriores.

Se realizaron ensayos preliminares de modulación de los glicolípidos aislados sobre la línea resistente MCF-7/Vin.<sup>8</sup> En estos ensayos se observó un incremento en la susceptibilidad de las células a la vinblastina desde 1 a >2140 veces (**Cuadro 16**). La reversión de la multifármaco resistencia en células de cáncer de mama resistentes a vinblastina demostró que el albinósido III (**3**) y el albinósido X (**10**) ejercen una fuerte

potenciación de la susceptibilidad a la vinblastina con un factor de reversión (RF) de más de 2140 a una concentración de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (**Figura 65**). Esta actividad es similar a la descrita previamente para la mururoidina V<sup>5,8</sup> y la purgina II,<sup>10</sup> los cuales resultaron positivos como agentes de reversión de la resistencia. El albinósido VII (**7**) desarrolló un RF de 190.3 y, por lo tanto, se considera con una excelente capacidad de potenciación ya que es aproximadamente 20 veces superior a la desarrollada por el compuesto control, la reserpina. Los albinósidos I, II V y VI mostraron una moderada actividad, siendo para **1** (RF 3.1), **2** (RF 2.6), **5** (RF 2.3) y **6** (RF 2.1), mientras que el albinósido IX (**9**) (RF 1.7) mostró una baja actividad. Los albinósidos IV (**4**) y VIII (**8**) no mostraron actividad moduladora de la multifármaco resistencia. La reversión observada para el albinósido XI (RF 351.3) se puede considerar como un sinergismo de tipo aditivo, y no de modulación, ya que este compuesto es citotóxico.



**Figura 65.** Ensayo de modulación de la vinblastina con el albinósido III (**3**) (25 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) contra MCF-7/Vin<sup>+</sup>. Abreviaciones: Res, reserpina como control positivo (5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ); Vin, vinblastina.

**Cuadro 16. Modulación de la citotoxicidad de la vinblastina en células sensibles y resistentes a vinblastina por los albinósidos de prueba**

compuesto <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (µg/mL)			Factor de reversión <sup>c</sup>		
	MCF-7/Vin <sup>-</sup>	MCF-7/Vin <sup>+</sup>	MCF-7 sens	RF <sub>MCF-7/Vin<sup>-</sup></sub>	RF <sub>MCF-7/Vin<sup>+</sup></sub>	RF <sub>MCF-7 sens</sub>
vinblastina	1.08 ± 0.06	1.37 ± 0.23	0.047 ± 0.01			
<b>1</b>	0.26 ± 0.002	0.44 ± 0.03	0.022 ± 0.05	4.2	3.1	2.1
<b>2</b>	0.84 ± 0.082	0.54 ± 0.061	0.025 ± 0.002	1.3	2.6	1.9
<b>3</b>	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1687.5	>2140.6	>73.4
<b>4</b>	0.0008 ± 0.0003	>25	0.015 ± 0.12	1350	-	3.1
<b>5</b>	0.0048 ± 0.002	0.59 ± 0.43	0.0017 ± 0.001	225	2.3	27.6
<b>6</b>	1.28 ± 0.15	0.64 ± 0.29	0.012 ± 0.006	0.8	2.1	3.9
<b>7</b>	0.0036 ± 0.01	0.0072 ± 0.13	0.0015 ± 0.01	300	190.3	31.3
<b>8</b>	0.25 ± 0.03	>25	<0.00064	4.3	-	>73.4
<b>9</b>	0.98 ± 0.16	0.79 ± 0.098	0.015 ± 0.02	1.1	1.7	3.1
<b>10</b>	<0.00064	<0.00064	<0.00064	>1687.5	>2140.6	>73.4
<b>11</b>	<0.00064	0.0039 ± 0.001	<0.00064	>1687.5	351.3	>73.4
reserpinab	0.037 ± 0.01	0.31 ± 0.19	0.003 ± 0.001	29.2	4.4	15.7

<sup>a</sup> Diluciones seriadas desde 0.00064 a 10 µg/mL de vinblastina en presencia o ausencia de glicolípido (25 µg/mL), <sup>b</sup> Reserpina = 5 µg/mL como control positivo, <sup>c</sup> RF = CI<sub>50</sub> Vinblastina/ CI<sub>50</sub> Vinblastina en presencia de glicolípido. Cada valor representa la media ± D.E. de tres experimentos independientes.

En términos de la relación entre la estructura química y la actividad moduladora no específica, se determinó que ni el tamaño de la macrolactona, ni el largo de la cadena oligosacárida o azúcares que la conforman, ni el tipo y posición de acilación del núcleo sacárido fueron cruciales para la potenciación de la actividad. Por lo tanto, las resinas glicosídicas pueden considerarse como compuestos inespecíficos en su acción, desde un punto de vista estructural, debido a que pueden presentar actividades biológicas similares como la citotoxicidad y modulación con estructuras distintas.<sup>36</sup>

## 7. CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron once glicolípidos novedosos a partir de las semillas de la especie *Ipomoea alba*, los albinósidos I-XI (**1-11**), siendo las principales diferencias entre ellos: a) el tipo de aglicona que forma la macrolactona (el ácido 11*S*-hidroxitetradecanoico o el ácido 11*S*-hidroxihexadecanoico); b) las posiciones de esterificación para los residuos de acetilo, niloilo y tigloilo, c) las posiciones de lactonización de la aglicona.
2. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia, como método de separación y purificación de los oligosacáridos individuales, representó una poderosa herramienta para lograr la resolución de la mezcla compleja de resinas glicosídicas aisladas del extracto clorofórmico de la especie en estudio.
3. Las técnicas espectroscópicas, como la resonancia magnética nuclear y espectrométricas, como la espectrometría de masas, constituyen una herramienta esencial para la caracterización de las estructuras moleculares de los glicolípidos. Además, el empleo de técnicas degradativas como la hidrólisis alcalina y la hidrólisis ácida fueron útiles para la identificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios y de los residuos acilantes.
4. Se encontraron dos albinósidos, los albinósidos III y X, extremadamente potentes como inhibidores de la multifarmaco resistencia, con lo cual este tipo de productos naturales representan una clase prometedora de novedosos prototipos más seguros y eficaces para la inhibición de las bombas de eflujo para vencer la resistencia adquirida a los agentes antineoplásicos de uso común en la clínica, disminuyendo sus dosis terapéuticas efectivas y, por lo tanto, los efectos tóxicos indeseables.

## 8. REFERENCIAS

- (1) Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J. (2010). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, AD, Falk H, Kobayashi J. Eds.; Springer-Verlag: New York; Vol. **92**, Chapter 2, 77–152.
- (2) Escobedo-Martínez C, Cruz-Morales S, Fragoso-Serrano M, Mukhlesur Rahman M, Gibbons S, Pereda-Miranda R. (2010). Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry*. **71**: 1796-1801.
- (3) Ding W, Jiang ZH, Wu P, Xu L, Wei X. (2012). Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry*. **81**: 165-174.
- (4) Pereda-Miranda R, Kaatz GW, Gibbons S. (2006). Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *J. Nat. Prod.* **69**: 406–409.
- (5) 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.* **71**: 1037.
- (6) Chérigo L, Pereda-Miranda R, Gibbons S. (2009). Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomoea murucoides*. *Phytochemistry*. **70**: 222–227.
- (7) Corona-Castañeda B, Pereda-Miranda R. (2012). Morning glory resin glycosides as modulators of antibiotic activity in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Planta Med.* **78**: 128–131.
- (8) Figueroa-González G, Jacobo-Herrera N, Zentella-Dehesa A, Pereda-Miranda R. (2012). Reversal of multidrug resistance by Morning Glory resin glycosides in human breast cancer cells. *J. Nat. Prod.* **75**: 93–97.
- (9) Cruz-Morales S, Castañeda-Gómez J, Figueroa-González G, Mendoza-García A, Lorence A, Pereda-Miranda R. (2012). Mammalian multidrug resistance lipopentasaccharide inhibitors from *Ipomoea alba* seeds. *J. Nat. Prod.* **75**: 1603-1611.
- (10) Castañeda-Gómez J, Figueroa-González G, Jacobo N, Pereda-Miranda R. (2013). Purgin II, a resin glycoside ester-type dimer and inhibitor of multidrug efflux pumps from *Ipomoea purga*. *J. Nat. Prod.* **76**: 64-71.

- (11) Pereda-Miranda R, Mata R, Anaya AL, Wickramaratnen DBM, Pezzuto JM, Kinghorn AD. (1993). Tricolorin A, major phyto-growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**: 571–582.
- (12) 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.
- (13) Rencurosi A, Mitchell EP, Cioci G, Pérez S, Pereda-Miranda R, Imberty A. (2004). Crystal structure of tricolorin A: molecular rationale for the biological properties of plant resin glycosides found in some Mexican herbal remedies. *Angew. Chem.* **43**: 5918–5922.
- (14) McDonald A. (1994). *Flora de Veracruz*; Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, University of California: Riverside, CA, 13–18.
- (15) Osadao R. (1834). *El libro Judío o Medicina Doméstica. Descripción de las Virtudes de las Yervas Medicinales de Yucatán, Mérida*. Andrew Heath de Zapata, Ed.; México, 100–208.
- (16) (a) Gunn C. (1972). Moonflowers *Ipomoea* section *Calonyction* in Temperate North America. *Brittonia*, **24**: 150–168. (b) Burkill IH. (1935). *A Dictionary of the Economic Products of the Malay Peninsula*. The Government of the Straits Settlements and Federated Malay States. The Crown Agents for the Colonies: London; Vol. **2**, 2101–2108.
- (17) (a) Murofushi N, Yokota T, Watanabe A, Takahashi N. (1970). Isolation and structures of gibberellins from immature seeds of *Calonyction aculeatum*. *Agr. Biol. Chem.* **34**: 1436–1438. (b) Shen SH, Shen HM, Wu JH. (1996). Role of calonyctin on free sugars in relation to starch accumulation in developing sweet potatoes. *J. Plant Growth Regul.* **15**: 27–31. (c) Shen SH, Wu JH; Zen DL. (1996). Physiological effects of calonyction on development and yield of potato. *Potato Res.* **39**: 63–68.
- (18) (a) Fang Y, Chai W, Chen S, He Y, Zhao L, Peng J, Huang H, Xin B. (1993). On the structure of calonyctin A, a plant growth regulator. *Carbohydr Res.* **245**: 259–270. (b) Furukawa J, Kobayashi S, Nomizu M, Nishi N, Sakairi N. (2000). Total synthesis of calonyctin A2, a macrolidic glycolipid with plant growth-promoting activity. *Tetrahedron Letters.* **41**: 3453–3457.

- (19) (a) Space JC, Flynn T. (2000). *Observations on Invasive Plant Species in American Samoa*. U.S.D.A. Forest Service, Pacific Southwest Research Station, Institute of Pacific Islands Forestry: Honolulu, Hawaii, 1–50. (b) Foxcroft L, Richardson D, Wilson J. (2008). Ornamental plants as invasive aliens: problems and solutions in Kruger National Park, South Africa. *Environ. Manage.* **41**: 32–51. (c) Macdonald IA, Reaser JK, Bright C, Neville LE, Howard GW, Murphy SJ. (2003). *Invasive Alien Species in Southern Africa: National Reports & Directory of Resources*. Global Invasive Species Programme, Cape Town, Eds. G. Preston: South Africa, 1–125.
- (20) Howard A, Gerrans G, Michael J. (1979). Use of vinylogous urethanes in alkaloid synthesis: formal synthesis of ipalbidina. *J. Org. Chem.* **45**: 1713-1715.
- (21) Ikhiri K, Dan Koulodo D, Garba M, Mamane S. (1987). Nouveaux alcaloides indolizínicos isolés de *Ipomoea alba*. *J. Nat. Prod.* **50**: 152-156.
- (22) Vivero J, Castorena-Cortés G, Meneses-Acosta A, Montero-Molina L, Sánchez-García L. (1996). Effect of 2.4-D concentration on ergometrine accumulation in *Ipomoea alba* L. (Convolvulaceae) cell suspension culture. *Biotecnología Aplicada*. **13**: 98-100.
- (23) Noda N, Kobayashi H, Miyahara K, Kawasaki T. (1988). Resin glycosides III. Isolation and structural study of the genuine resin glycosides, muricatin I–VI, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**: 920-929.
- (24) Bosch I, Croop JM. (1998). *Cytotechnology*. **27**: 1-30.
- (25) Pereda-Miranda R, Hernández-Carlos B. (2002). HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican Scammony Root. *Tetrahedron*. **58**: 3145-3154.
- (26) (a) Hussain RA, Lin YM, Poveda LJ, Bordas E, Chung BS, Pezzuto JM, Soejarto DD y Kinghorn AD. (1990). Plant-derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. *Journal of Ethnopharmacology*. **28**: 105-113. (b) Kakehi K, Honda S. (1989). *Analysis of Carbohydrates by GLC and MS*. CJ Biermann y GD McGinnis Eds.; CRC Press, Inc.: Florida, 43-85.
- (27) (a) Hara S, Hikaru O, Kunihide M. (1987). Gas-liquid chromatographic separation of aldose enantiomers as trimethylsilyl ethers of methyl 2-(polyhydroxyalkyl)-thiazolidine-4(R)-carboxylates. *Chem. Pharm. Bull.* **35**: 501–506. (b) Miyase T,



- Saitch H, Shiokawa K, Ueno A. (1995). Six new presenegenin glycosides, reiniosides A-F, from *Polygala reinii* root. *Chem. Pharm. Bull.* **43**: 466–472.
- (28) Pereda-Mirada R, Fragoso-Serrano M, Escalante-Sánchez E, Hernández-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.
- (29) Castañeda-Gómez J, Pereda-Miranda R. (2011). Resin glycosides from the herbal drug jalap (*Ipomoea purga*). *J. Nat. Prod.* **74**: 1148–1153.
- (30) 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.
- (31) Escalante-Sánchez E, Pereda-Miranda R. (2007). Batatins I and II, ester-type dimers of acylated pentasaccharides from the resin glycosides of sweet potato. *J. Nat. Prod.* **70**: 1029-1034.
- (32) Chérigo L, Pereda-Miranda R. (2006). Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **69**: 595-599.
- (33) Escalante-Sánchez E, Rosas-Ramírez D, Linares E, Bye R, and Pereda-Miranda R. (2008). Batatinosides II–VI, acylated lipooligosaccharides from the resin glycosides of Sweet Potato. *J. Agric. Food Chem.* **56**: 9423-9428.
- (34) Duus J, Gotfredsen ChH, Bock K. (2000). Carbohydrate structural determination by NMR Spectroscopy: Modern methods and limitations. *Chem. Rev.* **100**: 4589-4614.
- (35) (a) Bah M, 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* (Convolvulaceae). *Tetrahedron.* **52**: 13063-13080. (b) Bah M, Pereda-Miranda R. (1997). Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron.* **53**: 9007-9022.
- (36) Silverman, R. B. (2004). *The Organic Chemistry of Drug Design and Drug Action*. Elsevier: USA; 2<sup>nd</sup> Edition; 1-3, 21.
- (37) Noda N, Ono M, Miyahara K, Kawasaki T, Okabe M. (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.

- (38) Noda N, Kogetsu H, Kawasaki T, Miyahara K. (1992). Scammonins VII and VIII. Two resin glycosides from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*. **31**: 2761-2766.
- (39) Noda N, Kogetsu H, Kawasaki T, Miyahara K. (1990). Scammonins I and II. The resin glycosides of Radix Scammoniae from *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*. **29**: 3565-3569.
- (40) Kogetsu H, Noda N, Kawasaki T, Miyahara K. (1991). Scammonins III–VI. Resin glycosides of *Convolvulus scammonia*. *Phytochemistry*. **30**: 957-963.

## 9. ESPECTROS $^1\text{H}$ Y $^{13}\text{C}$

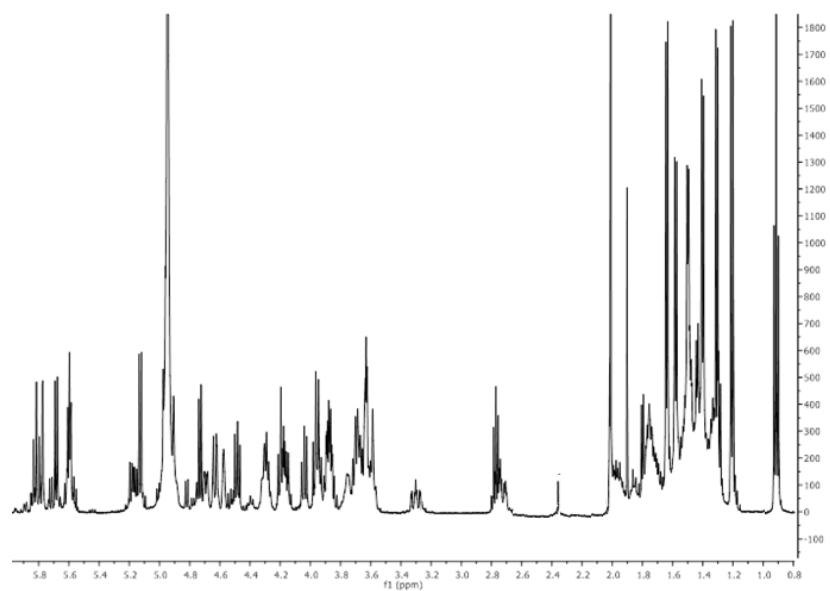


Figura I. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido I (1)

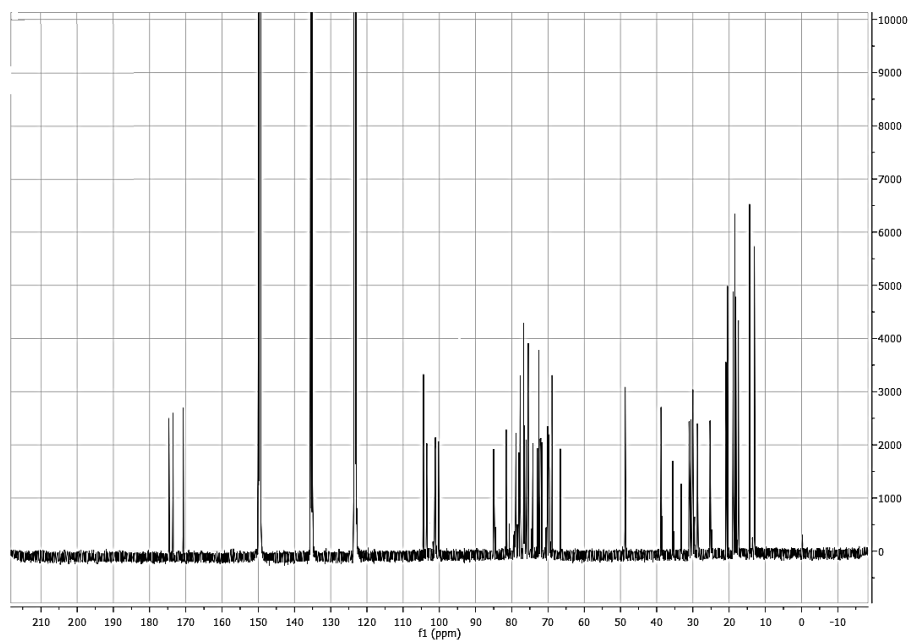
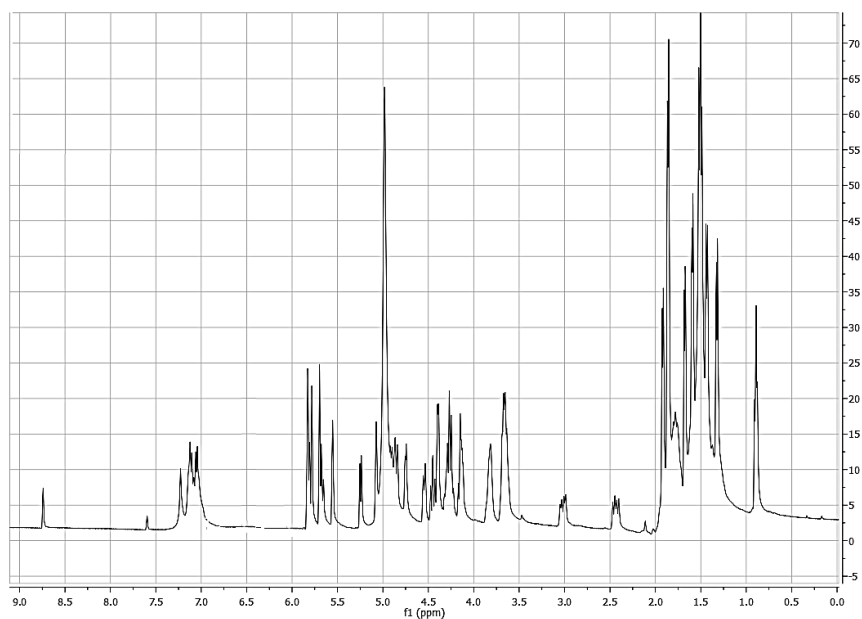
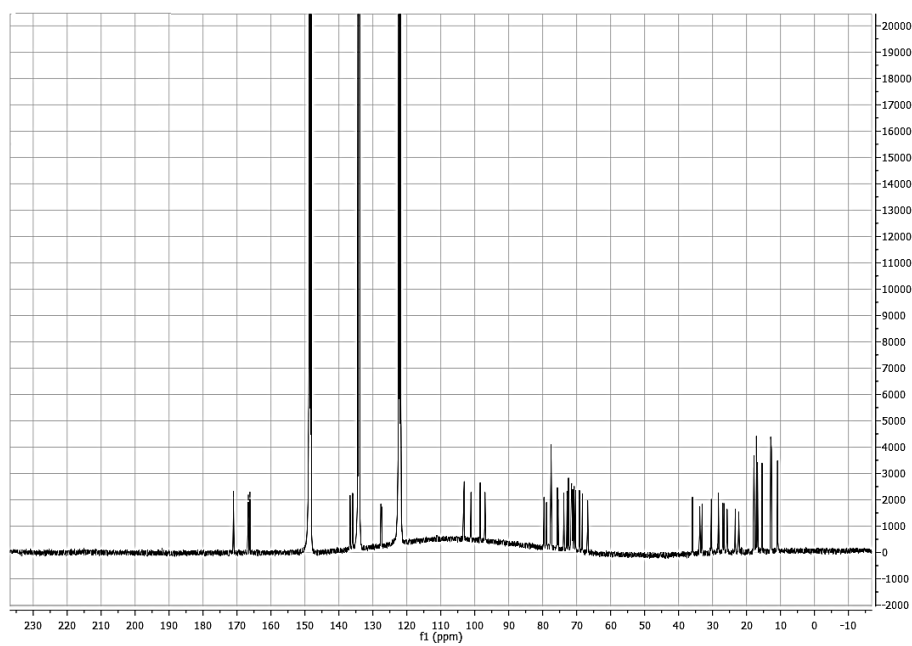


Figura II. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido I (1)



**Figura III. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido II (2)**



**Figura IV. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido II (2)**

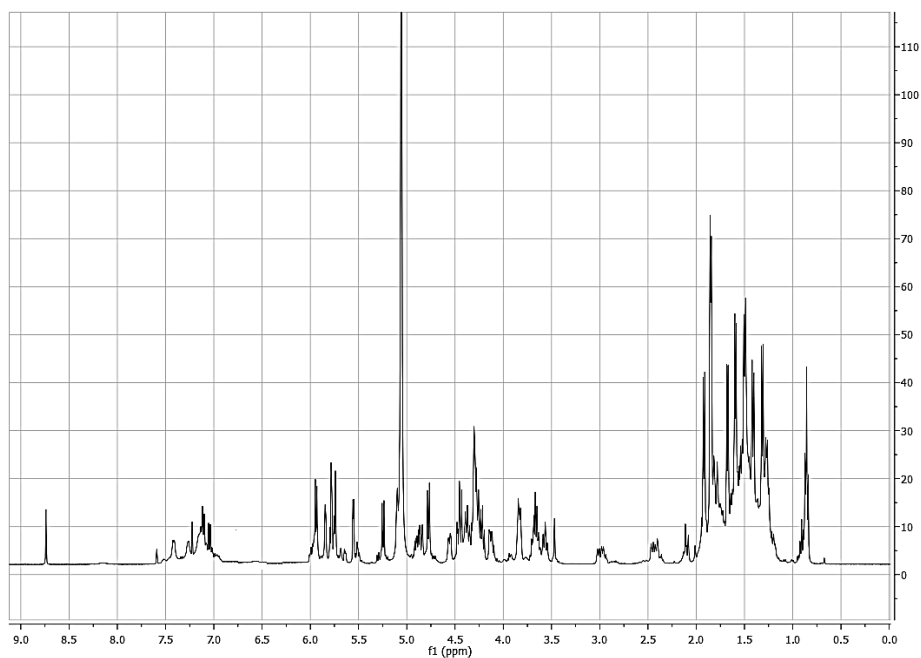


Figura V. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido III (3)

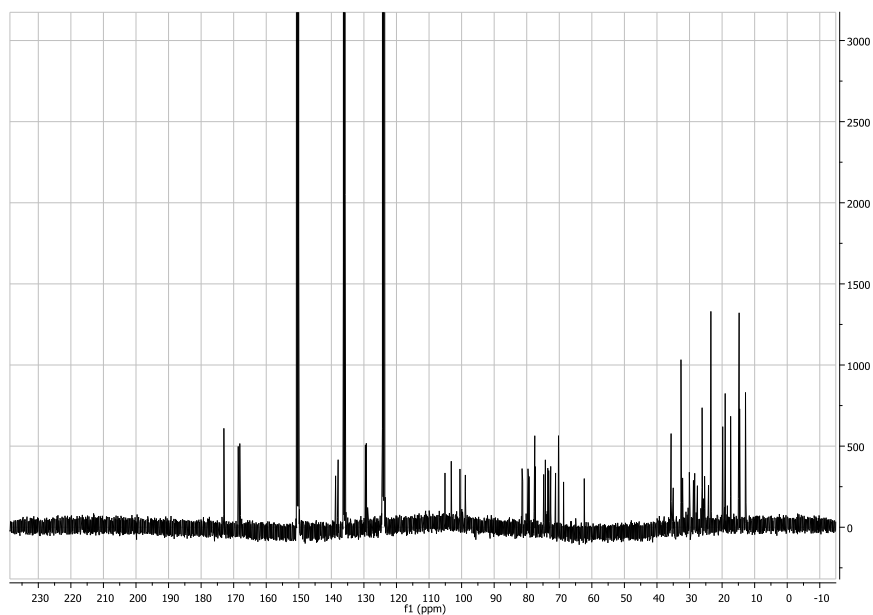


Figura VI. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido III (3)

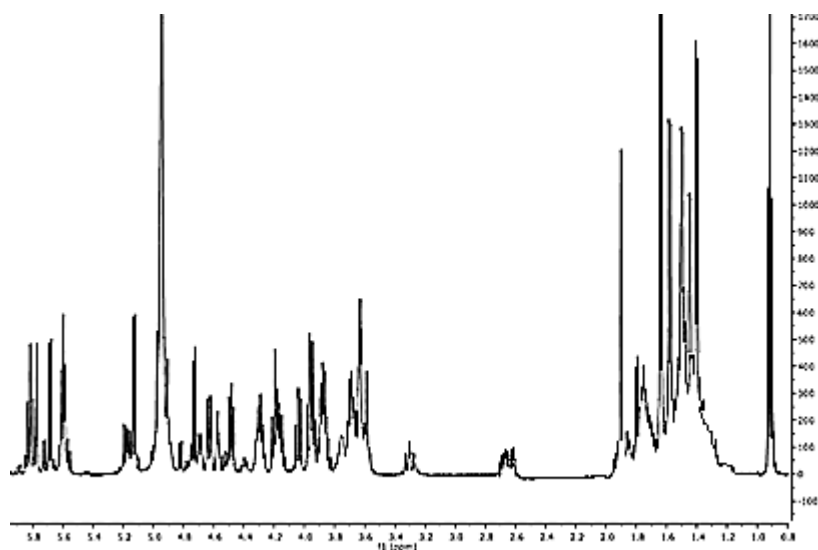


Figura VII. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido IV (4)

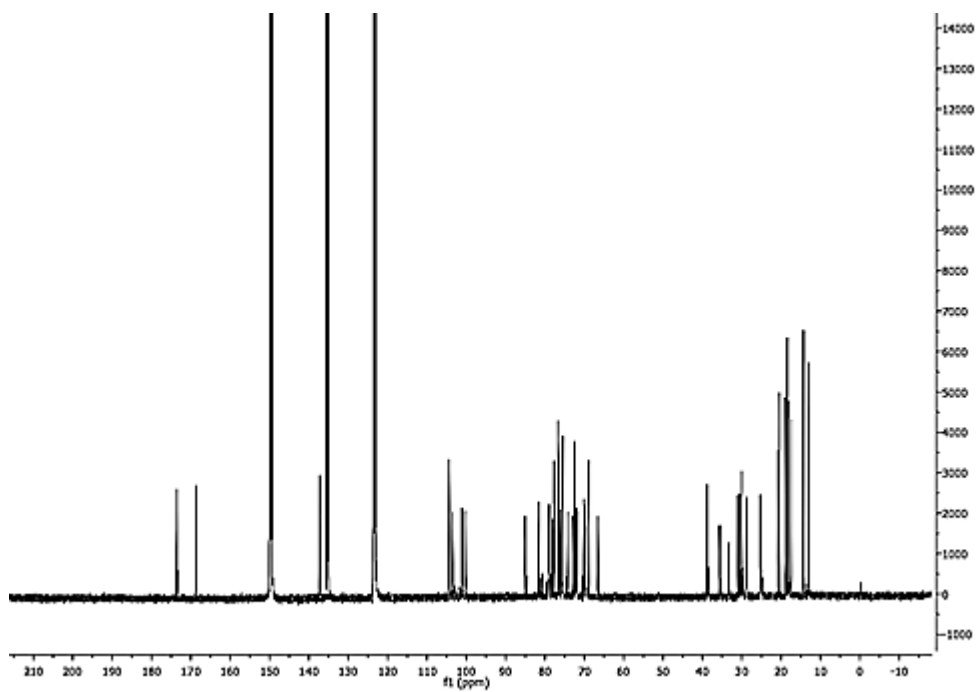
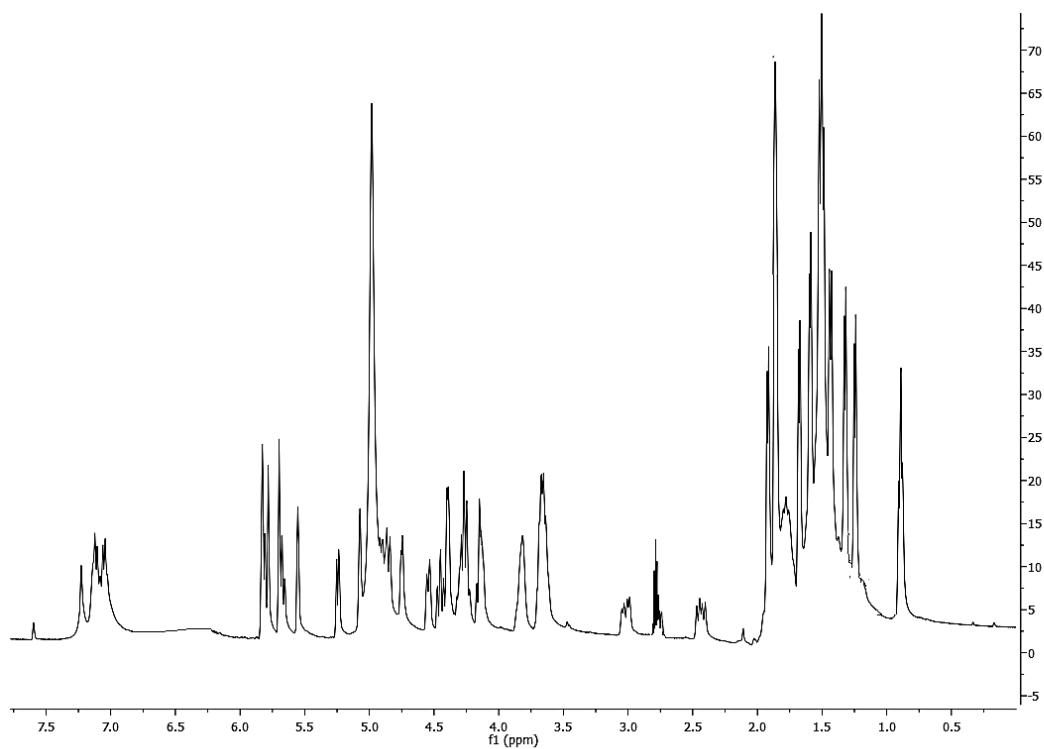
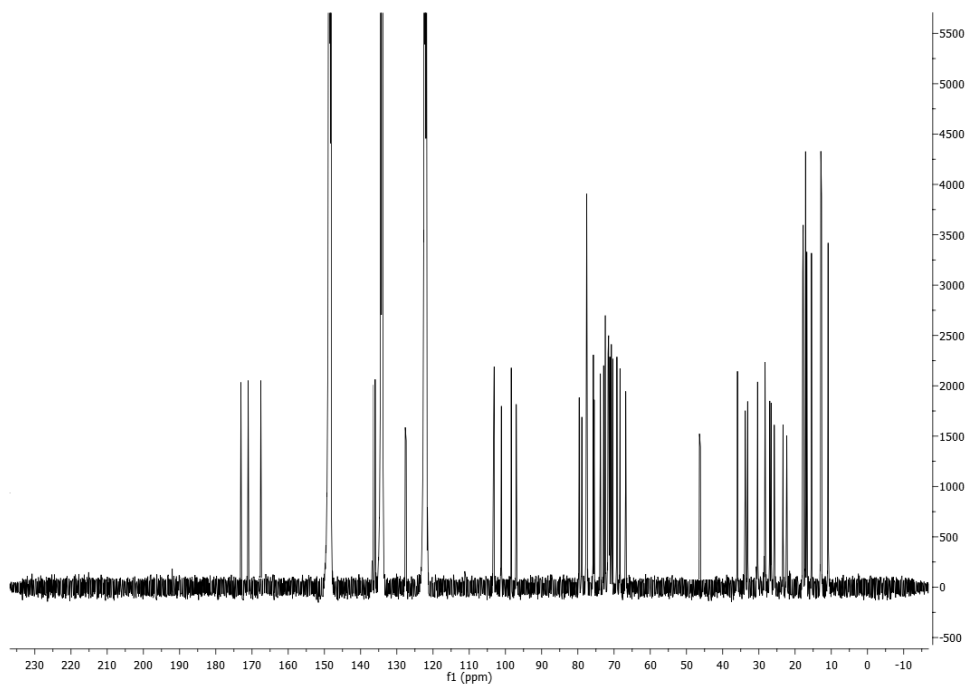


Figura VIII. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido IV (4)



**Figura IX. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido V (5)**



**Figura X. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido V (5)**



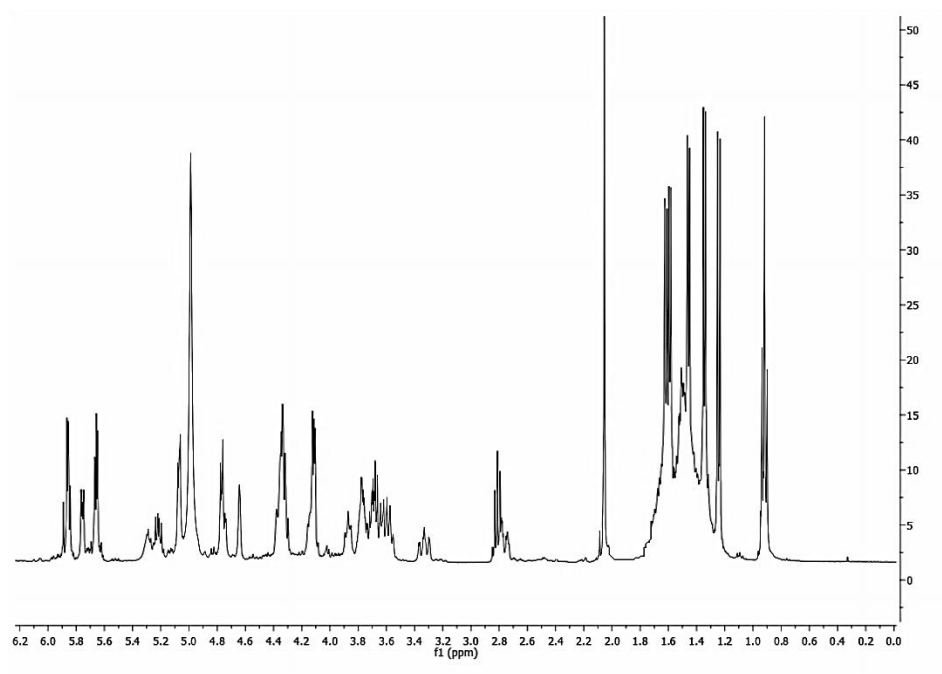


Figura XI. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinosido VI (6)

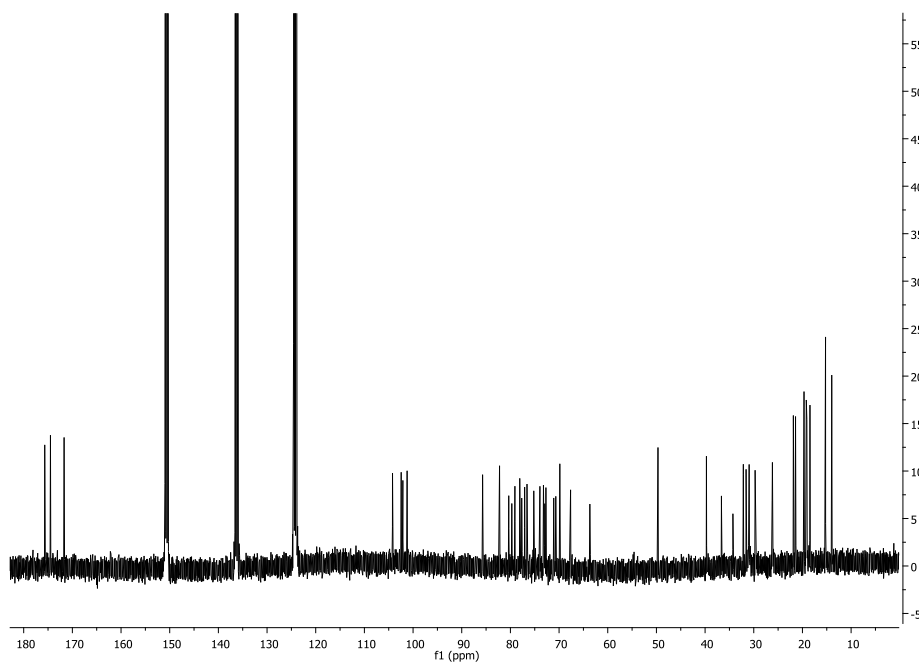


Figura XII. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinosido VI (6)

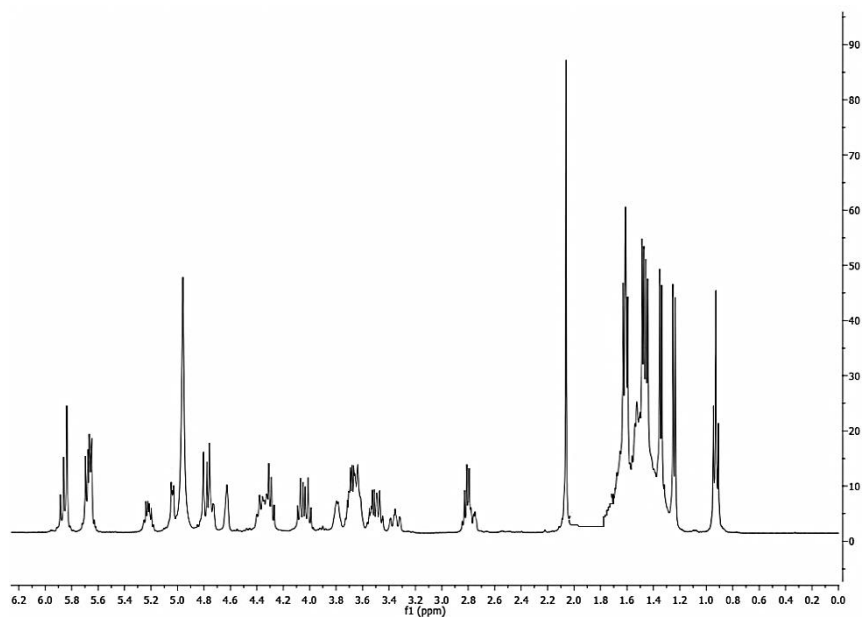


Figura XIII. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VII (7)

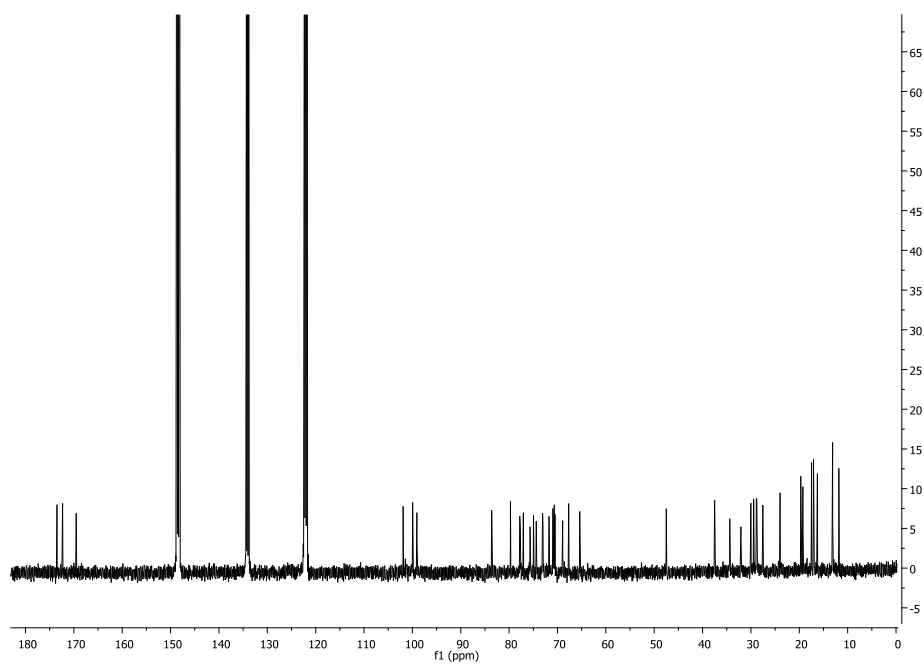


Figura XIV Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VII (7)

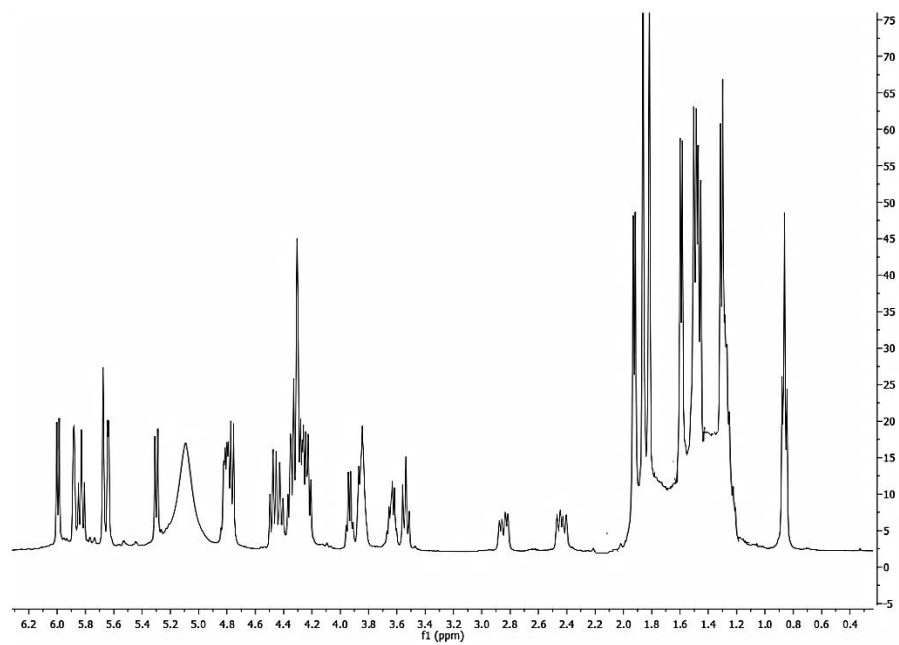


Figura XV. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VIII (8)

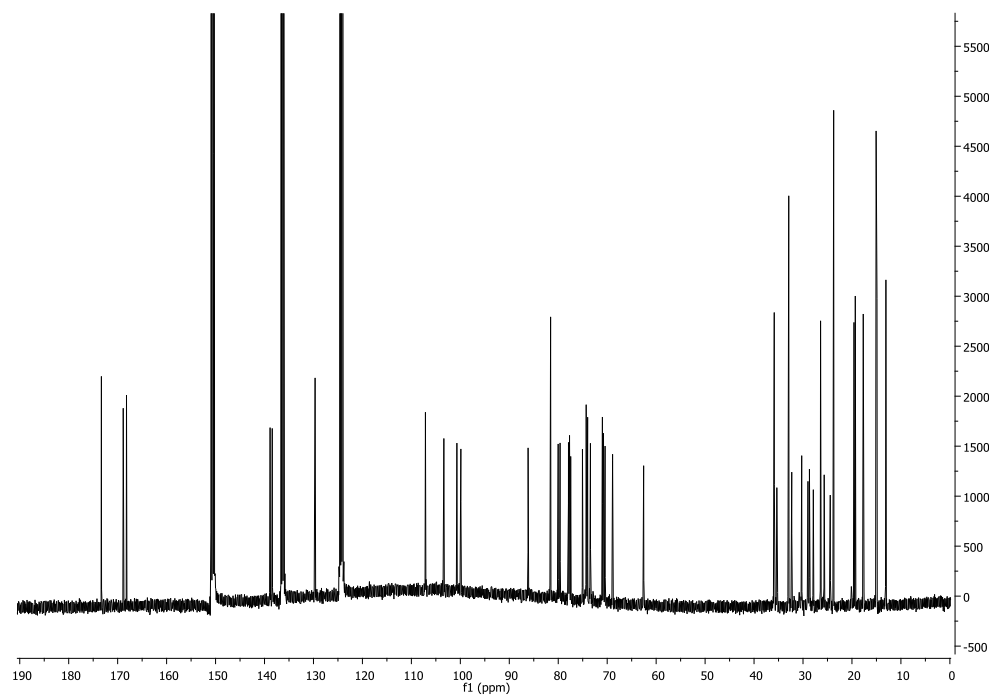
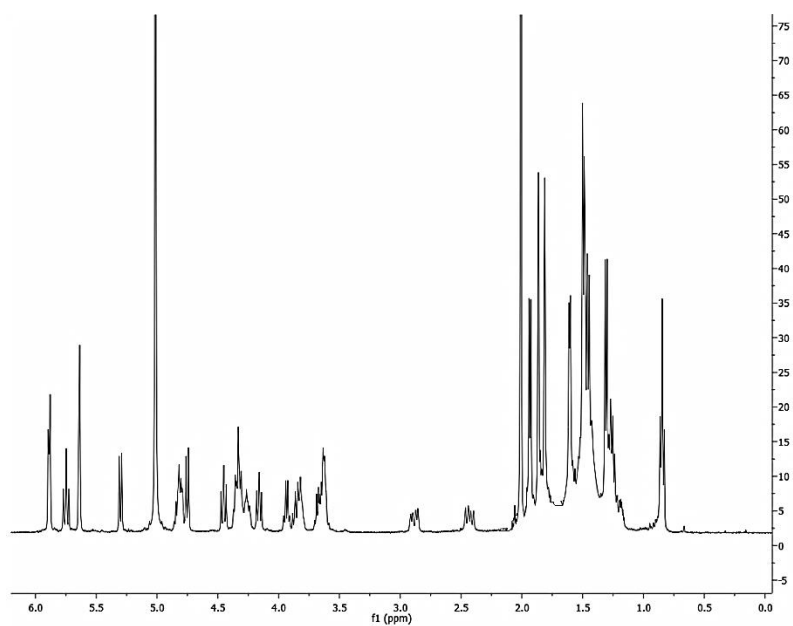
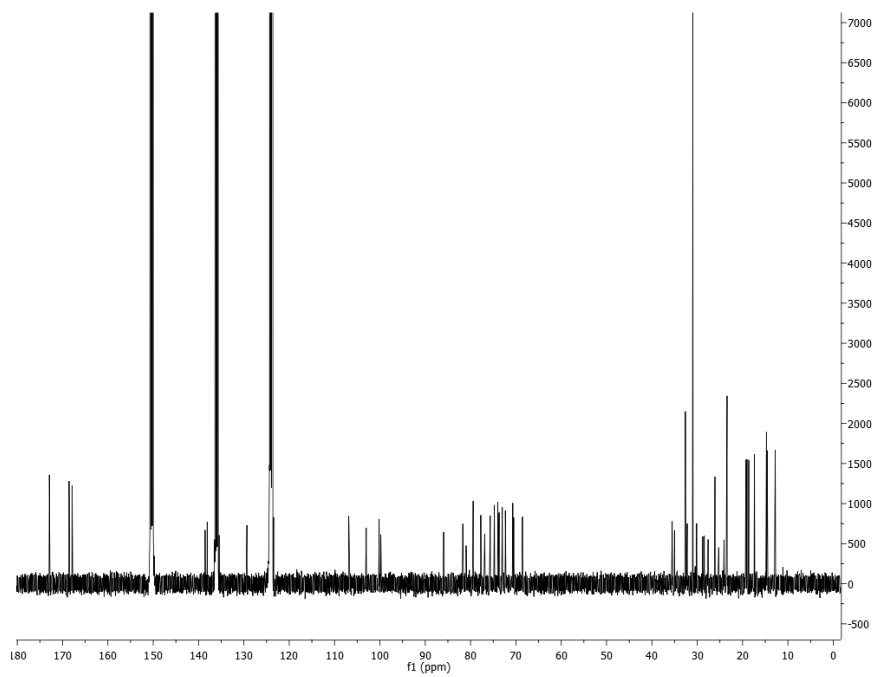


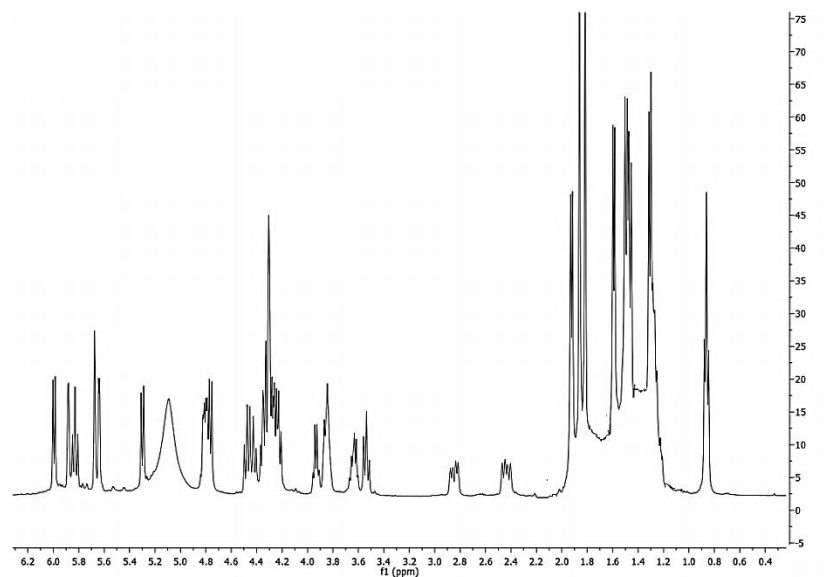
Figura XVI. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido VIII (8)



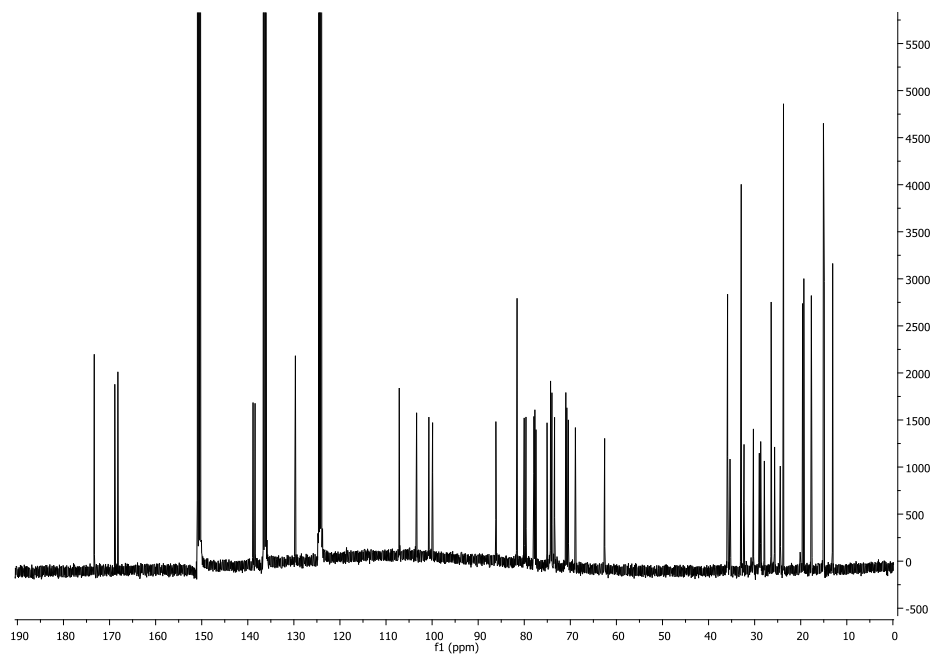
**Figura XVII. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido IX (9)**



**Figura XVIII. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido IX (9)**



**Figura XIX. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido X (10)**



**Figura XX. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido X (10)**

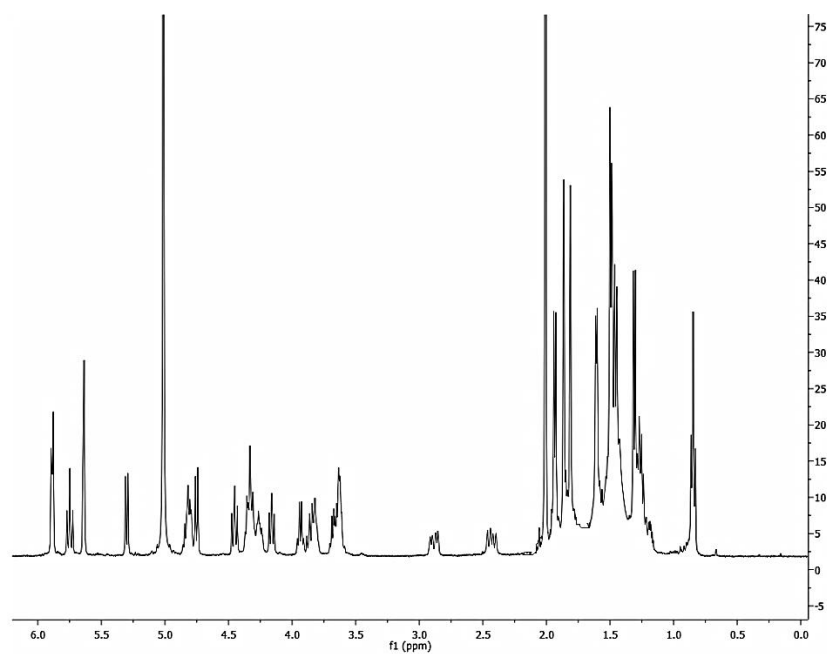


Figura XXI. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido XI (11)

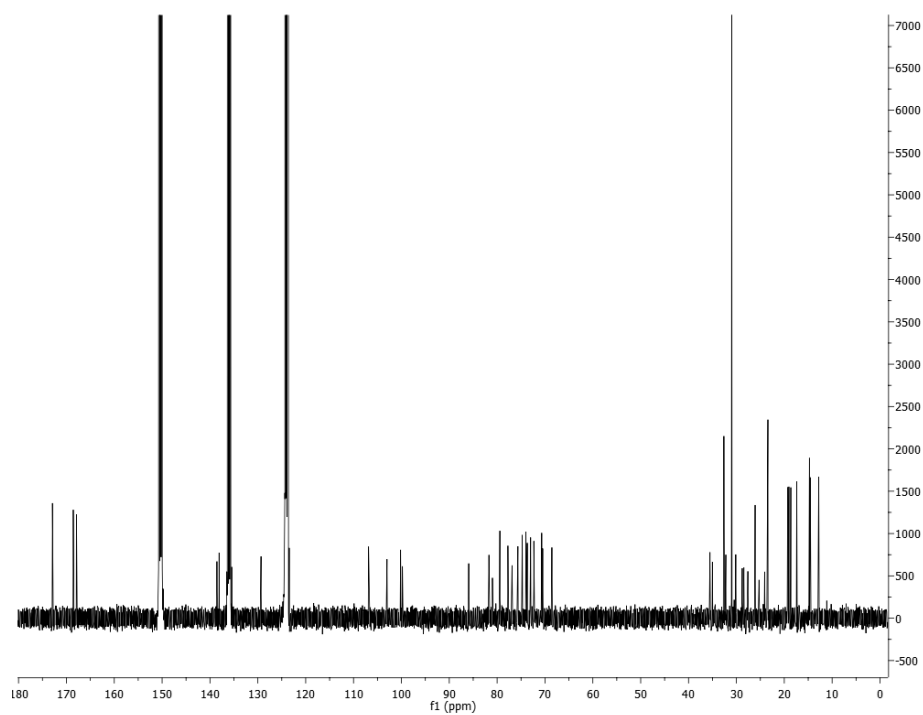


Figura XXII. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) del albinósido XI (11)