



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
QUÍMICAS

*“Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de
Ipomoea purga”*

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. C. Jhon Fredy Castañeda Gómez



TUTOR: **Dr. Rogelio Pereda Miranda**

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Dra. Rachel Mata Essayag
VOCAL	Dra. Luz Elena Vera Avila
VOCAL	Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas
VOCAL	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
SECRETARIO	Dr. José Federico del Río Portilla

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. Jhon Fredy Castañeda Gómez

AGRADECIMIENTOS

El más sincero y eterno agradecimiento a mi tutor: Dr. Rogelio G. Pereda Miranda por darme la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación, por su asesoría constante en el proyecto de investigación y sus valiosos consejos a mi formación académica. De igual manera deseo expresar mis agradecimientos a las siguientes instituciones y personas:

- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el financiamiento de este proyecto de investigación 101380-Q y por la beca otorgada para llevar a cabo mis estudios de doctorado durante el periodo de Enero del 2008 – Enero 2012 (número de becario: 216351).
- ❖ A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (IN217310).
- ❖ Al Biólogo Alberto Linajes de la Facultad de Ciencias Agrícolas (Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver.), por la identificación de las muestras de *Ipomoea purga*
- ❖ A las Dras. Isabel Chavez U., Beatriz Quiroz G. y al M. en C. Hector Rios Olivares del Instituto 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.
- ❖ A la Dra. Davinia Mills del Biocentro, University of Reading (Reino Unido), por el registro de los espectros de masas (MS-ESI) de alta resolución.
- ❖ 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 los Miembros del Comité Tutor: Dr. Alexandre Cardoso Taketa y el Dr. Leovigildo Quijano, por sus oportunas y acertadas sugerencias al trabajo de investigación.

- ❖ A los Miembros del Jurado: Dra. Rachel Mata Essayag, Dra. Luz Elena Vera Avila, Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas, Dr. José Federico del Río Portilla y Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, por las correcciones sugeridas en el manuscrito de tesis.
- ❖ A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (UNAM), por la constante asistencia técnica en los procedimientos cromatográficos, y por darme la oportunidad de orientar clases de Farmacognosia.
- ❖ Un especial agradecimiento a la Dra. Rachel Mata Essayag del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (UNAM), por recomendarme trabajar la tesis doctoral con el Dr. Rogelio G. Pereda Miranda (Lab. 123).
- ❖ Mis profundos agradecimientos a la Dra. Eddy Francis Plaza Medina por motivarme para ingresar y llevar a cabo estudios de doctorado en esta gran casa de estudios (UNAM). gracias por tu apoyo y amistad, y muchos éxitos en tu vida profesional.

“A mi madre: Gloria Amparo Gómez por ser ejemplo de lucha y superación, y a mis hermanos: Geimar Antonio Castañeda G. y Jorge Armando Castañeda G. por ser cómplices de vida”

ABSTRACT

Ipomoea purga (“Officinal Jalapae Radix”) is a vine native to Mexico and it is one of species that form the jalap root medicinal plant complex producing purgative principles since pre-Hispanic times. Jalap root is the main ingredient for herbal drug. A decoction of the aerial parts of this species is recommended as a galactagogue. This herb is further employed in the treatment of functional digestive disorders, bilious disorders and ulcerated skin.

The present dissertation describes the isolation, purification and structure elucidation of the seven individual constituents from resin glycosides contents in this medicinal species. The chloroform-soluble extract from the aerial parts of this plant, through high-performance liquid chromatography, using the techniques of column overload, peak shaving and recycling were isolated new oligosaccharides derivatives of jalapinic acid named **purginosides I-IV**, macrocyclic pentasaccharides, and the **purgins I-III**, ester-type dimers.

Saponification of the crude resin glycoside mixture yielded operculinic acid A as the major glycosidic acid component whereas the fatty acids: 2-methylbutyric, *n*-hexanoic, *n*-decanoic, *n*-dodecanoic and *trans*-cinnamic were identified as the esterifying residues on the oligosaccharide cores.

High-field nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and mass spectrometry (FAB, ESI) were used to characterize all new isolated compounds. **Purginosides I-IV** are pentaglycosidic lactones of operculinic acid A and their differences are due to the acylating residues in the positions C₂ or C₃ and C₄ of the last rhamnose unit. The structural characterization of the **purgins I-III** indicated that these molecules possess dimeric structures consisting of two units of the operculinic acid A, in the case of **purgin I**, and two units of the operculinic acid B, in the case of the **purgins II** and **III**. The main difference between **purgin II** and **III** is due to the acylating residue on C₄ of the last rhamnose unit of both monomeric units.

The isolation of **purgins I-III** demonstrated the complexity of the chemical diversity of resin glycosides contents in this medicinal species (*Ipomoea purga*) and also confirmed the previous hypothesis about chemical composition of the Jalap root as high molecular weight oligosaccharides glycosidically linked to a hydroxylated fatty acid.

RESUMEN

Ipomoea purga (Raíz de Jalapa) es una enredadera nativa de México que forma parte del complejo de plantas medicinales conocidas como “las jalapas” empleadas por sus propiedades purgantes desde tiempos prehispánicos. La raíz de esta especie es el principal ingrediente para la preparación del remedio. Las partes aéreas de esta planta se utilizan en forma de decocciones para estimular la producción de leche materna, para tratar desórdenes funcionales digestivos, desórdenes biliares e infecciones en la piel.

La presente disertación describe por primera vez el aislamiento, la purificación y la elucidación estructural de siete constituyentes individuales de las resinas glicosídicas presentes en esta especie medicinal. A partir del extracto soluble en cloroformo proveniente de las partes aéreas de esta planta y a través 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 los nuevos oligosacáridos del ácido jalapínico: **purginósidos I-IV**, pentasacáridos macrocíclicos y las **purginas I-III**, dímeros de tipo éster.

La saponificación de la mezcla cruda de resinas glicosídicas proporcionó el ácido operculínico A como el ácido glicosídico mayoritario, mientras que los ácidos grasos que se encuentran acilando los núcleos oligosacáridos se identificaron como: 2-metilbutanoico, *n*-hexanoico, *n*-decanoico, *n*-dodecanoico y el *trans*-cinámico.

Mediante el empleo de diferentes técnicas de la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (FAB, ESI) se llevó a cabo la identificación de las estructuras químicas de los compuestos aislados. Así, los **purginósidos I-IV** son lactonas pentaglicosídicas del ácido operculínico A, que difieren por el tipo de sustituyente que se encuentra acilando las posiciones C₂ ó C₃ y C₄ de la unidad de ramnosa terminal en el núcleo oligosacárido. La caracterización estructural de las **purginas I-III**, mostró que estas moléculas poseen estructuras diméricas constituidas por dos unidades del ácido operculínico A, en el caso de la **purgina I**, y dos unidades del ácido operculínico B, en el caso de las purginas **II y III**. La principal diferencia entre las purginas II y III se presenta

en el tipo de sustituyente que se encuentra acilando la posición C₄ de la unidad de ramnosa terminal en ambos núcleos oligosacáridos que conforman los dímeros.

El aislamiento y la identificación de las **purginas I-III** permite demostrar la complejidad de la diversidad química de las resinas glicosídicas presentes en la especie medicinal *Ipomoea purga* y confirmar la hipótesis previa sobre la composición química de la Raíz de Jalapa como oligosacáridos de alto peso molecular glicosídicamente enlazados a ácidos grasos hidroxilados.

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES	5
2.1 La familia Convolvulaceae.....	5
2.2 El Género Ipomoea y la especie <i>Ipomoea purga</i>.....	6
2.3 Metabolitos secundarios principales en la familia Convolvulaceae.....	8
2.3.1 Alcaloides.....	8
2.3.2 Resinas Glicosídicas.....	8
2.3.2.1 Lipopentasacáridos del Ácido Arboresínico	10
2.3.2.2 Lipopentasacáridos del Ácido Calisólico A	10
2.3.2.3 Lipopentasacáridos del Merremósido J	11
2.3.2.4 Lipopentasacáridos del Ácido Multifidínico A	12
2.3.2.5 Lipopentasacáridos del Ácido Murucínico.....	13
2.3.2.6 Lipopentasacáridos de los Ácidos Operculínicos A y B	14
2.3.2.7 Pescaprosidos A, B y lipopentasacáridos del pescaprosido C.....	17
2.3.2.8 Lipopentasacáridos del Ácido Quamoclínico A.....	18
2.3.2.9 Lipopentasacáridos de los Ácidos Simónicos A y B.....	19
2.3.2.10 Lipopentasacáridos del Ácido Soldanético A.....	22
2.3.2.11 Lipopentasacáridos del Ácido Woodrosínico A.....	22
2.3.2.12 Lipohehexasacáridos	23
2.3.2.13 Dímeros tipo-éster	28

3. OBJETIVOS	34
4. HIPÓTESIS.....	35
5. PARTE EXPERIMENTAL	36
5.1 Procedimientos cromatográficos	36
5.2 Determinación de las constantes físicas.....	37
5.3 Material vegetal	38
5.3.1 Obtención de los extractos del material vegetal de <i>Ipomoea purga</i>	38
5.4 Fraccionamiento primario del extracto CHCl₃ de las partes aéreas de <i>Ipomoea purga</i>	39
5.5 Preparación de derivados de la Fracción XII	40
5.5.1 Obtención del ácido glicosídico mayoritario mediante hidrólisis alcalina	40
5.5.2 Preparación del ácido glicosídico peracetilado	41
5.5.3 Preparación del diazometano	41
5.5.4 Preparación del derivado acetilado-metilado	42
5.5.5 Purificación del derivado acetilado-metilado del ácido glicosídico mayoritario mediante CLAE.....	42
5.5.5.1 Condiciones por CLAE a nivel analítico:	42
5.5.5.2 Condiciones por CLAE a nivel preparativo:	43
5.5.6 Identificación del derivado acetilado-metilado del ácido glicosídico mayoritario	44
5.5.7 Preparación y purificación de los ácidos operculínicos A y B metilados	45
5.6 Purificación de los constituyentes individuales de la fracción XII mediante CLAE	45
5.6.1 Condiciones por CLAE a nivel analítico:	46
5.6.2 Condiciones por CLAE a nivel preparativo:	46
5.6.3 Obtención de los purginósidos I-IV y las purginas I-III	47

5.7 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de la Raíz de Jalapa (muestra comercial)	50
5.7.1 Hidrólisis alcalina del extracto clorofórmico de la Raíz de Jalapa (muestra comercial).....	51
5.8 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de la Raíz de Jalapa (muestra colectada).....	52
5.8.1 Hidrólisis alcalina del extracto clorofórmico de la Raíz de Jalapa (muestra colectada)	53
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	54
6.1 Colecta de material vegetal y preparación de los extractos.....	54
6.2 Fraccionamiento del extracto clorofórmico de las partes aéreas	54
6.3 Identificación de agliconas.....	54
6.4 Purificación del ácido glicosídico	55
6.5 Identificación estructural del ácido glicosídico (1)	57
6.6 Aislamiento y purificación de los compuestos 4-10	65
6.6.1 Extracción y fraccionamiento.....	65
6.6.2 Análisis por CLAE de la fracción XII.....	66
6.6.3 Purificación de los glicolípidos individuales	68
6.7 Caracterización de la estructura química de los purginósidos I-IV	69
6.7.1 Empleo de la RMN: COSY y TOCSY.....	71
6.7.2 Empleo de la RMN: HSQC.....	76
6.7.3 Empleo de la técnica HMBC.....	81
6.7.3.1. Identificación de las posiciones de esterificación	83
6.7.4 Empleo de la espectrometría de masas.....	87
6.8 Identificación de la purgina I	92
6.8.1 Empleo de la RMN: COSY y TOCSY.....	94

6.8.2 Empleo de la RMN: HSQC y HMBC	96
6.8.3 Empleo de la espectrometría de masas.....	98
6.9 Identificación de las purginas II y III.....	103
6.9.1 Empleo de la RMN: COSY y TOCSY.....	104
6.9.2 Empleo de la RMN: HSQC y HMBC	104
6.9.3 Empleo de la espectrometría de masas.....	111
7. CONCLUSIONES	117
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	120
9. APÉNDICE	127
9.1 Artículos generados por la presente investigación	127
9.2 Trabajos presentados en congresos	127
10. ESPECTROS	128

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Peso de los extractos obtenidos.....	39
Cuadro 2.	Fraccionamiento primario del extracto CHCl ₃ de las partes aéreas de <i>Ipomoea purga</i>	40
Cuadro 3.	Fraccionamiento primario del extracto CHCl ₃ de la Raíz de Jalapa (muestra comercial).....	51
Cuadro 4.	Fraccionamiento primario del extracto CHCl ₃ de la Raíz de Jalapa (muestra colectada).....	53
Cuadro 5.	Identificación de los ácidos grasos mediante CG-EM.....	55
Cuadro 6.	Constantes espectroscópicas (RMN ¹ H y ¹³ C) del derivado XII-HAM..	62
Cuadro 7.	Datos espectroscópicos en la RMN ¹ H para los purginósidos I-IV (4-7).....	77
Cuadro 8.	Datos espectroscópicos en la RMN ¹³ C para los purginósidos I-IV (4-7).....	79
Cuadro 9.	Datos espectroscópicos en la RMN ¹ H y ¹³ C para la purgina I (8).....	102
Cuadro 10.	Datos espectroscópicos en la RMN ¹ H y RMN ¹³ C para la purgina II (9).....	115
Cuadro 11.	Datos espectroscópicos en la RMN ¹ H y RMN ¹³ C para la purgina III (10).....	116

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ilustración de la raíz de jalapa (<i>Ipomoea purga</i>) en el manuscrito Badiano (1552)	3
Figura 2.	Morfología de la especie <i>Ipomoea purga</i>	7
Figura 3.	Estructura de las arboresinas I-VI	10
Figura 4.	Estructura de las calisolinas II-III	11
Figura 5.	Estructura de los merremósidos F, G, h₁ y h₂	12
Figura 6.	Estructura de las multifidinas I-II	13
Figura 7.	Estructura de las murucinas I-IX	14
Figura 8.	Resinas Glicosídicas derivadas del ácido operculínico A y B	16
Figura 9.	Estructura de los pescaprosidos A y B y la pescapreína XVIII	17
Figura 10.	Estructura de las quamoclinas I-III	18
Figura 11.	Resinas glicosídicas derivadas de los ácidos simónicos A y B	21
Figura 12.	Estructura de la soldanelina A	22
Figura 13.	Estructura de las woodrosinas I-II	23
Figura 14.	Estructura de la calisolina IV	24
Figura 15.	Estructura del ácido lonchofílico	24
Figura 16.	Estructura del ácido operculínico y operculínico H	25
Figura 17.	Estructura de los ácidos farbíticos A y B	26
Figura 18.	Estructura de los ácidos púrgicos A y B	27
Figura 19.	Estructura de los hexasacáridos PM-1-PM-7	28
Figura 20.	Estructura de la merremina	29
Figura 21.	Estructura de las tricolorinas H-J	31
Figura 22.	Estructura de las batatinas I-II	32

Figura 23. Estructura de las batatinas III-IV	32
Figura 24. Estructura de las tyriantinas A-B	33
Figura 25. Cromatograma a nivel preparativo del peracetato del ácido glicosídico metilado mayoritario	44
Figura 26. Purificación del derivado como el peracetato-metilado del ácido glicosídico mayoritario mediante “rasurado de pico” y “reciclaje”	44
Figura 27. Estructuras químicas de los ácidos operculínicos A y B metilados.....	56
Figura 28. Espectro de RMN ^1H del peracetato del ácido glicosídico metilado	57
Figura 29. Región de las señales anoméricas del espectro HSQC del peracetato del ácido glicosídico metilado	58
Figura 30. Espectro ^1H - ^1H COSY de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM.....	59
Figura 31. Espectro TOCSY de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM.....	60
Figura 32. Espectro HSQC de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM.....	61
Figura 33. Espectro HMBC de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM.....	63
Figura 34. Estructura química del derivado peracetilado-metilado del ácido glicosídico mayoritario XII-HAM.	64
Figura 35. Espectro de masas MALDI-TOF en modo positivo del ácido operculínico A peracetilado metilado	65
Figura 36. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción XII.	67
Figura 37. Cromatograma de líquidos de la fracción XII a escala preparativa.	67
Figura 38. Purificación del pico B, a través de la técnica de “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”.	68
Figura 39. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido II (5)	70
Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (125.7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido II (5)	71

Figura 41. Espectro ^1H - ^1H COSY del purginósido II (5). Sección de la porción oligosacárida.	72
Figura 42. Espectro ^1H - ^1H COSY del purginósido I (4).	73
Figura 43. Espectro ^1H - ^1H COSY del purginósido IV (7).	74
Figura 44. Espectro TOCSY del purginósido II (5).	75
Figura 45. Espectro TOCSY del purginósido II (5).	76
Figura 46. Espectro HSQC del purginósido II (5).	78
Figura 47. Espectro HSQC del purginósido I (4).	80
Figura 48. Conectividades C-H a tres enlaces ($^3J_{\text{C-H}}$) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación.	81
Figura 49. Espectro HMBC del purginósido I (4).	82
Figura 50. Espectro HMBC del purginósido I (4).	84
Figura 51. Conectividades C-H a tres enlaces ($^3J_{\text{C-H}}$) para el establecimiento de los sustituyentes éster en el purginósido II (5).	85
Figura 52. Espectro HMBC del purginósido II (5).	86
Figura 53. Patrones de fragmentación característica de los purginósidos I-IV.	87
Figura 54. Espectro de masas FAB en modo negativo del purginósido I (4).	89
Figura 55. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la purgina I (8).	93
Figura 56. Espectro de RMN ^{13}C (125.7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la purgina I (8).	93
Figura 57. Espectro HSQC de la región anomérica de la purgina I (8)	94
Figura 58. Espectro ^1H - ^1H COSY de la purgina I (8).	95
Figura 59. Espectro HMBC de la purgina I (8).	97
Figura 60. Espectro HMBC de la purgina I (8).	99
Figura 61. Espectro EM-HRESI de la purgina I (8).	100
Figura 62. Espectro HSQC de la región anomérica de la purgina II (9).	103
Figura 63. Espectro ^1H - ^1H COSY de la purgina II (9).	105

Figura 64. Conectividades C-H a tres enlaces (${}^3J_{C-H}$) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación en las purginas II (9) y III (10).....	105
Figura 65. Espectro HMBC de la purgina II (9).....	106
Figura 66. Correlaciones a dos y tres enlaces ${}^{2-3}J_{C-H}$ entre los carbonos carbonílicos y los protones alfa metileno o metino de los ésteres para la purgina II (9)...	107
Figura 67. Espectro HMBC de la purgina II (9).....	108
Figura 68. Correlaciones ${}^{13}C-{}^1H$ comunes a tres enlaces de distancia (${}^3J_{C-H}$) de las purginas II y III	109
Figura 69. Espectro HMBC de la purgina II (9).....	110
Figura 70. Espectro EM-HRESI de la purgina II (9)	111
Figura 71. Espectro EM-HRESI de la purgina III (10)	112

LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviación	Significado
α	Rotación óptica
J	Constante de acoplamiento
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CH ₂ Cl ₂	Cloruro de metileno
CH ₃ Cl	Cloroformo
CLAE	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia
cm	Centímetros
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	Desplazamiento Químico
d	Doblete
dd	Doble doblete
ddd	Doble de doble de doble
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Electrospray ionization
eV	Electrón volts
°C	Grados centígrados
FAB	Bombardeo de átomos acelerados
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Coherence
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
H ₂ O	Agua
I.R.	Índice de Refracción
[M-H] ⁻	Ión pseudomolecular negativo
[M+H] ⁺	Ión pseudomolecular positivo
[M+Cl] ⁻	Ión negativo aducto con cloro
L	Litro
λ	Longitud de onda

Me ₂ CO	Acetona
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
min	Minutos
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
nm	Nanómetros
p.f.	Punto de fusión
ppm	Partes por millón
<i>m/z</i>	Relación de masa-carga
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
T	Triplete
<i>t_R</i>	Tiempo de retención

Monosacáridos:

Fuc	Fucosa
Glu	Glucosa
Ram	Primera unidad de ramnosa
Ram'	Segunda unidad de ramnosa
Ram''	Tercera unidad de ramnosa

1. INTRODUCCIÓN

El uso de numerosos remedios a base de hierbas surgió en los albores de la civilización. A pesar de no tener estos tratamientos ningún fundamento científico, se recomendaban como uso terapéutico. Incluso, el mismo Robert Boyle, a mediados del siglo XVII, cuando definió las bases científicas de la química, recomendaba brebajes a base de gusanos, excrementos, orina y hongos de cráneos de cadáveres como remedios terapéuticos. Cada vez más, las sustancias naturales, fundamentalmente extractos de plantas tomaban importancia, desde la purificación de compuestos activos hasta el estudio de sus efectos en organismos a nivel *in vitro* e *in vivo*. Entre los productos más importantes descubiertos a través de estos estudios se destacan: la quinina, la atropina, la efedrina, y la estricnina, entre otros.¹ Hoy en día, se estima que el 60% de los medicamentos de origen natural corresponden a agentes antiinfecciosos y antitumorales.²

El uso de los remedios herbolarios se ha aumentado en las últimas dos décadas. Se estima que en 1997 el 12% de la población mundial usó productos herbolarios, generando ganancias de billones de dólares en ventas al comercio de productos naturales. La popularidad de la terapia a base de hierbas ha ganado interés por un número de razones y creencias: las hierbas son menos costosas si se compara con medicamentos prescritos, son más seguras por ser de “origen natural” y representan una solución económica inmediata para muchos pacientes.³

En México, la herbolaria ha sido un recurso para el tratamiento de las enfermedades más comunes por ser un país geográficamente privilegiado, ya que posee una de las floras más ricas en el planeta. Su herbolaria se ha enriquecido por la observación y paciencia de los pueblos que durante siglos han buscado el poder de la flora nativa en la curación.

En el mundo prehispánico, la enfermedad era concebida como producto del desequilibrio corporal, que se mantenía gracias a la dualidad de los elementos vitales (el calor y el frío, la luz y la oscuridad, lo seco y lo húmedo). La medicina, en esta cosmovisión, se ocupaba de ayudar al paciente a recuperar el equilibrio perdido. Las plantas medicinales fueron un recurso que utilizaban los habitantes de Mesoamérica para

buscar la cura de sus enfermedades como era el caso del uso de sustancias purgantes por la creencia de que era posible alcanzar la “purificación del cuerpo” a través de su consumo. Estas sustancias eran obtenidas de plantas pertenecientes a la familia *convolvulaceae*, las cuales se han conocido y comercializado como las “jalapas” desde la época colonial, tales como la “raíz de Michoacán” (*Ipomoea purga*)⁴ (**Figura 1**), considerada como la auténtica raíz de Jalapa, la “escamonea mexicana” (*Ipomoea orizabensis*), la “tumbavaqueros” (*Ipomoea stans*), el “camote” (*Ipomoea batatas*) e *Ipomoea simulans*, entre otros. Estas raíces, atrajeron la atención de los colonizadores españoles en el siglo XVI por sus propiedades purgantes. La “raíz de Michoacán”, bien conocida en Europa a partir de su introducción en el siglo XVI como el “ruibarbo de las indias” y cuyos efectos son más moderados que los de la escamonea (*Convolvulus scamonina*), fue considerada la más importante dentro de estos remedios, hasta el punto tal de convertirse en el sucedáneo americano más importante de la escamonea, la cual había sido usada desde tiempos precristianos. La gran demanda comercial de la “raíz de jalapa” hacia Europa y Estados Unidos ocasionó que los remedios herbolarios, los cuales habían sido preparados con la raíz de jalapa como el ingrediente activo, sean preparados actualmente con otras raíces adulterantes para mejorar o modificar su efecto terapéutico, los cuales pueden adquirirse en tiendas comerciales de productos naturistas.

Las resinas glicosídicas y los alcaloides del ergot son los principios biodinámicos representativos de las especies medicinales pertenecientes a la familia *Convolvulaceae*. Dentro de estos principios, las resinas glicosídicas son las responsables de la actividad purgante y constituyen un conjunto de glicolípidos de alto peso molecular, cuya porción hidrofílica está compuesta de un núcleo oligosacárido y la porción hidrofóbica por una aglicona que está representada por un ácido graso mono o dihidroxilado de 16 o 14 átomos de carbono y que establece un éster cíclico intramolecular. En la mayoría de las veces, el núcleo oligosacárido se encuentra esterificado por ácidos grasos saturados con diferentes longitudes de cadena.⁵ La naturaleza química (moléculas anfipáticas) y la complejidad de las resinas glicosídicas constituyen la necesidad del empleo de métodos cromatográficos y espectroscópicos modernos para el aislamiento de los constituyentes individuales y su caracterización estructural.



Figura 1. Ilustración de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) en el manuscrito Badiano (1552).

El desarrollo de la cromatografía líquida y de las técnicas de identificación estructural como la resonancia magnética nuclear bidimensional ha permitido superar las dificultades que se tuvieron en el pasado para realizar el aislamiento y la identificación de este tipo de molécula. Por esta razón, en las últimas dos décadas se han incrementado en forma significativa las publicaciones sobre la química de las resinas glicosídicas de especies pertenecientes a la familia *Convolvulaceae*.⁶

Debido a la gran diversidad estructural de las resinas glicosídicas encontrada en diferentes especies pertenecientes a la familia *Convolvulaceae*, el presente proyecto describe por primera vez, el aislamiento, la purificación y la identificación estructural de los constituyentes individuales intactos que componen las resinas glicosídicas de la auténtica “raíz de jalapa” o *Ipomoea purga*. En la medicina tradicional mexicana, el uso principal de la raíz de esta planta es como un remedio purgante; pero las partes aéreas de

esta planta han sido usadas para promover la producción de leche materna (galactogogo), así como para el tratamiento de la gastritis, la inflamación abdominal, los desórdenes biliares, la disentería, la enteromeningitis, la hidrocefalia, y las úlceras en la piel.⁷

Específicamente, en este trabajo se hace una descripción detallada sobre el aislamiento de los glicolípidos intactos de *Ipomoea purga*, a través de técnicas cromatográficas de alta resolución y su identificación estructural a través de técnicas como la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear.

2. ANTECEDENTES

2.1 La familia Convolvulaceae

El nombre botánico *Convolvulaceae* deriva del latín *convolvere* que significa entrelazarse, el cual describe la forma de crecimiento característico de la mayoría de las especies en forma de enredaderas.⁶ En la lengua inglesa, esta familia se conoce con el nombre común de “Morning Glory” y se refiere a la tendencia que tienen la mayoría de sus especies ornamentales de florecer sólo en la mañana, donde muestran su esplendor por pocas horas antes de que se inicie la caída de sus pétalos. Estas flores sólo duran una mañana y mueren en la tarde.

Dentro de las angiospermas, esta familia se divide en dos subfamilias, Cuscutoidae y Convolvuloideae. Esta última subfamilia se compone de siete tribus, Dichondreae, Dicranostyleae, Convolvuleae, Poraneae, Erycibae, Ipomoeae y Argyreieae. Las tribus Convolvuleae e Ipomoeae poseen los géneros más importantes desde el punto de vista medicinal, como son *Calystegia*, *Convolvulus* y *Exogonium* que pertenecen a la primera tribu e *Ipomoea*, *Merremia*, *Operculina*, *Quamoclit*, y *Pharbitis* que forman parte de la tribu *Ipomoeae*. Aproximadamente 60 géneros y 1650 especies se estiman en el mundo, distribuidas ampliamente en las zonas tropicales de Asia y América. 250 especies pertenecen al género *Convolvulus*, 500 especies para el género *Ipomoea* y 170 especies para *Cuscuta*. En México se han reportado 15 géneros y aproximadamente 217 especies, siendo el género *Ipomoea* el que presenta el mayor grado de endemismo (65%), es decir, 104 especies se encuentran presentes en México de las 160 especies que conforman el género.

Las especies vegetales pertenecientes a esta familia poseen en sus tejidos foliares y radiculares células que secretan resinas glicosídicas, las cuales ejercen su acción purgante de utilidad en la medicina tradicional. Muchas de estas especies se encuentran mencionadas en numerosas farmacopeas y forman parte de los remedios comerciales.⁸

2.2 El Género *Ipomoea* y la especie *Ipomoea purga*

El nombre genérico de *Ipomoea* se deriva de las palabras griegas *ιψ* (*ips*) o *ιπος* (*ipos*), que significa “enroscarse” o “enredadera” y *ὅμοιος* (*homoios*) que significa “semejante a”. Así, éste se refiere a la manera de crecimiento de la mayoría de sus especies, las cuales, se presentan como enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 m.⁷ Sin embargo, las especies *I. phillomega* e *I. santillanii* son lianas tropicales que alcanzan alturas de hasta 15 m. En especial, la especie *Ipomoea purga* crece hasta 7 m de largo, se tiende sobre el suelo y se enreda en otras plantas. Otras especies han perdido su capacidad de enroscarse, como son *I. imperata* e *I. pescaprae* que crecen tendidas sobre arenas costeras. Las especies como *I. stans*, *I. duranguensis*, *I. sescossiana* (crecen en zonas áridas hasta 1m) e *I. carnea* (crece hasta 4 m) se presentan como arbustos perennes leñosos y herbáceos, mientras que las especies *I. arborescens* e *I. murucoides* crecen hasta 9 m como árboles de madera suave.

El género *Ipomoea* se encuentra ampliamente distribuido a nivel mundial, en especial en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios. En México, la mayor proporción de especies pertenecientes a este género se encuentra en las regiones subtropicales de la costa del pacífico. Entre los estados de Jalisco y Oaxaca se han encontrado por lo menos 20 especies endémicas, mientras que en las praderas y desiertos del centro y norte de México se han encontrado las especies de la serie *Tyrianthinae*. En el golfo de México, sólo se han encontrado dos especies endémicas, *Ipomoea eximia* e *Ipomoea purga*. La especie *I. purga* se distribuye en las montañas de la Sierra Madre Oriental, en los estados de Hidalgo, Puebla y Oaxaca. Se encuentra en abundancia en la región tropical de Jalapa, en el estado de Veracruz.

El adjetivo latino “purga” significa “purgante” y fue usado para darle el nombre a la especie “*Ipomoea purga*” (Wender) Hayne, la cual se considera como la “raíz de jalapa oficial”, aunque, aparecen diferentes sinonimias para referirse a esta especie como *Exogonium purga* (Wender) Benth., *Convolvulus officinalis* Pelletan, *Convolvulus jalapa* Scheide, *Convolvulus purga* Wender e *Ipomoea jalapa* Nutt. & Cox.⁷

Esta especie también se conoce por sus nombres comunes de purga, jalapa, raíz de jalapa, limoncillo, sombrilla, mechoacán negra, raíz de Michoacán, entre otros. Sus tallos son ramificados y lisos que se enroscan para trepar, son de color verde o púrpura y no presentan vellosidades. Sus hojas son alternas, ovaladas con tamaños de hasta 12.5 cm de largo y 7.7 cm de ancho, ligeramente puntiagudas con su base acorazonada. Los pecíolos se presentan lisos con tamaños de 6 cm de largo. Sus inflorescencias muestran de 1 a 2 flores sobre largos pedúnculos, en las axilas de las hojas. Sus flores presentan un cáliz de 5 sépalos verde-oscuros de 10 mm de largo y 7 mm de ancho; la corola es de color púrpura, en forma de trompeta con el tubo (de hasta 6 cm de largo) muy delgado (ligeramente hinchado hacia su parte media), sin pelillos y con cinco estambres que sobrepasan la corola, con filamentos y el estilo blancos. Los frutos consisten de cápsulas cónicas de hasta 10 mm de largo y hasta 8 mm de ancho, sin pelillos, que al madurar se abre para liberar las semillas. Se encuentran cuatro semillas de color negro, globoso-triangulars y cubiertas de pelillos. Sus raíces son tuberosas de color café que alcanzan 10 cm de diámetro⁹ (**Figura 2**).

La especie *Ipomoea purga* es una planta perenne que crece en bosques tropicales caducifolios, pinares, encinares y mesófilos de montaña a alturas entre 1900 y 2400 m. Empieza a florecer entre julio y noviembre.⁹ Esta especie se considera como la más importante dentro del complejo de raíces purgantes conocido como “jalapas” y no puede distinguirse a simple vista de las otras jalapas mexicanas como *I. orizabensis* e *I. stans*, entre otras.



Figura 2. Morfología de la especie *Ipomoea purga*

2.3 Metabolitos secundarios principales en la familia Convolvulaceae

2.3.1 Alcaloides

Los alcaloides de tipo ergolina constituyen uno de los dos grupos quimiotaxonómicos del género *Ipomoea*. En algunos casos, las actividades biológicas mostradas para este género son atribuidas a la presencia de los alcaloides derivados del ácido lisérgico. Por ejemplo, las flores de *Ipomoea intrapilosa* se emplean como cataplasmas para calmar el dolor,¹⁰ *Ipomoea parasitica* provoca intoxicaciones en rumiantes debido a su ingesta¹¹ y las semillas de *Ipomoea violaceae* (“ololiuqui”) inducen alucinaciones durante los rituales adivinatorios y religiosos entre los pueblos mesoamericanos.¹²

2.3.2 Resinas Glicosídicas

Las resinas glicosídicas constituyen el segundo grupo de metabolitos que caracteriza a este género. Desde el punto de vista estructural, los constituyentes individuales consisten de oligosacáridos unidos a una aglicona formando un macrociclo a través de un enlace éster intramolecular. Los núcleos oligosacáridos se encuentran en la mayoría de los casos sustituidos por ácidos grasos.¹³

La diversidad estructural de estos compuestos surge de las variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas que componen el núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosidación, en la posición de lactonización y en el tipo, número y posición de los ácidos que se encuentran acilando al núcleo. Así, se han podido identificar desde disacáridos hasta heptasacáridos y dímeros tipo éster constituidos por tres hasta cinco azúcares en cada unidad oligomérica. Estos núcleos se componen principalmente de cuatro carbohidratos, tres 6-desoxihexosas como son la D-fucosa, D-quinovosa y L-ramnosa, y la D-glucosa, como la única hexosa presente en esta clase de metabolitos.⁶ La D-xilosa se describió recientemente para las resinas glicosídicas de *Ipomoea pescaprae*.¹⁴

En cuanto a la secuencia de glicosidación, se han encontrado lipooligosacáridos lineales o ramificados y los ácidos que con mayor frecuencia representan a las agliconas de las macrolactonas son los ácidos (11*S*)-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínico) y el (11*S*)-hidroxitetradecanoico (ácido convolvulinico).⁶ Sin embargo, otras agliconas han sido identificadas como son el ácido 3,11-dihidroxitetradecanoico (ácido ipurólico) y el ácido (11*S*)-hidroxi-4-oxotetradecanoico, las cuales han sido encontradas en las resinas glicosídicas de las semillas de *Pharbitis nil* y en las hojas de *Ipomoea squamosa*, respectivamente. Los ácidos 12-hidroxipentadecanoico, 12-hidroxihexadecanoico y 12-hidroxihexadecanoico fueron identificados en las resinas glicosídicas de las partes aéreas de *Ipomoea turpethum*.¹⁵ Los ácidos que con mayor frecuencia se encuentran acilando los núcleos oligosacáridos son derivados de cadena corta que incluyen a los ácidos acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2*S*)-2-metilbutírico (mba), 3-metilbutírico (3-mba), (-)-(2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nílico, nla), y 2-metil-2-butenico (tiglico, tga). También, se han encontrado ésteres derivados de ácidos arilalquílicos como el (2*E*)-3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico, CA) y ésteres derivados de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena tales como el *n*-hexanoico (hexa) o caproico, *n*-octanoico (octa) o caprílico, *n*-decanoico (deca) o cáprico, *n*-dodecanoico (dodeca) o láurico, *n*-hexadecanoico (hexadeca) o palmítico, *n*-octadecanoico (octadeca) o esteárico, y *n*-eicosanoico (eicosa) o ácidos araquidónicos.⁶

Cabe mencionar que los constituyentes individuales que componen las resinas glicosídicas de una misma especie comparten, en la mayoría de los casos, un mismo núcleo oligosacárido. Por lo tanto, a través de métodos de degradación (hidrólisis alcalina), los núcleos oligosacáridos de las resinas glicosídicas pueden ser identificados permitiendo la obtención de los ácidos glicosídicos que son distintivos de las especies que los biosintetizan. Una revisión completa sobre la diversidad estructural de las resinas glicosídicas fue recientemente publicada como parte de los resultados generados por esta tesis.⁶ Por esta razón, en esta sección sólo se revisará la diversidad estructural de las resinas glicosídicas compuestas por pentasacáridos y hexasacáridos, incluyendo a sus estructuras diméricas.

2.3.2.1 Lipopentasacáridos del Ácido Arboresínico

Las arboresinas **I-VI** fueron aisladas del extracto clorofórmico de las raíces de *Ipomoea arborescens*. El núcleo oligosacárido (ácido arboresínico) se compone de dos unidades de D-glucosa y tres de L-ramnosa. Para todas las arboresinas el enlace de la macrolactona se identificó en el C₂ de la segunda unidad de azúcar. En todas las arboresinas, el grupo *n*-dodecanoil y un residuo niloil fueron identificados en el C₂ de la tercera unidad monosacárida y en el C₃ de la cuarta unidad. La presencia de congéneres en estas especies se debe a los diferentes tipos de sustituyentes que se encuentran esterificando la posición C₄ de la cuarta unidad de azúcar e.g., ácidos acético (ac), propiónico (pa), butanoico (ba), (2*S*)-metilbutanoico o tíglico (tga) (**Figura 3**).¹⁶

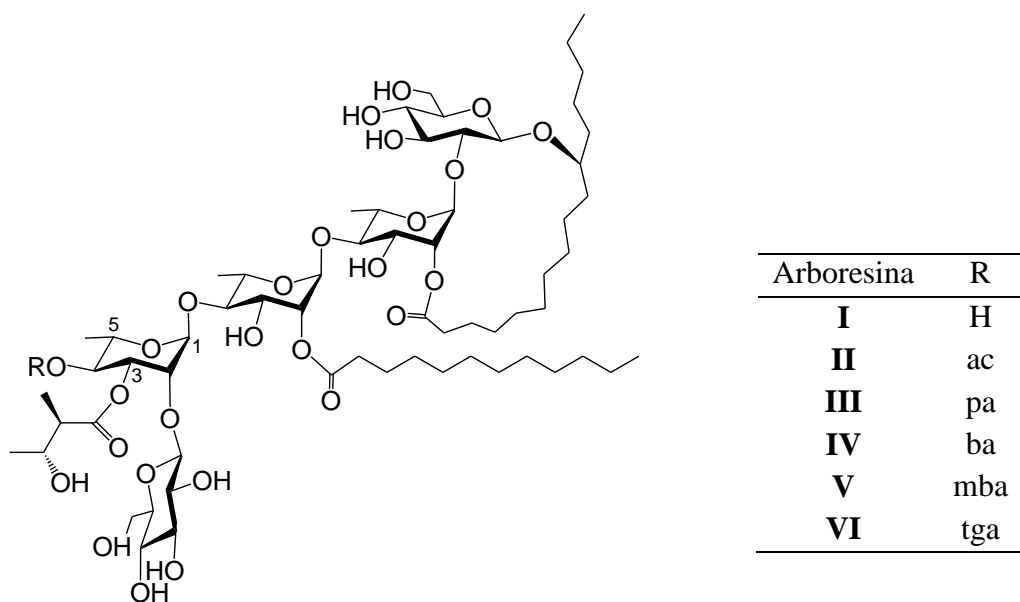


Figura 3. Estructura de las arboresinas I-VI

2.3.2.2 Lipopentasacáridos del Ácido Calisólico A

Recientemente, se describió el aislamiento de las calisolinas **II** y **III** del extracto metanólico de las hojas, tallos y raíces de *Calystegia soldanella*. Estos lipopentasacáridos forman parte de la mezcla de resinas glicosídicas que contienen una unidad de D-

quinovosa, tres unidades de D-glucosa y una unidad de L-ramnosa. En ambas calisolininas el sitio de la macrolactona (ácido 11*S*-hidroxihexadecanoico) se identificó en la posición C₂ de la glucosa terminal. La diferencia entre la calisolina **II** y **III** se encuentra en las posiciones C₂ y C₃ de la unidad de L-ramnosa, donde la calisolina **II** contiene un residuo niloilo en el C₂ en lugar de estar en la posición C₃ como se presenta en la calisolina **III** (**Figura 4**).¹⁷

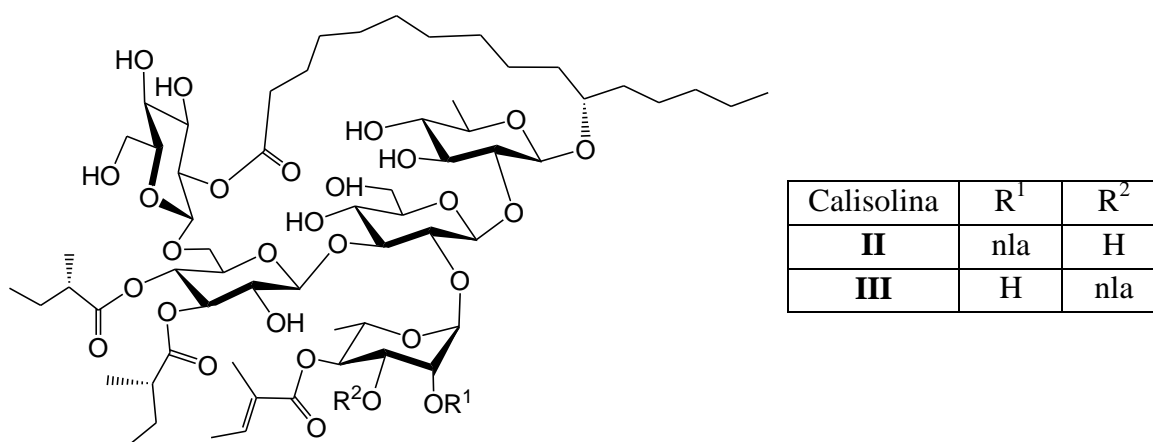


Figura 4. Estructura de las calisolininas II-III

2.3.2.3 Lipopentasacáridos del Merremósido J

Los merremósidos **f**, **g**, **h₁** y **h₂** fueron obtenidos del extracto metanólico de la droga cruda de *Ipomoea mammosa* (*Merremia mammosa*). Estos glicolípidos del ácido jalapínico se componen de una D-glucosa y cuatro L-ramnosas formando un núcleo oligosacárido ramificado unido a la macrolactona en el C₃ de la segunda unidad monosacárida para los merremósidos **f** y **g** y en el C₂ del mismo azúcar para los merremósidos **h₁** y **h₂**. La diversidad estructural para la serie de los merremósidos surge de las diferencias observadas en los patrones de acilación por los ácidos isobutírico y 2*S*-metilbutírico en las posiciones C₂ de la tercera unidad monosacárida y C₄ de la ramnosa terminal (**Figura 5**).¹⁸

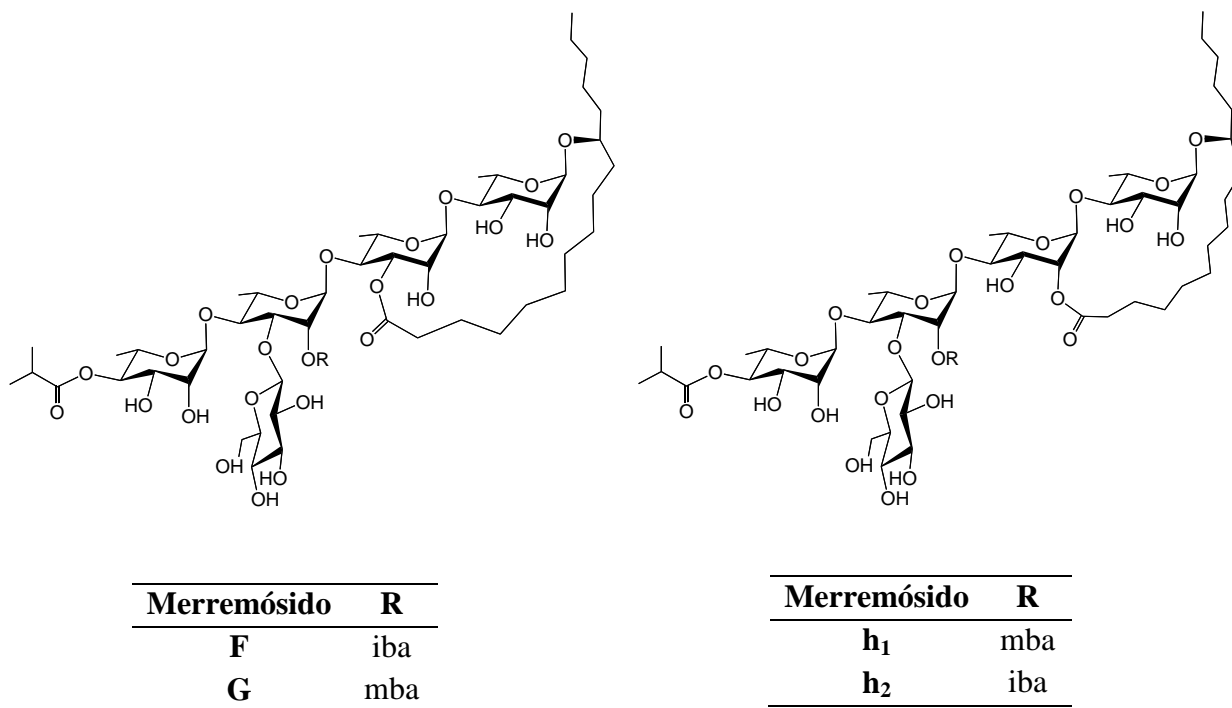


Figura 5. Estructura de los merremósidos F, G, h₁ y h₂

2.3.2.4 Lipopentasacáridos del Ácido Multifidínico A

Las multifidinas **I** y **II** son las resinas glicosídicas solubles en éter obtenidas de las semillas de *Ipomoea multifida* (*Quamoclit multifida*). Esta planta es un híbrido ornamental entre las plantas *Quamoclit coccinea* y *Quamoclit pinnata*. Sus glicolípidos se caracterizan por contener una unidad de D-glucosa, una de D-quinovosa y tres unidades de L-ramnosa. El sitio de lactonización de la aglicona fue identificado en el C₂ de la segunda unidad monosacárida. También, se identificó al éster (2S)-metilbutiril en el C₄ en la cuarta unidad de azúcar. Las multifidinas **I** y **II** difieren en la longitud del sustituyente que se encuentra enlazado en el C₂ de la tercera unidad monosacárida, el éster *n*-decanoilo en la multifidina **I** y el éster *n*-dodecanoilo en la multifidina **II** (Figura 6).¹⁹

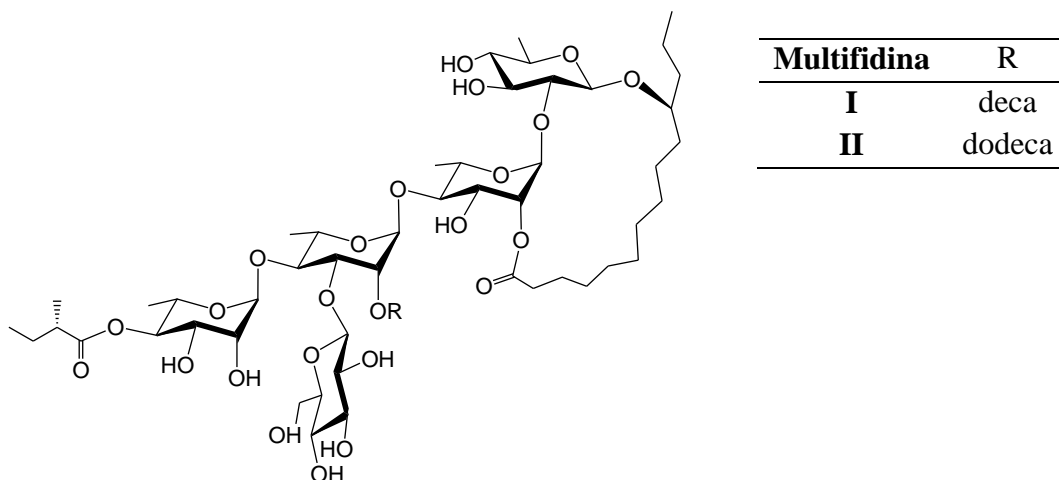
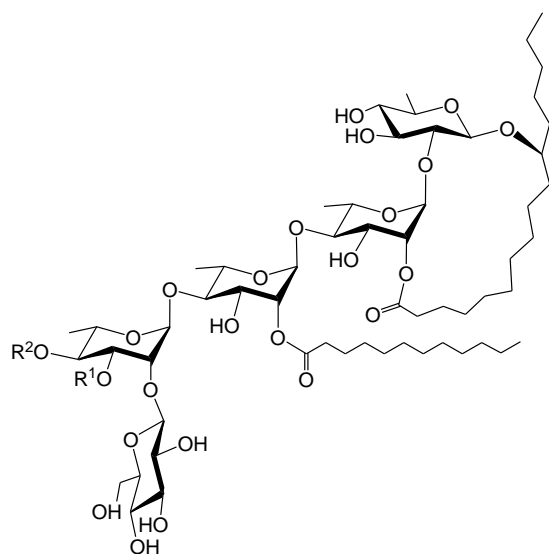


Figura 6. Estructura de las multifidinas I-II

2.3.2.5 Lipopentasacáridos del Ácido Murucínico

Nueve resinas glicosídicas intactas denominadas murucinas **I-IX** fueron aisladas del extracto clorofórmico de las raíces de la planta identificada incorrectamente como *Ipomoea murucoides*. En realidad, el material vegetal analizado corresponde *I. arborescens*, debido a que las resinas glicosídicas aisladas de esta especie fueron totalmente diferentes de las aisladas en *Ipomoea murucoides*. El núcleo oligosacárido en toda la serie de murucinas se caracteriza por: a) contener una unidad de D-glucosa, una unidad de D-quinovosa y tres unidades de L-ramnosa; b) el sitio de unión de la lactona se identificó en el C₂ de la segunda unidad monosacárida (ram); c) el C₂ de la tercera unidad monosacárida se encuentra acilado por un residuo *n*-dodecanoilo. Variaciones en el tipo de sustituyentes éster enlazados en los C₃ y C₄ de la cuarta unidad monosacárida se describieron en esta serie. Un residuo niloil enlazado en la posición C₃ se encontró en las murucinas **VI, VII y VIII (Figura 7)**.²⁰



Murucina	R ¹	R ²
I	H	ac
II	H	pa
III	H	ba
IV	H	mba
V	H	nla
VI	nla	ac
VII	nla	ba
VIII	nla	tga
IX	H	H

Figura 7. Estructura de las murucinas I-IX

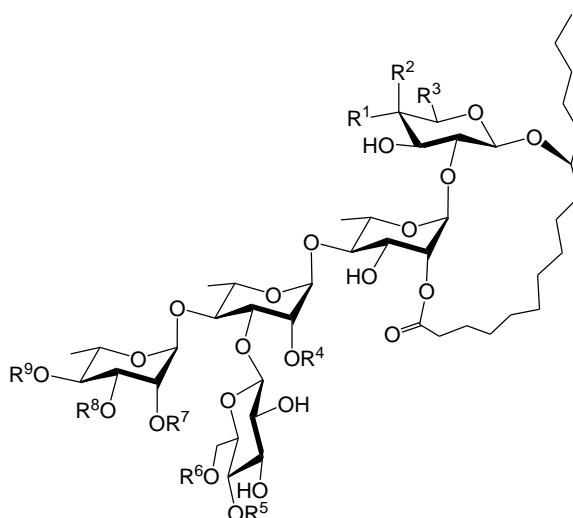
2.3.2.6 Lipopentasacáridos de los Ácidos Operculínicos A y B

Hasta el momento, se han aislado 38 resinas glicosídicas intactas derivadas del ácido operculínico A a partir de diferentes especies del género *Ipomoea* y en una especie del género *Merremia*. El batatinósido **VI** y los batatósidos **H** e **I** se aislaron de *I. batatas*,^{21,22} la digitatajalapina de *I. digitata*²³, las intrapilosinas **I-VII** de *I. intrapilosa*,²⁴ las leptofilinas **A** y **B** de *I. leptophylla*,²⁵ los mamósidos **H₁** y **H₂** de *I. mamosa* (*Merremia mammosa*),²⁶ las murucoidinas **IV**, **V** y **XI** de *I. murucoides*,^{12,27} las operculinas **I**, **II**, **V**, **VII** y **VIII** de *I. operculata*,^{28,29} las estoloniferinas **IV-VII** de *I. estolonifera*,³⁰ la quamoclina **IV** de *I. quamoclit* (*Quamoclit pennata*),³¹ y las tuguajalapinas **I-X** de *M. hungaiensis*.³² Estos glicolipidos derivados del ácido operculínico A, están compuestos de una unidad de D-fucosa, una unidad de D-glucosa y tres unidades de L-ramnosa. Se identificó el sitio de lactonización de la aglicona en el C₂ de la segunda unidad monosacárida (ram), excepto en la operculina **V** y en las murucoidinas **V** y **XI**, en los cuales, la aglicona se encuentra enlazada al C₃ de la misma unidad de azúcar (ram).¹² Resinas glicosídicas derivadas del ácido operculínico B, han sido aisladas de *Ipomoea operculata* y denominadas como operculinas **III**, **IV**, **IX**, **X**, **XVI**, **XVII** y **XVIII**. La

diferencia de estos lipooligosacáridos es la presencia de una unidad de D-glucosa en lugar de una D-fucosa presente en los glicolípidos derivados del ácido operculínico A. De la misma manera, la posición de lactonización se identificó en el C₂ de la primera unidad de ramnosa.

La diversidad química de los pentasacáridos del ácido operculínico A y B radica en los diferentes tipos de grupos sustituyentes que se encuentran acilando la posición C₂ de la tercera unidad monosacárida (ram') y las posiciones C₂, C₃ y C₄ de la cuarta unidad (ram'')

(Figura 8).



Lipopentasacárido	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸	R ⁹
Batatinósido VI	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	H	H
Batatósido H	H	OH	CH ₃	mba	H	H	H	CA	dodeca
Batatósido I	H	OH	CH ₃	mba	H	H	CA	H	dodeca
Intrapilosina I	H	OH	CH ₃	mba	H	H	H	CA	mba
Intrapilosina II	H	OH	CH ₃	mba	H	H	H	CA	octa
Intrapilosina III	H	OH	CH ₃	octa	H	H	H	CA	octa
Intrapilosina IV	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	CA	(-)-(2R)-mba
Intrapilosina V	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	CA	mba
Intrapilosina VI	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	mba	CA
Intrapilosina VII	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	CA	octa
Leptofilina A	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	CA	H	propa
Leptofilina B	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	H	propa
Operculina I	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	H	dodeca
Operculina II	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	H	dodeca
Operculina III	OH	H	CH ₂ OH	dodeca	H	H	H	H	dodeca
Operculina IV	OH	H	CH ₂ OH	dodeca	H	H	H	H	dodeca
Operculina VII	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H	H	dodeca

2.3.2.7 Pescaprósidos A, B y lipopentasacáridos del pescaprósido C

Los pescaprósidos A y B se obtuvieron del extracto soluble en hexano de las partes aéreas de *Ipomoea pescaprae*, coloquialmente conocida como “riñonina”. El pescaprósido A presenta una unidad de D-fucosa y cuatro unidades de L-ramnosa, mientras que el pescaprósido B presenta un residuo (2*S*)-metilbutírico en la posición C₄ de la ramnosa terminal.^{33,34} La aglicona en estos dos glicolípidos no se encuentra formando un éster macrocíclico y, en su forma abierta, se caracterizó como un éster metílico.

La pescapreína XVIII, se aisló de las fracciones lipofílicas de *Ipomoea pescaprae*. El núcleo oligosacárido de este glicolípido se identificó como el pescaprósido C, que contiene una unidad de D-xilosa y cuatro unidades de L-ramnosa. El sitio de lactonización de la aglicona se identificó en la posición C₃ de la segunda unidad monosacárida (ram). Los grupos *n*-dodecanoil y el (2*S*)-metilbutanoil se encuentran acilando el núcleo en la posición C₂ de la tercera unidad monosacárida (ram') y en el C₄ de la ramnosa terminal (**Figura 9**).¹⁴

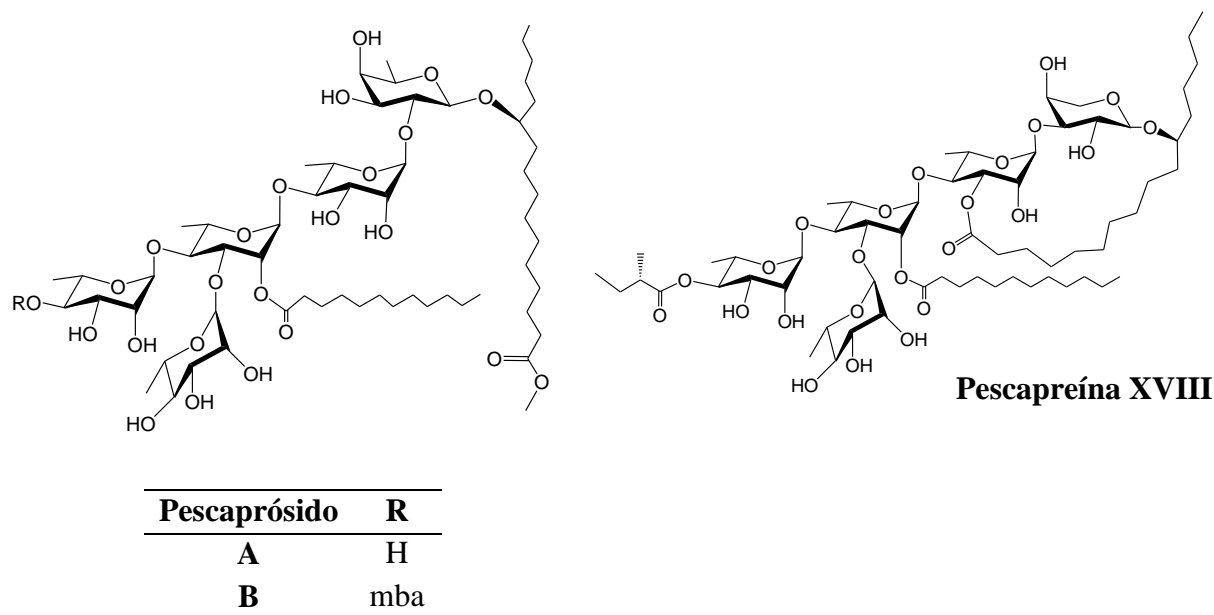
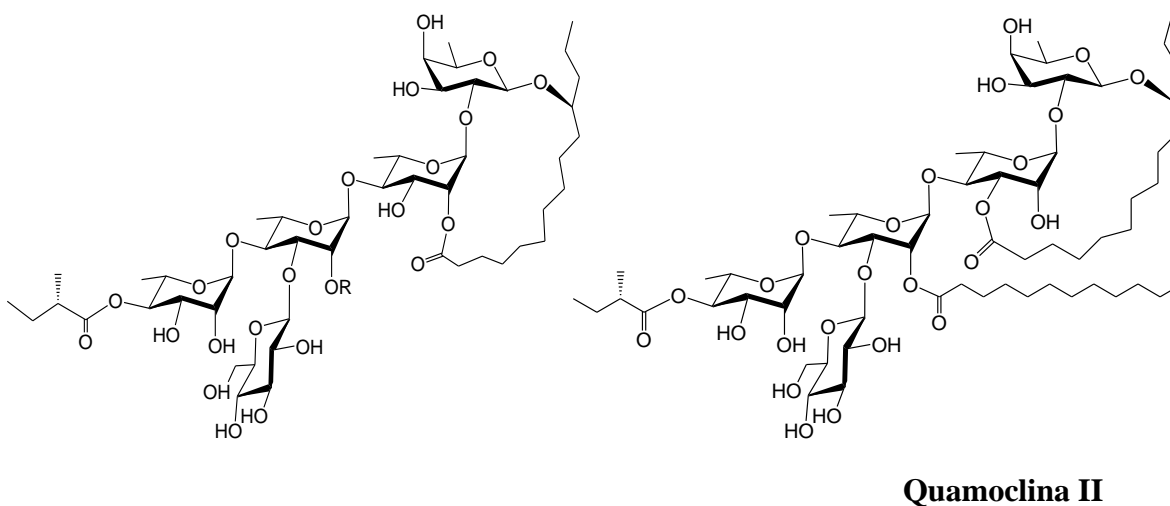


Figura 9. Estructura de los pescaprósidos A y B y la pescapreína XVIII

2.3.2.8 Lipopentasacáridos del Ácido Quamoclínico A

Tres resinas glicosídicas denominadas quamoclinas **I-III** se obtuvieron del extracto metanólico de las semillas de *Ipomoea quamoclit* (*Quamoclit pennata*). Estos lipooligosacáridos presentan el mismo tipo de monosacáridos y la misma secuencia de glicosidación del ácido operculínico A. Sin embargo, la aglicona presente en el ácido quamoclínico A se compone de 14 átomos de carbono (11*S*-tetradecanoico) diferente de la aglicona presente en el ácido operculínico A, el 11*S*-hexadecanoico. Para las quamoclinas **I** y **III**, el enlace de la lactona de la aglicona se presenta en el C₂ de la segunda unidad monosacárida (ram), mientras que en la quamoclina **II** se presentó en el C₃ de la misma unidad de ramnosa. En todas las quamoclinas, el grupo 2*S*-metilbutanoilo se localizó en el C₄ de la ramnosa terminal (**Figura 10**).³⁵



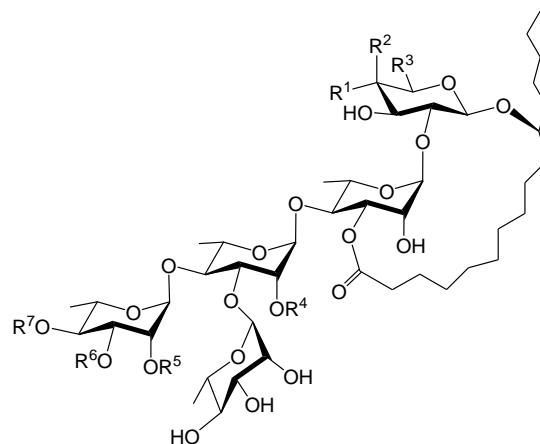
Quamoclina	R
I	dodeca
III	deca

Figura 10. Estructura de las quamoclinas I-III

2.3.2.9 Lipopentasacáridos de los Ácidos Simónicos A y B

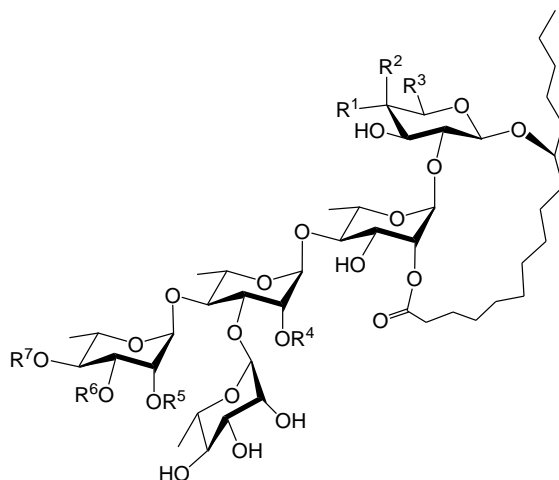
Seis resinas glicosídicas intactas han sido aisladas del género *Ipomoea* conteniendo el ácido simónico A, entre ellas, la simonina **II** y los batatósidos **M** y **N** se aislaron de *Ipomoea batatas*,^{21,36} y las murucoidinas **VI-VIII** de *Ipomoea murucoides*.²⁷ Estos glicolípidos se caracterizan por contener una unidad de D-glucosa como el primer monosacárido de la cadena oligosacárida y cuatro unidades de L-ramnosa. El enlace de la lactona del ácido jalapινόlico se identificó en el C₃ de la segunda unidad monosacárida (ram) para la simonina **II** y la murucoidina **VI**, mientras que en los batatósidos **M** y **N** y las murucoidinas **VII** y **VIII**, se identificó el enlace de la macrolactona en la posición C₂ de la primera ramnosa.

Con respecto a la identificación de resinas glicosídicas conteniendo el ácido simónico B como su núcleo oligosacárido, se aislaron las simoninas **III-V**, los batatinósidos **I, IV** y **V**, y los batatósidos **A-G** y **O-P** de *I. batatas*,^{21,22,37,38} las murucoidinas **I-III, IX** y **X** de *I. murucoides*,^{12,27} las pescapreinas **I-IV, VII-IX** y **X-XVII** de *I. pescaprae*,^{33,34,39} y las estoloniferinas **I-III** de *I. estolonifera*.³⁰ A diferencia del ácido simónico A, la primera unidad monosacárida presente en estas resinas glicosídicas es la D-fucosa en lugar de la D-glucosa. En la mayoría de estos compuestos, se identificó el sitio de lactonización en C₃ de la segunda unidad monosacárida (ram), excepto en el batatinósido **V**, batatósidos **D-G** y **M-P** y las murucoidinas **I-III** y **VII-VIII**, en los cuales, la macrolactona se localizó en C₂ de la unidad de ramnosa (ram). La presencia de congéneres en estas series se debe a las variaciones encontradas en los grupos acilantes que se encuentran en el C₂ de la segunda unidad de ramnosa y en las posiciones C₂, C₃ y C₄ de una de las ramnosas terminales (**Figura 11**).



Lipopentasacárido	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷
Simonina II	OH	H	CH ₂ OH	mba	H	H	dodeca
Simonina III	H	OH	CH ₃	mba	H	H	dodeca
Simonina IV	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	dodeca
Simonina V	H	OH	CH ₃	octa	H	H	dodeca
Batatinósido I	H	OH	CH ₃	mba	H	CA	dodeca
Batatinósido IV	H	OH	CH ₃	mba	H	H	dodeca
Batatósido A	H	OH	CH ₃	mba	CA	iba	H
Batatósido B	H	OH	CH ₃	ba	H	CA	iba
Batatósido C	H	OH	CH ₃	mba	CA	dodeca	H
Murucoïdina VI	OH	H	CH ₂ OH	dodeca	H	H	mba
Murucoïdina IX	H	OH	CH ₃	mba	H	H	iba
Murucoïdina X	H	OH	CH ₃	(8 <i>R</i>)-hidroxi-dodeca	H	H	mba
Pescapreina I	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	H
Pescapreina II	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	iba
Pescapreina III	H	OH	CH ₃	dodeca	H	H	mba
Pescapreina IV	H	OH	CH ₃	deca	H	H	hexa
Pescapreina VII	H	OH	CH ₃	deca	H	H	H
Pescapreina VIII	H	OH	CH ₃	iba	H	H	dodeca
Pescapreina IX	H	OH	CH ₃	deca	H	H	hexa
Pescapreina X	H	OH	CH ₃	deca	H	CA	mba
Pescapreina XI	H	OH	CH ₃	deca	CA	H	mba
Pescapreina XII	H	OH	CH ₃	deca	H	CA	iba
Pescapreina XIII	H	OH	CH ₃	deca	CA	H	iba
Pescapreina XIV	H	OH	CH ₃	dodeca	H	CA	iba
Pescapreina XV	H	OH	CH ₃	dodeca	CA	H	iba
Pescapreina XVI	H	OH	CH ₃	dodeca	H	CA	mba
Pescapreina XVII	H	OH	CH ₃	dodeca	CA	H	mba

Pescapreina XVIII	H	OH	CH ₃	mba	H	H	mba
Pescapreina XIX	H	OH	CH ₃	deca	H	H	iba
Pescapreina XX	H	OH	CH ₃	deca	H	H	mba



Lipopentasacárido	R¹	R²	R³	R⁴	R⁵	R⁶	R⁷
Batatinósido V	H	OH	CH ₃	deca	H	H	H
Batatósido D	H	OH	CH ₃	mba	H	CA	dodeca
Batatósido E	H	OH	CH ₃	mba	CA	H	dodeca
Batatósido F	H	OH	CH ₃	mba	CA	dodeca	H
Batatósido G	H	OH	CH ₃	dodeca	H	CA	ba
Batatósido M	OH	H	CH ₂ OH	dodeca	CA	H	mba
Batatósido N	OH	H	CH ₂ OH	mba	H	CA	iba
Batatósido O	H	OH	CH ₃	iba	CA	H	dodeca
Batatósido P	H	OH	CH ₃	deca	CA	H	iba
Murucoïdina I	H	OH	CH ₃	mba	H	H	H
Murucoïdina II	H	OH	CH ₃	mba	H	H	iba
Murucoïdina III	H	OH	CH ₃	mba	H	H	mba
Murucoïdina VII	OH	H	CH ₂ OH	mba	H	H	iba
Murucoïdina VIII	OH	H	CH ₂ OH	mba	H	H	mba

Figura 11. Resinas glicosídicas derivadas de los ácidos simónicos A y B

2.3.2.10 Lipopentasacáridos del Ácido Soldanelico A

La soldanelina **A** se aisló del extracto soluble en cloroformo de las raíces liofilizadas de *Calystegia soldanella*. Este pentasacárido ramificado se compone de una unidad de D-quinovosa, tres unidades de D-glucosa y una unidad de L-ramnosa. Su núcleo oligosacárido, se encuentra unido al ácido 11*S*-hexadecanoico como su aglicona, donde el sitio de lactonización de la aglicona se encuentra en el C₂ de la segunda unidad de glucosa. Tres sitios de acilación se identificaron en las posiciones C₂ y C₄ de la tercera unidad monosacárida (ram) por los ácidos nílico y tíglico, respectivamente. También, fue identificado el ácido 2*S*-metilbutírico, que se encuentra enlazado a la posición C₃ de la segunda unidad de glucosa (**Figura 12**).⁴⁰

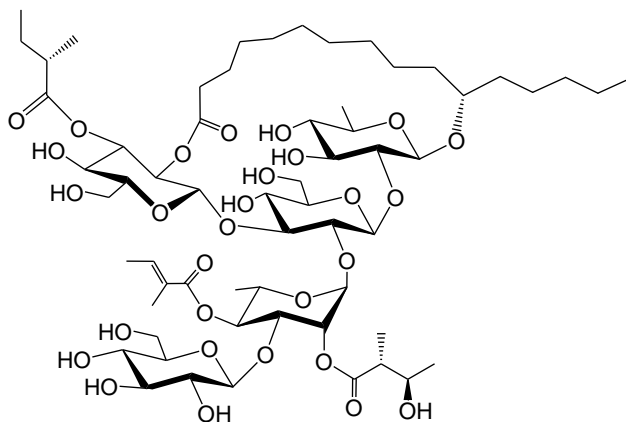


Figura 12. Estructura de la soldanelina A

2.3.2.11 Lipopentasacáridos del Ácido Woodrosínico A

Las woodrosinas **I** y **II** fueron aisladas del extracto insoluble en éter de los tallos de *Ipomoea tuberosa* (*Merremia tuberosa*). Estos heteropentasacáridos se caracterizan por contener una secuencia de glicosidación ramificada compuesta por 4 unidades de D-glucosa y una de L-ramnosa. El ácido 11*S*-hexadecanoico (ácido jalapinólico) se identificó como la aglicona, cuyo sitio de lactonización se encontró en la posición C₂ de la cuarta unidad de D-

glucosa. En la woodrosina I, se identificó al ácido 2*S*-metilbutanoico en la posición C₃ de la tercera unidad de glucosa, en lugar del ácido 2-metilpropanoico enlazado a la misma posición en la woodrosina II. En ambos lipopentacáridos se identificó al ácido 2*S*-metilbutanoico en las posiciones C₂ y C₄ de la ramnosa terminal y en el C₄ de la tercera unidad de glucosa (**Figura 13**).⁴¹

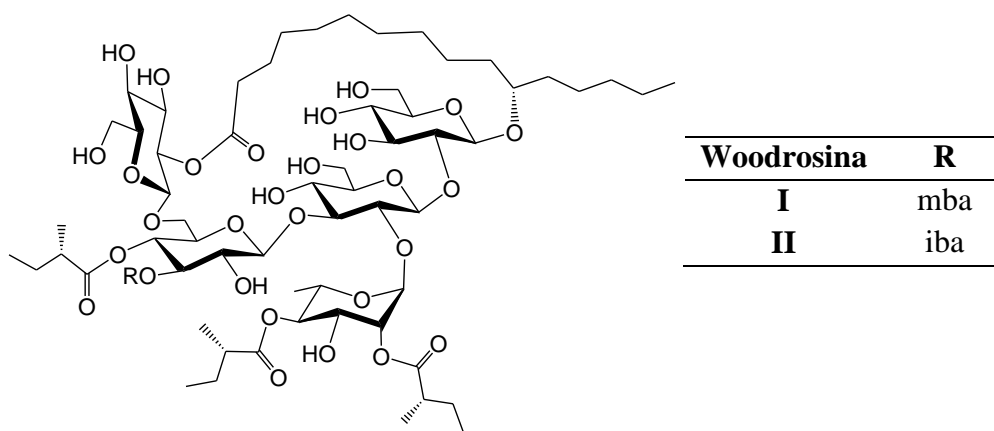


Figura 13. Estructura de las woodrosinas I-II

2.3.2.12 Lipohexasacáridos

Hasta el momento, sólo ha sido posible el aislamiento de un lipooligosacárido intacto formado por seis unidades monosacáridas, la calisolina **IV** que se obtuvo del extracto metanólico de las hojas, tallos y raíces de *Calystegia soldanella*. El núcleo oligosacárido (ácido calisólico D) se encuentra constituido por una unidad de D-quinovosa, cuatro unidades de D-glucosa y una unidad de L-ramnosa. El sitio de enlace de la macrolactona se identificó en la posición C₂ de una de las glucosas terminales. En este compuesto se identificaron los sustituyentes 2*S*-metilbutanoilo en la posición C₂ de la unidad de ramnosa y el tigloilo en la posición C₃ de la tercera unidad de glucosa (Glu''') (**Figura 14**).¹⁷

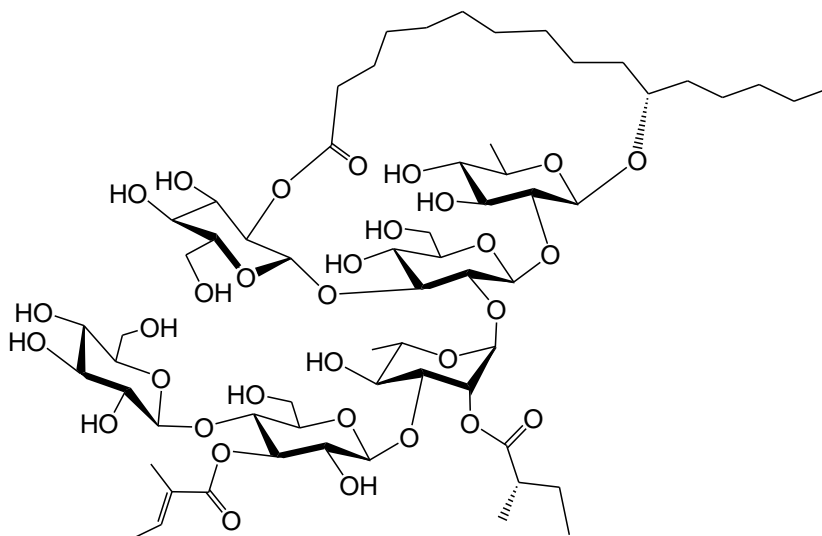


Figura 14. Estructura de la calisolina IV

Varios lipohexasacáridos como ácidos glicosídicos han sido aislados de diferentes especies de *Ipomoea*. Así, el ácido lonchofílico fue obtenido de la hidrólisis alcalina del extracto soluble en metanol de *Ipomoea lonchophylla*. Este heterohexasacárido está formado por dos unidades de D-glucosa, una de D-fucosa, dos unidades de D-quinovosa y una unidad de L-ramnosa. El ácido 3,11-dihidroxitetradecanoico (ácido ipurólico) fue identificado como la aglicona enlazada a este núcleo oligosacárido (**Figura 15**).⁴²

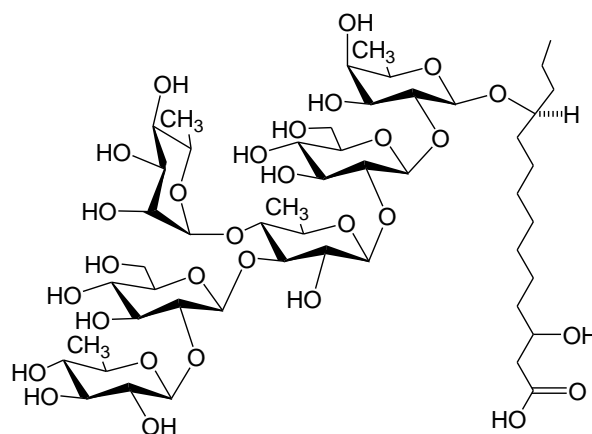


Figura 15. Estructura del ácido lonchofílico

Los ácidos operculínico⁴³ y operculínico H⁴⁴ fueron obtenidos de la saponificación de la fracción insoluble en éter del extracto metanólico de *Ipomoea operculata*. Estos ácidos se caracterizan por contener cuatro unidades de D-glucosa, dos unidades de L-ramnosa y el ácido 3,12-dihidroxihexadecanoico como la aglicona que une a estos glucorannohexasacáridos. La diferencia entre el ácido operculínico y el ácido operculínico H se encuentra en las uniones de glicosidación de los monosacáridos en cada núcleo oligosacárido (**Figura 16**).

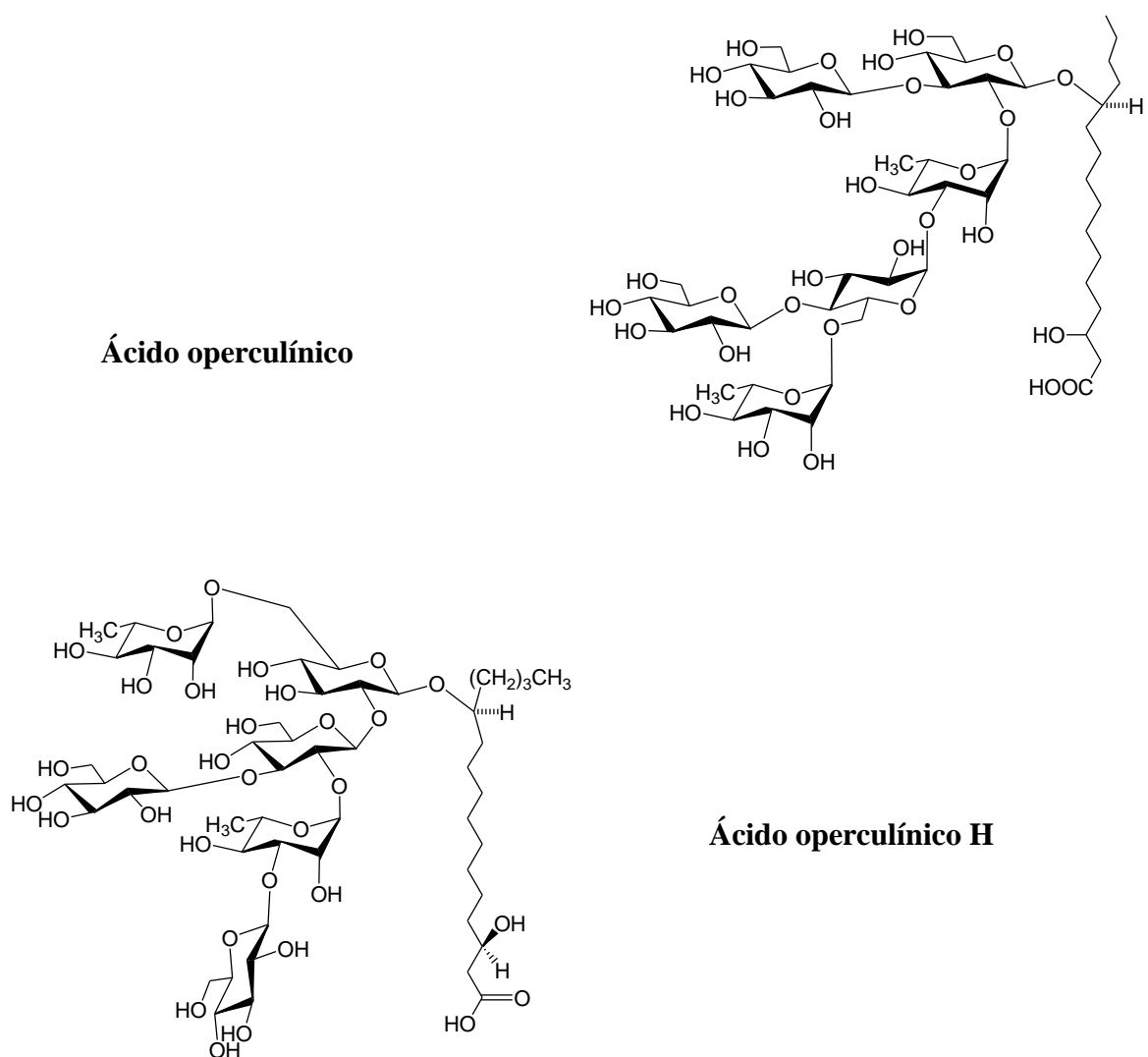


Figura 16. Estructura del ácido operculínico y operculínico H

Los ácidos farbíticos B y D se obtuvieron del producto de la hidrólisis alcalina de las resinas glicosídicas insolubles en éter de las semillas de *Ipomoea nil* (*Pharbitis nil*). Estos ácidos glicosídicos contienen dos unidades de D-glucosa, tres unidades de L-ramnosa y una unidad de D-quinovosa. La única diferencia entre estos dos ácidos radica en el tipo de aglicona que se encuentra unida al núcleo, así, el ácido 3,11-dihidroxihexadecanoico se encontró en el ácido farbítico B y el ácido 3,11-dihidroxitetradecanoico (ácido ipurólico) para el ácido farbítico D^{45,46} (**Figura 17**).

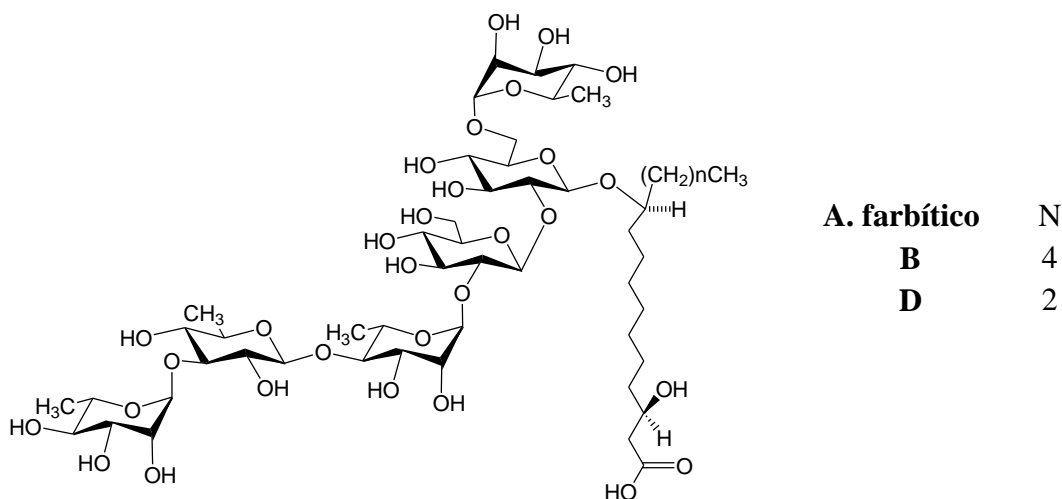


Figura 17. Estructura de los Acidos farbíticos A y B

Del extracto metanólico de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) fueron aislados los ácidos púrgicos A y B. Estos dos heterohexasacáridos no lineales se componen de dos unidades de D-glucosa, dos de D-quinovosa, una de D-fucosa y una de L-ramnosa. Estos dos ácidos se diferencian en el tipo de aglicona que se encuentra unida a los núcleos oligosacáridos, identificándose el ácido tetradecanoico en el ácido púrgico A y el ácido hexadecanoico en el ácido púrgico B (**Figura 18**).⁴⁷

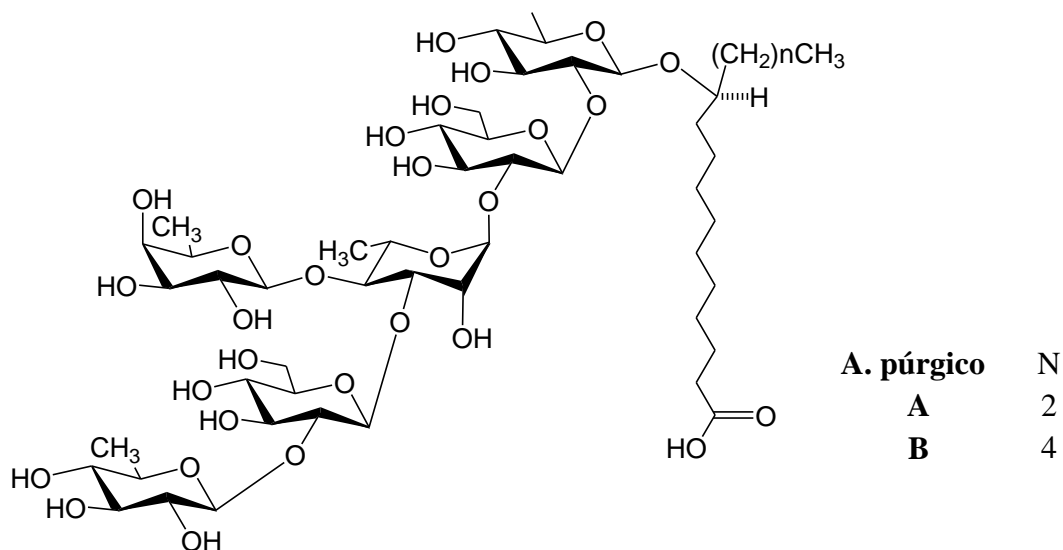
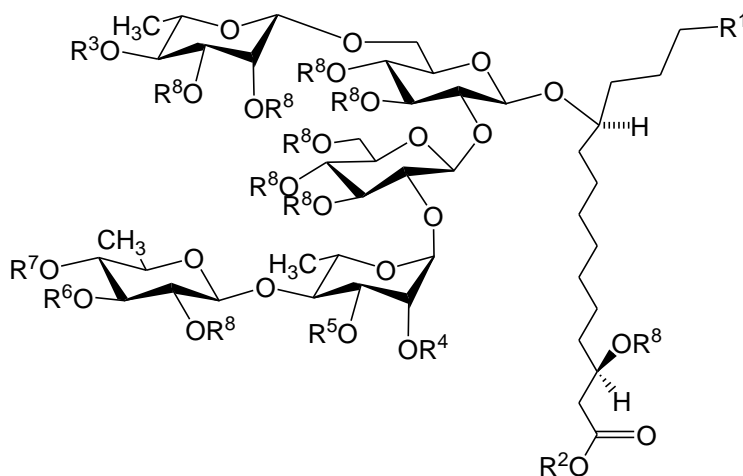


Figura 18. Estructura de los Ácidos púrgicos A y B

Recientemente, se describió el aislamiento de glicósidos acilados constituidos por seis unidades de azúcar a partir de las resinas glicosídicas insolubles en éter de las semillas de *Pharbitis nil* (*Pharbitis semen*). Los compuestos fueron aislados mediante un tratamiento de la fracción rica en resinas glicosídicas con cloruro de indio (III), para la obtención de los ácidos glicosídicos metilados y acilados por los ácidos nílico y 2*S*-metilbutanóico. El ácido 3,11-dihidroxitetradecanoico fue la aglicona que se encontró en la mayoría de estos compuestos y, de esta forma, la diversidad estructural de estos glicolípidos resulta de las variaciones en el tipo y la posición de los sustituyentes acilo en el núcleo oligosacárido (**Figura 19**).⁴⁸



	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	R ⁵	R ⁶	R ⁷	R ⁸
PM-1	H	CH ₃	H	mba	H	Ram''	nla-nla'	H
PM-2	H	CH ₃	H	H	mba	Ram''	nla-nla'	H
PM-3	C ₂ H ₅	CH ₃	H	H	mba	Ram''	nla-nla'	H
PM-4	H	CH ₃	nla''	mba	H	Ram''	nla-nla'	H
PM-5	H	CH ₃	nla''	H	mba	Ram''	nla-nla'	H
PM-6	H	CH ₃	nla-nla'	mba	H	H	H	H
PM-7	H	CH ₃	nla-nla'	H	mba	H	H	H

Figura 19. Estructura de los hexasacáridos PM-1–PM-7

2.3.2.13 Dímeros tipo-éster

La merremina fue el primer ejemplo de esta clase de glicolípidos y se aisló del extracto metanólico de las raíces de *Merremia hungaiensis*. Este dímero consiste de dos unidades de ácido operculínico A correspondientes a la unidad oligosacárida macrocíclica (unidad A) y al residuo glicosídico esterificante (unidad B). En la unidad A se identificó al enlace de la macrolactona en la posición C₂ de la primera unidad de L-ramnosa y, en la unidad B se identificó a la aglicona que enlaza las dos unidades monoméricas en la posición C₆ de la glucosa terminal. En ambas unidades, se identificó al ácido *n*-

hexadecanoico en la posición C₄ de la ramnosa terminal y, al ácido *n*-dodecanoico en la posición C₂ de la segunda unidad de ramnosa (**Figura 20**).⁴⁹

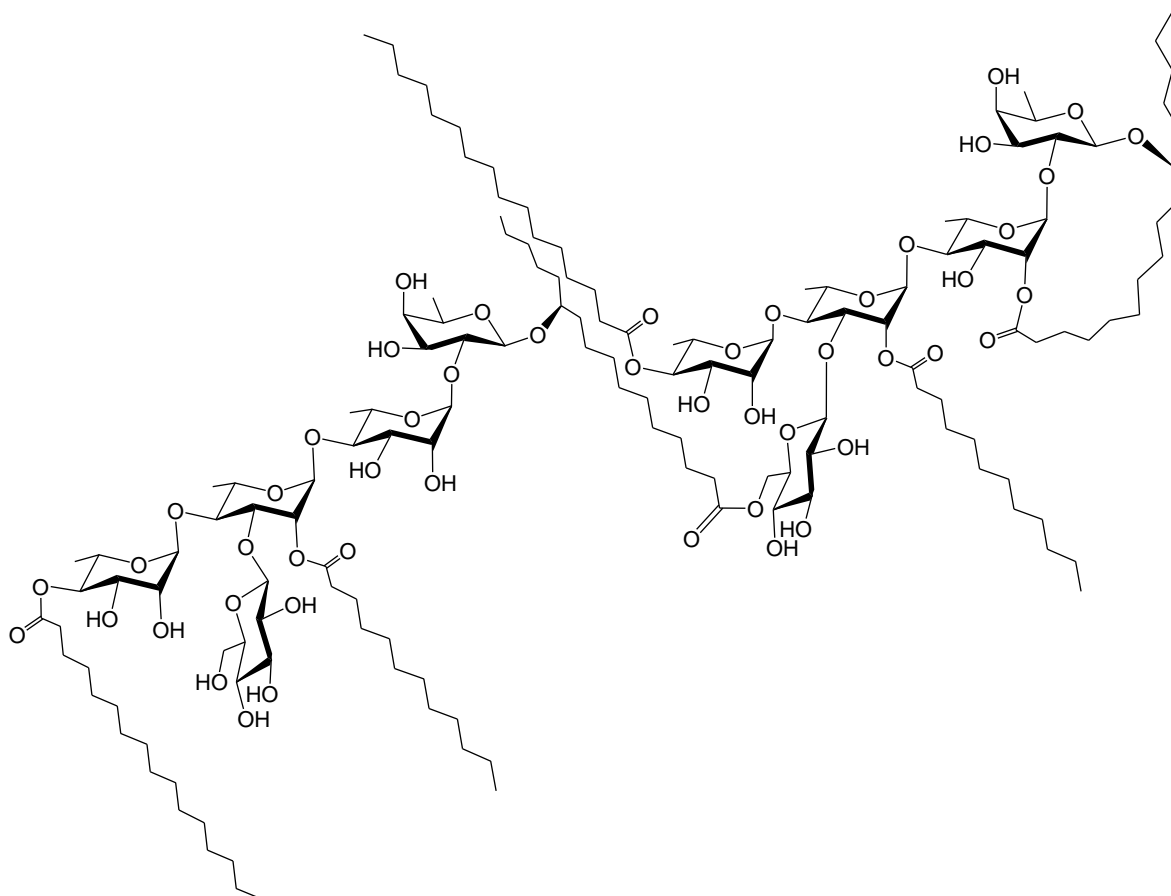
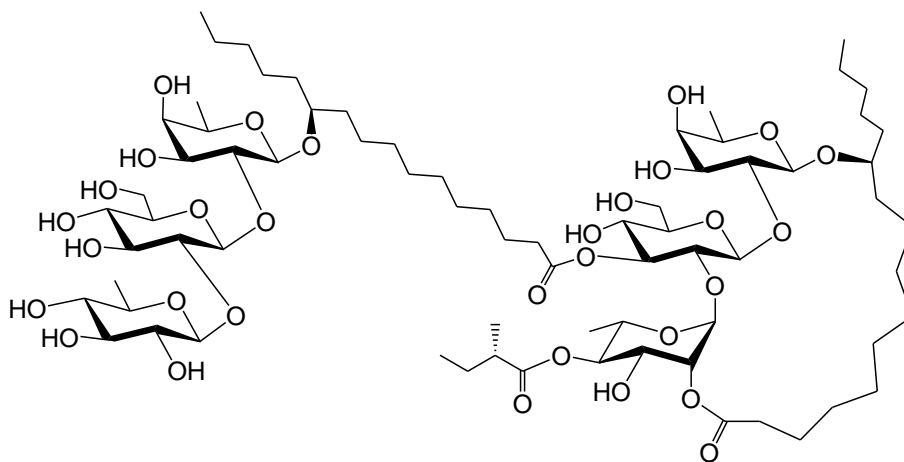


Figura 20. Estructura de la Merremina

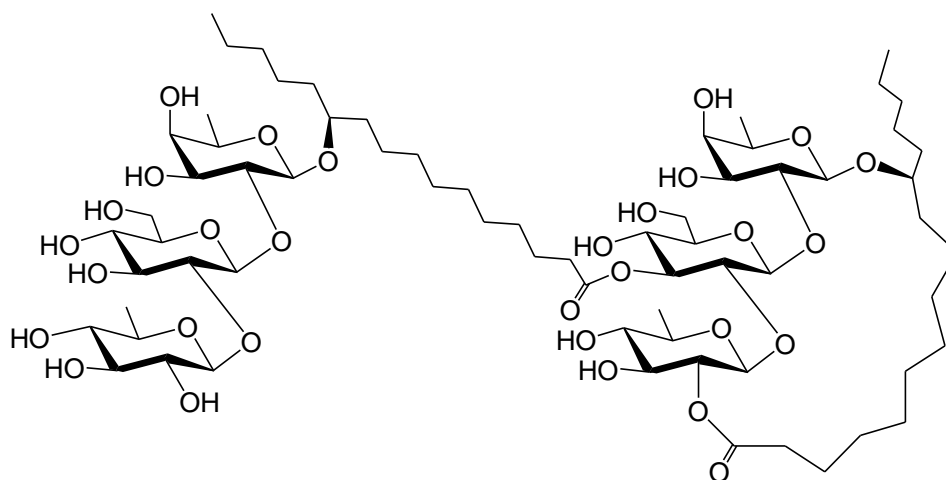
Las tricolorinas **H-J** son dímeros de trisacáridos que se encontraron formando parte de las fracciones polares de *Ipomoea tricolor* (*Ipomoea violacea*). Las tricolorinas I y J son dímeros del ácido tricolórico C. Cada unidad glicosídica está formada por una unidad de D-fucosa, una unidad de D-glucosa y una unidad de D-quinovosa. La aglicona que une las dos unidades oligoméricas en la tricolorina I se encuentra en el C₃ de la unidad de glucosa, mientras que en la tricolorina J se encontró en la posición C₆ de la unidad oligosacárida macrocíclica.

La diferencia que existe entre la tricolorina H y las tricolorinas I y J es la presencia de una unidad de L-ramnosa en lugar de una unidad de D-quinovosa. El enlace éster que une

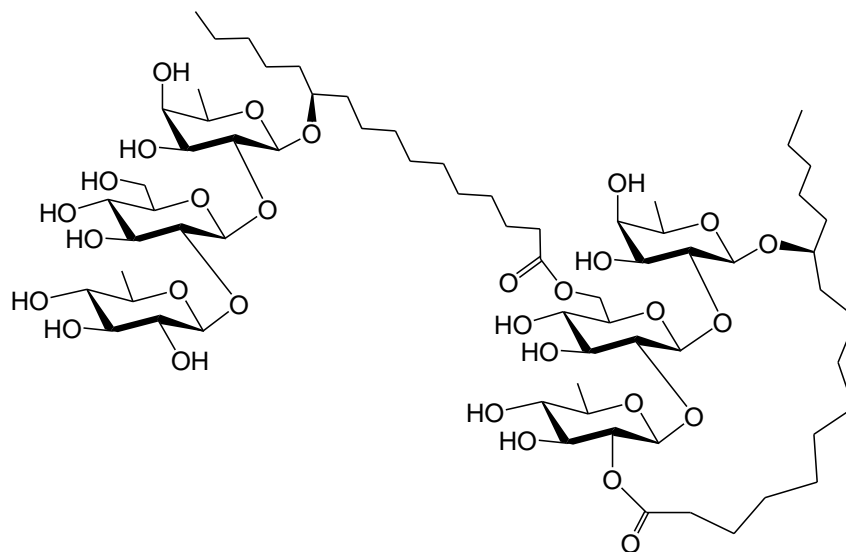
las dos unidades trisacáridas se identificó en la posición C₃ de la unidad de glucosa para la tricolorina H. En todas las tricolorinas H-J, el enlace para la formación de la lactona se identificó en la posición C₂ de la unidad monosacárida terminal (**Figura 21**).⁵⁰



Tricolorina H



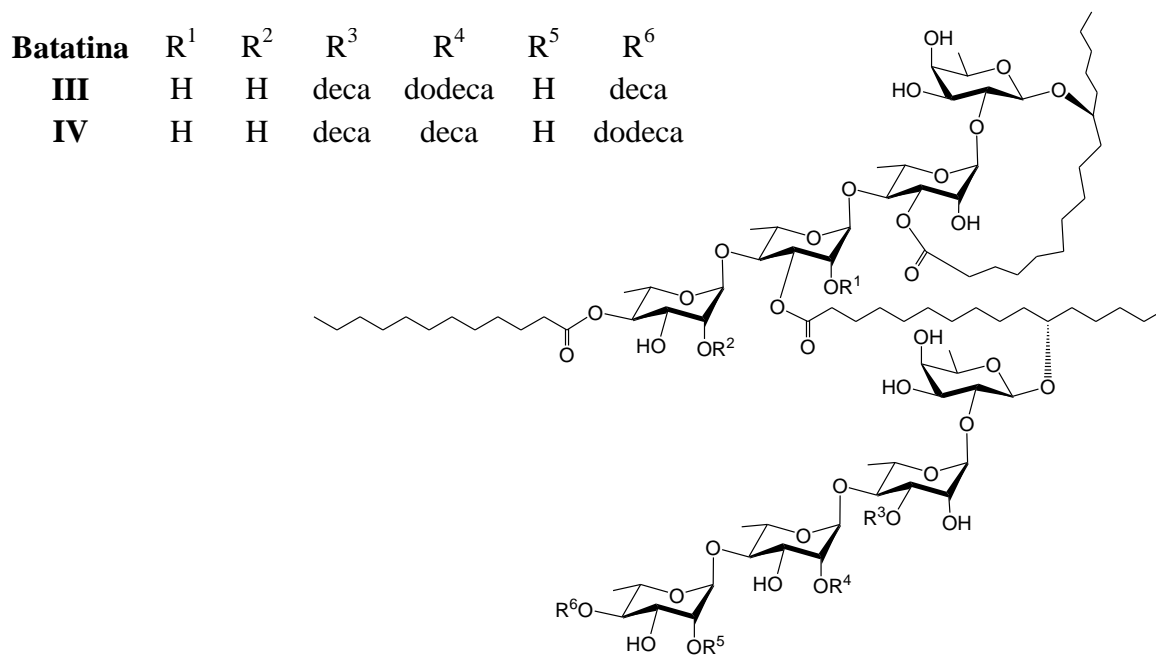
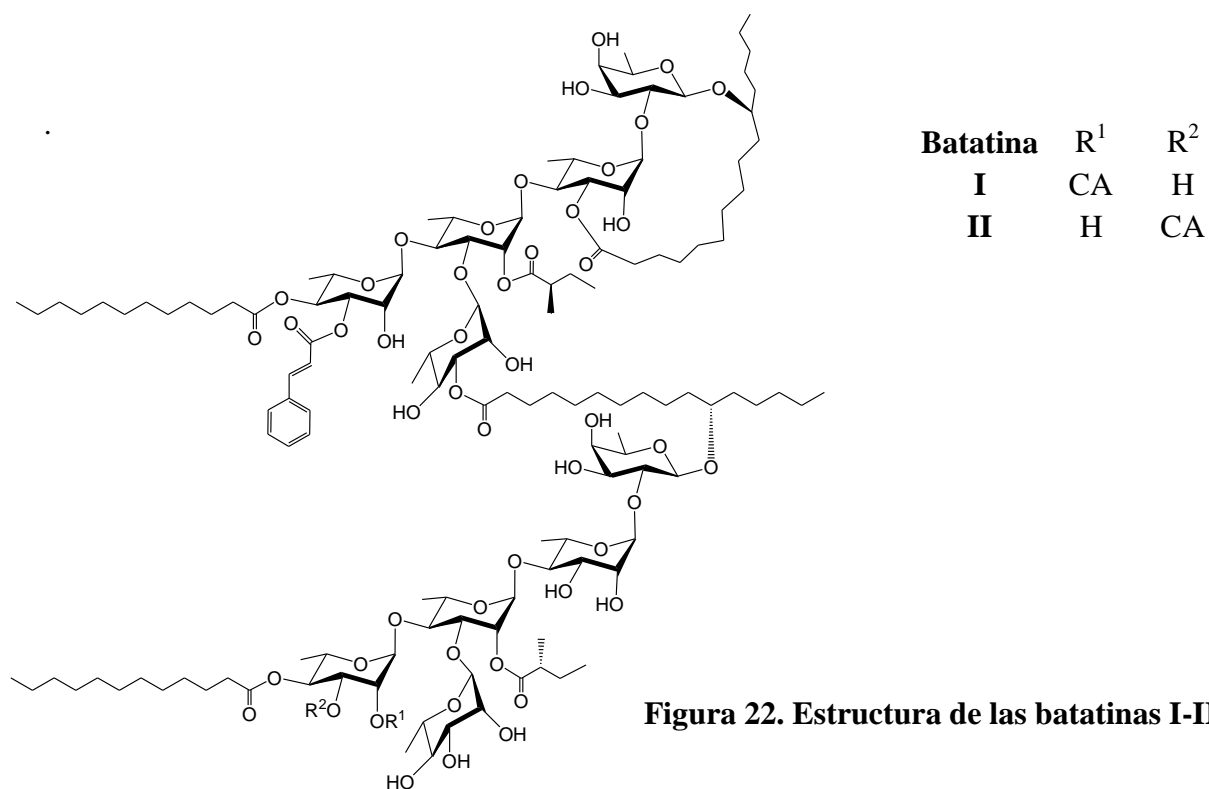
Tricolorina I



Tricolorina J

Figura 21. Estructura de las tricolorinas H-J

Las batatinas **I-IV** fueron aisladas del extracto soluble en hexano del camote blanco de *Ipomoea batatas*, entre las cuales, las batatinas **I-II** (**Figura 22**), se identificaron como dímeros tipo éster de pentasacáridos, donde el núcleo de cada unidad monomérica de estos glicolípidos corresponde al ácido simónico B (una unidad de D-fucosa y cuatro unidades de L-ramnosa). El enlace de la lactona de la aglicona (ácido jalapínico) se identificó en la posición C₃ de la segunda unidad monosacárida (ram) y el enlace éster de la aglicona que se encuentra uniendo las dos unidades monoméricas se estableció en la posición C₃ de la ramnosa terminal. Variaciones en el tipo de grupos que se encuentran acilando el núcleo han sido encontradas en las posiciones C₂ de la tercera unidad monosacárida (ram') y, en C₂, C₃ y C₄ de una de las ramnosas terminales (ram'').³⁷ Por otra parte, las batatinas **III-IV** (**Figura 23**) se identificaron como dímeros tipo éster de tetrasacáridos derivados del ácido operculínico C (una unidad de D-fucosa y tres unidades de L-ramnosa). El sitio de macrolactonización se encontró en la misma posición de las batatinas **I-II** (ram). Sin embargo, el enlace éster que une las dos unidades oligoméricas se encontró en la posición C₃ de la tercera unidad monosacárida (ram').⁵¹



Las tyriantinas **A** y **B**, fueron aisladas de *Ipomoea tyrianthina*. Estos dos glicolípidos fueron identificados como heterodímeros de tetrasacáridos, donde cada unidad se deriva del ácido escamónico A, como el núcleo oligosacárido (dos unidades de D-quinovosa, una unidad de D-glucosa y una unidad de L-ramnosa). En estos glicolípidos, el enlace de la macrolactona se encontró en la posición C₃ de la tercera unidad monosacárida (ram), y el enlace éster que une las dos unidades monoméricas se identificó en el C₄ de la quinovosa terminal. La diferencia entre estos dos glicolípidos se encuentra en la unidad B del dímero, específicamente en el tipo y posición de los sustituyentes, los ácidos 2-metil-3-hidroxi-butanoico (niloil), 2-metilbutanoico y el butanoico en las posiciones C₂ de la unidad de ramnosa y C₄ de la quinovosa terminal (**Figura 24**).⁵²

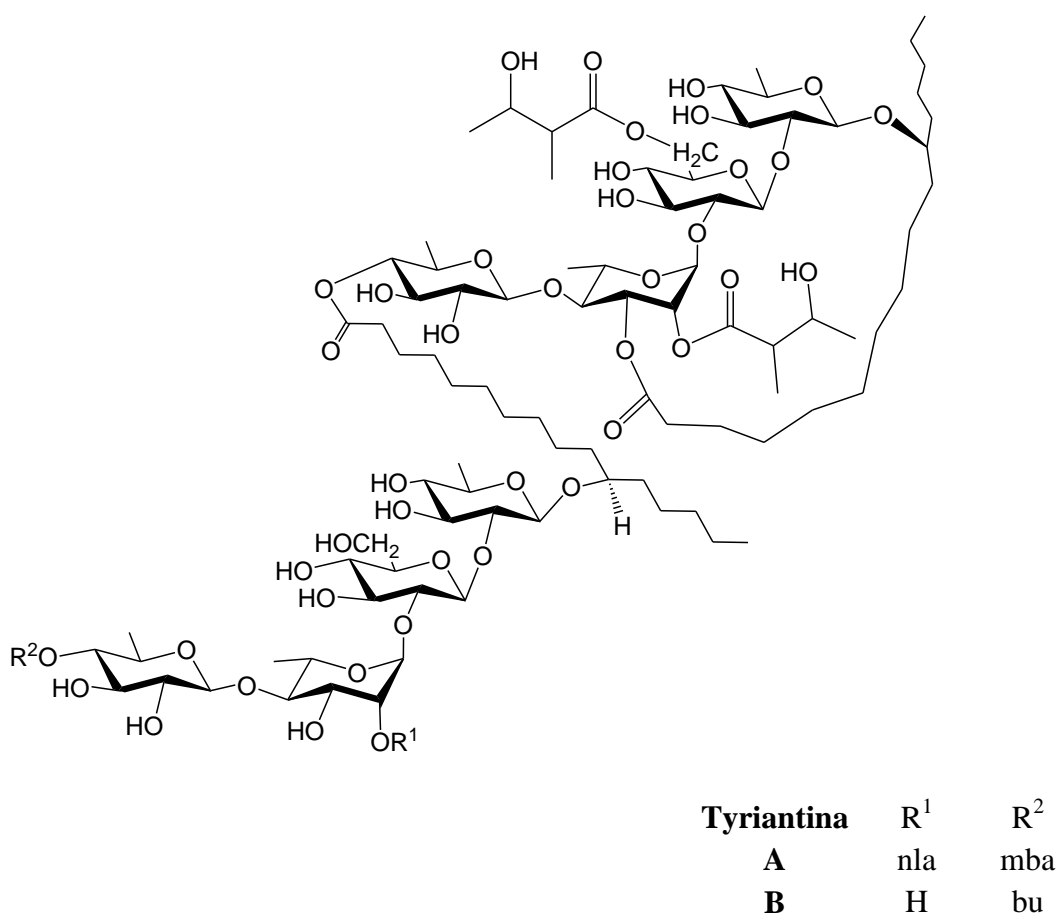


Figura 24. Estructura de las tyriantinas A-B

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GENERALES

- 3.1.1 Establecer la composición química de las resinas glicosídicas de la especie medicinal *Ipomoea purga* a través de la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1 Llevar a cabo la extracción con cloroformo de las partes aéreas de *I. purga* para el aislamiento de las resinas glicosídicas menos polares.
- 3.2.2 Realizar el fraccionamiento del extracto clorofórmico mediante la cromatografía en columna abierta para la obtención de las fracciones ricas en resinas glicosídicas.
- 3.2.3 Identificar el ácido glicosídico mayoritario presente en las fracciones de resinas glicosídicas mediante la hidrólisis alcalina para conocer el núcleo oligosacárido constitutivo de los glicolípidos individuales.
- 3.2.4 Establecer las condiciones instrumentales en la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) a nivel analítico y preparativo, para lograr la separación de las mezclas complejas de resinas glicosídicas presentes en las fracciones obtenidas de las partes aéreas de *Ipomoea purga*.
- 3.2. Determinar las estructuras moleculares de los constituyentes individuales presentes en las fracciones clorofórmicas de las partes aéreas de *Ipomoea purga* mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas, con el objetivo de ampliar el conocimiento de la diversidad estructural de estos metabolitos.

4. HIPÓTESIS

Debido a que los ácidos hexaglicosídicos, ácido purgico A y B, fueron obtenidos de la hidrólisis alcalina de las fracciones metanólicas de la raíz de *Ipomoea purga*, los componentes biodinámicos de esta especie están constituidos por resinas glicosídicas, cuyos glicolípidos individuales están formados por un núcleo oligosacárido que contiene el ácido (11*S*)-hidroxitetradecanoico o el ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico. Por lo tanto, su alta polaridad puede ser una consecuencia de su naturaleza polimérica en forma de ésteres interglicosídicos (e.g., dímeros). De esta forma, las resinas de la raíz de jalapa representan mezclas complejas de constituyentes poliméricos que sólo podrán purificarse mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 Procedimientos cromatográficos

Los glicolípidos de la especie en estudio se aislaron y purificaron a través de dos técnicas cromatográficas, la cromatografía en columna abierta y la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

La primera técnica se empleó para lograr el fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de las partes aéreas y la raíz, así, se empleó gel de sílice 60 Merck (70-230 mesh) como fase estacionaria y como fase móvil se emplearon hexano, cloroformo, acetona y metanol preparados en diferentes proporciones para garantizar el aumento en la polaridad. Las fracciones se reunieron por homogeneidad, una vez analizadas por cromatografía en capa fina, empleándose cromatoplasmas de gel de sílice 60 F254 sobre aluminio reveladas con una mezcla de H₂SO₄-sulfato cérico como agente cromógeno y calentadas sobre una parrilla a una temperatura de 80 °C.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) fue empleada para lograr la resolución de los constituyentes individuales presentes en las fracciones enriquecidas de resinas glicosídicas. Inicialmente, se estudiaron las condiciones a nivel analítico para elegir la mejor condición que permitiera una mayor definición de los picos, así, se emplearon diversas fases estacionarias: sílica octadecilo y sílica aminopropilmetilo y como fase móvil acetonitrilo, metanol y agua usados en diferentes proporciones. Las separaciones se realizaron de manera isocrática. Posteriormente, se extrapolaron las condiciones analíticas a nivel preparativo para lograr cantidades suficientes de los constituyentes individuales para la caracterización espectrométrica y espectroscópica.

5.2 Determinación de las constantes físicas

El equipo de cromatografía de alta eficiencia usado para la separación de los glicolípidos consistió de un modelo 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). Adicionalmente, 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 cromatográfica fueron llevados a cabo por el software Empower 2 (Waters) (LAB 123, EDIFICIO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM).

Los análisis por cromatografía de gases-masas (CG-MS) para la identificación de los ácidos orgánicos obtenidos por hidrólisis alcalina de las fracciones se llevaron a cabo en un equipo Thermo-Electron acoplado a un espectrómetro Thermo-Electron, usándose una columna (5 % fenil)-metilpolisiloxano (30 m x 0.25 mm, 0.1 μm) como fase estacionaria y He como fase móvil, a una velocidad lineal de 30 cm/s (USAI, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM).

Los experimentos por resonancia magnética nuclear de hidrógeno (^1H) y carbono (^{13}C) fueron registrados en equipos Varian Inova operando a una frecuencia de 500 MHz para ^1H y 125 MHz para ^{13}C (INSTITUTO DE QUÍMICA, UNAM). Las muestras fueron registradas con piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm. Los puntos de fusión fueron determinados en un aparato Fisher-Johns sin corrección. Las rotaciones ópticas fueron medidas con un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizándose metanol como disolvente. Los espectros de masas de baja resolución y alta resolución fueron registrados en un aparato JEOL SX10 mediante el método de ionización por bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) en el modo negativo sobre una matriz de trietanolamina (USAI, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM).

Los espectros de masas de alta resolución mediante el método de ionización por electrospray para la identificación de las muestras con pesos moleculares mayores a 2000 daltons, fueron registrados en un espectrómetro de masas de tiempo de vuelo-cuadrupolo modelo Bruker MicrOTOF-Q (BIOCENRO, UNIVERSITY OF READING, REINO

UNIDO). Las muestras fueron disueltas en metanol grado HPLC (0.4 mg/mL) e inyectadas directamente a la fuente de electrospray a una velocidad de flujo de 180 μ L/h, usándose nitrógeno como el gas acarreador. Los espectros de masas fueron adquiridos en un rango de 50 a 3500 Da. Las muestras fueron procesadas usando un software Bruker para análisis de datos.

5.3 Material vegetal

Las partes aéreas de *Ipomoea purga* fueron colectadas en la región de Coxmatla localizada en el Municipio de Xico (Veracruz-México) en Noviembre del año 2008. La identificación del material vegetal fue realizada por el botánico Alberto Linajes y un ejemplar fue depositado en el herbario del Instituto de Ecología, Xalapa, Veracruz-México (J. Castañeda y R. Pereda). Adicionalmente, se archivaron ejemplares en el Departamento de Farmacia de la facultad de Química, UNAM (RP-05-XAL) y en el Herbario Nacional del Instituto de Biología, UNAM (MEXU 425654) y comparados con muestras previamente depositadas en el Herbario del Instituto de Ecología, A.C. (Ortega 1488; XAL ID-I77366; Martínez-Vasquez 863; XAL ID-94389).

La raíz de Jalapa analizada consistió de 10 Kg de tubérculos frescos colectados en el municipio de Xico, Veracruz. La identificación del material fue realizada por los Biólogos Alberto Linajes y el Dr. Víctor Ríos. Un ejemplar se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología, A.C. (Ortega 475, XAL).

Muestras sólidas comerciales de *I. purga* (R. Bye 26909) fueron obtenidas de los laboratorios Mixim, S.A. de C.V. México.

5.3.1 Obtención de los extractos del material vegetal de *Ipomoea purga*

Las partes aéreas se secaron a temperatura ambiente y las raíces se secaron al horno a una temperatura de 40 °C durante una noche. El material vegetal seco y pulverizado fue

sometido a una maceración exhaustiva preliminar con cloroformo y después con metanol. Al término de cada una de las extracciones, las soluciones se filtraron y se concentraron a sequedad a presión reducida (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Peso de los extractos obtenidos

EXTRACTO	Partes aéreas	Rizomas	Muestra comercial (Raíz)
Clorofórmico	21.5 g	6.23 g	4.4 g
Metanólico	8.0 g	183 g	169 g

Para la obtención de las resinas glicosídicas de las partes aéreas de *Ipomoea purga* sólo se utilizó el extracto soluble en cloroformo y para el estudio fitoquímico de los rizomas y la muestra comercial de raíz de jalapa se utilizaron los extractos clorofórmicos.

5.4 Fraccionamiento primario del extracto CHCl₃ de las partes aéreas de *Ipomoea purga*

Se llevó a cabo el fraccionamiento de 20 g de extracto a través de la cromatografía en columna abierta. La columna se empacó con 380 g de gel de sílice y la muestra se eluyó inicialmente utilizando las mezclas de disolventes mencionadas en el **cuadro 2**. Primero se inició la elución con hexano obteniéndose 10 eluatos de 200 mL cada uno. Posteriormente, se incrementó la polaridad preparándose los sistemas hexano-CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO y Me₂CO-MeOH en diferentes proporciones. Se colectaron 89 eluatos de 100 a 200 mL. Cada fracción se analizó mediante cromatografía en capa fina, aquellas que resultaron con patrones similares se reagruparon en 20 fracciones (I-XX), dentro de las cuales las fracciones IX y XII presentaron resinas glicosídicas (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Fraccionamiento primario del extracto CHCl₃ de las partes aéreas de *Ipomoea purga*

Eluato	Disolvente	Proporción %	Eluatos reunidos	Clave	Peso (mg)
1-10	Hexano	100	3	I	1023.7
11-20	Hexano-CHCl ₃	1:1	4	II	339.4
21-27	Hexano-CHCl ₃	2:8	5	III	242.1
28-39	Hex-CHCl ₃ - Acetona	1: 4.3 : 2.3	6-10	IV	20
40-60	Acetona	100	11-14	V	340.6
61-78	Acetona-MeOH	8:2	15-19	VI	670.8
79-89	Metanol	100	20-26	VII	367.5
			27-29	VIII	4213.9
			30-32	IX	4824.8
			33-41	X	682.6
			42	XI	40
			43-46	XII	2269.4
			47-56	XIII	550.2
			57-61	XIV	23.1
			62-63	XV	66.3
			64-73	XVI	1848.7
			74-76	XVII	81.9
			77-79	XVIII	23.1
			80-82	XIX	863
			83-89	XX	68

5.5 Preparación de derivados de la Fracción XII

5.5.1 Obtención del ácido glicosídico mayoritario mediante hidrólisis alcalina

A 253 mg de la fracción XII se adicionaron 6.5 mL de KOH al 5%, luego, la mezcla se sometió a un calentamiento a reflujo a 95 °C por 3 horas. Posteriormente 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, luego la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se concentró a presión reducida. La fase orgánica proporcionó una mezcla de ácidos grasos la cual fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Después, la fase acuosa se extrajo con *n*-butanol (2×20 mL), la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 y se evaporó a vacío para proporcionar 116 mg de un residuo sólido, el cual fue analizado por espectrometría de masas por bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) en el modo negativo. Adicionalmente, este residuo se sometió a una reacción de acetilación.

5.5.2 Preparación del ácido glicosídico peracetilado

El producto de hidrólisis alcalina de la fracción XII se sometió a una reacción de acetilación. Por lo tanto, a 54 mg de la mezcla de ácidos glicosídicos (XII-OH) se adicionaron 1.75 mL de anhídrido acético y 0.97 mL de piridina (1.8:1.0). La mezcla de reacción permaneció en agitación por 48 horas, la cual fue monitoreada por cromatografía en capa fina. En seguida, se adicionaron 10 mL de agua fría. Luego, se realizó una extracción con acetato de etilo (3×10 mL). Posteriormente, la fase orgánica se trató con una solución de ácido clorhídrico (0.1 N, 2×20 mL), seguido de un tratamiento alcalino con una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO_3 , 1×20 mL). Adicionalmente, la fase orgánica se lavó con agua (2×20 mL), se secó con Na_2SO_4 anhidro y se concentró a presión reducida para obtener 46.2 mg de producto peracetilado (XII-OHA). Finalmente, este producto acetilado se sometió a una reacción de alquilación con diazometano para obtener el derivado peracetilado-metilado (XII-OHAM).

5.5.3 Preparación del diazometano

5 g de N-metil-N-nitroso-p-toluensulfonamida (Diazald) en 45 mL de éter fueron adicionados lentamente a una solución de 5 g de KOH, 8 mL de agua y 10 mL de etanol (95 %). La mezcla de reacción permaneció en agitación y con calentamiento a 60 °C. A medida

que se adicionaba la diazald se generaba el diazometano mediante destilación, colectado mediante enfriamiento.

5.5.4 Preparación del derivado acetilado-metilado

41.5 mg del derivado acetilado (XII-OHA) fueron disueltos en 10 mL de metanol, luego se adicionó gota a gota un exceso de la solución etérea de diazometano. El agente alquilante se adicionó hasta que cesó la emisión del gas nitrógeno en la mezcla de reacción. Adicionalmente, la reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina. Finalmente el disolvente se eliminó mediante rotaevaporación, obteniéndose 44.7 mg de un sólido de color amarillo (XII-OHAM).

5.5.5 Purificación del derivado acetilado-metilado del ácido glicosídico mayoritario mediante CLAE

Para lograr la purificación del ácido glicosídico peracetilado-metilado mayoritario presente en la fracción XII se hizo uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, de tal manera que fue necesario encontrar las condiciones a nivel analítico y preparativo (**Figura 25**), que permitieran la obtención del producto a través de las técnicas de corte de núcleo y reciclaje (**Figura 26**) y en cantidades suficientes para su identificación espectroscópica por RMN y espectrometría de masas.

5.5.5.1 Condiciones por CLAE a nivel analítico:

Fase estacionaria: Columna Symmetry Silicaoctadecilo (C₁₈) (4.6 mm de diámetro interno x 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 µL

Concentración de la muestra: 2 mg/100 µL

Sensibilidad: 128 RIU

Tipo de elución: Isocrático

Para extrapolar la condición de flujo de nivel analítico a nivel preparativo, se hizo uso de la siguiente fórmula:

$$F_p = F_a \times (L_p/L_a) \times (d_p)^2 / (d_a)^2$$

F_p: Flujo a nivel preparativo; F_a: Flujo a nivel analítico; L_p: Longitud de la columna preparativa; L_a: Longitud de la columna analítica; d_p: diámetro interno de la preparativa, d_a: diámetro interno de la analítica.

5.5.5.2 Condiciones por CLAE a nivel preparativo:

Fase estacionaria: Columna Symmetry Silicaoctadecilo (C₁₈) (19 mm de diámetro interno x 300 mm de longitud, 7 µm tamaño de partícula, Waters)

Fase móvil: Acetonitrilo-Agua (95:5)

Flujo: 8.0 mL/min

Detector: Índice de refracción

Volumen de inyección: 500 µL

Concentración de la muestra: 40 mg/500µL

Sensibilidad: 128 RIU

Tipo de elución: Isocrático

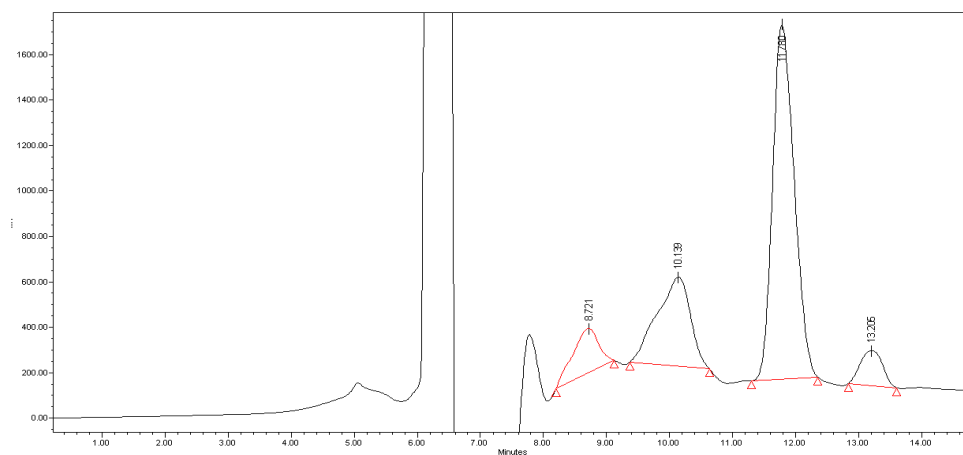


Figura 25. Cromatograma a nivel preparativo del peracetato del ácido glicosídico metilado mayoritario

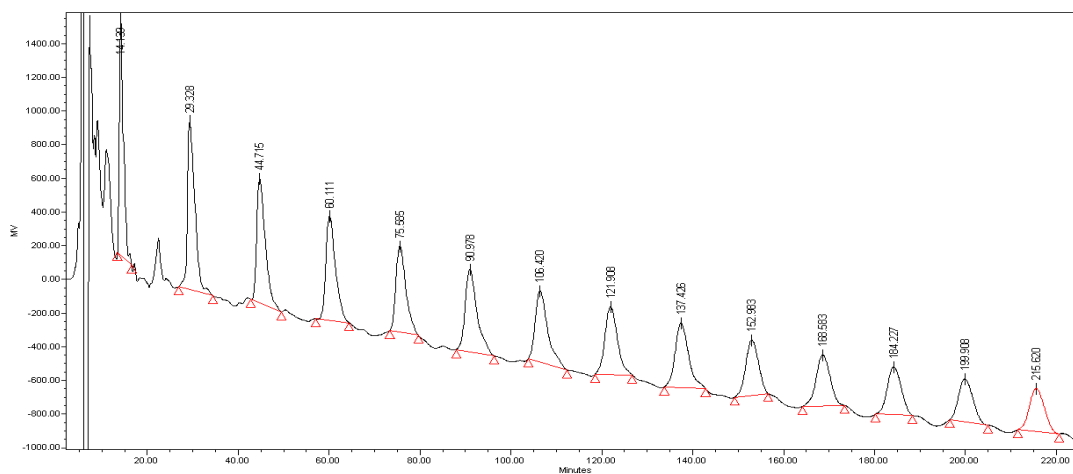


Figura 26. Purificación del derivado como el peracetato-metilado del ácido glicosídico mayoritario mediante “rasurado de pico” y “reciclaje”

5.5.6 Identificación del derivado acetilado-metilado del ácido glicosídico mayoritario

Acido operculínico A peracetilado-metilado (1): Sólido amorfo blanco; mp 83 - 85 °C; $[\alpha]_D = -40$ (c 0.14, MeOH), RMN ^1H y ^{13}C (cuadro 6); MALDIMS (modo positivo): m/z $[\text{M} + \text{Na}]^+$ 1559 ($\text{C}_{71}\text{H}_{108}\text{O}_{36}\text{Na}$).

5.5.7 Preparación y purificación de los ácidos operculínicos A y B metilados

10 mg de la mezcla de ácidos glicosídicos obtenidos de la hidrólisis de la fracción XII se disolvieron en 3 mL de metanol, luego se adicionó gota a gota una solución etérea de diazometano. El avance de la reacción se monitoreó por cromatografía en capa fina. Posteriormente, el disolvente se eliminó mediante rotaevaporación, obteniéndose 12 mg de producto. Este producto crudo se sometió a análisis mediante cromatografía de líquidos para su purificación por la técnica de corte de núcleo (columna symmetry silicaoctadecilo C₁₈, MeOH-H₂O 7:3, flujo: 0.4 mL/min). Los bajos rendimientos obtenidos para las muestras correspondientes al pico mayoritario ($t_R = 39$ min) y uno de los picos minoritarios ($t_R = 25$ min) limitaron su caracterización únicamente al empleo de la espectrometría de masas MALDI (modo positivo). El registro de los iones pseudomoleculares permitió identificar al éster metílico del ácido operculínico A (**2**) (m/z [M]⁺ 1032, C₄₇H₈₄O₂₄), y al éster metílico del ácido operculínico B (**3**) (m/z [M]⁺ 1048, C₄₇H₈₄O₂₅).

5.6 Purificación de los constituyentes individuales de la fracción XII mediante CLAE

La fracción XII, se trató previamente con carbón activado para la eliminación de los residuos pigmentados, luego esta fracción fue sometida a un análisis preliminar en cromatografía líquida de alta eficiencia y establecer las condiciones instrumentales que permitieran la separación de los glicolípidos individuales. Inicialmente se estudiaron las condiciones a nivel analítico usándose columnas analíticas de fase reversa (Symmetry C₁₈, 4.6 mm x 250 mm, 5 μm, Waters) con un sistema de detección de índice de refracción y a un flujo de 0.5 mL/min. Cada fase evaluada se limpió de impurezas sólidas mediante filtración por un filtro Millipore conectado al vacío, empleando una membrana de polipropileno hidrofílico de 0.45 μm. Luego, la fase móvil fue desgasificada mediante sonicado y por desplazamiento del aire con helio a una velocidad de 10 mL/min durante 15 minutos.

Cada muestra de prueba se disolvió en metanol-tetrahidrofurano (9:1) y se filtró a través de Acrodiscos GHP, provistos de una membrana de polipropileno hidrofílico de 0.2 μm (PALL Gelman Laboratory).

El mejor sistema cromatográfico que permitió la máxima resolución de los picos de la muestra problema consistió en una columna analítica C_{18} y una fase móvil de MeOH. Para la obtención de cantidades suficientes de cada uno de los constituyentes se hizo uso de CLAE a nivel preparativo a partir de las condiciones encontradas a nivel analítico. Las condiciones que reprodujeron la resolución de los picos de nivel analítico a nivel preparativo fueron con una columna preparativa C_{18} (19 x 300 mm, 7 μm). Mediante la aplicación de las técnicas de “sobrecarga de columna”, “rasurado de pico” o “corte de núcleo” se logró la purificación completa de los purginósidos y las purgínas.

5.6.1 Condiciones por CLAE a nivel analítico:

Fase estacionaria: Columna Symmetry Silicaoctadecilo (C_{18}) (4.6 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, 5 μm tamaño de partícula, Waters)

Fase móvil: MeOH

Flujo: 0.4 mL/min

Detector: Índice de refracción

Volumen de inyección: 10 μL

Concentración de la muestra: 2 mg/100 μL

Sensibilidad: 128 RIU

Tipo de elución: Isocrático

Para extrapolar la condición de flujo de nivel analítico a nivel preparativo, se hizo uso de la fórmula mostrada en el punto 5.5.5.1

5.6.2 Condiciones por CLAE a nivel preparativo:

Fase estacionaria: Columna Symmetry Silicaoctadecilo C₁₈ (19 mm de diámetro interno x 300 mm de longitud, 7 μm tamaño de partícula, Waters)

Fase móvil: MeOH

Flujo: 8.0 mL/min

Detector: Índice de refracción

Volumen de inyección: 500 μL

Concentración de la muestra: 50 mg/500μL

Sensibilidad: 128 RIU

Tipo de elución: Isocrático

5.6.3 Obtención de los purginósidos I-IV y las purginas I-III

La fracción XII fue analizada mediante CLAE en condiciones analíticas y preparativas para lograr su fraccionamiento. Las condiciones analíticas mostradas en el punto 5.5.5.1 permitieron la obtención de 8 picos resueltos con tiempos de retención A: t_R 14.09 min, B: t_R 15.36 min, C: t_R 16.7 min, D: t_R 18.3 min, E: t_R 19.21 min, F: t_R 21.77 min, G: t_R 23.97 min y H: t_R 26.17 min. Estos picos se reprodujeron cuando se realizó el análisis a nivel preparativo, a excepción de los picos D y E, los cuales coeluyeron en un sólo pico. Los picos generados a nivel preparativo correspondieron a los siguientes tiempos de retención: A: t_R 16.6 min, B: t_R 18.2 min, C: t_R 19.9 min, D: t_R 22 min, E: t_R 26.6 min, F: t_R 29.4 min, G: t_R 32.5 min. Cada pico fue colectado utilizándose la técnica de corte de núcleo, para obtener 8 muestras de menor complejidad. El pico A (**IPA-Purg-I**), fue de nueva cuenta reinyectado obteniéndose dos picos. El pico mayoritario fue purificado mediante la técnica de “rasurado de pico”, seguida del reciclaje del mismo a través de la columna hasta 15 ciclos para obtener la máxima resolución que garantizó una pureza del 99%. Este pico correspondió al compuesto nombrado como **purgina II** (t_R 16.6 min, 13 mg).

De la misma manera, se purificaron cada uno de los picos restantes, utilizándose de 10 a 15 ciclos. Así, del pico B (**IPA-Purg II**), se obtuvieron tres picos, dentro de los cuales, el pico mayoritario correspondió a la **purgina III** (t_R 17.7 min, 19 mg). Del pico C (**IPA-Purg-III**), se obtuvieron 4 picos, dentro de los cuales, el pico mayoritario correspondió al compuesto nombrado como **purginósido I** (t_R 19.8 min, 13 mg).

La reinyección del pico D (**IPA-Purg-IV**), produjo tres picos, dentro de los cuales el pico mayoritario fue reciclado. A medida que el pico D mayoritario se reciclaba, se generaba un segundo pico mayoritario más retenido (D₁, **IPA-Purg-V**), el cual fue cortado y reinyectado separadamente para ser purificado a través de la técnica de reciclaje. Estos dos picos mayoritarios generaron los **purginósidos II y III** (t_R 21.9 min, 9 mg; t_R 23 min, 9 mg). Adicionalmente, el pico minoritario de D (D₂) más retenido fue reinyectado y reciclado, de esta manera se obtuvo el **purginósido IV** (t_R 19 min, 10.3 mg).

Para la purificación del pico E, se decidió aumentar el flujo hasta 9 mL/min, de esta manera, tres picos minoritarios fueron obtenidos, adicionales al pico mayoritario de E (**IPA-Purg-VI**). La técnica de rasurado de pico y reciclaje durante 15 ciclos del pico mayoritario permitió la obtención del compuesto nombrado como **purgina I** (t_R 23.7 min, 20 mg)

Purginósido I (4): Sólido amorfo blanco; p.f 133-135 °C; $[\alpha]_{589} -16$, $[\alpha]_{578} -16$, $[\alpha]_{546} -18$, $[\alpha]_{436} -26$, $[\alpha]_{365} -33$ (*c* 0.2, MeOH); RMN ¹H y ¹³C (Cuadros 7 y 8); FABMS (modo negativo): *m/z* 1367 [M – H][–], 1237 [M – H – C₉H₆O (cinamoil ester)][–], 1083 [1237 – C₁₀H₁₈O (decanoil ester)][–], 853 [1083 – C₅H₈O ((2*S*)-2-metilbutanoil ester) – C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)][–], 691 [853 – C₆H₁₀O₅ (hexosa)][–], 545 [691 – C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)][–], 417 [545 + H₂O – C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)][–], 271 [417 – C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)][–]; HRFABMS *m/z* 1367.7021 [M – H][–] (calculada para C₇₀H₁₁₁O₂₆ requiere 1367.7358).

Purginósido II (5): Sólido amorfo blanco; p.f. 135-137 °C; $[\alpha]_{589} -16$, $[\alpha]_{578} -16$, $[\alpha]_{546} -18$, $[\alpha]_{436} -29$, $[\alpha]_{365} -41$ (*c* 0.1, MeOH); RMN ¹H y ¹³C (Cuadros 7 y 8); FABMS (modo negativo): *m/z* 1381 [M – H][–], 1251 [M – H – C₉H₆O (cinamoil ester)][–], 1097 [1251 – C₁₀H₁₈O (decanoil ester)][–], 853 [1097 – C₆H₁₀O (hexanoil ester) – C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)][–], 691 [853 – C₆H₁₀O₅ (hexosa)][–], 545 [691 – C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)][–], 417

[545 + H₂O - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻, 271 [417 - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻; HRFABMS *m/z* 1381.7339 [M - H]⁻ (calculada para C₇₁H₁₁₃O₂₆ requiere 1381.7515).

Purginósido III (6): Sólido amorfo blanco; p.f. 136-138 °C; [α]₅₈₉ -21.5, [α]₅₇₈ -22, [α]₅₄₆ -25, [α]₄₃₆ -42, [α]₃₆₅ -63.5 (*c* 0.2, MeOH); RMN ¹H y ¹³C (Cuadros 7 y 8); FABMS (modo negativo): *m/z* 1381 [M - H]⁻, 1251 [M - H - C₉H₆O (cinamoil ester)]⁻, 1097 [1251 - C₁₀H₁₈O (decanoil ester)]⁻, 853 [1097 - C₆H₁₀O (hexanoil ester) - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻, 691 [853 - C₆H₁₀O₅ (hexosa)]⁻, 545 [691 - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻, 417 [545 + H₂O - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻, 271 [417 - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻; HRFABMS *m/z* 1381.7345 [M - H]⁻ (calculada para C₇₁H₁₁₃O₂₆ requiere 1381.7515).

Purginósido IV (7) Sólido amorfo blanco; p.f. 130-132 °C; [α]₅₈₉ -16.6, [α]₅₇₈ -20.0, [α]₅₄₆ -23.3, [α]₄₃₆ -33.3, [α]₃₆₅ -46.6 (*c* 0.03, MeOH); RMN ¹H y ¹³C (Cuadros 7 y 8); FABMS (modo negativo): *m/z* 1251 [M - H]⁻, 1097 [1251 - C₁₀H₁₈O (decanoil ester)]⁻, 853 [1097 - C₆H₁₀O (hexanoil ester) - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻, 545 [853 - C₆H₁₀O₅ (hexosa)]⁻ - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻, 417 [545 + H₂O - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻, 271 [417 - C₆H₁₀O₄ (metilpentosa)]⁻; HRFABMS *m/z* 1250.6970 [M - H]⁻ (calculada para C₆₂H₁₀₇O₂₅ requiere 1251.7101).

Purgina I (8): Sólido amorfo blanco; p.f. 128 - 130 °C; [α]₅₈₉ -16, [α]₅₇₈ -17, [α]₅₄₆ -19, [α]₄₃₆ -29, [α]₃₆₅ -38 (*c* 0.14, MeOH); RMN ¹H y ¹³C (Cuadro 9); HRESIMS (modo negativo): *m/z* 2828.5374 [M + Cl]⁻ (calculada para C₁₄₄H₂₃₂O₅₂Cl requiere 2828.5208, δ = +5.87 ppm), *m/z* 1395.7767 [M/2 - H]⁻ (calculada para C₇₂H₁₁₅O₂₆ requiere 1395.7676).

Purgina II (9): Sólido amorfo blanco; mp 128 - 130 °C; [α]_D = -58 (*c* 0.2, MeOH), RMN ¹H y ¹³C (Cuadro 10); HRESIMS (modo negativo): *m/z* [M + Cl]⁻ 2804.4567 (calculada para C₁₄₀H₂₂₄O₅₄Cl requiere 2804.4480)

Purgina III (10): Sólido amorfo blanco; mp 126 - 128 °C; [α]_D = -89 (*c* 0.2, MeOH), RMN ¹H y ¹³C (Cuadro 11); HRESIMS (modo negativo) *m/z* [M + Cl]⁻ 2832.4783 (calculada para C₁₄₂H₂₂₈O₅₄Cl requiere 2832.4793).

5.7 Fraccionamiento Primario del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (muestra comercial)

Para el extracto clorofórmico de la muestra comercial de la raíz de jalapa, se generaron 141 fracciones que fueron combinadas en 15 fracciones I-XV a través del fraccionamiento primario, conteniendo seis de éstas (VII, VIII, IX, X, XI y XII) mezclas de glicolípidos. Las fracciones VII, VIII y IX fueron combinadas (IPC-1, 52 mg) al igual que las fracciones X, XI y XII (IPC-II, ~ 300 mg) (**Cuadro 3**). Las condiciones instrumentales a nivel analítico que permitieron lograr una adecuada resolución de las resinas glicosídicas de la muestra IPC-II (Picos A-H, $t_R = 7.13, 8.38, 9.05, 9.54, 11.7, 12.5, 13.9, 17.4$) fueron: Columna de siliceaminopropilmetilo con sistemas de detección en el UV (254 nm) e índice de refracción, flujos de elución de 0.5 mL, CH₃CN-MeOH (85:15). La purificación de cada uno de los constituyentes a nivel preparativo no fue posible debido a la poca cantidad obtenida de la fracción IPC-II, sumado a la complejidad de los picos en que se resuelve la mezcla de resinas glicosídicas.

Cuadro 3. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (muestra comercial)

Eluato	Disolvente	Proporción	Combinación	Marca	Peso (mg)
1-24	Hexano-CHCl ₃	1:1	4-13	I	
25-37	CHCl ₃	100 %	14-27	II	
38-61	CHCl ₃ - Acetona	7:3	28-30	III	
62-71	CHCl ₃ - Acetona	1:1	31-38	IV	
72-89	Acetona	100 %	39-41	V	
90-110	Acetona-MeOH	7:3	42-48	VI	
111-121	Acetona-MeOH	1:1	49-55	VII	45.1
122-141	Metanol	100 %	56-62	VIII	3.7
			63-69	IX	4.09
			70-77	X	162.7
			78-90	XI	60.7
			91-102	XII	58.8
			103-105	XIII	
			106-120	XIV	
			121-141	XV	

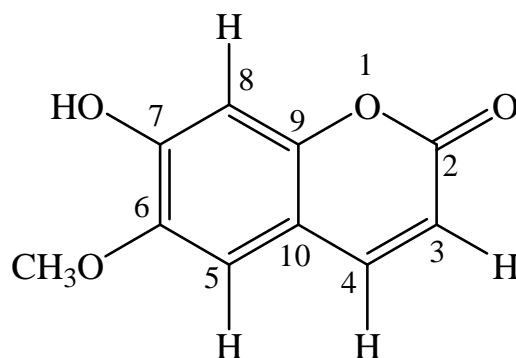
5.7.1 Hidrólisis alcalina del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (muestra comercial)

A 100 mg del extracto se adicionaron 2.0 mL de KOH al 5%, luego, la mezcla se sometió a un calentamiento a reflujo a 95 °C por 3 horas. Posteriormente la mezcla se aciduló con HCl 4N hasta un pH de 5.0 y se extrajo con cloroformo (2 × 10 mL) y acetato de etilo (2 × 10 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua destilada, luego la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. La fase orgánica proporcionó una mezcla de ácidos grasos la cual fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (ácido 2-metilbutírico *m-z* [M]⁺ 102, el ácido n-decanoico [M]⁺ 172, el ácido n-dodecanoico [M]⁺ 200). Después, la fase acuosa se extrajo con *n*-butanol (2 × 10 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a vacío para proporcionar 80 mg de un residuo sólido. Mediante el espectro de MS-FAB negativo se logró concluir la presencia del ácido púrgico A. *m/z* 1151 [M-H]⁻, 1005 [1151 - 146

(metilpentosa)], 843 [1005-162 (hexosa)], 697 [843-146 (metilpentosa)], 551 [697-146 (metilpentosa)], 389 [551-162 (hexosa)].

5.8 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (muestra colectada)

El extracto clorofórmico de la raíz de *Ipomoea purga* colectada fue fraccionado mediante cromatografía de columna. Este procedimiento generó 75 fracciones que fueron combinadas en 13 fracciones, dentro de las cuales, cuatro de estas contenían mezcla de resinas glicosídicas (VII, VIII, X y XI) (**Cuadro 4**). Sin embargo, las pocas cantidades obtenidas de cada fracción (VII = 6 mg, VIII = 3.7 mg, X = 421 mg, XI = 267 mg), dificultó el procedimiento de purificación a escala preparativa de cada uno de los constituyentes. Cabe mencionar, que el fraccionamiento secundario de las fracciones mayoritarias obtenidas del fraccionamiento primario (II-IV: 4380 mg), permitieron el aislamiento de una cumarina denominada la escopoletina.



Escopoletina: Sólido amarillo, mp 203-205 °C; UV (MeOH) λ máx 344.5 (0.40), 228 (0.51); MS: m/z 192; RMN ^1H (MeOD, 500 MHz): δ 3.7 ppm (3H, s); δ 6.20 ppm (1H, d, $J_{\text{H-H}}=9.5$ Hz, H-3), δ 6.77 ppm (1H, s, H-8), δ 7.1 ppm (1H, s, H-5), δ 7.85 ppm (1H, s, $J_{\text{H-H}}=9.0$ Hz, H-4). RMN ^{13}C (125 MHz, MeOD): δ 55.3 ppm ($\text{CH}_3\text{-O}$), δ 102.5 ppm (C-8), δ 108.5 ppm (C-5), δ 111.1 ppm (C-3), δ 113 ppm (C-10), δ 144.6 (C-4), δ 145.6 ppm (C-6), δ 149.9 ppm (C-9), δ 151.4 ppm (C-7), δ 162.6 ppm (C-2).

5.8.1 Hidrólisis alcalina del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (muestra colectada)

A 97 mg de la fracción se adicionaron 3.0 mL de KOH al 5%, luego, la mezcla se sometió a un calentamiento a reflujo a 95 °C por 3 horas. Posteriormente la mezcla se aciduló con HCl 4N hasta un pH de 5.0 y se extrajo con cloroformo (2 × 10 mL) y acetato de etilo (2 × 10 mL). Las fases orgánicas se combinaron y se lavaron con agua destilada, luego la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se concentró a presión reducida. Después, la fase acuosa se extrajo con *n*-butanol (2 × 10 mL), la fase orgánica se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a vacío para proporcionar 70 mg de un residuo sólido. Mediante el espectro de MS-FAB negativo se logró concluir la presencia del **ácido púrgico A** *m/z* 1151 [M-H]⁻ y el **ácido púrgico B** *m/z* 1179 [M-H]⁻.

Cuadro 4. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de la raíz de jalapa (muestra colectada)

Eluato	Disolvente	Proporción	F. Combinadas	Marca	Peso (mg)
1-9	Hexano-CHCl ₃	1:1	1-9	I	
10-19	CHCl ₃	100 %	10-16	II	4380
20-30	CHCl ₃ - Acetona	7:3	17-21	III	
31-38	CHCl ₃ - Acetona	1:1	22-23	IV	
39-48	Acetona	100 %	24-25	V	
49-58	Acetona-MeOH	8:2	26-30	VI	
59-67	Acetona-MeOH	1:1	31-32	VII	6.2
68-75	Metanol	100 %	33-36	VIII	3.7
			37-38	IX	
			39-49	X	421
			50-54	XI	267
			55-59	XII	
			60-75	XIII	

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Colecta de material vegetal y preparación de los extractos

La selección del material vegetal de estudio, tanto las partes aéreas como las raíces de *Ipomoea purga*, se realizó siguiendo los criterios etnobotánicos y quimiotaxonómicos que consideran a esta especie como la auténtica droga cruda del complejo de especies medicinales de la familia de las convolvuláceas usadas en México como remedios purgantes⁴⁷ y que se conoce popularmente con el nombre de “la raíz de jalapa”. La colecta de material vegetal se realizó en la localidad de Coxmatla, Veracruz (Noviembre del 2008). Las partes aéreas (tallos, hojas y flores) fueron separadas de las raíces mediante inspección visual. Los procesos de pulverizado y macerado con cloroformo de las partes aéreas permitieron obtener 21.5 g de extracto.

6.2 Fraccionamiento del extracto clorofórmico de las partes aéreas

El extracto clorofórmico de *Ipomoea purga* fue fraccionado mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice, iniciando la elución con hexano e incrementándose la polaridad con los sistemas siguientes: hexano-CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO y Me₂CO-MeOH. De esta manera, se obtuvieron veinte fracciones primarias identificadas con las claves I-XX (parte experimental inciso 5.4). La fracción XII (previamente tratada con carbón activado para la remoción de los pigmentos) se sometió a un análisis posterior mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).

6.3 Identificación de agliconas

Mediante la reacción de hidrólisis alcalina de la fracción XII, se liberaron los ácidos grasos que se encuentran esterificando los núcleos oligosacáridos de las resinas

glicosídicas intactas y que se recuperaron en una fase etérea con el objetivo de analizarlos 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 conocidos de muestras auténticas (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Identificación de los ácidos grasos mediante CG-EM

Ácido Orgánico	t_R (min)	m/z
Ácido isobutírico	1.12	[M] ⁺ 88 (20), 73 (28), 70 (55), 61 (100)
Ácido 2-metilbutírico	2.0	[M] ⁺ 102 (8), 87 (2), 74 (12), 57 (100)
Ácido hexanoico	6.5	[M] ⁺ 116 (2), 99 (3), 87 (21), 73 (63), 60 (100), 41 (16), 39 (7)
Ácido octanoico	7.0	[M] ⁺ 144 (2), 115 (8), 101 (18), 73 (75), 60 (100), 55 (28)
Ácido decanoico	7.4	[M] ⁺ 172 (2), 155 (1), 143 (8), 129 (50), 115 (12), 112 (8), 87 (16), 73 (100), 60 (90), 57 (32), 55 (30)
Ácido cinámico	7.7	[M] ⁺ 148 (84), 147 (100), 131 (22), 103 (42), 102 (21), 77 (28), 74 (5), 51 (12), 50 (5)
Ácido dodecanoico	8.01	[M] ⁺ 200 (9), 183 (2), 171 (15), 157 (38), 143 (9), 129 (45), 115 (22), 101 (15), 85 (30), 73 (100), 60 (68), 57 (30), 55 (30)

6.4 Purificación del ácido glicosídico

Para facilitar la purificación del ácido glicosídico mayoritario se llevó a cabo la derivatización del producto obtenido de la hidrólisis alcalina de la fracción XII. Así, se preparó el derivado peracetilado del ácido glicosídico a través de la reacción con anhídrido acético y piridina (ver inciso 5.5.2). Posteriormente, se realizó la reacción de metilación del grupo carboxilo de la aglicona con diazometano. Una vez obtenido el producto peracetilado metilado del ácido glicosídico mayoritario (**1**), se requirió del empleo de la técnica de cromatografía líquida a escala analítica y preparativa para su purificación. Las condiciones instrumentales a nivel analítico (ver inciso 5.5.5.1) permitieron determinar la complejidad de la muestra y determinar los tiempos de retención correspondientes a los productos obtenidos de la hidrólisis alcalina de la fracción XII. Las condiciones más adecuadas fueron extrapoladas a nivel preparativo (5.5.5.2) con el fin de separar y purificar al derivado

mayoritario en cantidades suficientes para el análisis espectroscópico (RMN) y espectrométrico (MALDI-TOF). Así en la escala preparativa (**Figura 25**), se generaron dos picos minoritarios ($t_R = 10.13$ min y 13.20 min) y un pico mayoritario ($t_R = 11.7$ min). El pico mayoritario fue purificado a través de las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo, en combinación con el rasurado y el reciclaje del pico durante 14 ciclos (**Figura 26**). Posteriormente, se llevó a cabo la identificación estructural mediante resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Cabe resaltar, que en experimentos alternos se trató una pequeña alícuota de la mezcla de ácidos glicosídicos únicamente con diazometano para la preparación de los derivados metilados, los cuales fueron sometidos a análisis mediante cromatografía de líquidos (ver inciso 5.5.7). Los bajos rendimientos obtenidos para las muestras limitaron su caracterización únicamente al empleo de la espectrometría de masas MALDI (modo positivo). El registro de los iones pseudomoleculares permitió identificar al éster metílico del ácido operculínico A (**2**) (m/z $[M]^+$ 1032, $C_{47}H_{84}O_{24}$), y al éster metílico del ácido operculínico B (**3**) (m/z $[M]^+$ 1048, $C_{47}H_{84}O_{25}$) (**Figura 27**).

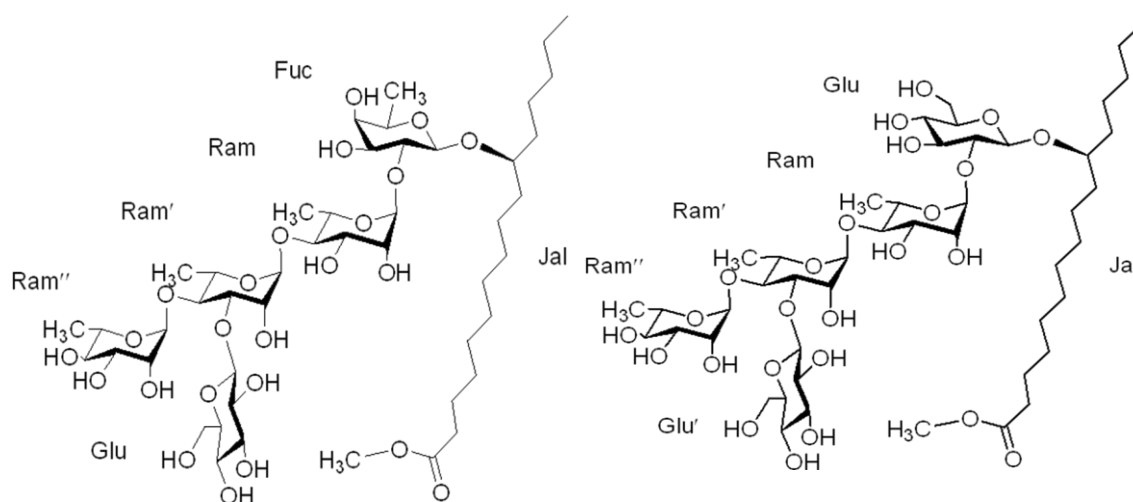


Figura 27. Estructura química de los ácidos operculínicos A (izquierda) y B (derecha) metilados

6.5 Identificación estructural del ácido glicosídico (1)

El análisis de los espectros unidimensionales (RMN ^1H y ^{13}C) del compuesto **1** permitió obtener información general acerca de la estructura del núcleo oligosacárido constitutivo de las resinas glicosídicas. Así, cinco señales de protones anoméricos fueron observadas en la región entre δ_{H} 4.99 – 5.70 ppm (**Figura 28**) que se encuentran correlacionando con cinco señales de carbono entre δ_{C} 97.8 y 100.2 ppm, confirmadas por la técnica de correlación heteronuclear ($^1J_{\text{C-H}}$) HSQC (**Figura 29**). De acuerdo a los patrones de acoplamiento observados para los protones de las unidades monosacáridas, se logró establecer su naturaleza. Así, la señal desplazada a δ_{H} 4.99 ppm posee un patrón de acoplamiento como un doblete ($^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz) que es característico de una unidad de D-fucosa.⁶ Adicionalmente, la señal a δ_{H} 5.22 ppm se presenta en forma de un doblete ($^3J_{\text{H-H}} = 7.5$ Hz) con el desplazamiento químico característico de una unidad de D-glucosa. Finalmente, las señales centradas en δ_{H} 5.35 ppm, δ_{H} 5.50 ppm y δ_{H} 5.70 ppm se presentaron como singuletes anchos generados por los protones anoméricos de las unidades de L-ramnosa. Otra característica importante, fue el número de señales dobles observadas entre δ_{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 fueron observados en esta región indicando la presencia de cuatro metilpentosas en el núcleo pentasacárido.

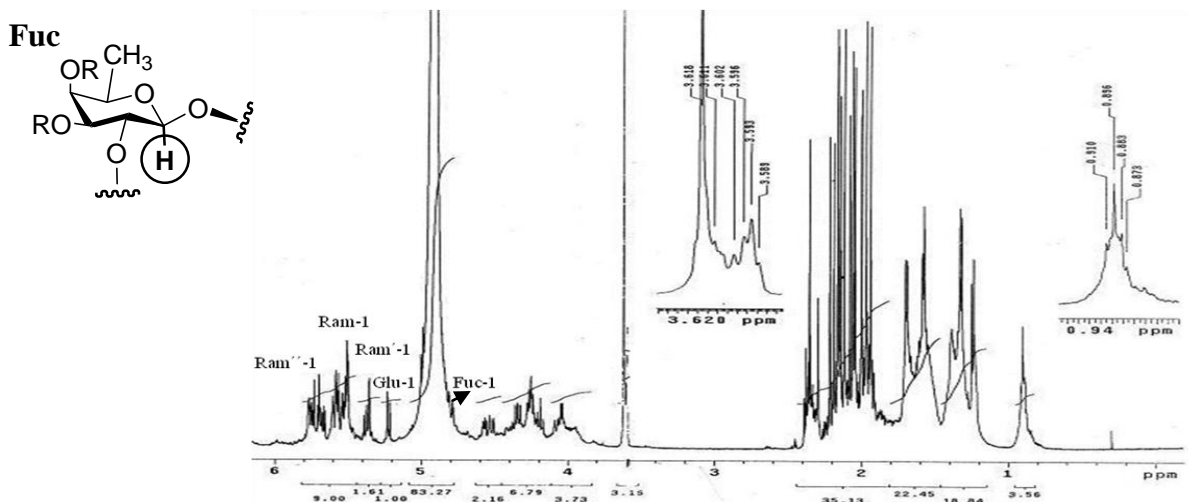


Figura 28. Espectro de RMN ^1H del peracetato del ácido glicosídico metilado

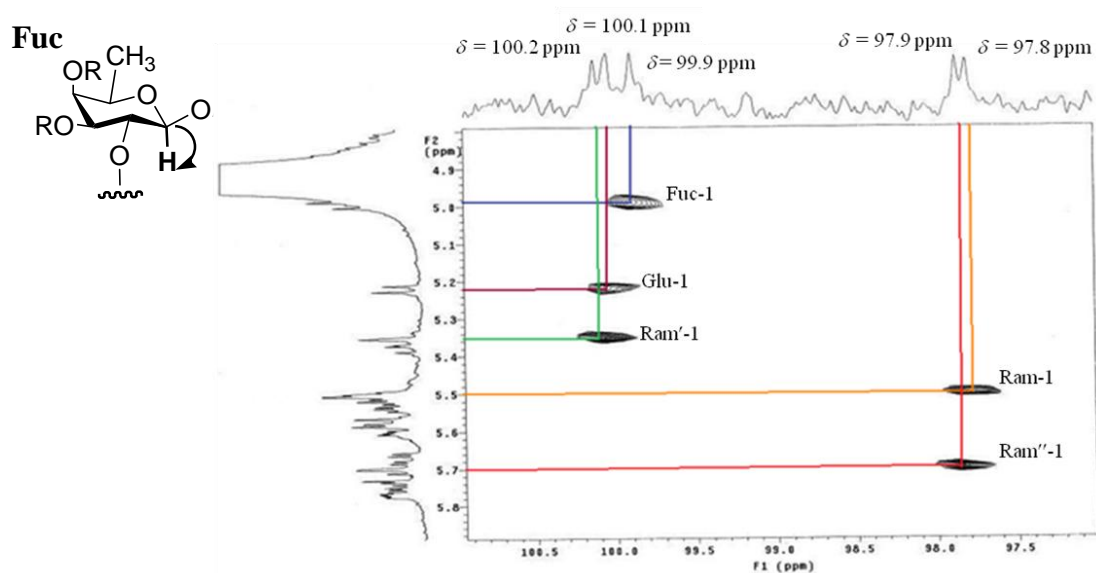


Figura 29. Región de señales anoméricas del espectro HSQC del peracetato del ácido glicosídico metilado

Con el auxilio de las técnicas espectroscópicas bidimensionales, como ^1H - ^1H COSY y TOCSY, se logró resolver la asignación de las señales para los metinos centrados entre δ_{H} 4.0-6.0 ppm y que son atribuibles a cada unidad monosacárida. A través de los patrones de acoplamiento ($J_{\text{H-H}}$) observados en cada unidad monosacárida se lograron confirmar los tres tipos de azúcares presentes como D-fucosa, D-glucosa y L-ramnosa. El procedimiento de asignación se inició con la identificación de las cinco señales anoméricas y su correlación con las señales para H_2 observadas a través de los cuadros de conectividad en el espectro COSY. 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_2 - H_3 , H_4 - H_5 y H_5 - H_6 en cada unidad monosacárida. Las señales mejor resueltas y diagnósticas fueron observadas para los protones H_2 y H_5 de fucosa (fuc), H_4 de ramnosa (ram), H_5 de la segunda y la tercera unidad de ramnosa (ram', ram'') y las señales H_2 , H_5 , H_{6a} y H_{6b} de la unidad de glucosa.

En los espectros COSY (**Figura 30**) y TOCSY (**Figura 31**) se indican las asignaciones para las resonancias de los protones de la porción oligosacárida. Sin embargo,

las resonancias correspondientes a los protones H₁-H₂, H₂-H₃ de la primera unidad de ramnosa (ram) y H₁-H₂, H₂-H₃, H₃-H₄ de la tercera unidad de ramnosa (ram'') no se aprecian con facilidad debido a la cercanía en sus desplazamientos químicos y a la sobreposición con otras señales.

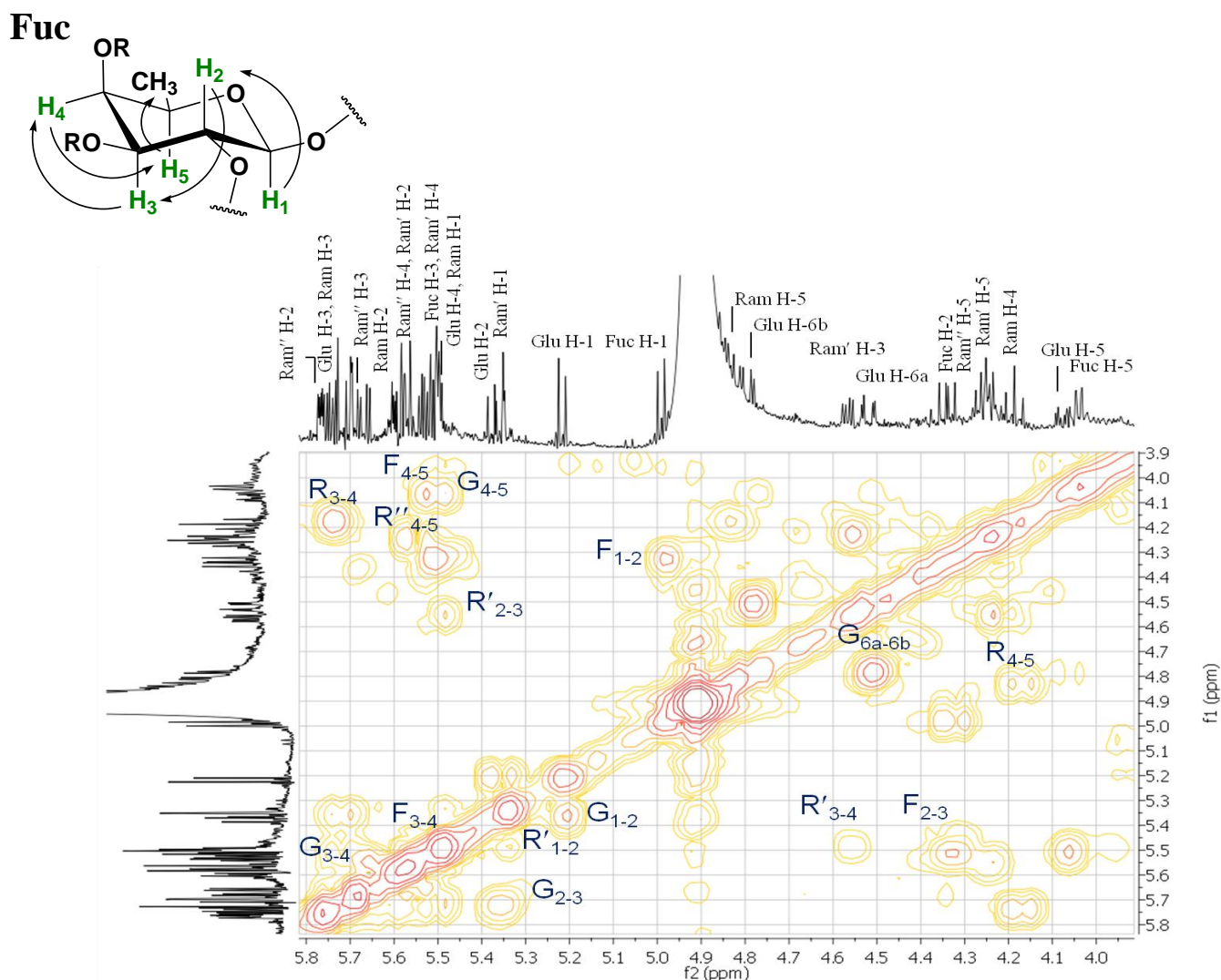


Figura 30. Espectro ^1H - ^1H COSY de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM. Correlaciones $^3J_{\text{H-H}}$: F₁₋₂; Fuc H₁-H₂, F₂₋₃; Fuc H₂-H₃, F₃₋₄; Fuc H₃-H₄, F₄₋₅; Fuc H₄-H₅, R₃₋₄; Ram H₃-H₄, R₄₋₅; Ram H₄-H₅, R'₁₋₂; Ram' H₁-H₂, R'₂₋₃; Ram' H₂-H₃, R'₃₋₄; Ram' H₃-H₄, R''₄₋₅; Ram'' H₄-H₅, G₁₋₂; Glu H₁-H₂, G₂₋₃; Glu H₂-H₃, G₃₋₄; Glu H₃-H₄, G_{6a-6b}; Glu H_{6a}-H_{6b}. Abreviaciones: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior, **Glu** = glucosa

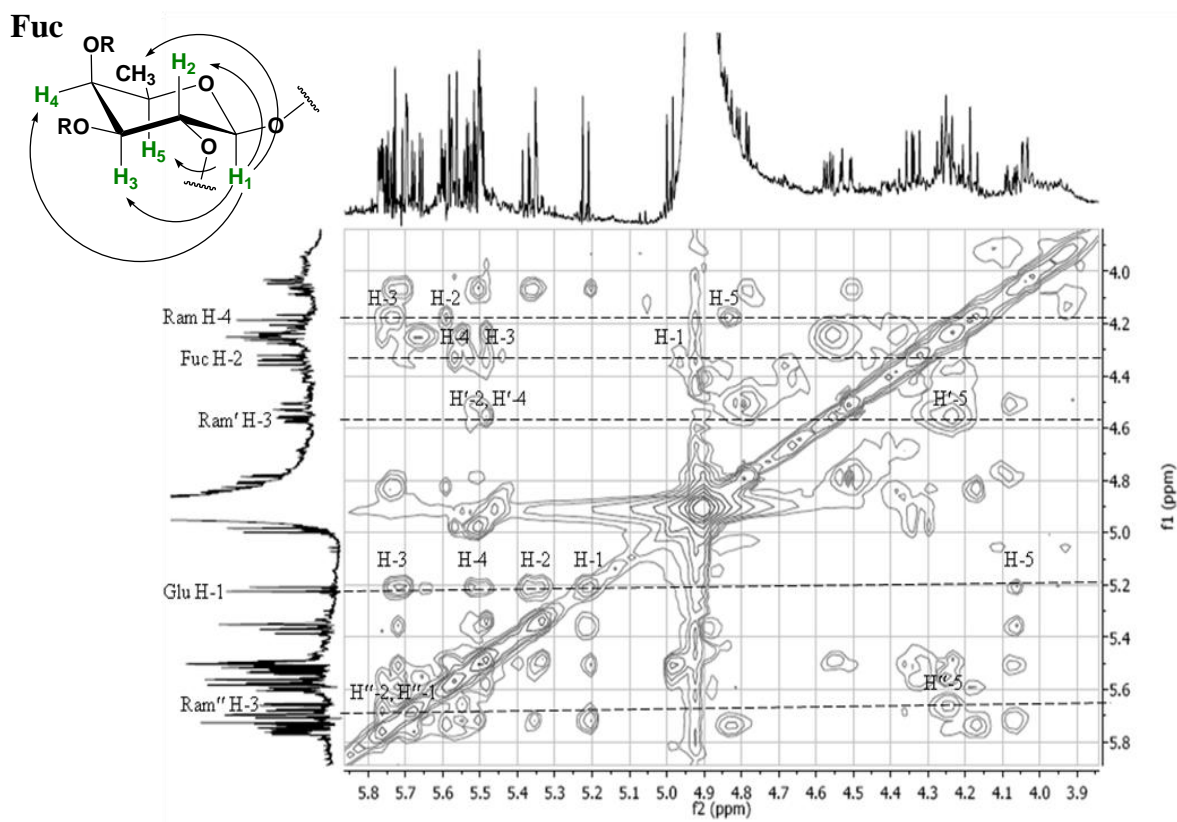


Figura 31. Espectro TOCSY de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM. Abreviaciones: Fuc = Fucosa, Ram = primera unidad de ramnosa, Ram' = segunda unidad de ramnosa, Ram'' = tercera unidad de ramnosa, Glu = Glucosa.

Por lo tanto, de los cinco azúcares que constituyen el núcleo pentasacárido, cuatro de ellos corresponden a metilpentosas o 6-desoxihexosas: tres unidades de L-ramnosa y una unidad de D-fucosa. La D-glucosa fue la única hexosa que se encontró constituyendo el núcleo pentasacárido. La correspondencia entre cada una de las resonancias protónicas con su átomo de carbono geminal se realizó a través del experimento de correlación heteronuclear HSQC ($^1J_{C-H}$). Así, 21 señales localizadas en la región del espectro de ^{13}C entre δ 60 – 80 ppm correspondieron a los carbonos oxigenados y diferentes a las cinco señales diagnósticas de los carbonos anoméricos entre δ 95- 110 ppm (**Figura 32**).

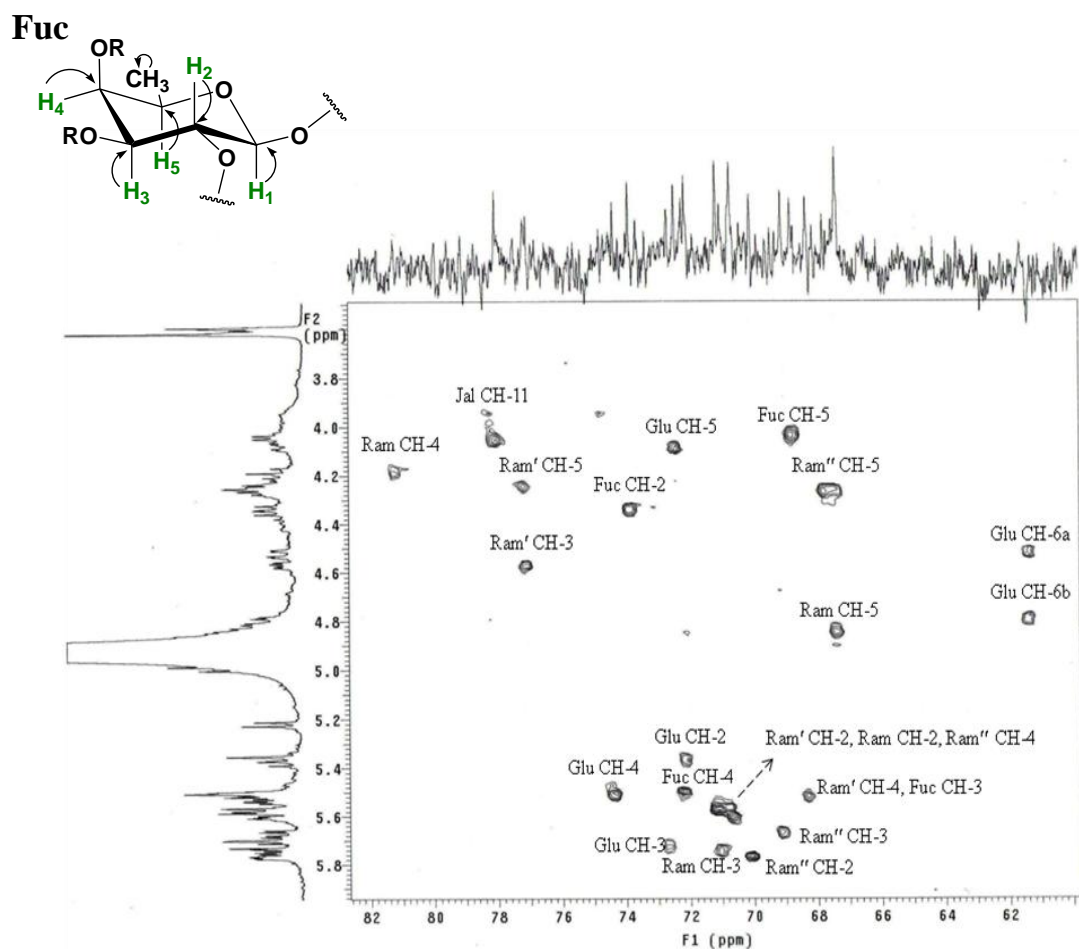


Figura 32. Espectro HSQC de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM. Correlaciones $^1J_{C-H}$, Abreviaciones: Fuc = Fucosa, Ram = primera unidad de ramnosa, Ram' = segunda unidad de ramnosa, Ram'' = tercera unidad de ramnosa, Glu = Glucosa.

El **cuadro 6** muestra los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento correspondientes a los protones de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida del derivado peracetilado-metilado del ácido glicosídico XII-HAM.

Cuadro 6. Constantes espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) del derivado XII-HAM^a

Posición ^b	δH	δC
fuc-1	4.99 d (7.5)	99.9
2	4.34 dd (9.5, 7.5)	73.9
3	5.50 dd (9.5, 3.0)	68.4
4	5.53 d (3.0)	72.1
5	4.04 dd (6.5, 0.5)	68.8
6	1.24 d (6.5)	16.0
ram-1	5.50 brs	97.8
2	5.60 dd (3.0, 1.5)	70.7
3	5.74 dd (9.5, 2.5)	71.0
4	4.19 dd (10.0, 9.5)	81.3
5	4.84 dq (9.5, 6.5)	67.4
6	1.69 d (6.0)	18.1
ram'-1	5.35 brs	100.2
2	5.53 m	71.2
3	4.56 dd (8.0, 3.5)	77.1
4	5.50 m*	68.4
5	4.25 dd (6.0, 10)	77.2
6	1.57 d (5.5)	18.4
ram''-1	5.70 brs	97.9
2	5.77 dd (3.5, 1.5)	70.0
3	5.67 dd (10.5, 3.5)	69.0
4	5.57 m	70.7
5	4.26 dd (10, 6.5)	67.4
6	1.32 d (6.5)	17.2
glu-1	5.22 d (7.5)	100.1
2	5.37 t (9.5)	72.1
3	5.73 t (9.5)	72.8
4	5.50 t (9.5)	74.4
5	4.08 ddd (10.5, 3.0, 3.0)	72.5
6a	4.51 dd (12.5, 2.5)	61.7
6b	4.80 dd (12.5, 3.5)	
jal-1		174.0
2	2.37 t (7.5)	34.0
11	4.0-4.1 m	78.0
16	0.90 t (7.0)	14.0
OCH ₃	3.6 s	52.0

^aDatos registrados a 500 MHz para RMN ^1H y a 125.7 MHz para RMN ^{13}C en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. 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. Los patrones de acoplamiento están expresados como: 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 ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMOC, HMBC).

^bAbreviaciones: fuc = fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanoilo.

Posteriormente, se identificó la secuencia de glicosidación a través de las correlaciones heteronucleares C-H ($^3J_{C-H}$) mediante el experimento HMBC (**Figura 33**). Este procedimiento se realizó considerando aquellas señales desplazadas por arriba de δ_H 5.3 ppm que indicaban la acetilación de los grupos hidroxilo del núcleo oligosacárido. El efecto desprotector del grupo acetato permitió la distinción de 12 posiciones acetiladas del núcleo pentasacárido. También, se observaron claramente 12 señales correspondientes a los metilos de grupos acetilo entre δ_H 2.0 – 2.2 ppm. Estos resultados permiten concluir que todos los grupos hidroxilo disponibles del núcleo oligosacárido original fueron convertidos en grupos acetoxilo y que aquellos desplazamientos químicos que aparecieron por debajo de δ_H 5.0 ppm indicaban las respectivas posiciones de glicosidación, ya que estas posiciones al igual que las anoméricas se encuentran inhabilitadas a la reacción de acetilación por estar formando el grupo acetal de la piranosas. Con estas evidencias, se estableció la secuencia de glicosidación para el compuesto a partir de las principales conectividades observadas en el espectro HMBC: $H_1\text{Fuc}-C_{11}\text{Jal}$, $H_1\text{Ram}-C_2\text{Fuc}$, $H_1\text{Ram}'-C_4\text{Ram}$, $H_1\text{Ram}''-C_4\text{Ram}'$, $H_1\text{Gluc}-C_3\text{Ram}'$ (**Figura 33**).

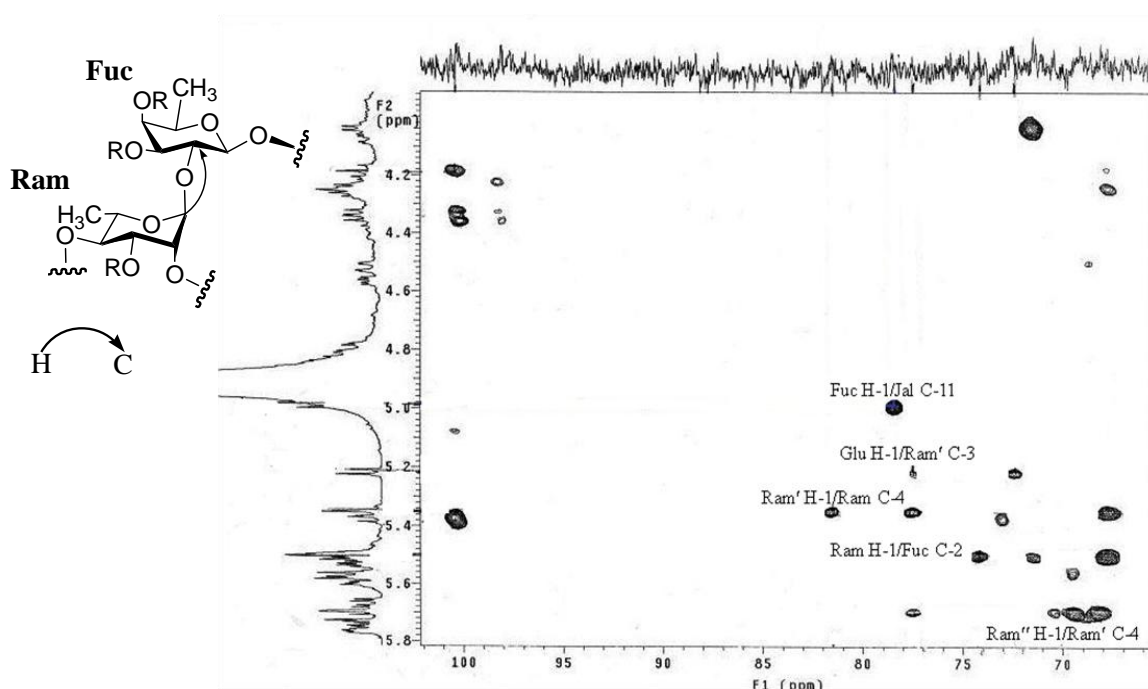


Figura 33. Espectro HMBC de la porción oligosacárida del ácido glicosídico XII-HAM. Correlaciones $^3J_{C-H}$, para la identificación de la secuencia de glicosidación.

La estructura del ácido glicosídico mayoritario fue identificado como el ácido operculínico A: 11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico (**Figura 34**). Este ácido glicosídico ha sido aislado en las especies *Ipomoea batatas*^{22,46}, *I. digitata*²³, *I. intrapilosa*²⁴, *I. leptophylla*²⁵, *I. mammosa*²⁶, *I. murucoides*^{12,27}, *I. operculata*^{28,29}, *I. stolonifera*³⁰, *I. quamoclit*³¹, y *Merremia hungaiensis*³².

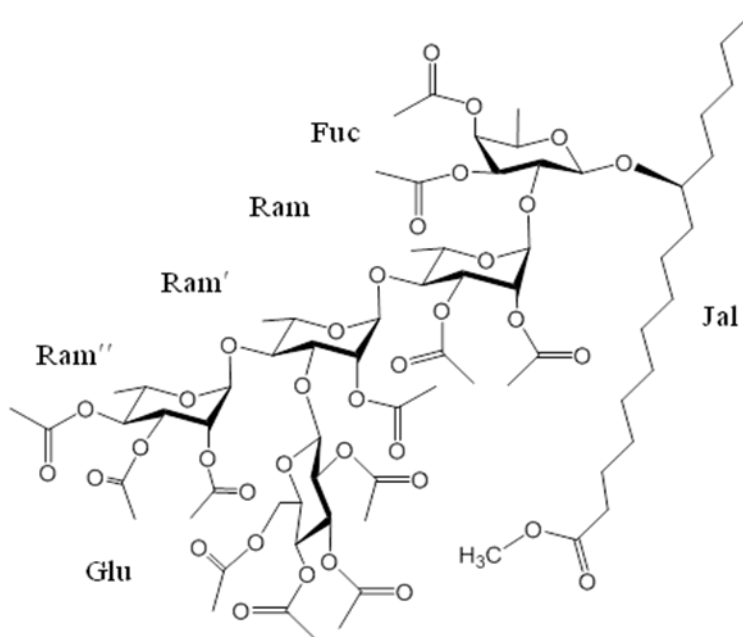


Figura 34. Estructura química del derivado peracetilado-metilado del ácido glicosídico mayoritario XII-HAM. Abreviaciones: **Fuc** = Fucosa, **Ram** = primera unidad de ramnosa, **Ram'** = segunda unidad de ramnosa, **Ram''** = tercera unidad de ramnosa, **Glu** = Glucosa.

El derivado peracetilado-metilado del ácido operculínico A (**1**) se analizó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF en modo positivo. El espectro de masas de este compuesto permitió confirmar una fórmula molecular de $C_{71}H_{108}O_{36}$ debido a la detección del ion pseudomolecular $[M + Na]^+$ de m/z 1559. El espectro de masas muestra los picos correspondientes a las fragmentaciones atribuibles a las eliminaciones de los grupos acetato ($-C_2H_2O$, 42 uma) (**Figura 35**).

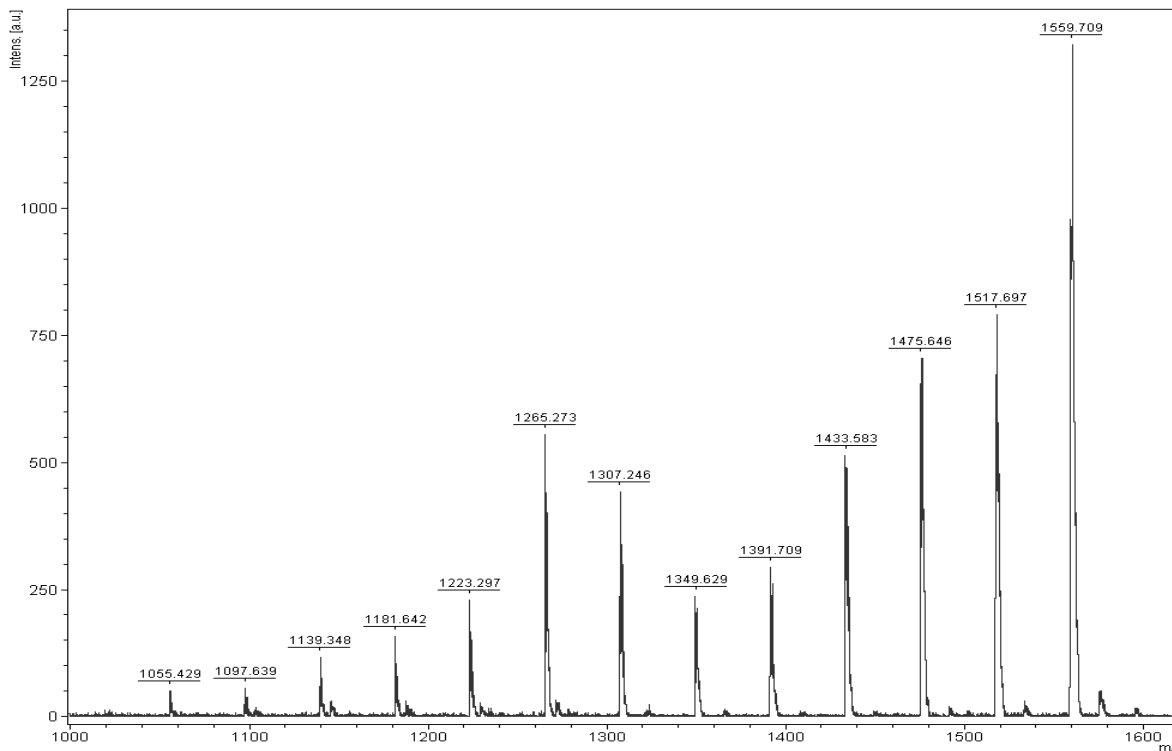


Figura 35. Espectro de masas MALDI-TOF en modo positivo del ácido operculínico A peracetilado metilado

6.6 Aislamiento y purificación de los compuestos 4-10

6.6.1 Extracción y fraccionamiento

El proceso de extracción con cloroformo de las partes aéreas de *I. purga* permitió obtener 21.5 g de extracto, el cual fue fraccionado de manera preliminar mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. El fraccionamiento se llevó a cabo con disolventes en diferentes proporciones en un gradiente de polaridad creciente: hexano-CHCl₃, CHCl₃-Me₂CO y Me₂CO-MeOH. Esta separación permitió la obtención de 20 fracciones primarias. La fracción XII se sometió a un tratamiento de decoloración con carbón activado para la eliminación de los pigmentos y fue analizada por cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE).

6.6.2 Análisis por CLAE de la fracción XII

Después de la obtención de las fracciones ricas en resinas glicosídicas, se procedió a realizar las pruebas de purificación a nivel analítico en la cromatografía de líquidos de alta eficiencia con la fracción XII. Inicialmente, éstas se realizaron en fase inversa usándose una columna C₁₈, con un sistema de detección con índice de refracción y diferentes sistemas de disolventes hasta encontrar las condiciones de elución más adecuadas que permitieran conseguir la mejor resolución de la mezcla compleja. La elución se inició con acetonitrilo, lo que permitió detectar un conjunto de picos con tiempos de retención desde 50 min hasta 100 min. Con el propósito de disminuir estos tiempos de retención, se decidió emplear mezclas binarias de acetonitrilo-metanol en diferentes proporciones (9:1, 7:3, 1:1, 3:7) y metanol. El sistema de elución que permitió la mejor resolución fue con metanol en donde se observó un conjunto de picos con tiempos de retención entre 10 min y 30 min. Así, se detectaron 8 picos mayoritarios designados arbitrariamente como subfracciones A: t_R 14.09 min, B: t_R 15.36 min, C: t_R 16.7 min, D: t_R 18.3 min, E: t_R 19.21 min, F: t_R 21.77 min, G: t_R 23.97 min y H: t_R 26.17 min (**Figura 36**). El análisis de la muestra a nivel preparativo permitió el registro del cromatograma que reprodujo el mismo número de picos: A: t_R 16.6 min, B: t_R 18.2 min, C: t_R 19.9 min, D: t_R 22 min, E: t_R 26.6 min, F: t_R 29.4 min, G: t_R 32.5 min (**Figura 37**).

Una vez que fueron establecidas las condiciones de separación, se llevaron a cabo inyecciones a nivel preparativo de aproximadamente 50 mg de muestra disueltos en 500 μ L de disolvente, empleando la técnica de sobrecarga de columna y corte de núcleo hasta agotar esta fracción y reunir cantidades suficientes de las subfracciones A-G. Cada subfracción se reinyectó de manera independiente y utilizando las técnicas de “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra” se procedió con el reciclaje para lograr la purificación total de los constituyentes individuales.

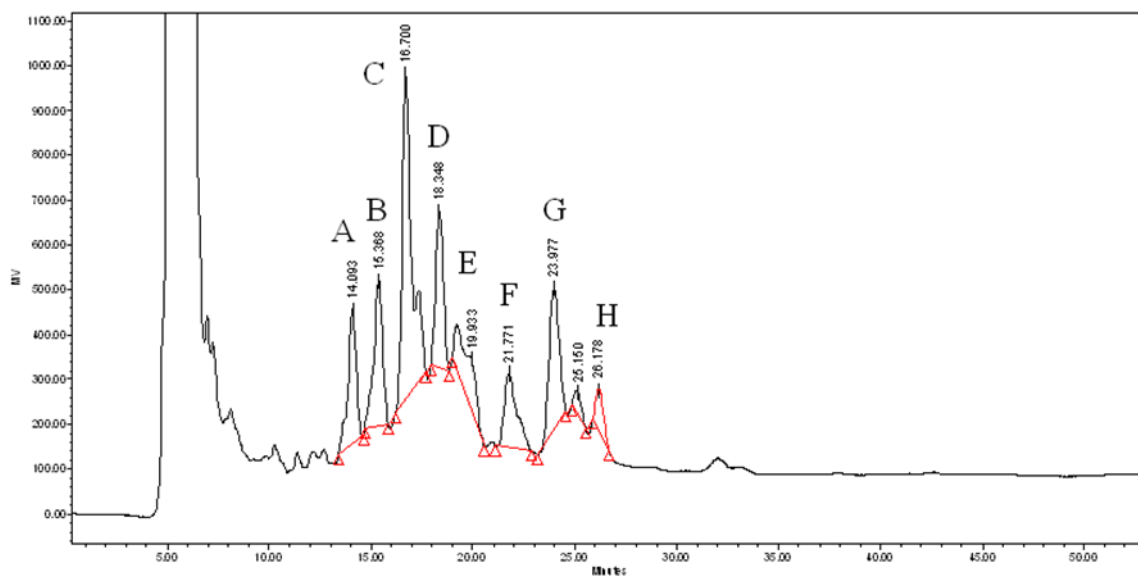


Figura 36. Cromatograma de líquidos a nivel analítico de la fracción XII. Condiciones instrumentales: Columna C_{18} (4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$); fase móvil: MeOH, flujo de elución: 0.4 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: $10 \mu\text{L}$ ($2 \text{ mg}/100 \mu\text{L}$)

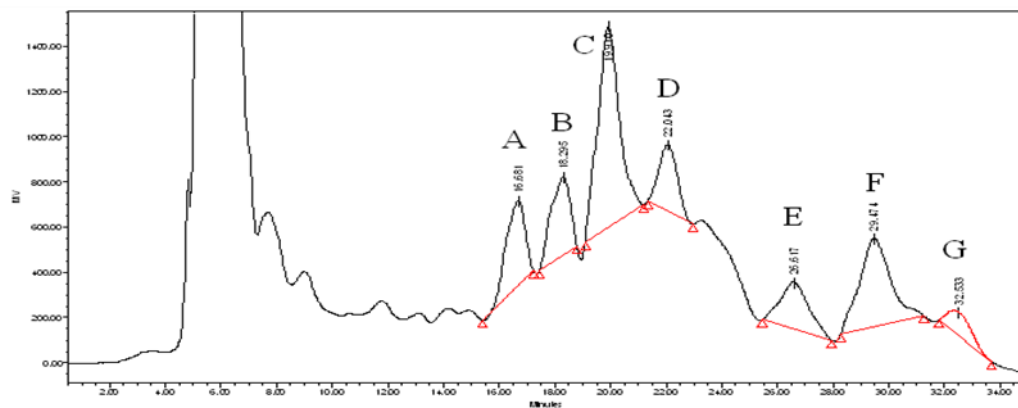


Figura 37. Cromatograma de líquidos de la fracción XII a escala preparativa. Condiciones instrumentales: Columna C_{18} (19×300 mm, $7 \mu\text{m}$); fase móvil: MeOH, flujo de elución: 8.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: $500 \mu\text{L}$ ($50 \text{ mg}/500 \mu\text{L}$)

6.6.3 Purificación de los glicolípidos individuales

El reciclaje de las muestras **A**, **B**, **C**, **D** y **E** permitió la purificación de los compuestos **4-10** (**Figura 38**). Cabe mencionar que aunque las condiciones descritas fueron aplicadas para una adecuada purificación de las subfracciones, se decidió aumentar la velocidad de flujo y, de esta forma, disminuir el tiempo de retención para la purificación de la subfracción **E** de 26.6 a 23.7 min. Adicionalmente, es importante resaltar que durante el proceso de reciclaje de la subfracción **D** se generaron dos picos de los cuales se logró la resolución de dos principios oligosacáridos, el purginósido II y III (compuestos **5** y **6**). El reciclaje de uno de los picos minoritarios de la subfracción **D**, permitió el aislamiento del purginósido IV (compuesto **7**).

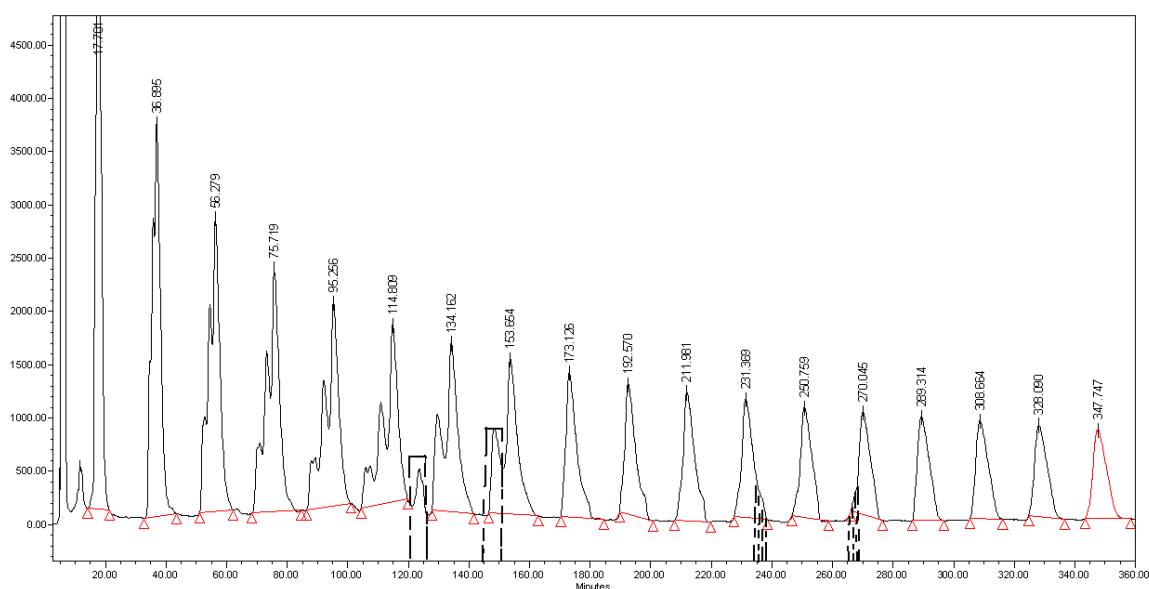


Figura 38. Purificación del pico **B**, a través de la técnica de “rasurado de pico” y “reciclaje de muestra”. Condiciones instrumentales: Columna C_{18} (19 × 300 mm, 7 μ m); fase móvil: MeOH, flujo de elución: 8.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: 500 μ L (50 mg/500 μ L).

Como resultado de la resolución de las subfracciones A-E, a través de las técnicas de “rasurado de pico” y “reciclaje de la muestra”, se logró el aislamiento de siete principios oligosacáridos distintos denominados los purginósidos **I-IV** (**4-7**) aislados de las subfracciones C y D y las purginas **I-III** (**8-10**) aisladas de las subfracciones A, B y E,

cuyas estructuras químicas fueron identificadas como dímeros del ácido operculínico A y B.

6.7 Caracterización de la estructura química de los purginósidos I-IV

Cada una de las muestras purificadas **A, B, C, D, D1, D2** y **E** fueron analizadas para caracterizar sus estructuras químicas mediante el empleo de diferentes técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas. Los espectros unidimensionales de protón RMN ^1H (**Figura 39**) y carbono RMN ^{13}C (**Figura 40**) proporcionaron una información general acerca de las estructuras químicas. Así, el análisis de los espectros por RMN ^{13}C permitió determinar el número de señales anoméricas en la región comprendida entre δ_{C} 95 - 110 ppm, que indicaron el número de monosacáridos que se encuentran constituyendo el núcleo oligosacárido en estas moléculas. Las resonancias de protón correspondientes a las señales anoméricas en el espectro RMN ^1H fueron identificadas por el experimento HSQC que permitió la correlación C-H a un enlace de distancia ($^1J_{\text{CH}}$). Una vez que se determinaron las señales de los protones anoméricos, se analizaron sus multiplicidades para identificar el tipo de azúcar mediante los patrones de acoplamiento. De esta forma, las señales que se presentaron como singuletes anchos fueron atribuidas a las unidades monosacáridas de L-ramnosa y las señales anoméricas que se presentaron como dobletes con constantes de acoplamiento de 7.5 Hz ($^3J_{\text{H-H}}$) fueron atribuibles a la unidad de D-fucosa, cuya presencia se confirmó mediante la señal generada por el protón localizado en el carbono C₅ como un cuarteto con constantes de acoplamiento de 6.5 Hz ($^3J_{\text{H-H}}$) y centrada en δ_{H} 3.7 ppm.

Las señales anoméricas correspondientes a las unidades de D-glucosa se asignaron debido a su multiplicidad como dobletes con constantes de acoplamiento de 7.5 Hz ($^3J_{\text{H-H}}$). Todas las señales vecinales a los protones anoméricos de estas unidades presentaron concordancia con las características determinadas por los patrones de acoplamiento como doblete de dobletes (pseudo-tripletes) con constantes de acoplamiento aproximadamente de 9.5 Hz ($^3J_{\text{H-H}}$) y que resultan de la orientación ecuatorial de los sustituyentes en el anillo glucopiranósido.⁵

Por lo tanto, los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ^1H) para los compuestos **4-7**, mostraron una señal generada para una fucosa, tres señales generadas para los protones anoméricos de las unidades de ramnosa y una señal atribuible a la unidad de glucosa. Adicionalmente, se observaron cuatro dobletes localizados entre δ_{H} 1.4 – 1.6 ppm correspondientes a los metilos de las unidades de metilpentosa en las estructuras. Al considerar, que los núcleos oligosacáridos están compuestos por cinco unidades de azúcar, cuatro metilpentosas (tres ramnosas y una fucosa) y una hexosa (la glucosa), se recurrió al uso de las técnicas bidimensionales en la RMN (^1H - ^1H COSY y TOCSY) para la asignación de las señales restantes de cada uno de los protones metinos en cada monosacárido.

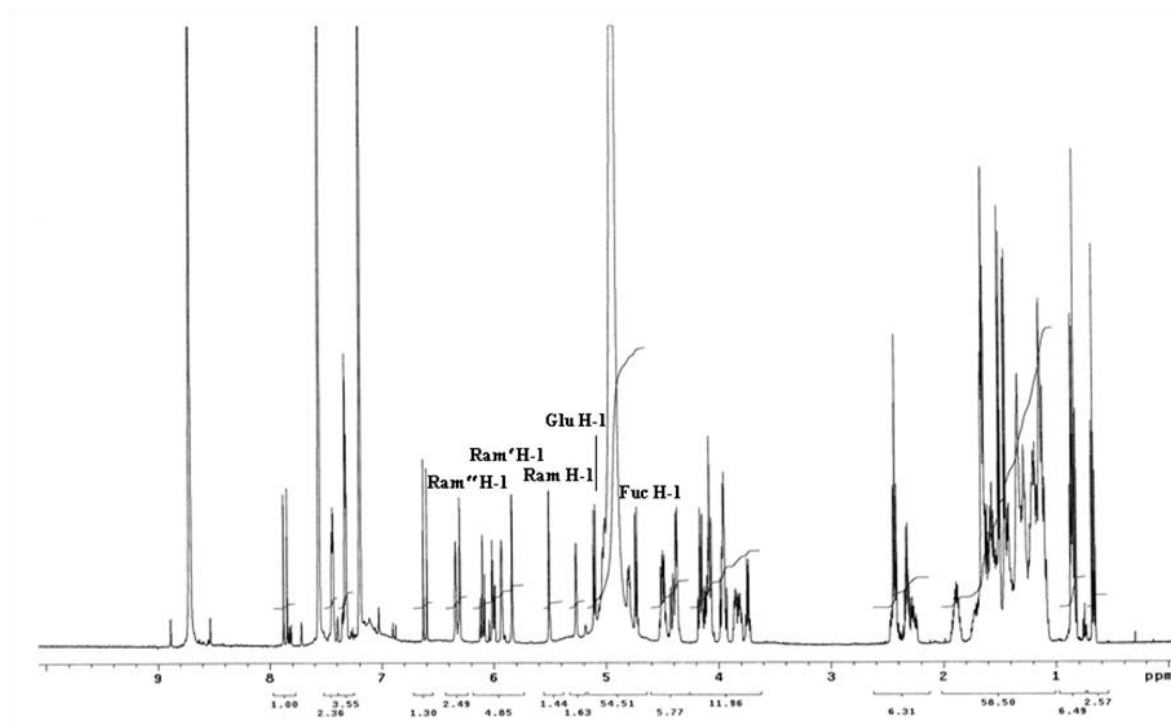


Figura 39. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido II (**5**)

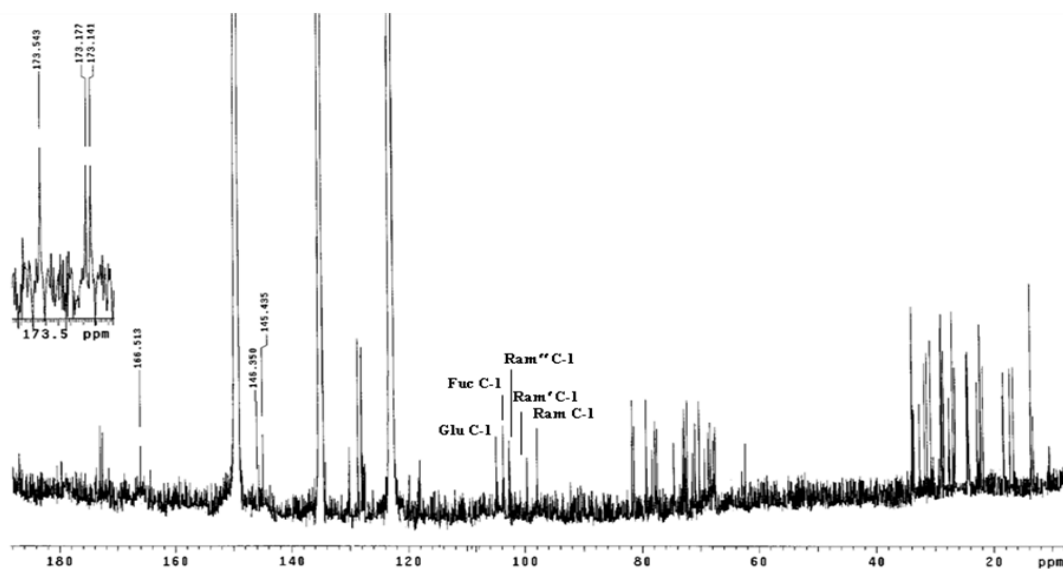


Figura 40. Espectro de RMN ^{13}C (125.7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido II (5)

6.7.1 Empleo de la RMN: COSY y TOCSY

El procedimiento de asignación de señales mediante estas técnicas se inicia 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 correspondiente a lo largo de toda la unidad sacárida. Es importante mencionar que para la identificación se tiene en cuenta la localización de las señales mejores resueltas, e.g., H_5 de la fucosa, H_3 de la primera unidad de ramnosa (ram) y H_2 de la tercera unidad de ramnosa (ram''), las cuales facilitan el diagnóstico para su asignación correcta, en especial en aquellos casos donde los protones vecinos a estos protones fácilmente identificables se encuentran localizados en regiones con sobreposición de señales. En los casos, donde se observa un desplazamiento de protón por arriba de δ_{H} 5.5 ppm, indica una posición de esterificación en el carbono correspondiente, como se detalló en la sección 6.5. Así, en el espectro mostrado en la **Figura 41** atribuible al purginósido II (5), se observa que el protón anomérico H_1 de la primera unidad de ramnosa (ram) establece su cuadro de conectividad con el H_2 , cuyo desplazamiento se encuentra en δ_{H} 5.9 ppm, indicando claramente una posición de esterificación en el C_2 de esta unidad de azúcar. Siguiendo el mismo razonamiento, se localizaron los sitios restantes de acilación en

el carbono C₂ de la segunda ramnosa (ram') y en las posiciones C₃ y C₄ de la tercera unidad de ramnosa (ram'').

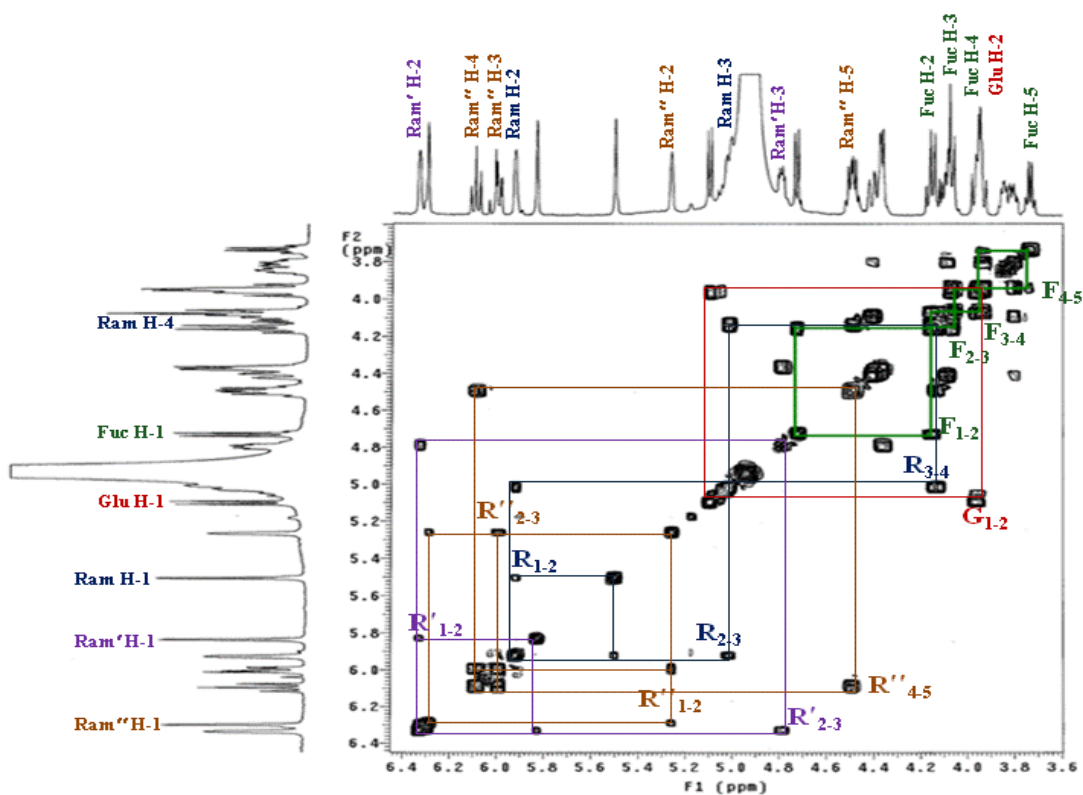


Figura 41. Espectro ^1H - ^1H COSY del purginósido II (5). Sección de la porción oligosacárida. Correlaciones ($^3J_{\text{H-H}}$): F₁₋₂; Fuc H₁-H₂, F₂₋₃; Fuc H₂-H₃, F₃₋₄; Fuc H₃-H₄, F₄₋₅; Fuc H₄-H₅, R₁₋₂; Ram H₁-H₂, R₂₋₃; Ram H₃-H₄, R₃₋₄; Ram H₃-H₄, R'₁₋₂; Ram' H₁-H₂, R'₂₋₃; Ram' H₂-H₃, R''₁₋₂; Ram'' H₁-H₂, R''₂₋₃; Ram'' H₂-H₃, R''₄₋₅; Ram'' H₄-H₅, G₁₋₂; Glu H₁-H₂. Abreviaciones: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior, **Glu** = glucosa.

La identificación de las señales que indican las posiciones de esterificación en los purginósidos I (4), III (6) y IV (7) fueron establecidas siguiendo el mismo procedimiento descrito para el purginósido II (5). Así, para el purginósido I (Figura 42), se encontró a un desplazamiento a campo bajo al protón H₂ (δ_{H} 5.92 ppm) de la primera unidad de ramnosa, de la misma forma que se localizó al protón H₂ (δ_{H} 6.26 ppm) de la segunda ramnosa (ram') y a los protones H₂ (δ_{H} 6.28 ppm) y H₄ (δ_{H} 5.80 ppm) de la unidad de ramnosa terminal (ram''); y para el purginósido IV (7) (Figura 43), solamente se encontraron los protones H₂

de la primera y segunda unidad de ramnosa y H₄ de la ramnosa terminal localizados arriba de 6.0 ppm.

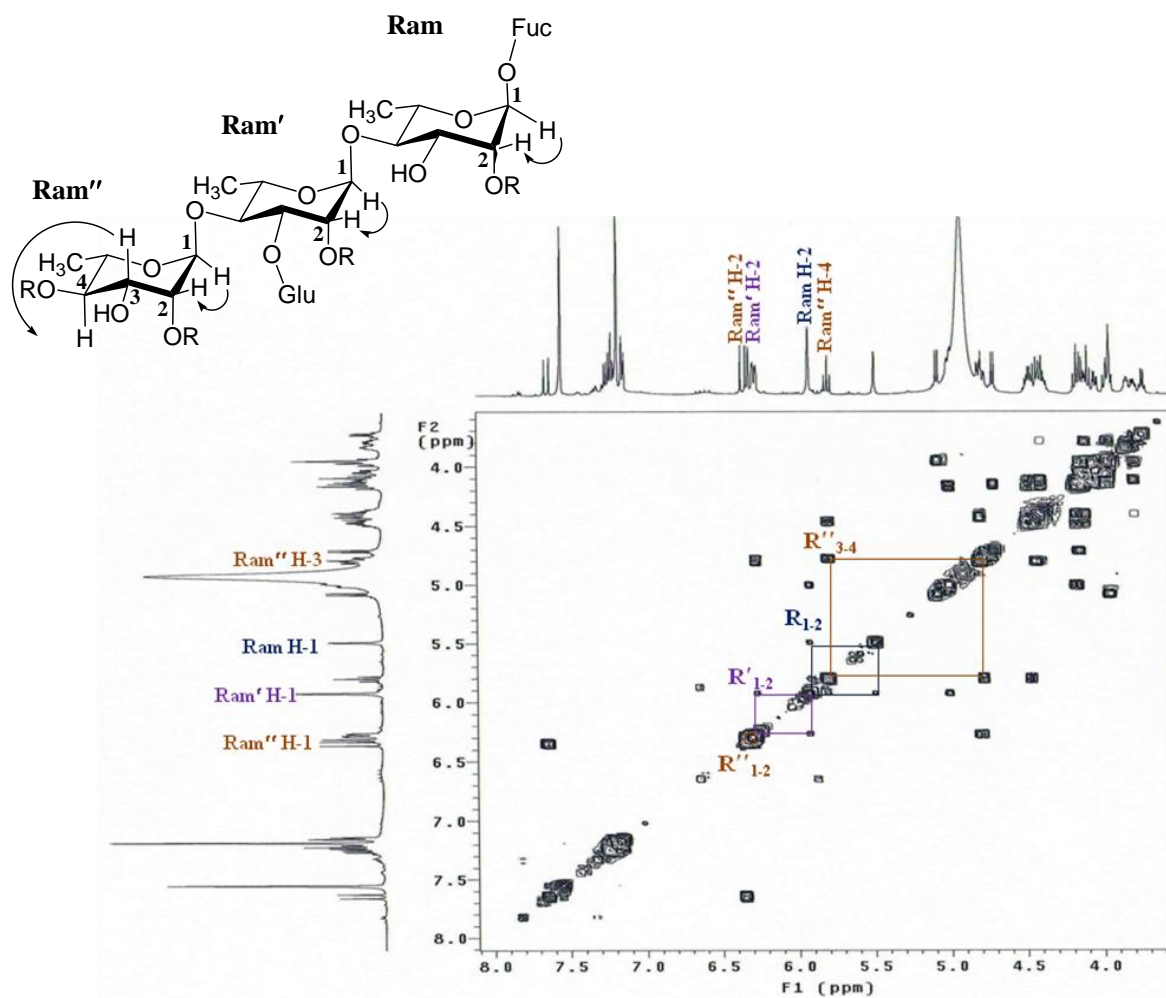


Figura 42. Espectro ^1H - ^1H COSY del purginósido I (4). Sección de la porción oligosacárida donde se localizan protones a campo bajo, debido al efecto desprotector de los residuos acilantes. Correlaciones ($^3J_{\text{H-H}}$): \mathbf{R}_{1-2} ; Ram H₁-H₂, \mathbf{R}'_{1-2} ; Ram' H₁-H₂, \mathbf{R}''_{1-2} ; Ram'' H₁-H₂, \mathbf{R}''_{3-4} ; Ram'' H₃-H₄

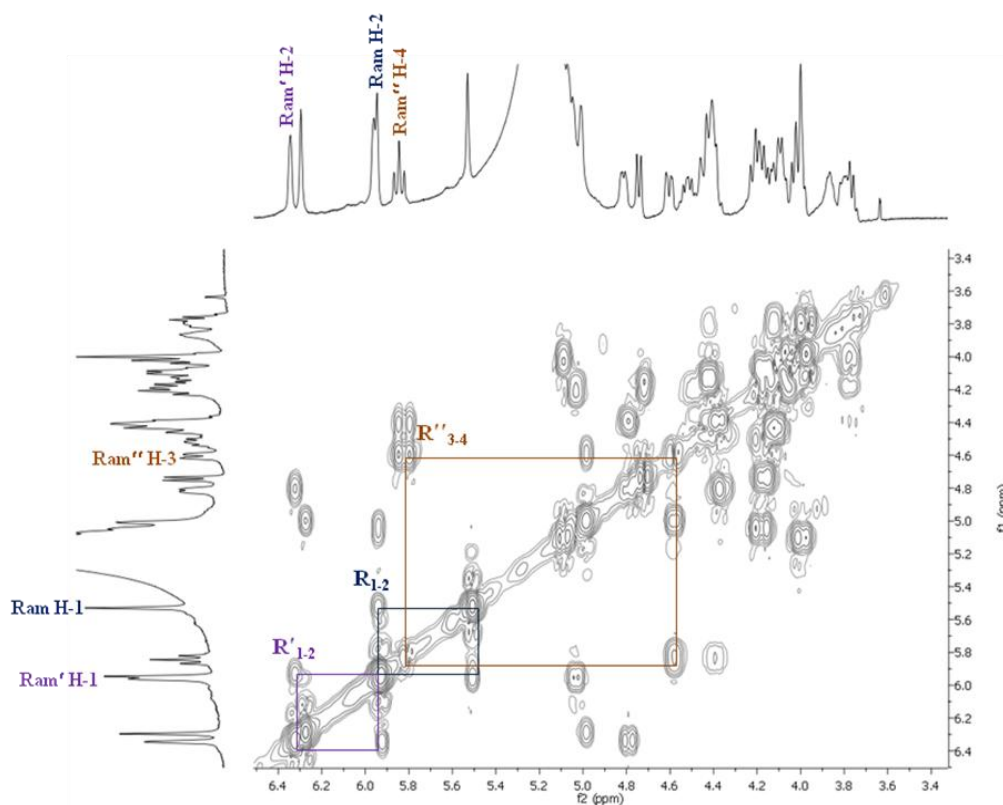


Figura 43. Espectro ^1H - ^1H COSY del purginósido IV (7). Sección de la porción oligosacárida donde se localizan protones a campo bajo, debido al efecto desprotector por sustituyentes éster. Correlaciones ($^3J_{\text{H-H}}$): $\mathbf{R}_{1,2}$; Ram H₁-H₂, $\mathbf{R}'_{1,2}$; Ram' H₁-H₂, $\mathbf{R}''_{3,4}$; Ram'' H₃-H₄

El empleo de la técnica bidimensional de correlación homonuclear TOCSY permite determinar las interacciones vecinales, así como las correlaciones a larga distancia ^1H - ^1H entre los protones de una unidad monosacárida, siendo de gran utilidad cuando existe sobreposición de señales localizadas entre δ_{H} 3.70 – 4.20 y 4.40 – 4.60 ppm. El procedimiento de asignación de señales mediante el empleo de la técnica TOCSY, se complementa con las señales espectroscópicas asignadas a través del espectro COSY, que de igual manera, se inicia con las posiciones de los protones anoméricos o cualquier señal oligosacárida diagnóstica y resuelta en el espectro, siguiendo en línea recta las señales de conectividad que determinan las interacciones con todos los protones pertenecientes a cada unidad de azúcar, así se realizó la asignación inequívoca de las señales de cada una unidad

sacárida específica. La **Figura 44** ilustra los cuadros de conectividad identificados para la unidad de fucosa del purginósido II (**5**).

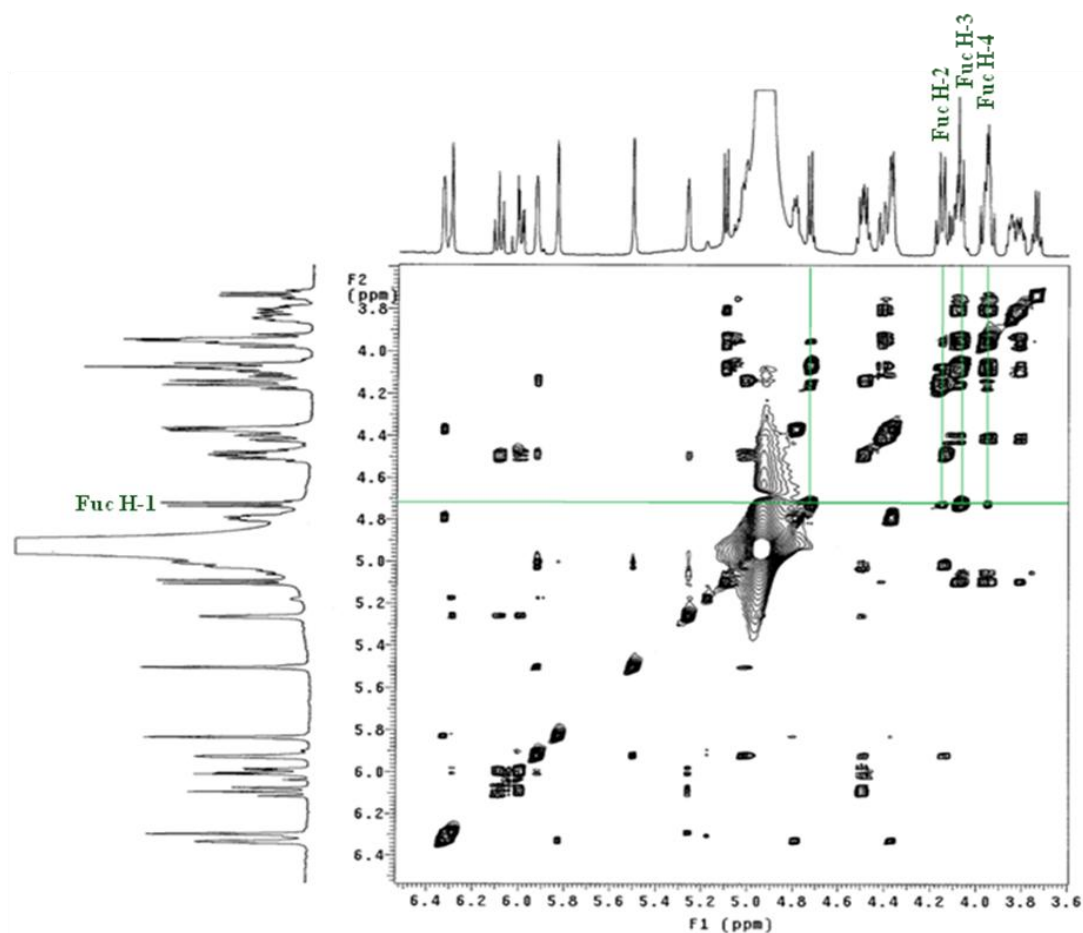


Figura 44. Espectro TOCSY del purginósido II (5). Sección de la porción oligosacárida
Correlaciones (J_{H-H}), Abreviaciones: Fuc = fucosa

En el espectro TOCSY para el purginósido II (**Figura 45**), se observaron cuatro protones que corresponden a posiciones de esterificación: H_2 (δ_H 5.91 ppm) de la primera unidad de ramnosa (ram); H_2 (δ_H 6.32 ppm) de la segunda unidad de ramnosa (ram'); H_3 (δ_H 5.98 ppm) y H_4 (δ_H 6.08 ppm) de la tercera unidad de ramnosa (ram'').

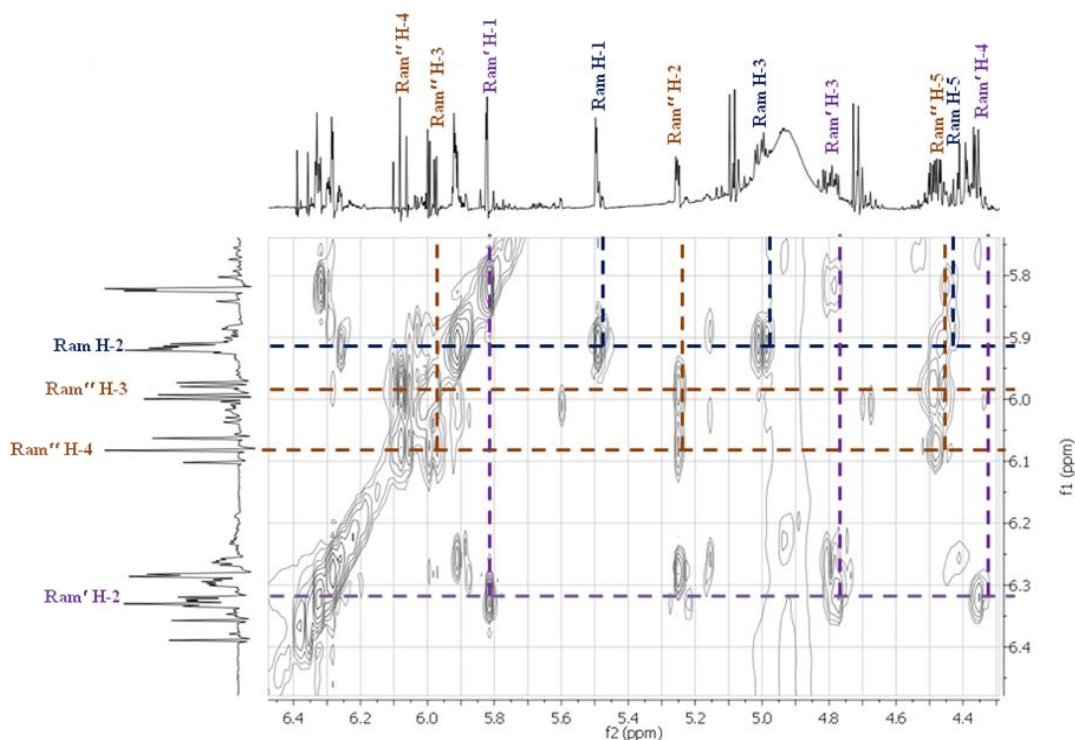


Figura 45. Espectro TOCSY del purginósido II (5). Sección de la porción oligosacárida Correlaciones (J_{H-H}), Abreviaciones: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior.

Los desplazamientos químicos correspondientes a los protones del núcleo oligosacárido y de las agliconas de cada uno de los purginósidos **4-7** que fueron asignados mediante la técnica de RMN ^1H se incluyen en el **cuadro 7**.

6.7.2 Empleo de la RMN: HSQC

Después de llevar a cabo la identificación de los protones correspondientes a las unidades sacáridas a través de las técnicas RMN ^1H bidimensionales (COSY y TOCSY), se procedió con la asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los protones oligosacáridos mediante la técnica de RMN bidimensional heteronuclear ^{13}C - ^1H a un enlace de distancia ($^1J_{C-H}$) HSQC.

Cuadro 7. Datos espectroscópicos en la RMN ¹H para los purginósidos I-IV (4-7)^a.

Protón ^b	Purginósido I (2)	Purginósido II (3)	Purginósido III (4)	Purginósido IV (5)
Fuc-1	4.70 d (7.0)	4.72 d (7.5)	4.73 d (7.5)	4.74 d (7.2)
2	4.12 dd (9.5, 7.0)	4.14 dd (9.5, 7.5)	4.17 dd (9.5, 7.5)	4.15 dd (9.5, 7.2)
3	4.03 dd (9.5, 3.5)	4.03 dd (9.5, 3.5)	4.04 dd (7.0, 2.5)	4.05*
4	3.94 brs	3.94 brs	3.95 brs	3.98 brs
5	3.72 q (6.5)	3.72 q (6.0)	3.74 q (6.0)	3.77 q (6.0)
6	1.49 d (6.0)	1.48 d (6.0)	1.49 d (6.5)	1.45 d (6.0)
Ram-1	5.49 d (1.5)	5.49 d (1.5)	5.50 d (1.5)	5.53 brs
2	5.92 brs	5.91 dd (3.0, 1.5)	5.92 dd (3.0, 1.5)	5.96 brs
3	5.0 dd (9.5, 3.5)	5.01 dd (9.5, 3.0)	5.02 dd (9.5, 3.0)	5.0*
4	4.16 t (9.5, 9.5)	4.15 dd (9.5, 9.5)	4.15 dd (9.5, 9.5)	4.20 t (9.5)
5	4.46 dq (9.5, 6.0)	4.48 m*	4.48 dq (10.0, 5.5)	4.50 dq (9.5, 6.4)
6	1.62 d (6.0)	1.63 d (6.5)	1.64 d (6.5)	1.67 d (6.4)
Ram'-1	5.92 brs	5.82 d (2.0)	5.83 brs	5.95 brs
2	6.26 dd (3.0, 1.0)	6.32 dd (3.0, 2.0)	6.34 dd (3.5, 2.5)	6.30 brs
3	4.81 dd (9.0, 3.0)	4.80 dd (10.0, 3.0)	4.81 dd (10.0, 3.0)	4.81*
4	4.42 m*	4.38 m*	4.37 m*	4.40 m*
5	4.46 dq (9.5, 6.0)	4.38 m*	4.40 m*	4.44 m*
6	1.51 d (6.0)	1.64 d (6.0)	1.65 d (6.5)	1.53 d (6.4)
Ram''-1	6.31 d (1.5)	6.29 d (1.5)	6.29 d (1.5)	6.29 brs
2	6.28 dd (3.0, 1.5)	5.25 dd (3.0, 1.5)	5.26 t (2.5)	5.0*
3	4.77 ddd (9.5, 3.0)	5.98 dd (10.0, 3.0)	6.0 dd (10.0, 3.0)	4.60 dd (9.2, 2.8)
4	5.80 t (9.5)	6.08 t (10.0)	6.09 t (10.0)	5.84 t (9.2)
5	4.40 dq (9.5, 6.0)	4.48 m*	4.48 dq (10.0, 5.5)	4.40*
6	1.67 d (6.0)	1.43 d (6.0)	1.44 d (6.5)	1.69 d (4.4)
Glu-1	5.08 d (7.5)	5.09 d (7.5)	5.10 d (7.5)	5.05*
2	3.97 t (9.5)	3.95 m*	3.95 t (9.0)	4.02 t (7.2)
3	4.13*	4.07 dd (9.0, 9.0)	4.10 dd (9.0, 9.0)	4.04*
4	3.95 t (9.5)	3.94 m*	3.94 t (9.0)	4.0 t (8.8)
5	3.78 ddd (9.0, 5.5, 2.5)	3.80 ddd (8.0, 5.5, 2.5)	3.80 ddd (8.5, 5.5, 2.0)	3.79 ddd (8.4, 5.6, 4.0)
6a	4.11 m*	4.10 m*	4.10 m*	4.10 m*
6b	4.42	4.39 m*	4.40 m*	4.44 m*
jal 2a	2.26 ddd (15.0, 8.0, 4.0)	2.26 ddd (15.0, 7.0, 4.5)	2.26 ddd (15.5, 7.5, 4.5)	2.26 m*
2b	2.44 ddd (14.5, 9.0, 4.0)	2.45 ddd (15.0, 8.5, 4.5)	2.46 ddd (15.0, 8.5, 4.5)	2.44 m*
11	3.83 m*	3.84 m*	3.85 m*	3.86 m*
16	0.84 t (7.5)	0.85 t (7.0)	0.86 t (7.0)	0.89 t (6.5)
deca-2	2.34 t (7.5)	2.32 m*	2.32 t (7.0)	2.36 m*
10	0.81 t (7.0)	0.83 t (7.0)	0.84 t (7.0)	0.89 t (6.5)
mba-2	2.52 tq (7.5, 7.0)			
2-Me	1.20 d (7.0)			
3-Me	0.89 t (7.5)			
hexa-2		2.42 t (7.5)	2.43 t (7.5)	2.47 t (7.2)
6		0.66 t (7.0)	0.67 t (7.0)	0.79 t (7.2)
cna-2	6.35 d (16)	6.59 d (16)	6.60 d (16)	
3	7.64 d (16)	7.85 d (16)	7.86 d (16)	

^aDatos registrados a 500 MHz en C₅D₅N. 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. Los patrones de acoplamiento están expresados como: 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 ¹H-¹H (COSY, TOCSY) y heteronuclear ¹H-¹³C (HMQC, HMBC).

^bAbreviaciones: TMS = tetrametilsilano, fuc = fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanólo, mba = 2-metilbutanólo, deca = *n*-decanólo, hexa = *n*-hexanólo, cna = trans-cinamólo.

Este procedimiento se inició con la localización de los carbonos anoméricos en la región comprendida entre δ_C 95 – 110 ppm en el espectro de carbono obtenidos a través de la técnica de RMN ^{13}C . Posteriormente, se estableció la conectividad entre cada carbono anomérico con su correspondiente protón. Las **Figura 46** muestra el espectro HSQC de la región anomérica del purginósido II (**5**), donde se observan cinco señales anoméricas, las cuales indican inequívocamente el número de unidades de azúcar en cada núcleo oligosacárido.

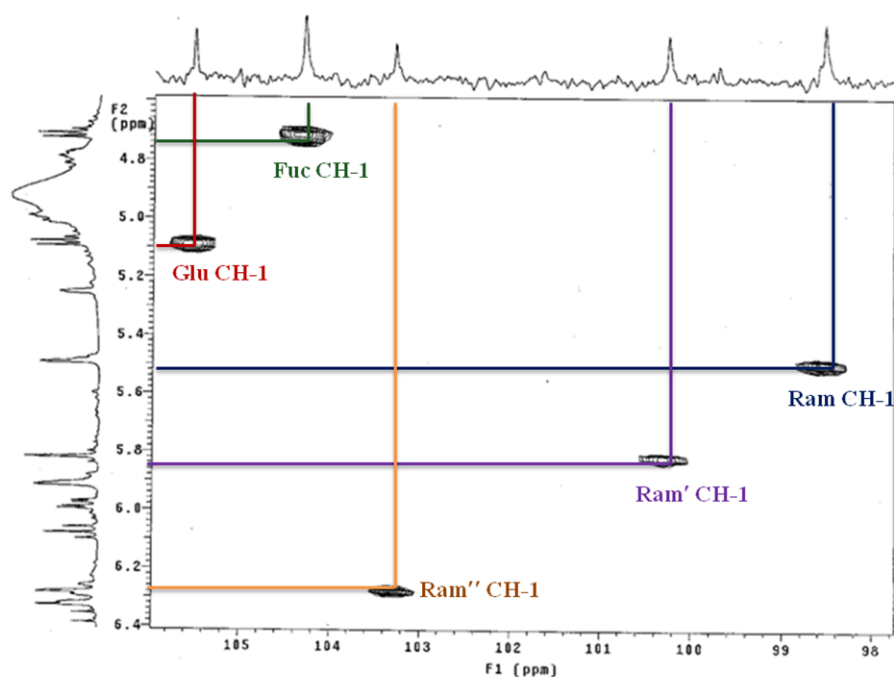


Figura 46. Espectro HSQC del purginósido II (**5**). Región anomérica para la identificación de los carbonos correspondientes a los protones anoméricos. Correlaciones ($^1J_{\text{C-H}}$). Abreviaciones: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior

Siguiendo con este análisis, se localizaron y asignaron los desplazamientos químicos de los carbonos restantes en el espectro de RMN ^{13}C . Una vez identificados los desplazamientos químicos de todos los protones pertenecientes a cada monosacárido en el espectro de RMN ^1H , se procedió a llevar a cabo el establecimiento de las conectividades ^{13}C - ^1H en el espectro HSQC para determinar inequívocamente la asignación de cada señal de carbono (**Cuadro 8**).

Cuadro 8. Datos espectroscópicos en la RMN ^{13}C para los purginósidos I-IV (4-7)^a.

Carbono ^b	Purginósido I (2)	Purginósido II (3)	Purginósido III (4)	Purginósido IV (5)
Fuc-1	104.4	104.3	104.3	104.7
2	80.2	80.0	79.9	80.4
3	73.5	73.3	73.4	73.8
4	72.9	72.9	72.9	73.3
5	70.8	70.8	70.8	71.3
6	17.3	17.3	17.3	17.8
Ram-1	98.6	98.5	98.5	98.9
2	73.8	73.6	73.6	74.1
3	70.0	69.3	69.3	72.9
4	81.4	82.0	82.0	81.8
5	69.0	69.0	68.9	69.4
6	19.1	19.1	19.1	19.3
Ram'-1	100.0	100.3	100.2	100.4
2	74.4	73.4	73.4	73.6
3	79.8	80.0	79.9	80.6
4	78.4	78.9	78.9	79.0
5	68.4	68.5	68.9	68.9
6	18.0	19.0	19.0	19.6
Ram''-1	100.0	103.3	103.3	103.7
2	72.9	69.9	69.9	69.9
3	68.3	73.2	73.2	70.8
4	74.8	71.9	72.0	75.9
5	68.6	68.1	68.1	68.6
6	19.1	17.9	17.9	18.5
Glu-1	105.1	105.5	105.5	105.9
2	75.2	75.2	75.2	75.6
3	80.2	78.4	78.5	79.0
4	71.6	71.5	71.5	72.0
5	78.3	78.1	78.1	78.6
6a	63.2	63.0	63.0	63.3
6b				
jal-1	173.2	173.1	173.1	173.6
2a	34.4	34.2	34.3	34.8
2b				
11	82.5	82.4	82.3	82.8
16	14.3	14.3	14.3	14.5
deca-1	173.8	173.5	173.5	174.0
2	34.7	34.5	34.5	35.0
10	14.3	14.2	14.3	14.7
mba-1	176.4			
2	41.6			
2-Me	17.0			
3-Me	11.7			
hexa-1		173.1	173.1	173.9
2		34.5	34.4	34.9
6		13.8	13.8	14.7
Cna-1	167.0	166.5	166.5	
2	118.9	118.6	118.6	
3	145.3	145.4	145.4	

^aDatos registrados a 125.7 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm en relación al TMS. Las asignaciones se basaron en los experimentos HSQC. ^bAbreviaciones: fuc = fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanoílo, mba = 2-metilbutanoílo, deca = *n*-decanoílo, hexa = *n*-hexanoílo, cna = trans-cinamoílo.

Esta técnica también permitió la identificación de los protones que se localizan en las regiones con mayor sobreposición, e.g. δ_{H} 3.9–4.2 y 4.35–4.50 ppm. En la **Figura 47**, se muestra el espectro HSQC del purginósido I (**4**), donde se observa que los protones H₄ de la unidad de fucosa, así como las señales para los protones H₂ y H₄ de la unidad de glucosa que se encuentran en δ_{H} 3.94 ppm, correlacionan con sus respectivos carbonos localizados en δ_{C} 73 ppm, 75.2 ppm y 71.6 ppm, respectivamente. Este procedimiento, fue necesario para llevar a cabo el establecimiento de la secuencia de glicosidación a través de las correlaciones ^{13}C - ^1H a larga distancia observadas en los espectros bidimensionales HMBC. Los desplazamientos químicos de protón RMN ^1H y carbono RMN ^{13}C para los **purginósidos I-IV** se incluyen en los cuadros 7 y 8.

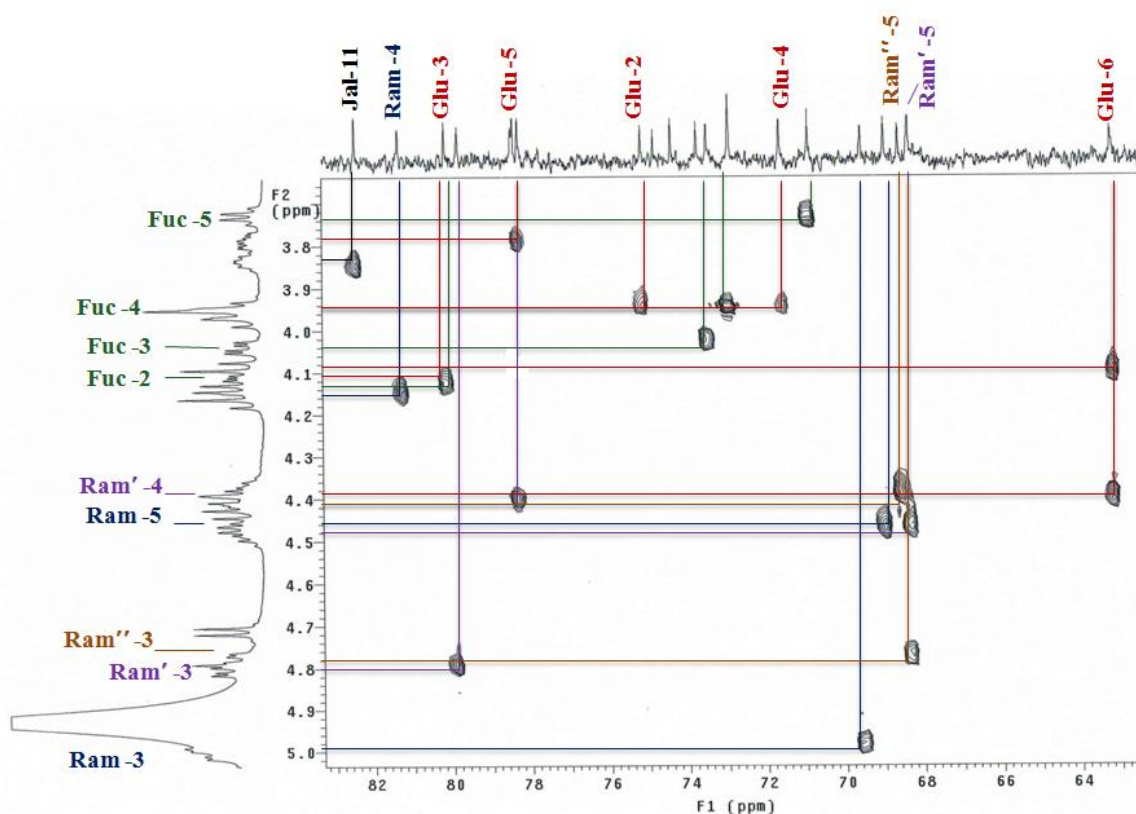


Figura 47. Espectro HSQC del purginósido I (**4**). Región oligosacárida para la identificación de los carbonos correspondientes a cada protón oligosacárido. Correlaciones ($^1J_{\text{C-H}}$). Abreviaciones: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior.

6.7.3 Empleo de la técnica HMBC

Se procedió a la determinación de las correlaciones ^{13}C - ^1H a tres enlaces de distancia ($^3J_{\text{C-H}}$) a través de la técnica HMBC para el establecimiento de los enlaces glicosídicos. De esta manera, se identifican los núcleos oligosacáridos constitutivos de las estructuras de los purginósidos I-IV (**4-7**). La técnica HMBC permitió confirmar las secuencias de glicosidación de los compuestos **4-7**, mismas que corresponden a las descritas para el ácido operculínico A (Véase sección 6.5). Este procedimiento se logró identificando las conectividades C-H entre los átomos de protones anoméricos y los carbonos enlazados directamente a la posición donde se establece el enlace glicosídico entre dos unidades monosacáridas. El análisis de los espectros HMBC de los compuestos **4-7** permitió determinar las mismas secuencias de glicosidación en los compuestos a través de las conectividades $^3J_{\text{H-C}}$ observadas, $\text{H}_1\text{Ram}-\text{C}_2\text{Fuc}$, $\text{H}_1\text{Ram}'-\text{C}_4\text{Ram}$, $\text{H}_1\text{Ram}''-\text{C}_4\text{Ram}'$ y $\text{H}_1\text{Gluc}-\text{C}_3\text{Ram}'$ (**Figura 48**).

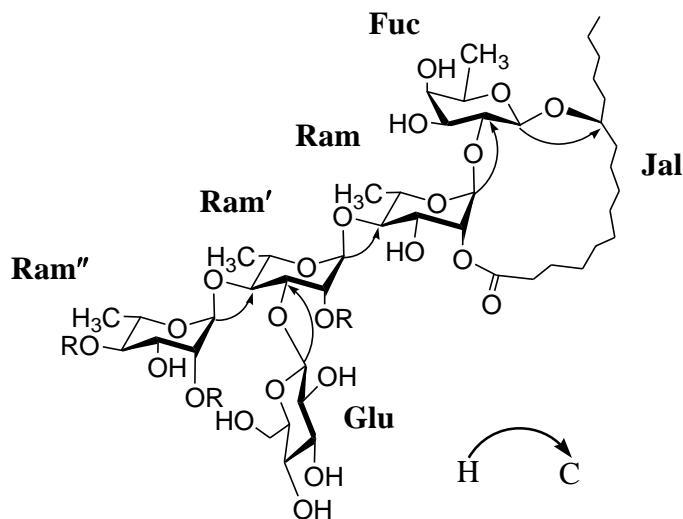


Figura 48. Conectividades C-H a tres enlaces ($^3J_{\text{C-H}}$) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación.

Por lo tanto, la secuencia de azúcares en el núcleo oligosacárido de los purginósidos **I-IV** se estableció de la siguiente manera: la primera unidad sacárida del núcleo glicosídico corresponde a la fucosa ya que se encuentra enlazada en la posición C_{11} de la aglicona, por

las correlaciones observadas entre FucH₁ ($\delta_{\text{H}} \sim 4.70$ ppm) -JalC₁₁ ($\delta_{\text{C}} 82$ ppm); la segunda unidad corresponde a una ramnosa (ram) que se encuentra enlazada al C₂ de la fucosa, RamH₁ ($\delta_{\text{H}} \sim 5.49$ ppm) -FucC₂ ($\delta_{\text{C}} 80$ ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una ramnosa (ram') enlazada en la posición C₄ de la segunda unidad monosacárida (ram), Ram'H₁ ($\delta_{\text{H}} \sim 5.8$ -5.9 ppm) -RamC₄ ($\delta_{\text{C}} 81$ -82 ppm); la cuarta unidad del oligosacárido corresponde a la tercera unidad de ramnosa (ram'') enlazada en el C₄ de la tercera unidad de azúcar (ram'), Ram''H₁ ($\delta_{\text{H}} \sim 6.29$ -6.31 ppm) -Ram'C₄ ($\delta_{\text{C}} \sim 78.4$ -78.9 ppm); y una unidad de glucosa terminal enlazada a la posición C₃ de la segunda unidad de ramnosa (ram'), GlucH₁ ($\delta_{\text{H}} \sim 5.0$ ppm) -Ram'C₃ ($\delta_{\text{C}} \sim 80$ ppm). La **figura 49** muestra una expansión del espectro HMBC del purginósido I que ejemplifica la aplicación de esta metodología en la determinación de la secuencia oligosacárida.

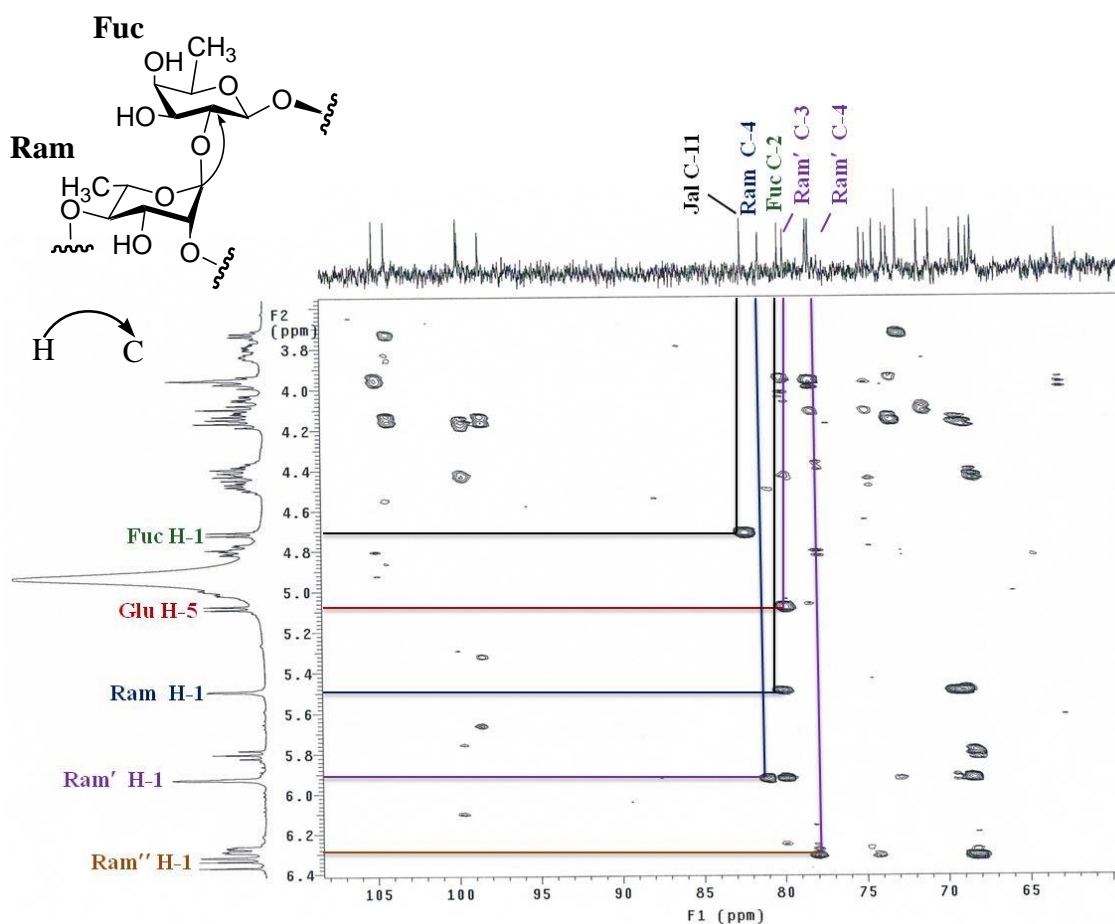


Figura 49. Espectro HMBC del purginósido I (4). Correlaciones $^3J_{\text{C-H}}$, para la identificación de la secuencia de glicosidación.

6.7.3.1. Identificación de las posiciones de esterificación

Mediante los espectros de RMN ^1H y RMN ^{13}C de los purginósidos **I** – **IV** se identificaron los ácidos de cadena corta 2-metilbutanoico y *trans*-cinámico, así como los ácidos de cadena larga, *n*-hexanoico, *n*-decanoico y *n*-dodecanoico, cuyas estructuras fueron confirmadas por espectrometría de masas.

En particular, el residuo éster de 2-metilbutanoilo genera las siguientes señales diagnósticas en el espectro de RMN ^1H , un triplete de cuartetos a δ_{H} 2.50 ppm con valores de constantes de acoplamiento de 7.5 y 7.0 Hz, atribuible a los protones alfa al grupo carbonilo del éster; un doblete centrado en δ_{H} 1.20 ppm ($J = 7$ Hz) atribuible a los protones del grupo metilo enlazado a la posición dos; un triplete en δ_{H} 0.89 ppm con constante de acoplamiento de 7.5 Hz correspondiente a los protones del grupo metilo terminal. En el espectro de RMN ^{13}C , el desplazamiento para C_2 se localiza en $\delta_{\text{C}} \sim 42$ ppm. En tanto que el éster de cinamoilo genera en el espectro de RMN ^1H dos señales atribuibles a los protones H_2 y H_3 como dobletes centrados en δ_{H} 6.3 ($J = 16$ Hz) y 7.6 ppm ($J = 16$ Hz), respectivamente. Adicionalmente, las señales aromáticas se localizan alrededor de δ_{H} 7.3 ppm. En el espectro de RMN ^{13}C , las señales vinílicas C_2 y C_3 se localizan en δ_{C} 119 y 145 ppm, y las señales aromáticas se presentan entre 128 y 145 ppm.

Los residuos de *n*-hexanoilo, *n*-decanoilo y *n*-dodecanoilo generan una señal diagnóstica como un triplete que aparece entre δ_{H} 2.42 ppm – 2.34 ppm, con una constante de acoplamiento cercana a los 7.5 Hz atribuible a los protones del grupo metileno alfa al grupo carbonilo. En algunos casos, esta señal aparece como un doble de doble de dobles para cada protón, cuyos valores de las constantes de acoplamiento son de aproximadamente 14, 10 y 7 Hz.³³ Esta característica aparece en aquellos casos donde hay alguna restricción en el núcleo oligosacárido que restringe la libertad conformacional de la cadena alifática de estos ácidos y generan señales no equivalentes magnéticamente, tal y como sucede para los protones del grupo metileno alfa al carbonilo de la aglicona que forma la macrolactona. Estos últimos generan dos señales características desplazadas en 2.2 y 2.4 ppm que presentan un patrón de acoplamiento identificado como un doble de doble de dobles con constantes de acoplamiento de $J = 15.0, 8.0$ y 4.0 Hz.¹²

Para identificar las posiciones de esterificación se debe iniciar con la asignación correcta de los núcleos de carbono correspondientes a cada uno de los grupos carbonilo. Por lo tanto, se realizó el análisis de las interacciones ^{13}C - ^1H a dos enlaces de distancia entre el núcleo de carbono de los grupos carbonilo y los protones H_2 de cada sustituyente y de la aglicona mediante el espectro HMBC (**Figura 50**).

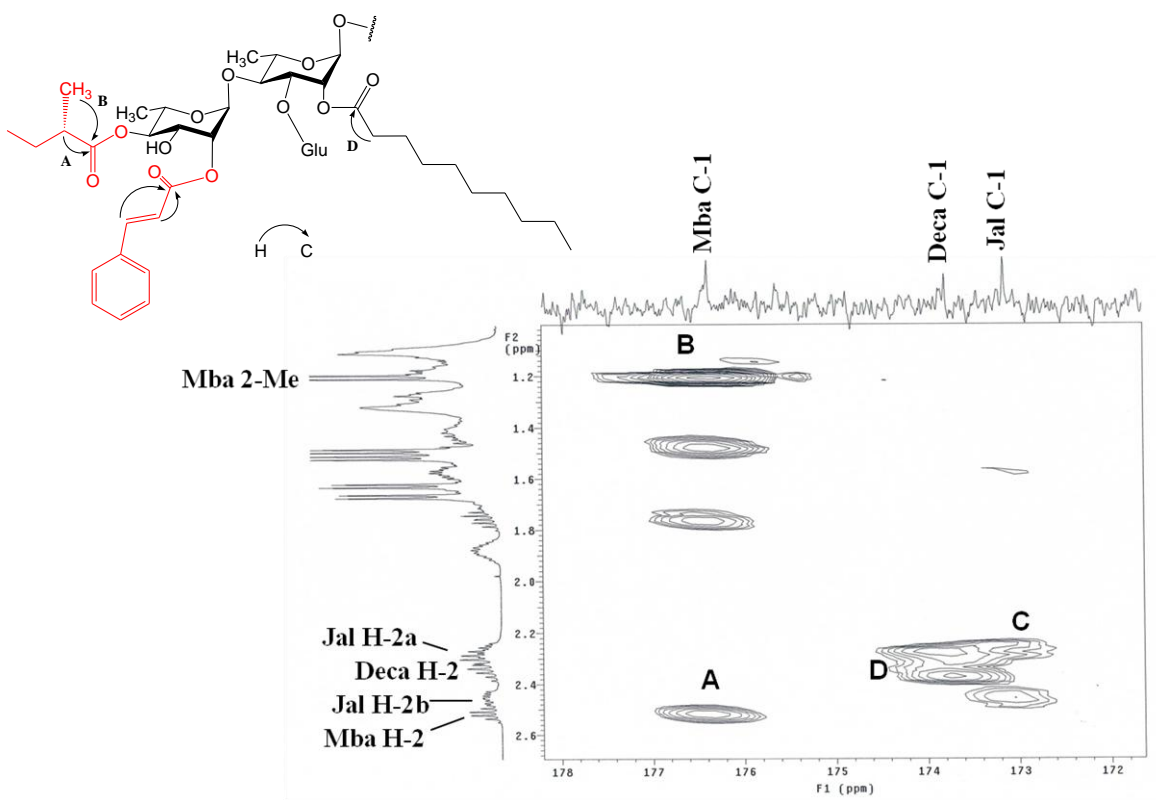


Figura 50. Espectro HMBC del purginósido I (4). Identificación de los carbonos de los grupos carbonílicos para la aglicona y sustituyentes éster. Correlaciones ($^2J_{\text{C-H}}$). **A:** $\text{C}_1 - \text{H}_2\text{Mba}$, **B:** $\text{C}_1 - \text{H}_{2\text{Me}}\text{Mba}$, **C:** $\text{C}_1 - \text{H}_2\text{Jal}$ y **D:** $\text{C}_1 - \text{H}_2\text{Deca}$. Abreviaciones: **Mba** = 2-metilbutanoilo, **Deca** = *n*-decanoilo, **Jal** = 11-hidroxihexadecanoilo.

Una vez que se ha identificado cada uno de los grupos carbonilo correspondiente a los sustituyentes y a la aglicona, se lleva a cabo su localización en el núcleo oligosacárido (**Figura 51**). La aglicona establece el enlace éster intramolecular de la macrolactona en el carbono dos de la segunda unidad monosacárida.

Para confirmar la unión de la macrolactona de la aglicona en los purginósidos **I-IV**, se llevó a cabo el establecimiento de las conectividades entre los carbonos de los grupos carbonilo y el protón geminal a la posición de esterificación. Así, se determinó la posición de lactonización de la macrolactona de la aglicona en los compuestos **4-7** y que corresponde a la posición C₂ de la primera unidad de ramnosa, mediante las correlaciones C-H a tres enlaces de distancia mediante el espectro HMBC, e.g., para el purginósido **I**, se observó la correlación entre el protón H₂ de la primera unidad de ramnosa (δ_{H} 5.92 ppm) y el carbonilo de la macrolactona (δ_{C} 173 ppm).

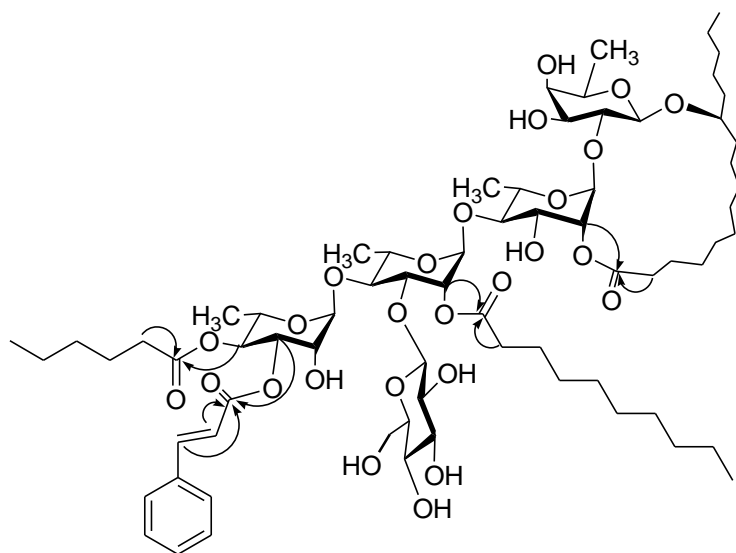


Figura 51. Conectividades C-H a tres enlaces (${}^3J_{\text{C-H}}$) para el establecimiento de los sustituyentes éster en el purginósido **II** (**5**)

De la misma manera, se llevó a cabo la identificación de las posiciones de los grupos éster de cadena abierta en los núcleos oligosacáridos. El análisis de los espectros HMBC de los compuestos **4-7** permitió determinar diferencias en los sitios de acilación de los núcleos oligosacáridos, particularmente en la tercera unidad de ramnosa, ya que en todos los purginósidos se encontró el éster decanoilo en la posición C₂ de la segunda unidad de ramnosa (ram'). Así, el núcleo pentasacárido del purginósido **I** (**4**) está esterificado por el éster 2-metilbutanoilo en la posición C₄ de la tercera unidad de ramnosa (ram'') y por el éster cinamoilo en la posición C₂ de esta misma unidad. Por otra parte, los purginósidos **II** (**5**) (**Figura 52**) y **III** (**6**) se encuentran esterificados por los residuos *n*-hexanoilo y

cinamoilo en las mismas posiciones (C_3 y C_4 de ram'') de su cadena oligosacárida, con la excepción de que cada sustituyente se encuentra en una posición diferente en esta unidad de azúcar. El purginósido IV (7) se encuentra esterificado solamente por el residuo *n*-hexanoilo en la posición C_4 de la tercera unidad de ramnosa. Los purginósidos I-IV (4-7) poseen una estructura química novedosa, que contribuyen a la diversidad estructural de los glicolípidos aislados y derivados del ácido operculínico A.

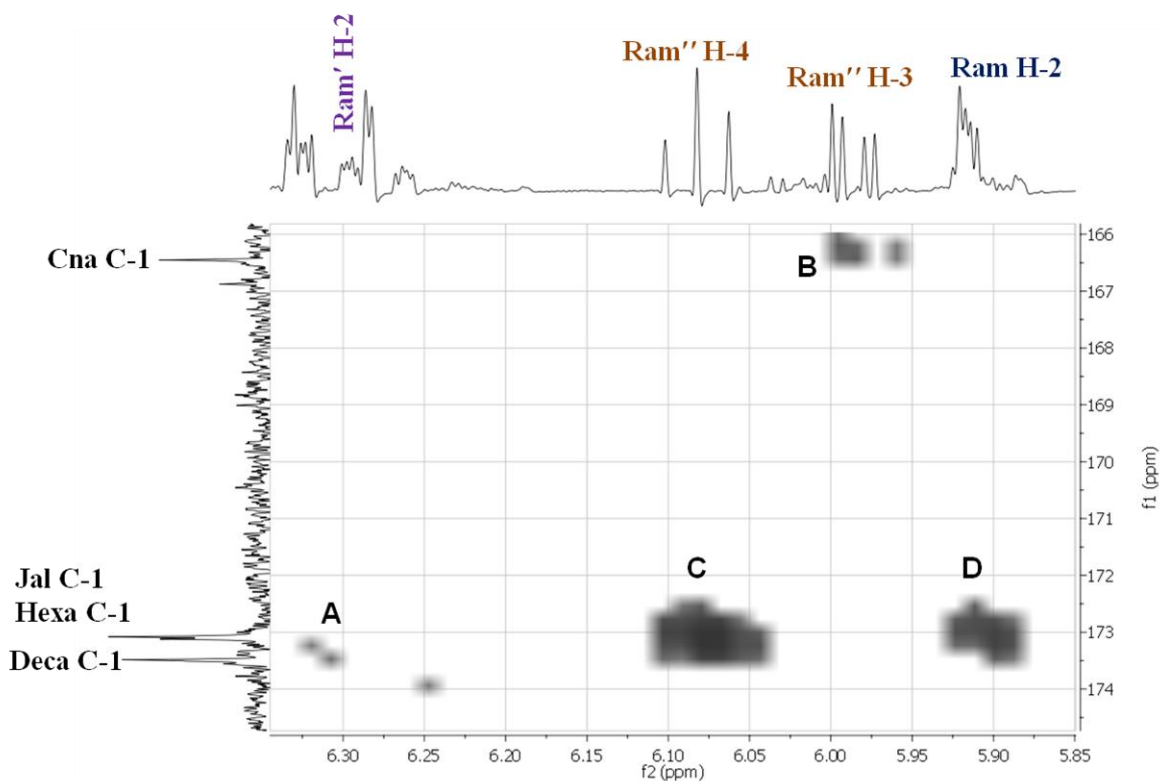


Figura 52. Espectro HMBC del purginósido II (5). Determinación de las posiciones de esterificación. Correlaciones ($^3J_{C-H}$). **A:** C_1 Deca – H_2 Ram', **B:** C_1 Cna – H_3 Ram'', **C:** C_1 hexa – H_4 Ram'', y **D:** C_1 Jal – H_2 Ram. Abreviaciones: **Cna** = *trans*-cinamoilo, **hexa** = hexanoilo, **Deca** = *n*-decanoilo, **Jal** = 11-hidroxihexadecanoilo.

6.7.4 Empleo de la espectrometría de masas

El empleo de las técnicas espectrométricas de masas por bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) y electrospray (EM-ESI) ha sido una herramienta útil para el establecimiento de la fórmula molecular de glicolípidos, al proporcionar los pesos moleculares a través de la detección de los iones pseudomoleculares $[M + H]^+$, $[M - H]^-$ y $[M + Cl]^-$ y permiten confirmar sus estructuras mediante la identificación de los iones fragmentos correspondientes a las rupturas de los enlaces glicosídicos.^{6,13} Al analizar las diferencias de peso que hay entre cada uno de los iones pseudomoleculares $[M - H]^-$ y los fragmentos correspondientes a las eliminaciones de los grupos acilos se establece la identidad de los mismos. Así, para los **purginósidos I-IV** se establecieron los siguientes iones fragmentos comunes para todos ellos de m/z 853, 691, 545, 417 y 271 (**Figura 53**) y que son característicos de las resinas glicosídicas.⁶

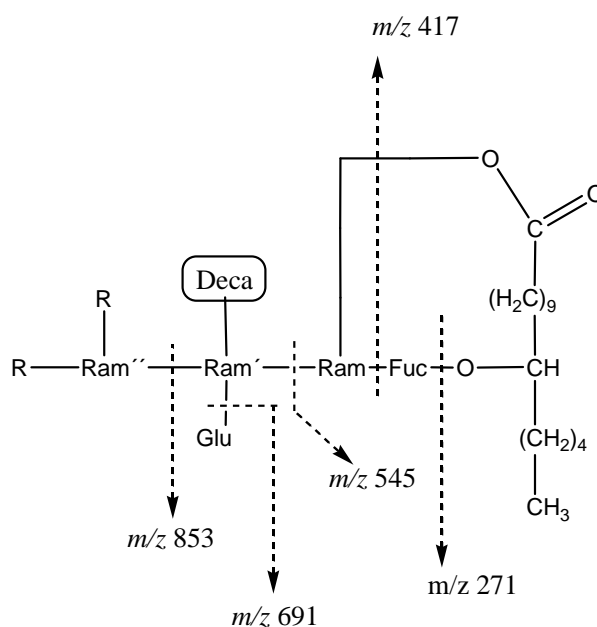


Figura 53. Patrones de fragmentación característica de los purginósidos I-IV.

Para el **purginósido I (4)**, se identificó el ión $[M - H]^-$ m/z 1367 correspondiente con la fórmula molecular $C_{70}H_{111}O_{26}$. El fragmento de m/z 1237 ($[M - H]^- - C_9H_6O$) corresponde a la pérdida del residuo *trans*-cinamoilo con una diferencia de 130 unidades de masa atómica respecto al ión pseudomolecular. El fragmento de m/z 1083 ($[M - H]^- - C_9H_6O - C_{10}H_{18}O$) corresponde a la eliminación del residuo decanoilo con una diferencia de 154 u.m.a respecto al ión de m/z 1237. El fragmento de m/z 853 ($[M - H]^- - C_9H_6O - C_{10}H_{18}O - C_5H_8O - C_6H_{10}O_4$) corresponde a las pérdidas sucesivas del éster 2-metilbutanoil (84 u.m.a) y una unidad sacárida de metilpentosa (146 u.m.a) con una diferencia de 230 unidades respecto al ión m/z 1083. El fragmento de m/z 691 corresponde a la pérdida subsecuente de una unidad sacárida de hexosa ($C_6H_{10}O_5$) con una diferencia de 162 unidades con respecto al ión de m/z 853. El fragmento de m/z 545 corresponde a la siguiente pérdida de una unidad sacárida de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) con una diferencia de 146 unidades con respecto al ión de m/z 691. El fragmento de m/z 417 corresponde a las pérdidas sucesivas de una unidad sacárida de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) y agua como producto de la hidrólisis de la macrolactona (18 u.m.a) con una diferencia de 128 unidades con respecto al ión de m/z 545. El fragmento de m/z 271 corresponde a la pérdida de una unidad sacárida de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) con una diferencia de 146 unidades con respecto al ión de m/z 417 (**Figura 54**).

Para los **purginósidos II (5)** y **III (6)**, se calculó la fórmula molecular como $C_{71}H_{113}O_{26}$ con base en el ión pseudomolecular m/z 1381 $[M - H]^-$. La diferencia entre los iones pseudomoleculares de los purginósidos II y III (m/z 1381) con el purginósido I (m/z 1367) de 14 u.m.a sugirió la presencia de un grupo hexanoilo en estos purginósidos en lugar del grupo metilbutanoilo presente en el purginósido I. Este residuo se confirmó por el fragmento de m/z 853 que corresponde a las pérdidas sucesivas del residuo hexanoilo ($C_6H_{10}O$, 98 u.m.a) y una unidad de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$, 146 u.m.a) con una diferencia de 244 unidades con respecto al ión de m/z 1097.

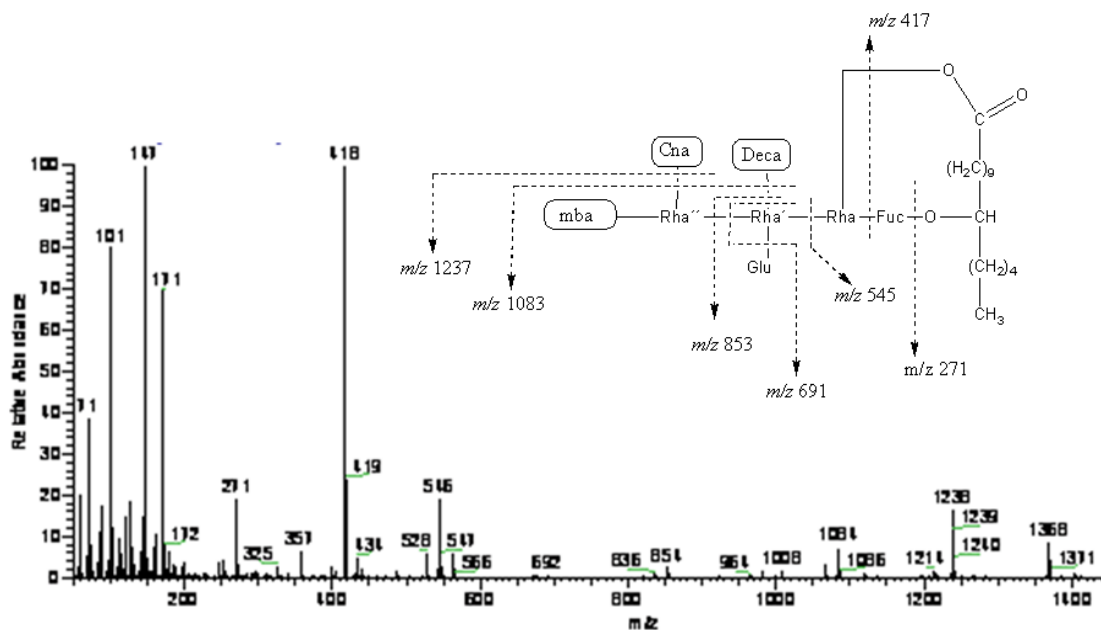
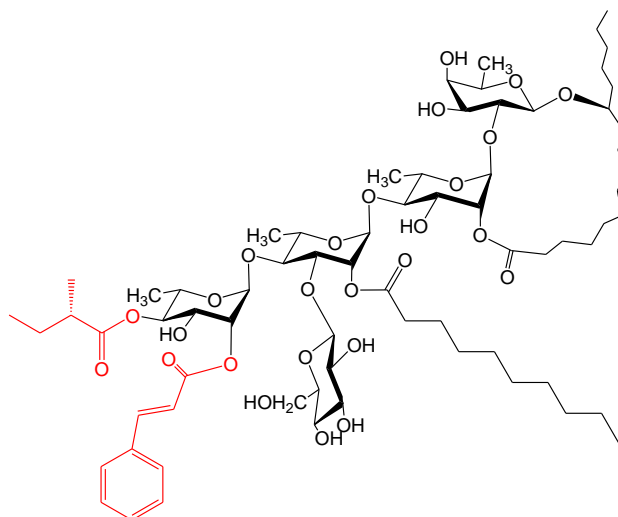


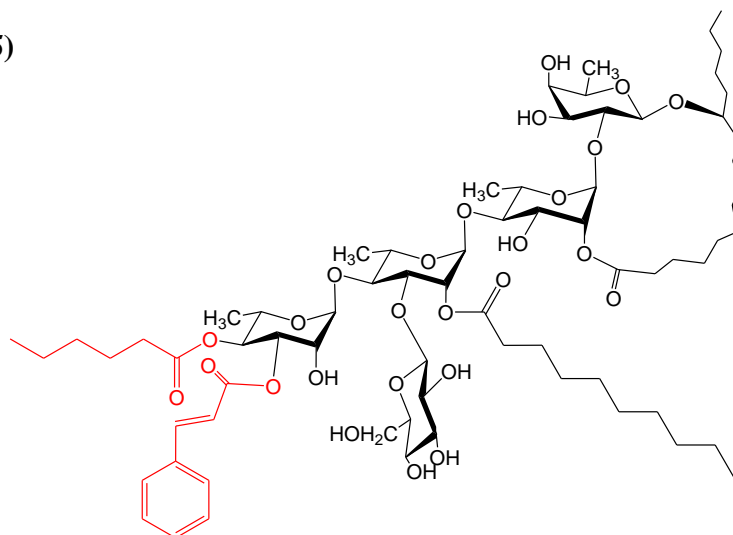
Figura 54. Espectro de masas FAB en modo negativo del purginósido I (4)

Para el **purginósido IV (7)**, se registró la fórmula molecular $C_{62}H_{107}O_{25}$ en concordancia con el ión pseudomolecular de m/z 1251 $[M - H]^-$. La diferencia entre los iones pseudomoleculares de los purginósidos II y III (m/z 1381) con el purginósido IV (m/z 1251) de 130 u.m.a sugirió la ausencia del residuo de cinamoilo en el purginósido IV. El fragmento de m/z 853 corresponde a las pérdidas sucesivas de un sustituyente hexanoilo ($C_6H_{10}O$, 98 u.m.a) y una unidad de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$, 146 u.m.a) con una diferencia de 244 unidades con respecto al ión m/z 1097.

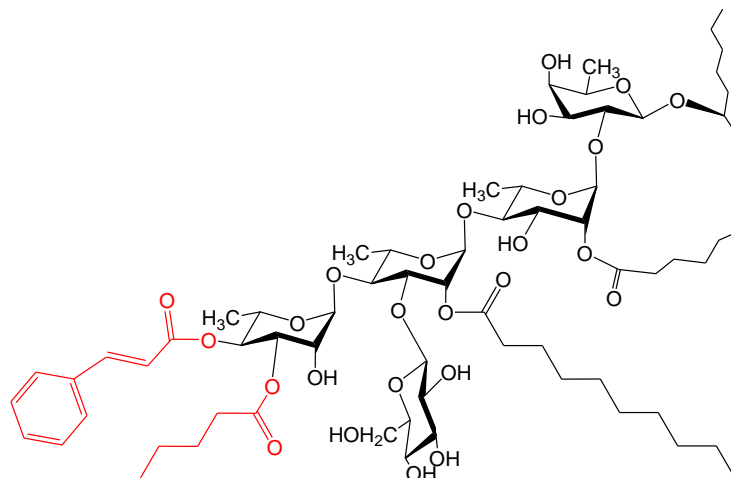
De acuerdo al análisis de todos los espectros por RMN y espectrometría de masas de todos los compuestos, se propusieron las siguientes estructuras químicas para los purginósidos **I-IV**:

Purginósido I (4)

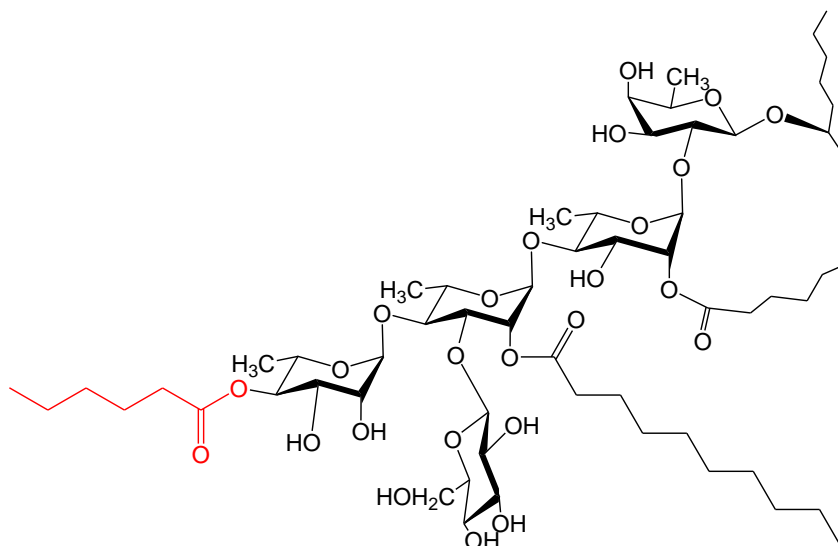
éster intramolecular 1,2''-11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[2-*O*-(*trans*-cinamoil)-4-*O*-(2-metilbutanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(2-*O*-(*n*-decanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico

Purginósido II (5)

éster intramolecular 1,2''- 11-*O*- β - D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[3-*O*-(*trans*-cinamoil)-4-*O*-(hexanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(2-*O*-(*n*-decanoil)- α - L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α - L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β - D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico

Puriginósido III (6)

Puriginósido III. éster intramolecular 1,2''- 11-*O*- β - D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-(*trans*-cinamoil)-3-*O*-(hexanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(2-*O*-(*n*-decanoil)- α - L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α - L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β - D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico

Puriginósido IV (7)

Puriginósido IV. éster intramolecular 1,2''- 11-*O*- β - D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[4-*O*-(hexanoil)- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-(2-*O*-(*n*-decanoil)- α - L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α - L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β - D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico

6.8 Identificación de la purgina I

La purgina I (**8**) es un dímero de pentasacáridos constituido por dos unidades de ácido operculínico A, la primera macrocíclica intramolecular (Unidad A) y la segunda como la porción glicosídica esterificante (Unidad B). Este dímero se caracteriza porque sus dos núcleos oligosacáridos se encuentran esterificados en las mismas posiciones por los ácidos *n*-dodecanoico en la posición C₂ de la segunda unidad de ramnosa (ram') y por el ácido 2*S*-metilbutanoico en la posición C₄ de la unidad de ramnosa terminal (ram''). La diferencia entre las unidades oligosacáridas A y B radica en la posición del ácido *trans*-cinámico. Este sustituyente se encuentra en la posición C₂ de la unidad de ramnosa terminal en la unidad A y en la posición C₃ de la unidad de ramnosa terminal en la unidad B. La posición del enlace éster que une las dos unidades oligosacáridas se encontró en la posición C₄ de la unidad de glucosa.

Para llevar a cabo la asignación de los desplazamientos químicos y la identificación de la estructura dimérica de la purgina I, se emplearon diferentes técnicas espectroscópicas de la resonancia magnética nuclear y de la espectrometría de masas. Adicionalmente, para determinar las constantes de acoplamiento de las señales sobrepuestas en la RMN ¹H de esta compleja estructura oligosacárida se empleó la simulación espectral, tomando como referencia los valores espectroscópicos registrados para el purginósido I (**4**) (ver figura XLIV, Apéndice de espectros). La diferencia entre la unidad macrocíclica A de **8** y el compuesto **4** radica solamente en la longitud del sustituyente que se encuentra en la posición C₂ de la segunda unidad de ramnosa, el *n*-dodecanoilo en **8** y el *n*-decanoilo en **4**. La elucidación de la purgina I se inició con el registro de los espectros unidimensionales de RMN ¹H y ¹³C (**Figuras 55 y 56**).

Como primera evidencia espectroscópica para determinar la naturaleza dimérica de la purgina I, fue la identificación de las señales anoméricas localizadas en la región entre δ_H 4.5 y 6.3 ppm en el espectro de RMN ¹H y entre δ_C 95 y 105 ppm en el espectro de RMN ¹³C. Estas señales correspondientes a los protones y carbonos anoméricos de las unidades monosacáridas se confirmaron a través de las correlaciones C-H a un enlace de distancia (¹J_{CH}) en el espectro HSQC (**Figura 57**).

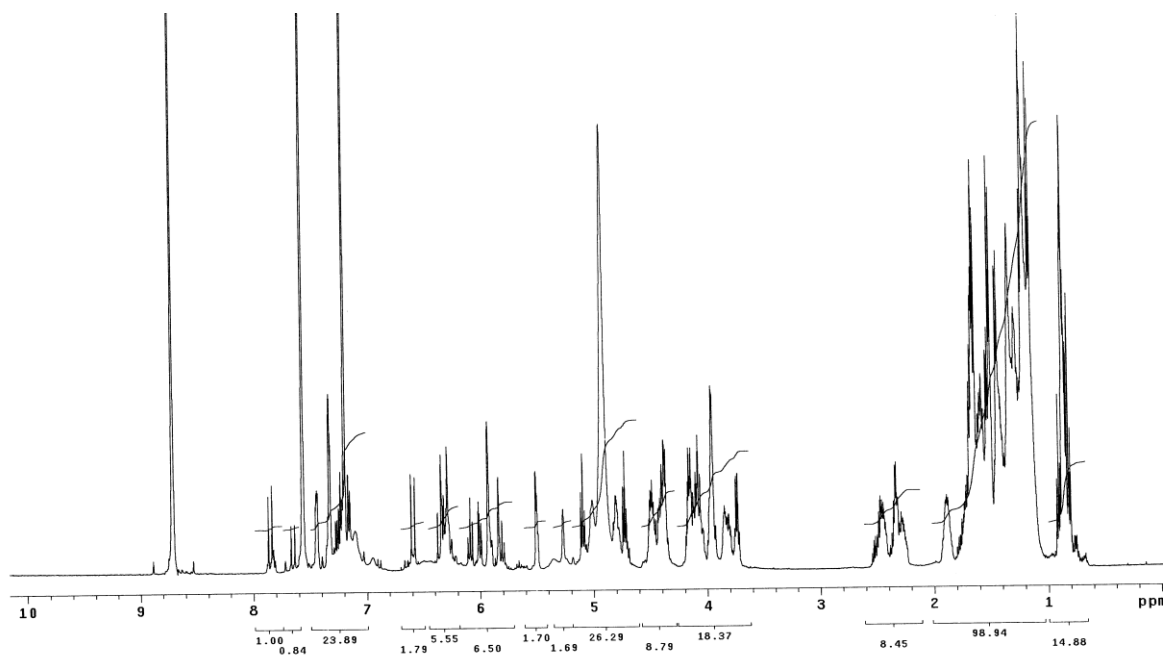


Figura 55. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de la purgina I (8)

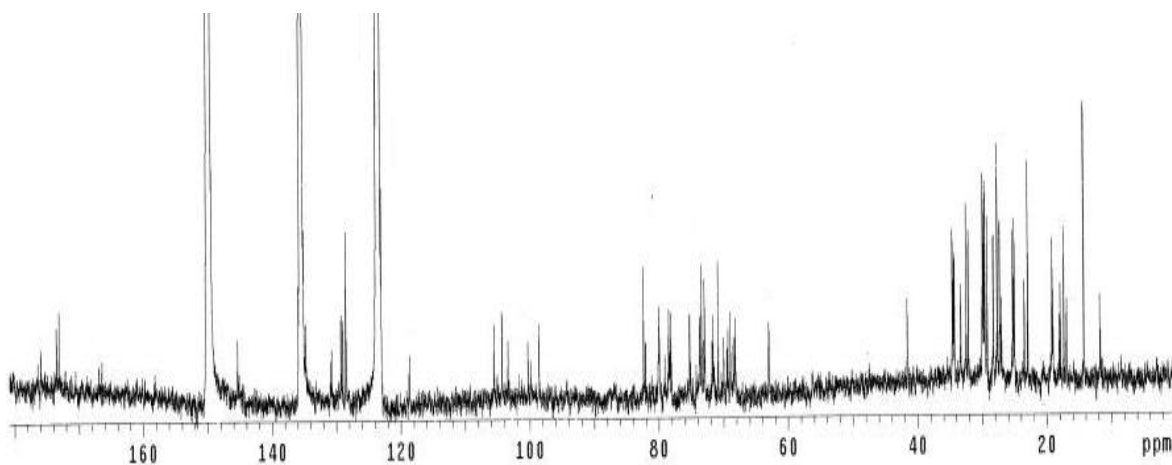


Figura 56. Espectro de RMN ¹³C (125.7 MHz, C₅D₅N) de la purgina I (8)

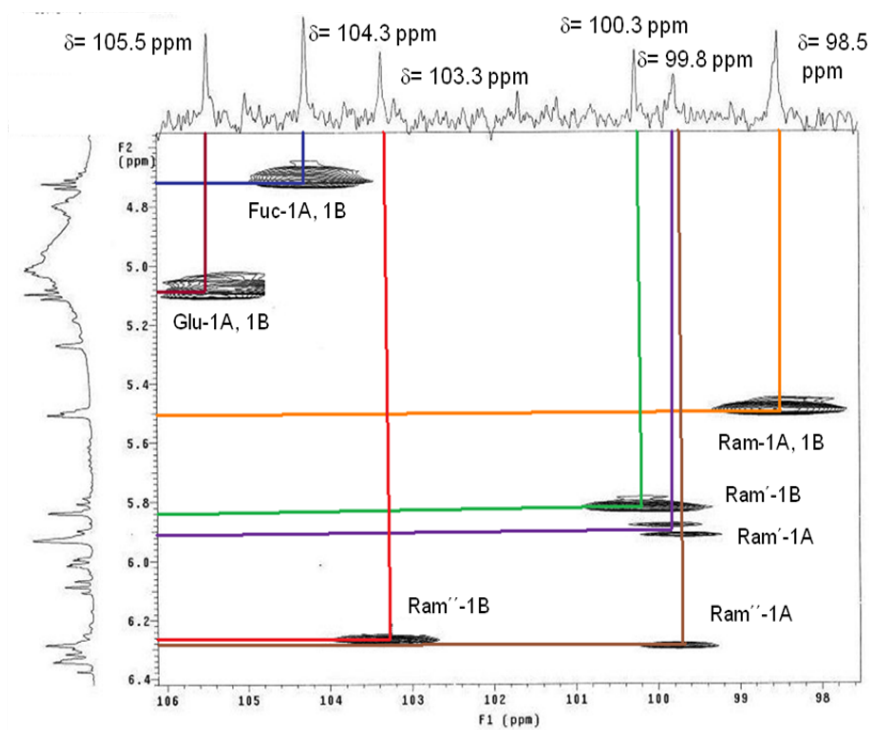


Figura 57. Espectro HSQC de la región de C e H anoméricos de la purgina I (8)

6.8.1 Empleo de la RMN: COSY y TOCSY

Como siguiente paso, se llevó a cabo la identificación de las unidades monosacáridas que constituyen cada unidad monomérica en la purgina I, mediante la asignación de las señales correspondientes a los protones de cada sistema en los espectros COSY y TOCSY. En el experimento ¹H-¹H COSY se establecieron los cuadros de conectividad de cada protón con su metino vecinal, observándose una clara complejidad en el espectro en las regiones entre δ_H 3.6 a 4.2 ppm y 4.2 a 4.6 ppm donde se localizan la mayoría de los protones que se encuentran enlazados a átomos de carbono sin acilación. Adicionalmente, en los espectros COSY y TOCSY se determinaron ocho posiciones de esterificación debido a la localización de señales no anoméricas paramagnéticamente desplazadas a campo bajo que correspondieron a los siguientes protones para la unidad A:

H₂ de la ramnosa interna superior (ram, δ_{H} 5.93 ppm), H₂ de la ramnosa intermedia (ram', δ_{H} 6.28 ppm), H₂ y H₄ de la ramnosa terminal (ram'', δ_{H_2} 6.31, δ_{H_4} 5.81 ppm) y H₄ de la unidad de glucosa (glu, δ_{H} 4.4 ppm); y para la unidad B: H₂ de la ramnosa intermedia (ram', δ_{H} 6.34 ppm), H₃ y H₄ de la ramnosa terminal (ram'', δ_{H_2} 5.99, δ_{H_4} 6.08 ppm) (**Figura 58**).

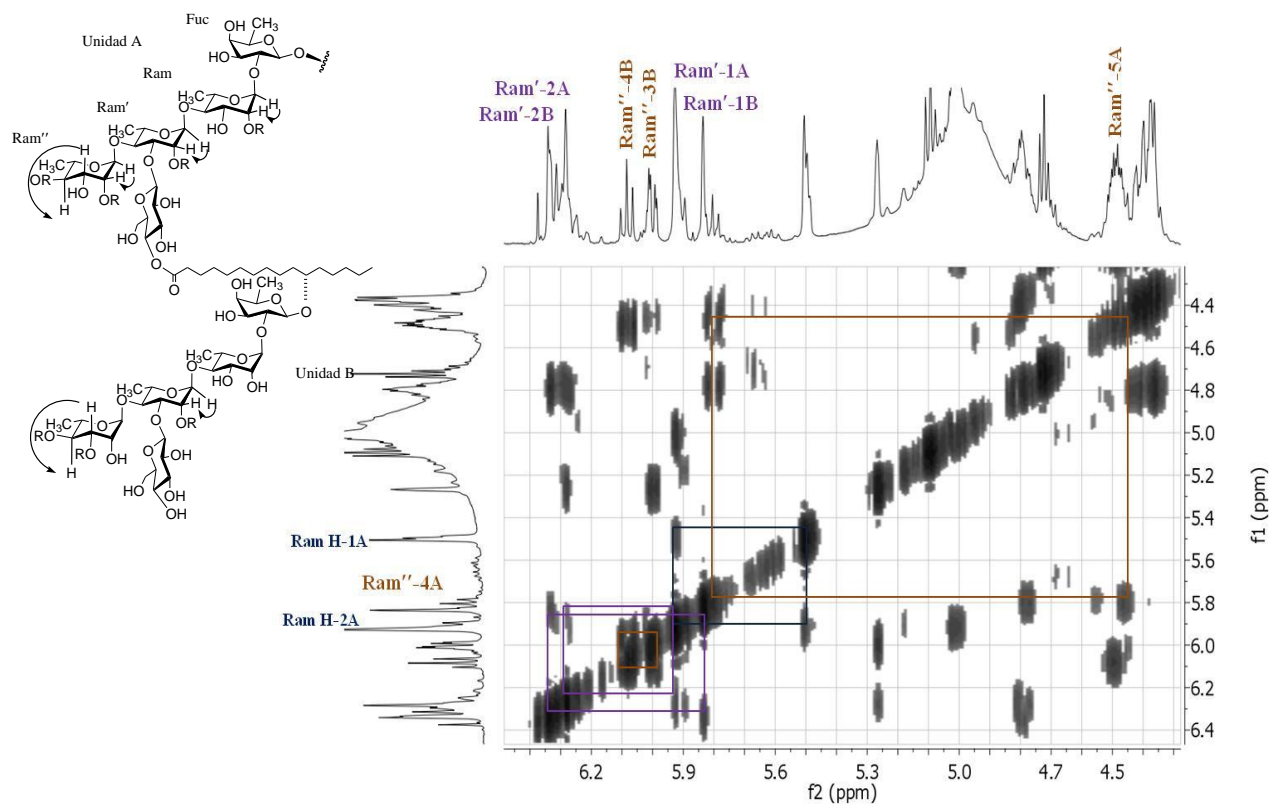


Figura 58. Espectro ^1H - ^1H COSY de la purgina I (**8**). Identificación de las señales no anoméricas paramagnéticamente desplazadas. Abreviaturas: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior, **Glu** = glucosa, **A** = Unidad A de la purgina I, **B** = Unidad B de la purgina I.

6.8.2 Empleo de la RMN: HSQC y HMBC

Una vez que se establecieron las asignaciones para los protones de cada unidad monosacárida en la RMN ^1H , se llevó a cabo la asignación de las señales de ^{13}C no anoméricas mediante la técnica HSQC (**Cuadro 9**). Posteriormente, se empleó la técnica HMBC para la identificación de la secuencia de glicosidación mediante las correlaciones observadas ^1H - ^{13}C entre los protones anoméricos con los carbonos de las unidades monosacáridas vecinales, mismas que fueron observadas en los purginósidos **I-IV** (véase sección 6.7.3). Las posiciones de esterificación se identificaron también mediante la técnica HMBC una vez que fueron determinados los residuos esterificantes en la purgina I. En este caso, se llevó a cabo la búsqueda de señales diagnósticas como se indicó en el apartado 6.7.3.1, que permitieron identificar a los tres residuos, (2*S*)-2-metilbutanoilo, *trans*-cinamoilo y el *n*-dodecanoilo (identificado mediante eliminación por espectrometría de masas). La diferenciación de los carbonilos de estos tres residuos ácidos que esterifican a las unidades A y B se realizó a través de las correlaciones observadas a dos enlaces de distancia ($^2J_{\text{C-H}}$) entre las señales correspondientes a los metilenos en C_2 con sus respectivos carbonilos (C_1) en el espectro HMBC (**Figura 59**).

Una vez que se identificaron los grupos carbonilo, se determinaron las posiciones específicas de estos residuos nuevamente mediante el análisis del espectro HMBC, a través de las correlaciones observadas a tres enlaces de distancia ($^3J_{\text{C-H}}$). Así, se identificó el sitio de lactonización para el ácido jalapινόlico en la posición C_2 de la segunda unidad monosacárida (ram, unidad A) por la correlación observada entre el C_1 de la lactona (δ_{C_1} 173.1 ppm) y el protón H_2 de la ramnosa interna superior (δ_{H} 5.93 ppm). La posición del enlace de la aglicona que une la unidad B acíclica con la unidad A macrocíclica se identificó en la posición C_4 de la unidad de glucosa terminal (glu', unidad A, δ_{H} 4.4 ppm). La posición para el *n*-dodecanoilo se determinó en C_2 de la tercera unidad monosacárida (ram') en ambas unidades pentasacáridas A y B, debido a las correlaciones observadas entre sus carbonilos (δ_{C_1} 173.5 ppm) con el H_2 de la ramnosa intermedia en la unidad A (δ_{H} 6.28 ppm) y en la unidad B (δ_{H} 6.34 ppm).

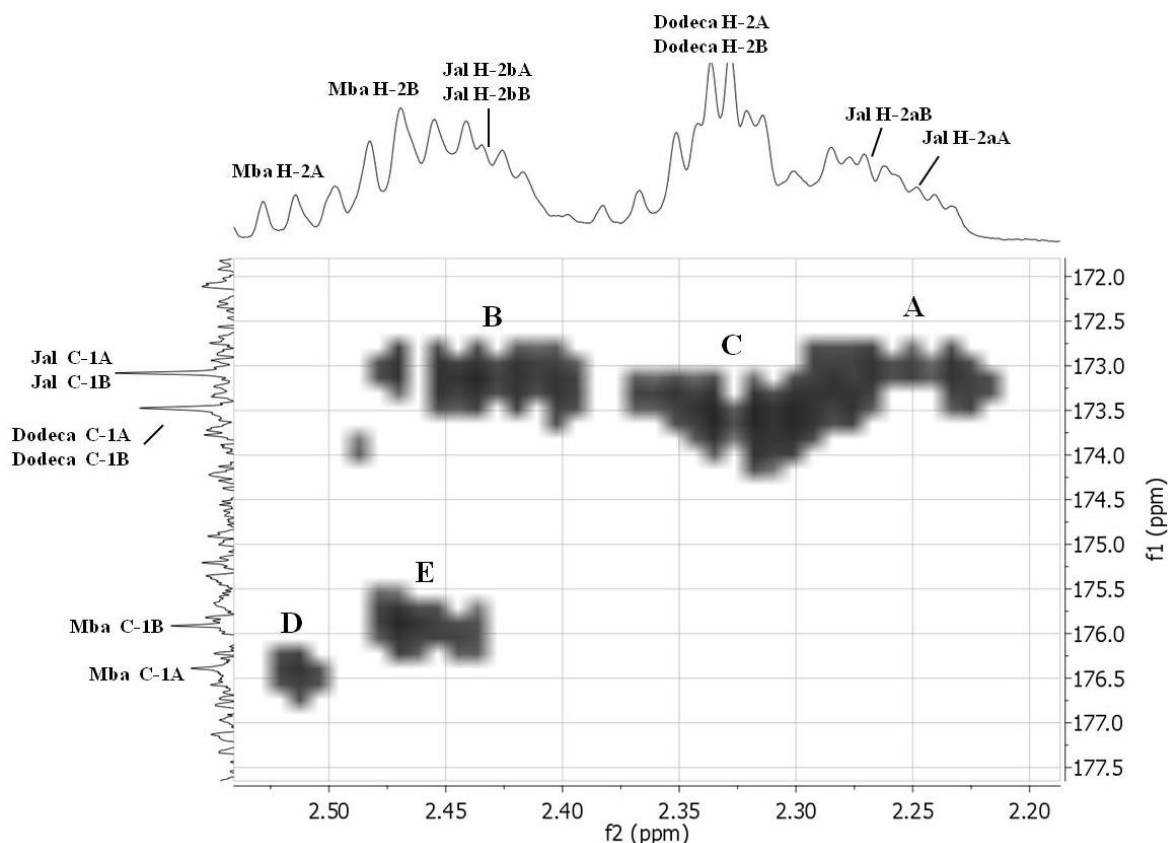


Figura 59. Espectro HMBC de la purgina I (8). Correlaciones a dos enlaces $^2J_{C-H}$ entre los carbonos carbonílicos y los protones alfa metileno o metino de los ésteres. **A:** $C_{1AB} - H_{2aAB}Jal$, **B:** $C_{1AB} - H_{2bAB}Jal$, **C:** $C_{1AB} - H_{2AB}Dodeca$, **D:** $C_{1A} - H_{2A}Mba$, **E:** $C_{1B} - H_{2B}Mba$. Abreviaciones: Mba = 2-metilbutanoilo, Dodeca = *n*-dodecanoilo, Jal = 11-hidroxihexadecanoilo.

Los grupos (2*S*)-2-metilbutanoilo se localizaron en las posiciones C_4 de las ramnosas terminales en ambas unidades por las correlaciones observadas entre sus carbonilos (δ_{C1} 176.4-175.9 ppm) con el H_4 de la ramnosa externa (ram'') en la unidad A (δ_H 5.81 ppm) y en la unidad B (δ_H 6.08 ppm). Un grupo *trans*-cinamoilo (δ_{C1} 166.9 ppm) se identificó en la posición C_2 de la ramnosa terminal (ram'') en la unidad A (δ_H 6.31 ppm), mientras, que el otro grupo *trans*-cinamoilo (δ_{C1} 166.4 ppm) se identificó en la posición C_3 de la ramnosa terminal (ram'') en la unidad B (δ_H 5.99 ppm) (**Figura 60**).

6.8.3 Empleo de la espectrometría de masas

El análisis espectrométrico de la purgina I se llevó a cabo mediante el empleo de dos técnicas de ionización, electrospray (EM-ESI) y bombardeo por átomos acelerados (EM-FAB) de alta resolución. Así, en la EM-ESI se obtuvo el ión pseudomolecular $[M + Cl]^-$ a m/z 2828.5374, correspondiente a la fórmula molecular $C_{144}H_{232}O_{52}$ para el producto natural. Este análisis también permitió detectar los fragmentos $[M/2 - H]^-$ de m/z 1395.7767 y $[M/2 + Cl]^-$ de m/z 1431.7643 como resultado de la ruptura del enlace tipo éster entre las dos unidades que constituyen el dímero (**Figura 61**). En la EM-FAB de la purgina I, el pico $[M/2 - H]^-$ se observó a una m/z de 1395. El fragmento de m/z 1265 corresponde a la pérdida del residuo *trans*-cinamoilo con una diferencia de 130 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 1395; el fragmento de m/z 1083 corresponde a la pérdida del residuo *n*-dodecanoilo con una diferencia de 182 unidades de masa con respecto al ión m/z 1265; el fragmento de m/z 853 corresponde a las pérdidas sucesivas del éster 2-metilbutanoilo (C_5H_8O , 84 u.m.a) y una unidad sacárida de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$, 146 u.m.a) con una diferencia de 230 unidades con respecto al ión de m/z 1083; el fragmento de m/z 691 corresponde a la pérdida subsecuente de una unidad sacárida de hexosa ($C_6H_{10}O_5$) con una diferencia de 162 unidades con respecto al ión de m/z 853.

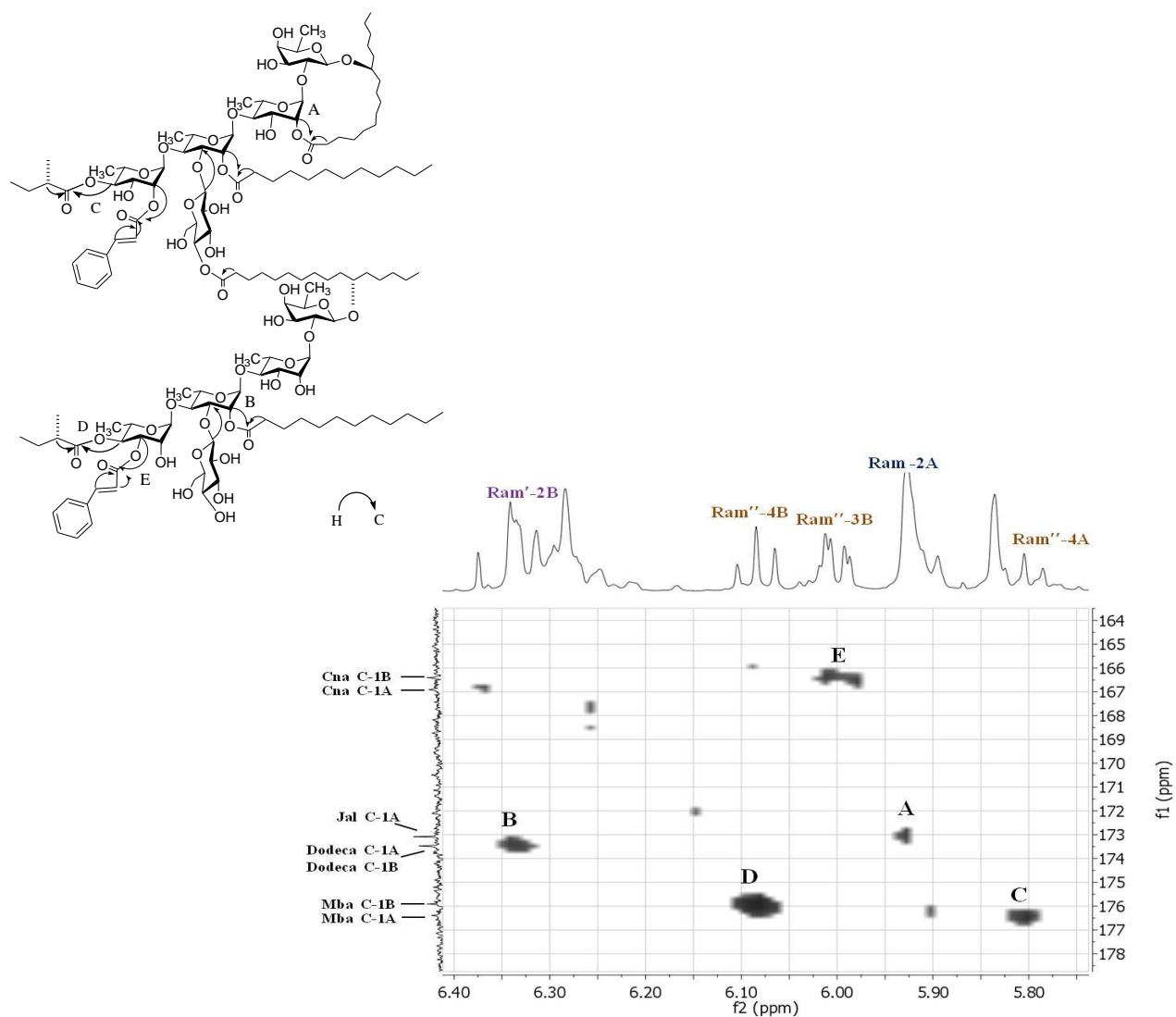


Figura 60. Espectro HMBC de la purgina I (8). Identificación de las posiciones de esterificación. **A:** C_{1A}Jal– H_{2a}Ram, **B:** C_{1B}Dodeca – H_{2B}Ram', **C:** C_{1A}Mba – H_{4A}Ram'', **D:** C_{1B}Mba – H_{4B}Ram'', **E:** C_{1B}Cna – H_{3B}Ram''. Abreviaciones: **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior, **Glu** = glucosa, **A** = Unidad A de la purgina I, **B** = Unidad B de la purgina I, **Mba** = 2-metilbutanoilo, **Dodeca** = *n*-dodecanoilo, **Jal** = 11-hidroxihexadecanoilo, **Cna** = *trans*-cinamoilo.

El fragmento de m/z 545 corresponde a la siguiente pérdida de una unidad sacárida de metilpentosa (C₆H₁₀O₄) con una diferencia de 146 unidades con respecto al ión de m/z 691. El fragmento de m/z 417 corresponde a las pérdidas sucesivas de una unidad sacárida

de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) y agua como producto de la hidrólisis de la macrolactona (18 u.m.a) con una diferencia de 128 unidades con respecto al ión de m/z 545. El fragmento de m/z 271 corresponde a la pérdida de una unidad sacárida de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) con una diferencia de 146 unidades con respecto al ión de m/z 417.

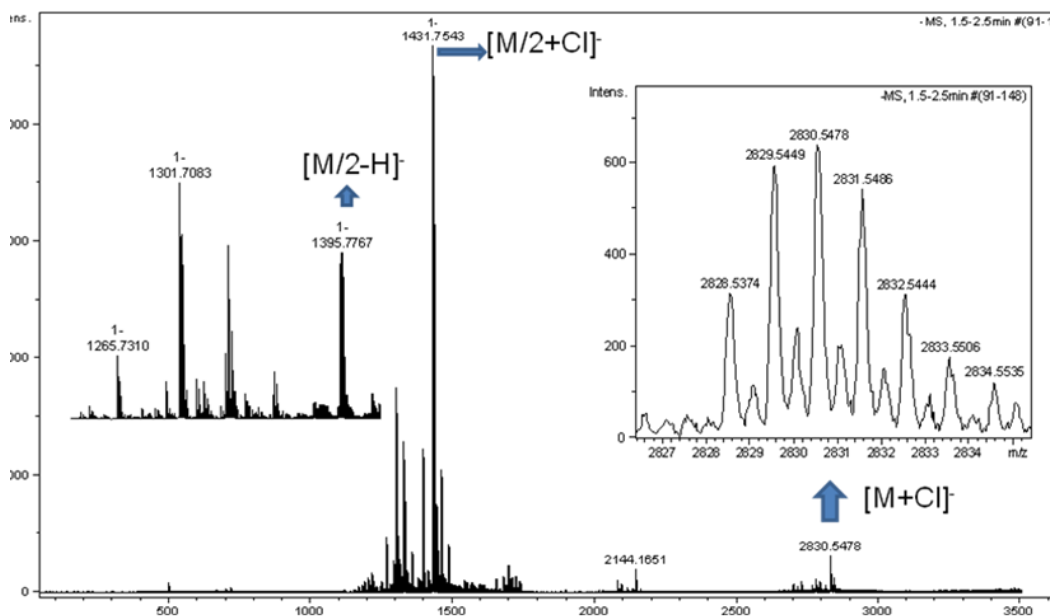
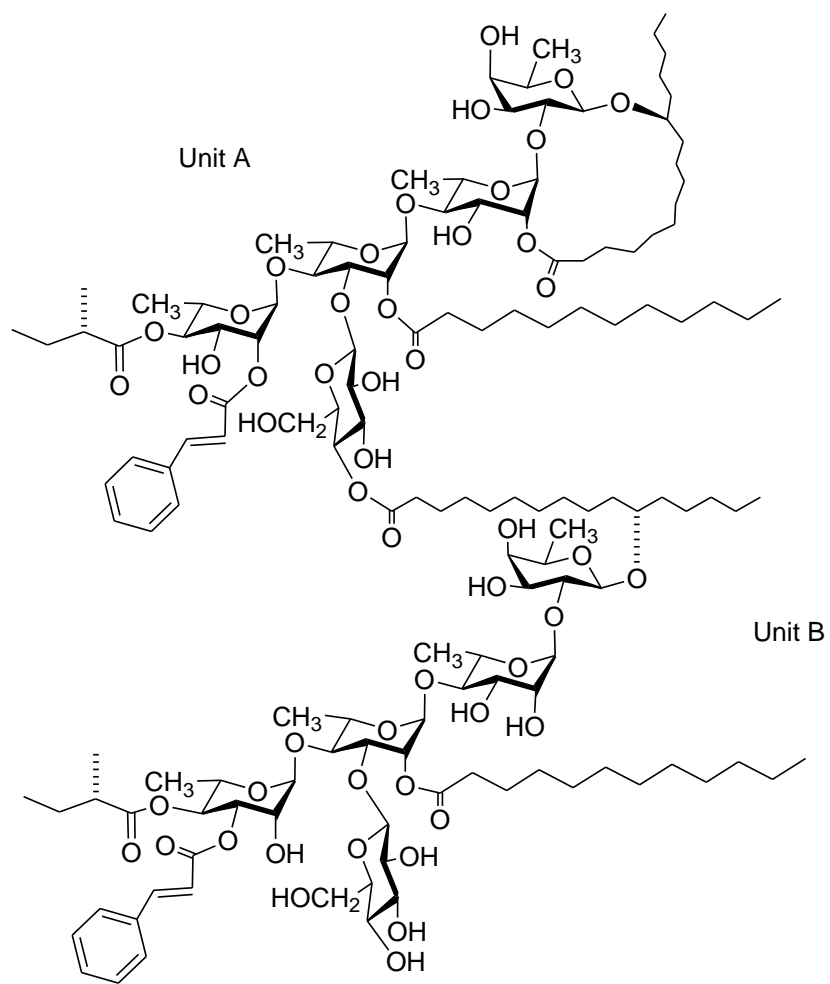


Figura 61. Espectro EM-HRESI de la purgina I (8)

De acuerdo con toda la información espectroscópica y espectrométrica analizada se propuso la siguiente estructura para la purgina I (8):

1,2''-11-O- α -L-[4-O-(11S-hidroxihexadecanoil)-11-O- α -L-ramnopiranosil-{3-O-(*trans*-cinamoil)-4-O-((2S)-2-metilbutanoil)}-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-{2-O-(*n*-dodecanoil)-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil}ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-fucopiranosido]ramnopiranosil-{2-O-(*trans*-cinamoil)-4-O-((2S)-2-metilbutanoil)}-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-{2-O-(*n*-dodecanoil)-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil}ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-fucopiranosido del ácido (11S)-hidroxihexadecanoico.



Cuadro 9. Datos espectroscópicos en la RMN ^1H y ^{13}C para la purgina I (8)^a.

posición ^b	Unidad A		Unidad B	
	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}
fuc-1	4.72 d (7.0)	104.3	4.73 d (7.0)	104.3
2	4.14 dd (9.5, 7.5)	80.0	4.14 dd (9.5, 7.5)	80.0
3	4.04 dd (9.5, 3.5)	73.4	4.04 dd (9.5, 3.5)	73.4
4	3.94 d (3.5)	72.9	3.94 d (3.5)	72.9
5	3.73 q (6.0)	70.8	3.73 q (6.0)	70.8
6	1.49 d (6.0)	17.3	1.49 d (6.0)	17.3
ram-1	5.50 brs	98.5	5.50 brs	98.5
2	5.93 *	73.6	4.5*	68.2
3	5.02 dd (9.0, 3.5)	69.3	5.02 dd (9.0, 3.5)	69.3
4	4.16 dd (9.5, 9.0)	82.0	4.16 dd (9.5, 9.0)	82.0
5	4.49 dq (9.5, 6.0)	68.9	4.49 dq (9.5, 6.0)	68.9
6	1.63 d (6.0)	19.1	1.63 d (6.0)	19.1
ram'-1	5.93 *	99.8	5.84 brs	100.3
2	6.28*	73.3	6.34 brs	73.3
3	4.79 m*	79.9	4.79 m*	79.9
4	4.37*	79.1	4.37*	79.1
5	4.37*	68.5	4.37*	68.5
6	1.52 d (6.5)	18.0	1.65 d (6.0)	19.0
ram''-1	6.28*	99.8	6.28 brs	103.3
2	6.31*	73.4	5.27 brs	70.0
3	4.79 m*	68.2	5.99 dd (10.0, 3.0)	73.0
4	5.81 t (9.5)	75.1	6.08 t (9.5)	71.7
5	4.50 dq (9.5, 6.5)	68.1	4.50 dq (9.5, 6.0)	68.1
6	1.65 d (6.0)	19.0	1.43 d (6.0)	17.9
glu-1	5.09 d (8.0)	105.5	5.10 d (8.0)	105.5
2	3.95 dd (9.0, 7.5)	75.2	3.95 dd (9.0, 7.5)	75.2
3	4.07 dd (9.0, 9.0)	78.5	4.07 dd (9.0, 9.0)	78.5
4	4.4*	78.3	3.95 m*	71.6
5	3.82 m*	78.1	3.82 m*	78.1
6 ^a	4.1*	62.9	4.1*	62.9
6b	4.41*		4.41*	
jal-1		173.1		173.1
2 ^a	2.26 ddd (15.0, 7.0, 4.0)	34.2	2.26 ddd (15.0, 7.0, 4.0)	34.2
2b	2.47 m*	34.4	2.47 m*	34.4
11	3.84 m	82.4	3.84 m	82.4
16	0.85*	14.2	0.85*	14.2
dodeca-1		173.5		173.5
2	2.34 t (7.5)	34.6	2.33 t (7.5)	34.6
12	0.81 t (7.5)	14.2	0.81 t (7.5)	14.2
mba-1		176.4		175.9
2	2.52*	42.0	2.43 tq (7.5, 7.5)	42.0
2-Me	1.14 d (7.0)	17.0	1.14 d (7.0)	17.0
3-Me	0.90 t (7.0)	11.7	0.90 t (7.0)	11.6
Cna-1		166.9		166.4
2	6.35 d (15.5)	118.6	6.59 d (16.0)	118.6
3	7.65 d (16)	145.4	7.85 d (16)	145.4

^aDatos registrados a 500 MHz y 125.7 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. 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. Los patrones de acoplamiento están expresados como: 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 ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC).

^bAbreviaciones: fuc = fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanofilo, A = Unidad macrocíclica, B = Unidad glicosídica esterificante, mba = 2-metilbutanofilo, deca = *n*-decanofilo, hexa = *n*-hexanofilo, cna = trans-cinamofilo.

6.9 Identificación de las purginas II y III

Las estructuras químicas de las purginas II (**9**) y III (**10**) resultaron ser dímeros de pentasacáridos del ácido operculínico B. Cada unidad oligosacárida, unidad A (macrocíclica) y unidad B (glicosídica esterificante) está constituida por dos unidades de D-glucosa y tres unidades de L-ramnosa y el ácido 11*S*-hidroxihexadecanoico. Estos dímeros se diferencian en el tipo de ácido que se encuentra esterificando la posición C₄ de la unidad de ramnosa terminal en cada una de sus unidades A y B, (2*S*)-2-metilbutanoil para la purgina II (**9**) y el residuo *n*-hexanoil para la purgina III (**10**).

La identificación estructural de estos dímeros se realizó nuevamente mediante el análisis de diferentes técnicas espectroscópicas en la RMN mono y bidimensional y en la espectrometría de masas. Inicialmente, se registraron sus espectros de RMN ¹H y ¹³C, y el análisis de sus señales anoméricas de protón (δ 4.6 – 6.5 ppm) y carbono (δ 95 – 110 ppm) permitieron deducir la complejidad de sus estructuras, observándose 10 señales de correlación C-H en el espectro HSQC (**Figura 62**).

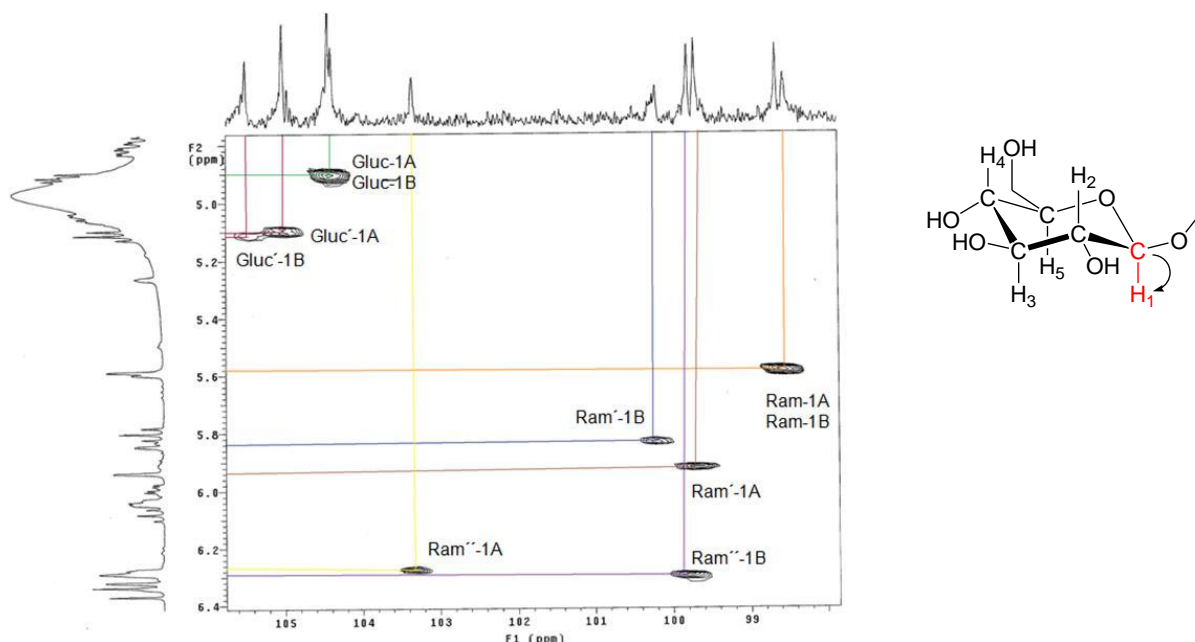


Figura 62. Espectro HSQC de la región anomérica de la purgina II (**9**). ^bAbreviaciones: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa, **Glu** = glucosa, **A** = Unidad macrocíclica, **B** = Unidad glicosídica esterificante.

6.9.1 Empleo de la RMN: COSY y TOCSY

El análisis de los espectros ^1H - ^1H COSY y TOCSY permitió el asignamiento de las señales de protón correspondientes a cada unidad monosacárida del núcleo oligosacárido, mediante el establecimiento de los cuadros de conectividad de cada uno de los protones con su metino vecinal correspondiente. Todas las unidades sacáridas de ramnosa de las purginas II y III (**9** y **10**) se encuentran aciladas debido a la presencia de señales no anoméricas paramagnéticamente desplazadas a campo bajo de acuerdo con las conectividades observadas en la expansión del espectro COSY. Se llevó a cabo la simulación espectral a través del programa MestRe-C para determinar la asignación correcta de las constantes de acoplamiento de todos los protones en cada unidad monosacárida (ver figuras XLV y XLVI, apéndice de espectros). En ambas estructuras díméricas de **9** y **10** se evidenciaron ocho posiciones de esterificación que correspondieron a las siguientes posiciones en el núcleo oligosacárido para las unidades A: H₂ de la ramnosa interna superior (ram, δ_{H} 6.04 – 6.05), H₂ de la ramnosa intermedia (ram', δ_{H} 6.28 ppm), H₂ y H₄ de la ramnosa terminal (ram'', δ_{H_2} 6.32, 6.34 δ_{H_4} 5.80, 5.83 ppm) y H₄ de la unidad de glucosa (glu, δ_{H} 4.41 ppm); y para las unidades B: H₂ de la ramnosa intermedia (ram', δ_{H} 6.34, 6.35 ppm), H₃ y H₄ de la ramnosa terminal (ram'', δ_{H_2} 5.99, δ_{H_4} 6.08, 6.09 ppm) (**Figura 63**). De estas ocho posiciones de esterificación, seis se encuentran ocupadas por los residuos alquílicos de los ácidos (2S)-2-metilbutanoico y *n*-decanoico (confirmado por espectrometría de masas) y los residuos aromáticos del ácido *trans*-cinámico y los dos restantes se encuentran ocupadas por el éster intramolecular de la macrolactona y el enlace éster que une las dos unidades oligosacáridas A y B de la estructura dimérica.

6.9.2 Empleo de la RMN: HSQC y HMBC

Posteriormente, se procedió con la asignación de las señales de carbono en la RMN ^{13}C , auxiliado por la técnica HSQC, a través de las correlaciones ^{13}C - ^1H a un enlace de distancia ($^1J_{\text{C-H}}$) (**Cuadros 10** y **11**). Es importante mencionar, que las señales correspondientes a las posiciones C₅ y C₆ de cada unidad monosacárida se confirmaron mediante la técnica HMBC a través de las correlaciones C₅-H₁ a tres enlaces de distancia

($^3J_{C-H}$) y C_5-H_6 a dos enlaces de distancia ($^2J_{C-H}$). Adicionalmente, la técnica HMBC permitió la identificación de la secuencia de glicosidación mediante las correlaciones observadas $^{13}C-^1H$ entre los carbonos anoméricos con los protones de las unidades monosacáridas vecinas que constituyen el enlace glicosídico (**Figura 64**).

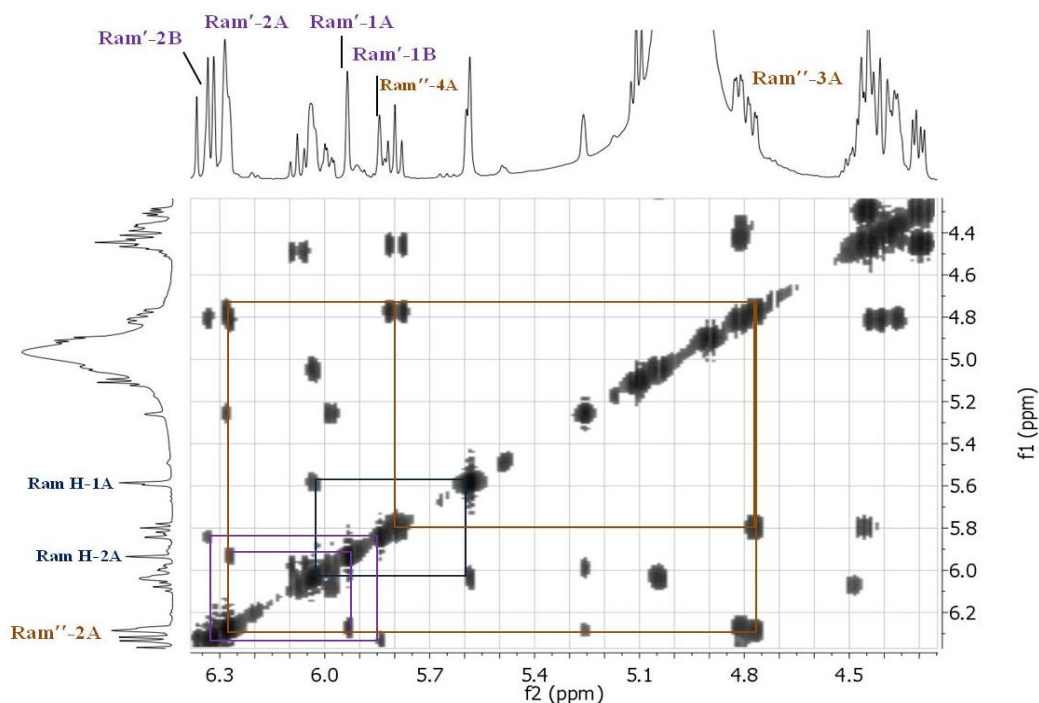


Figura 63. Espectro $^1H-^1H$ COSY de la purgina II (9). Identificación de las señales no anoméricas paramagnéticamente desplazadas. Abreviaturas: **Fuc** = fucosa, **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior, **Glu** = glucosa, **A** = Unidad A de la purgina I, **B** = Unidad B de la purgina I.

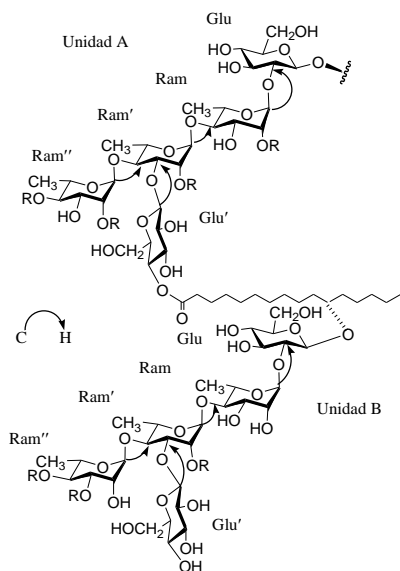


Figura 64. Conectividades C-H a tres enlaces ($^3J_{C-H}$) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación en las purginas II (9) y III (10)

La **Figura 65** ilustra las correlaciones más importantes que se observaron en los espectros HMBC de la purgina II para identificar la secuencia de glicosidación en ambas unidades oligosacáridas A y B, el carbono C₁ de la glucosa superior (δ_C 104 ppm) con el H₁₁ del ácido jalapínico en la unidad A (δ_H 3.86 ppm); el carbono C₁ (δ_C 98 ppm) de la segunda unidad monosacárida (ram) con el H₂ de la unidad de glucosa (δ_H 3.88 ppm); el carbono C₁ (δ_C ~ 100 ppm) de la tercera unidad monosacárida (ram') con el H₄ de la segunda unidad monosacárida (ram) (δ_H 4.17 ppm); el carbono C₁ (δ_C 99.8 (A), 103.4 (B)) de la cuarta unidad monosacárida (ram'') con el H₄ de la tercera unidad monosacárida (ram') (δ_H ~ 4.4 ppm), el C₁ (δ_C ~ 105 ppm) de la unidad de glucosa terminal (glu') con el H₃ de la tercera unidad monosacárida (ram') (δ_H 4.82 ppm).

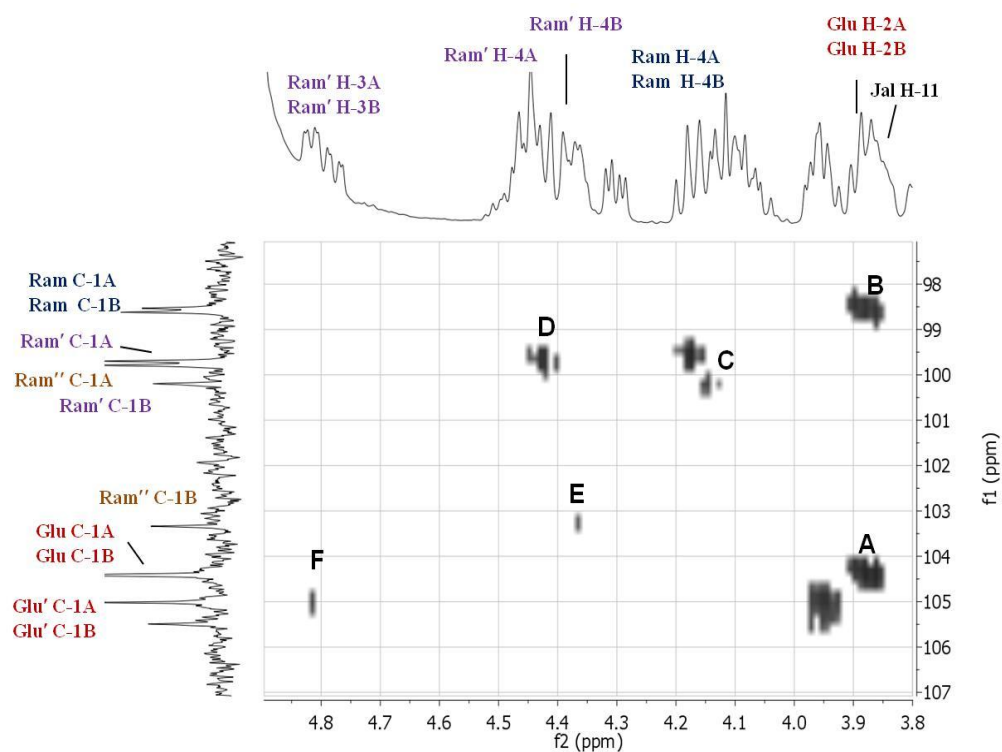


Figura 65. Espectro HMBC de la purgina II (9). Identificación de las posiciones de glicosidación. **A:** C_{1AB}Glu – H_{11A}Jal, **B:** C_{1AB}Ram – H_{2AB}Glu, **C:** C_{1AB}Ram' – H_{4AB}Ram, **D:** C_{1A}Ram'' – H_{4A}Ram', **E:** C_{1B}Ram'' – H_{4B}Ram', **F:** C_{1AB}Glu' – H_{3AB}Ram'. Abreviaciones: **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior, **Glu** = glucosa superior, **Glu'** = glucosa terminal, **A** = Unidad macrocíclica A, **B** = Unidad glicosídica esterificante B, **Jal** = 11-hidroxihexadecanoilo.

La asignación correcta de los carbonos correspondientes a cada uno de los grupos carbonilo de los sustituyentes que se encuentran acilando los núcleos oligosacáridos se llevó a cabo nuevamente a través de las interacciones entre el carbono y los protones H₂ en posición alfa al grupo carbonilo, mediante los espectros HMBC, con el objetivo de luego realizar la localización correcta de los ácidos y la macrolactona en las estructuras. Así, para la purgina II, la señal de carbonilo centrado en δ_C 173.4 ppm se asignó a la lactona y al enlace de la aglicona entre la unidad B acíclica y la unidad A macrocíclica. Las señales de carbonilo centradas en δ_C 173.8, 173.6 ppm se asignaron al residuo *n*-decanoilo de la unidad A y B, respectivamente, y las señales de carbonilo localizadas a δ_C 176.4 ppm (unidad A) y a δ_C 175.9 ppm (unidad B), se asignaron a los residuos (2*S*)-2-metilbutanoilo. Las **figuras 66 y 67** ilustran la asignación para los residuos que esterifican la porción oligosacárida de la purgina II (**9**).

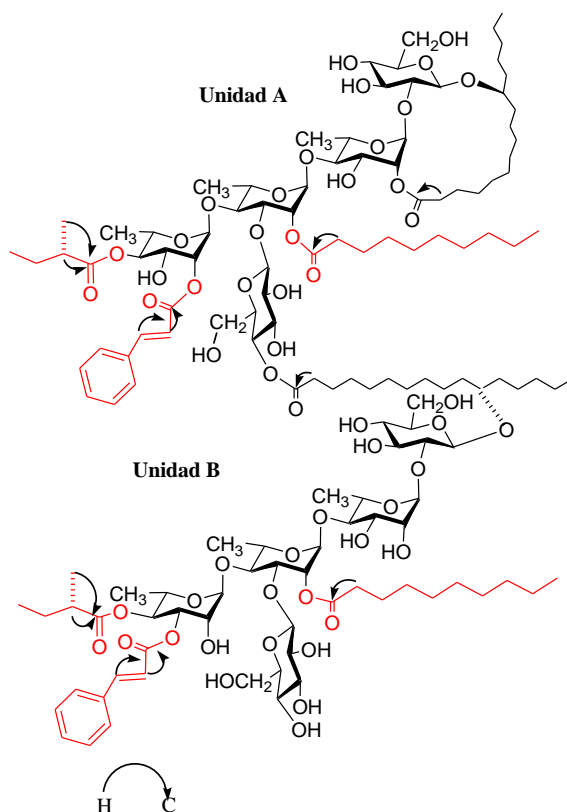


Figura 66. Correlaciones a dos y tres enlaces $^{2-3}J_{C-H}$ entre los carbonos carbonílicos y los protones alfa metileno o metino de los ésteres para la purgina II (**9**)

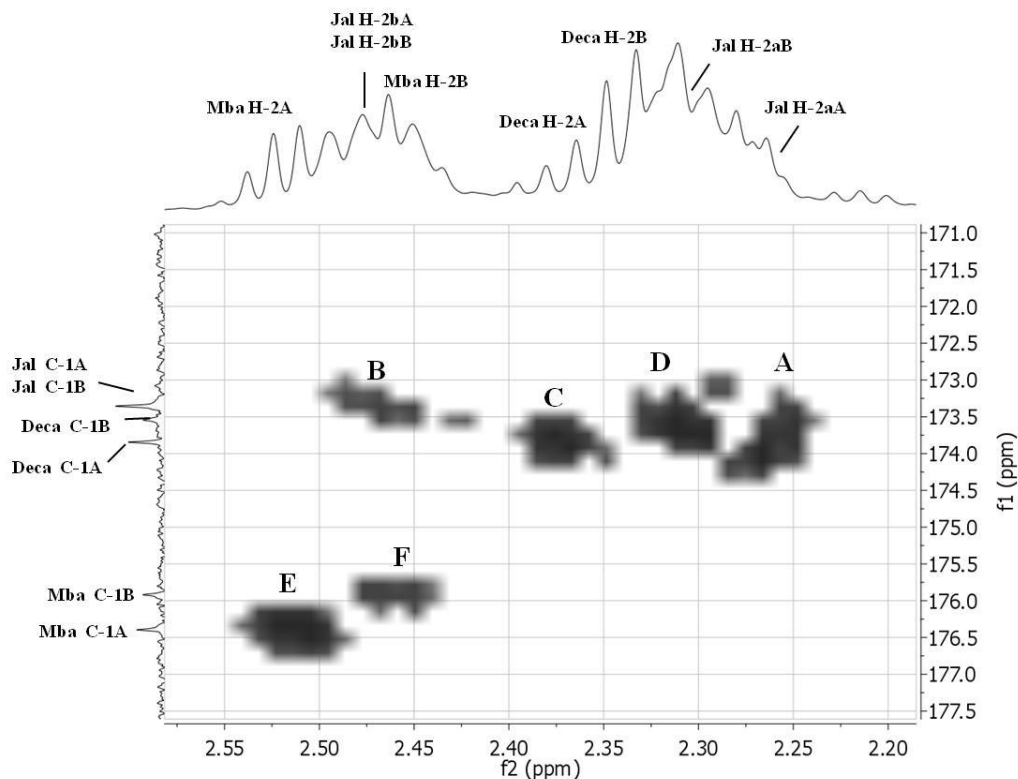


Figura 67. Espectro HMBC de la purgina II (9). Correlaciones a dos enlaces ${}^2J_{C-H}$ entre los carbonos carbonílicos y los protones alfa metileno o metino de los ésteres. **A:** $C_{1AB} - H_{2aAB}Jal$, **B:** $C_{1AB} - H_{2bAB}Jal$, **C:** $C_{1A} - H_{2A}Deca$, **D:** $C_{1B} - H_{2B}Deca$, **E:** $C_{1A} - H_{2A}Mba$, **F:** $C_{1B} - H_{2B}Mba$. Abreviaciones: **Mba** = 2-metilbutanoilo, **Deca** = *n*-dodecanoilo, **Jal** = 11-hidroxihexadecanoilo.

Posteriormente, se llevó a cabo la identificación de los ésteres que se encuentran acilando el núcleo una vez asignada la localización correcta de los desplazamientos químicos de cada grupo carbonilo. Las principales correlaciones ${}^{13}C-{}^1H$ a tres enlaces de distancia (${}^3J_{C-H}$) que se observaron en los espectros HMBC de la purginas II y III entre el C_1 (grupo carbonilo) de cada uno de los ésteres con las señales protónicas geminales a estos grupos en los núcleos oligosacáridos son: C_1 de la lactona (δ_{C_1} 173.4, 173.2 ppm) y el protón H_2 de la ramnosa interna superior (δ_H 6.04, 6.05 ppm), C_1 de la aglicona que una la

unidad B acíclica con la unidad A macrocíclica (δ_{C1} 173.4, 173.2 ppm) y el protón H₄ de la unidad de glucosa terminal (glu, unidad A, δ_H 4.4 ppm) (**Figura 68**).

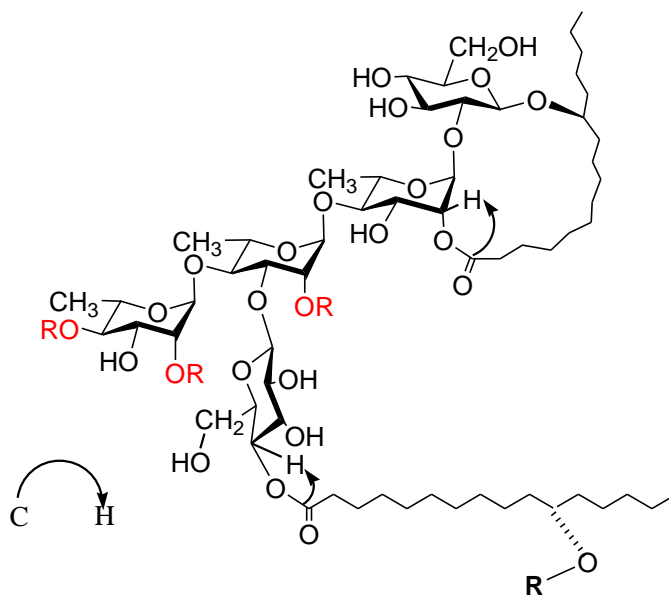


Figura 68. Correlaciones ^{13}C - 1H comunes a tres enlaces de distancia ($^3J_{C-H}$) de la purgina II y III entre el C₁ (grupo carbonilo) de cada uno de los ésteres con las señales protónicas geminales a estos grupos en los núcleos oligosacáridos

Las correlaciones por HMBC que permitieron identificar las posiciones de esterificación en la purgina II (**9**) fueron: C₁ de los grupos *n*-decanoilo (δ_{C1} 173.8, 173.6 ppm) con los H₂ de la ramnosa intermedia (ram') a δ_H 6.28 ppm (unidad A) y a δ_H 6.34 ppm (unidad B); C₁ de los residuos (2*S*)-2-metilbutanoilo (δ_{C1} 176.4-175.9 ppm) con los H₄ de la ramnosa externa (ram'') a δ_H 5.80 ppm (unidad A) y a δ_H 6.08 ppm (unidad B); C₁ de un grupo *trans*-cinamoilo (δ_{C1} 166.9 ppm) con H₂ de la ramnosa terminal (ram'') a δ_H 6.32 ppm (unidad A), y C₁ del otro grupo *trans*-cinamoilo (δ_{C1} 166.4 ppm) con H₃ de la ramnosa terminal (ram'') a δ_H 5.99 ppm (unidad B) (**Figura 69**). Con respecto a la purgina III (**10**), los carbonos C₁ de los grupos *n*-decanoilo (δ_{C1} 173.9, 173.6 ppm) correlacionaron con los H₂ de la ramnosa intermedia (ram') a δ_H 6.28 ppm (unidad A) y a δ_H 6.35 ppm (unidad B); C₁ de los residuos *n*-hexanoilo (δ_{C1} 173.6-173.2 ppm) con los H₄ de la ramnosa externa (ram'') a δ_H 5.83 ppm (unidad A) y a δ_H 6.09 ppm (unidad B); C₁ de un grupo *trans*-

cinamoilo (δ_{C1} 166.9 ppm) con H_2 de la ramnosa terminal (ram'') a δ_H 6.34 ppm (unidad A), y C_1 del otro grupo *trans*-cinamoilo (δ_{C1} 166.5 ppm) con H_3 de la ramnosa terminal (ram'') a δ_H 5.99 ppm (unidad B).

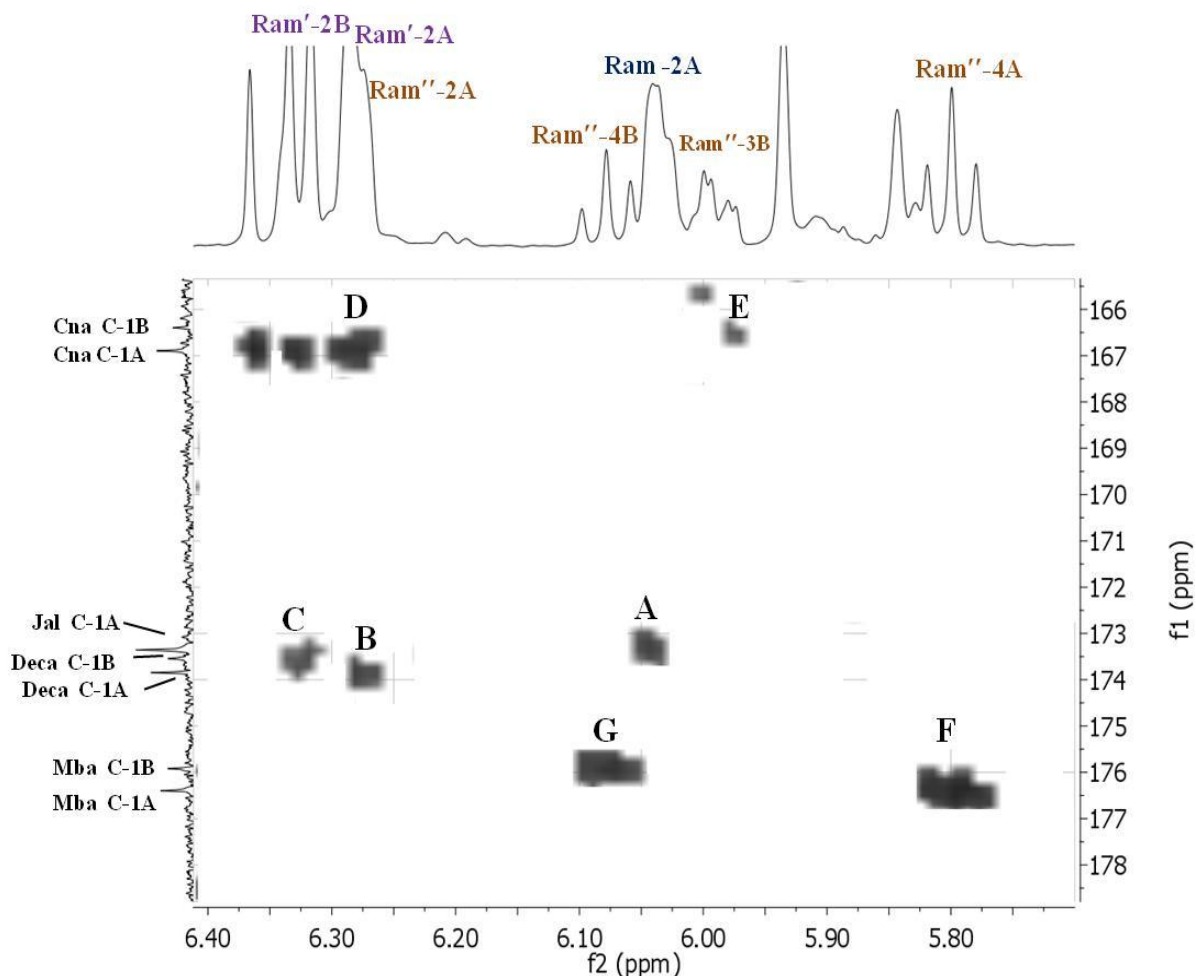


Figura 69. Espectro HMBC de la purgina II (9). Identificación de las posiciones de esterificación. **A:** $C_{1A}Jal - H_{2A}Ram$, **B:** $C_{1A}Deca - H_{2A}Ram'$, **C:** $C_{1B}Deca - H_{2B}Ram'$, **D:** $C_{1A}Cna - H_{2A}Ram''$, **E:** $C_{1B}Cna - H_{3B}Ram''$, **F:** $C_{1A}Mba - H_{4A}Ram''$, **G:** $C_{1B}Mba - H_{4B}Ram''$. Abreviaciones: **Ram** = ramnosa superior, **Ram'** = ramnosa intermedia, **Ram''** = ramnosa inferior, **A** = Unidad A de la purgina I, **B** = Unidad B de la purgina I, **Mba** = 2-metilbutanoilo, **Deca** = *n*-dodecanoilo, **Jal** = 11-hidroxihexadecanoilo, **Cna** = *trans*-cinamoilo.

6.9.3 Empleo de la espectrometría de masas

Las estructuras de las purginas II (**9**) y III (**10**) se confirmaron por espectrometría de masas mediante el empleo de las dos técnicas de ionización: electrospray (EM-ESI) y bombardeo por átomos acelerados (EM-FAB) y los análisis de esta información se realizaron de la misma manera que se llevó a cabo para la purgina I (**8**). Así, para la purgina II (**9**), en la EM-ESI de alta resolución se obtuvo el pico del ión pseudomolecular $[M + Cl]^-$ a m/z 2804.4567 ($\delta + 3.10$ ppm), correspondiente a la fórmula molecular $C_{140}H_{224}O_{54}$ para el producto natural. Adicionalmente, se detectaron los fragmentos $[M/2 - H]^-$ de m/z 1383.7262 y $[M/2 + Cl]^-$ de m/z 1419.7243, como resultado de la ruptura del enlace tipo éster entre las dos unidades que constituyen el dímero y el fragmento $[M/2 - H - C_9H_6O]^-$ de m/z 1253.6816 correspondiente a la pérdida del residuo *trans*-cinamoilo con una diferencia de 130 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 1383.7262 (**Figura 70**). En la EM-FAB⁻ de la purgina II, el pico $[M/2 - H]^-$ se observó a m/z de 1383, mientras que el fragmento $[M/2 - H - C_9H_6O]^-$ se observó a m/z de 1253. El fragmento de m/z 1099 corresponde a la pérdida del residuo *n*-decanoilo con una diferencia de 154 unidades de masa con respecto al ión de m/z 1253.

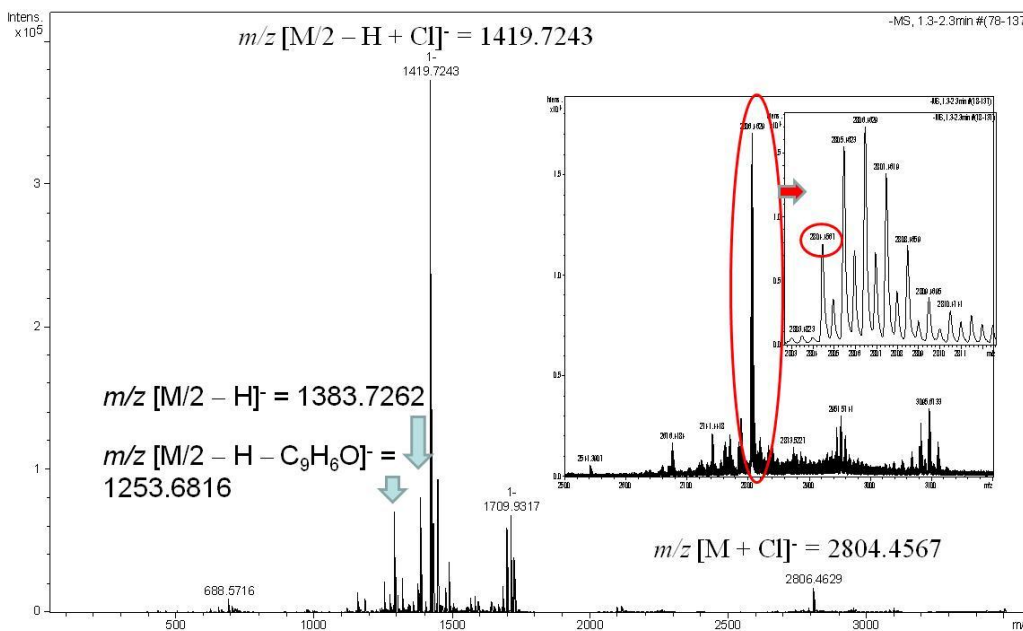


Figura 70. Espectro EM-HRESI de la purgina II (**9**)

Con respecto a la purgina III (**10**), en la EM-ESI de alta resolución se obtuvo el pico del ión pseudomolecular $[M + Cl]^-$ a m/z 2832.4783 ($\delta - 0.35$ ppm), correspondiente a la fórmula molecular $C_{142}H_{228}O_{54}$ para el producto natural. Adicionalmente, se detectaron los fragmentos $[M/2 - H]^-$ de m/z 1397.7474 y $[M/2 + Cl]^-$ de m/z 1433.7236 como resultado de la ruptura del enlace tipo éster entre las dos unidades que constituyen el dímero. El fragmento $[M/2 - H - C_9H_6O]^-$ de m/z 1267.7040 corresponde a la pérdida del residuo *trans*-cinamoilo con una diferencia de 130 unidades de masa con respecto al peso del ión m/z 1397.7474 (**Figura 71**). En la EM-FAB⁻ de la purgina III, el pico $[M/2 - H]^-$ se observó a una m/z de 1397, y el fragmento $[M/2 - H - C_9H_6O]^-$ a una m/z de 1267. El fragmento de m/z 1023 corresponde a la pérdida consecutiva de los residuos *n*-hexanoilo y una unidad de metilpentosa con una diferencia de 244 unidades de masa con respecto al ión de m/z 1267.

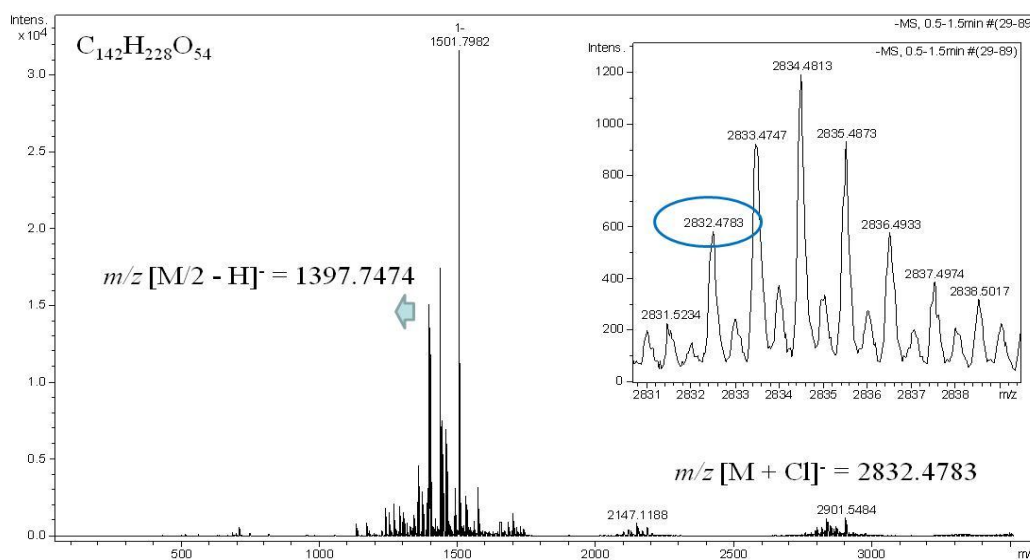
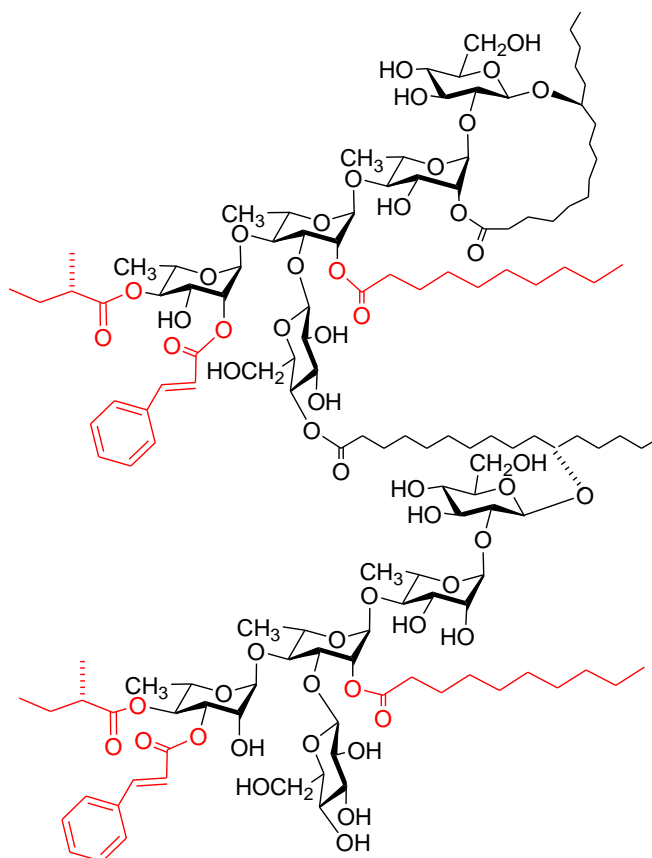


Figura 71. Espectro EM-HRESI de la purgina III (10)

De acuerdo con toda la información espectroscópica y espectrométrica analizada se propusieron las siguientes estructuras para las purginas II (**9**) y III (**10**):

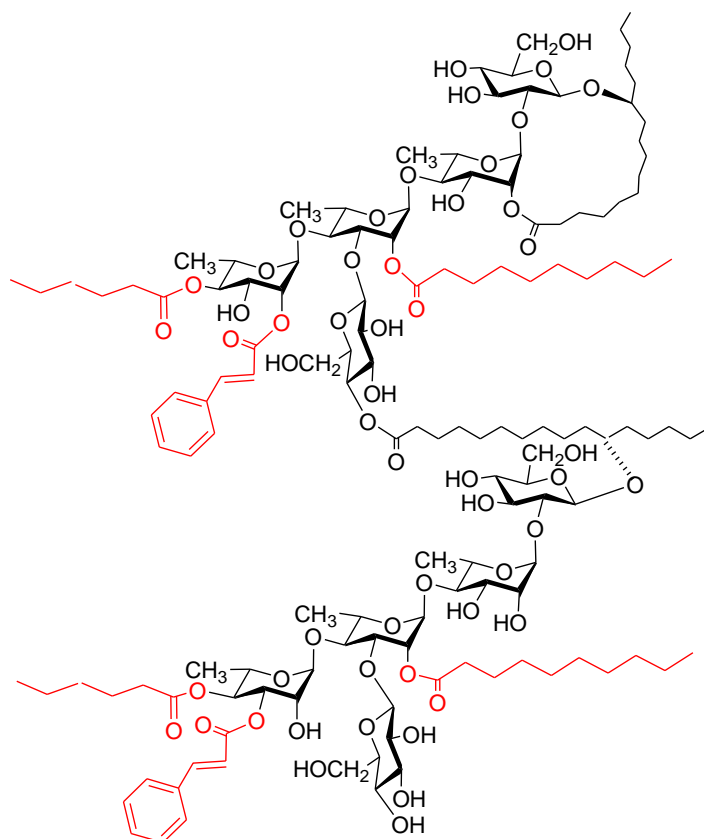
Purgina II (9)

1,2''-11-O- α -L-[4-O-(11*S*-hidroxihexadecanoil)-11-O- α -L-ramnopiranosil-{3-O-(*trans*-cinamoil)-4-O-((2*S*)-2-metilbutanoil)}-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-{2-O-(*n*-decanoil)-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil}ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosido]ramnopiranosil-{2-O-(*trans*-cinamoil)-4-O-((2*S*)-2-metilbutanoil)}-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-{2-O-(*n*-decanoil)-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil}ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico.



Purgina III (10)

1,2''-11-O- α -L-[4-O-(11S-hidroxihexadecanoil)-11-O- α -L-ramnopiranosil-{3-O-(*trans*-cinamoil)-4-O-(*n*-hexanoil)}-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-{2-O-(*n*-decanoil)-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil}ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosido]ramnopiranosil-{2-O-(*trans*-cinamoil)-4-O-(*n*-hexanoil)}-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-{2-O-(*n*-decanoil)-(1 \rightarrow 3)-O- β -D-glucopiranosil}ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosido del ácido (11S)-hidroxihexadecanoico.



Cuadro 10. Datos espectroscópicos en la RMN ^1H y RMN ^{13}C para la purgina II (9)^a.

posición ^b	Unidad A		Unidad B	
	δH	δC	δH	δC
Glu-1	4.91 d (7.5)	104.4	4.90 d (7.5)	104.4
2	3.88 dd (9.5, 7.5)	82.0	3.88 dd (9.5, 7.5)	82.0
3	4.17 t (9.5)	76.6	4.17 t (9.5)	76.6
4	4.1 dd (9.5, 9.5)	71.9	4.1 dd (9.5, 9.5)	71.9
5	3.85 ddd (9.5, 6.0, 3.0)	78.0	3.85 ddd (9.5, 6.0, 3.0)	78.0
6a	4.30 dd (6.0, 11.5)	62.8	4.30 dd (6.0, 11.5)	62.8
6b	4.46 dd (3.0, 11.5)		4.46 dd (3.0, 11.5)	
Ram-1	5.59 brs	98.6	5.60 brs	98.5
2	6.04 dd (3.5, 1.0)	73.5	4.5*	68.3
3	5.05 dd (3.5, 9.5)	69.5	5.05 dd (3.5, 9.5)	69.5
4	4.17 dd (9.5, 9.5)	81.0	4.17 dd (9.5, 9.5)	81.0
5	4.46 dq (6.0, 9.5)	69.0	4.46 dq (6.0, 9.5)	69.0
6	1.58 d (6.0)	19.1	1.6 d (6.0)	19.1
Ram'-1	5.94 brs	99.7	5.84 br s	100.2
2	6.28 dd (3.0, 1.0)	72.8	6.34 d (9.5)	73.3
3	4.82 dd (3.0, 9.0)	79.9	4.82 dd (3, 9.0)	79.9
4	4.37 dd (9.5, 9.5)	78.1	4.4 dd (9.5, 9.5)	78.1
5	4.37 dq (9.5, 6.0)	68.4	4.37 dq (9.5, 6.0)	68.5
6	1.52 d (6.0)	18.0	1.65 d (6.0)	19.0
Ram''-1	6.29 br s	99.8	6.27 br s	103.4
2	6.32 dd (3.0, 1.0)	74.2	5.26 dd (3.0, 1.0)	69.2
3	4.77 dd (10.0, 3.0)	68.2	5.99 dd (10.0, 3.0)	73.0
4	5.80 t (10.0, 9.5)	74.7	6.08 t (10, 9.5)	71.7
5	4.45 dq (9.5, 6.0)	68.2	4.5 dq (9.5, 6.0)	68.2
6	1.67 d (6.0)	19.1	1.43 d (6.0)	17.9
Glu'-1	5.11 d (7.5)	105.0	5.12 d (7.5)	105.5
2	3.96 dd (9.0, 7.5)	75.0	3.95 (9.0, 7.5)	75.0
3	4.10 dd (9.0, 9.0)	78.4	4.06 dd (9.0, 9.0)	78.4
4	4.41 dd (9.0, 9.0)	78.03	3.96 dd (9.0, 9.0)	71.4
5	3.79 ddd (9.5, 6.0, 3.0)	78.3	3.79 ddd (9.5, 6.0, 3.0)	78.3
6a	4.09 dd (6.0, 10.0)	62.7	4.09 dd (6.0, 10.0)	62.7
6b	4.46 dd (3.0, 10.0)		4.46 dd (3.0, 10.0)	
jal-1		173.4		173.4
2a	2.28 ddd (4.0, 7.5, 14.5)	34.4	2.28 ddd (4.0, 7.5, 14.5)	34.4
2b	2.46*	34.3	2.46*	34.3
11	3.86 m*	82.8	3.86 m*	82.8
16	0.83 t (7.0)	14.3	0.83 t (7.0)	14.3
deca-1		173.8		173.6
2	2.37 t (8.0)	34.5	2.33 t (8.0)	34.5
10	0.81 t (7.0)	14.3	0.81 t (7.0)	14.3
mba-1		176.4		175.9
2	2.51 tq (6.5, 7.0)	41.5	2.46*	41.6
2-Me	1.20 d (6.5)	17.0	1.13 d (7.0)	16.9
3-Me	0.90 t (7.5)	11.7	0.81 t (7.0)	11.8
hexa-1				
2				
6				
Cna-1		166.9		166.4
2	6.35 d (16)	118.7	6.58 d (16)	118.6
3	7.65 d (16)	145	7.84 d (16)	145

^aDatos registrados a 500 MHz y 125.7 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. 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. Los patrones de acoplamiento están expresados como: 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 ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC).

^bAbreviaciones: fuc = fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanofilo, A = Unidad macrocíclica, B = Unidad glicosídica esterificante, mba = 2-metilbutanofilo, deca = *n*-decanofilo, cna = *trans*-cinamofilo.

Cuadro 11. Datos espectroscópicos en la RMN ^1H y RMN ^{13}C para la purgina III (10)^a.

posición ^b	Unidad A		Unidad B	
	δH	δC	δH	δC
Glu-1	4.91 d (7.5)	104.5	4.90 d (7.5)	104.5
2	3.89 dd (9.5, 7.5)	82.1	3.89 dd (9.5, 7.5)	82.1
3	4.19 t (9.5)	76.6	4.19 t (9.5)	76.6
4	4.07 dd (9.5, 9.5)	71.9	4.07 dd (9.5, 9.5)	71.9
5	3.80 ddd (3.0, 6.0, 9.5)	78.3	3.80 ddd (3.0, 6.0, 9.5)	78.3
6a	4.30 dd (6.0, 11.5)	62.9	4.30 dd (6.0, 11.5)	62.9
6b	4.43 dd (3.0, 11.5)		4.43 dd (3.0, 11.5)	
Ram-1	5.59 brs	98.7	5.59 brs	98.6
2	6.05 dd (2.0, 3.0)	73.5	4.5 dd (1.0, 3.0)	68.3
3	5.05 dd (3.0, 9.5)	69.5	5.05 dd (3.0, 9.5)	69.5
4	4.17 dd (9.5, 8.5)	81.0	4.17 dd (9.5, 8.5)	81.0
5	4.46 dq (6.0, 8.5)	69.0	4.46 dq (6.0, 8.5)	69.0
6	1.58 d (6.0)	19.0	1.61 d (6.0)	19.0
Ram'-1	5.94 brs	99.8	5.84 d (2.0)	100.2
2	6.28 dd (1.0, 3.5)	72.8	6.35 dd (1.0, 3.5)	74.2
3	4.83 dd (3.5, 9.0)	80.0	4.83 dd (3.5, 9.0)	80.0
4	4.4 dd (9.0, 9.5)	78.0	4.38 dd (9.0, 9.5)	78.0
5	4.39 dd (9.5, 6.0)	68.5	4.39 dd (9.5, 6.0)	68.5
6	1.65 d (6.0)	19.0	1.54 d (6.5)	18.1
Ram''-1	6.30 brs	99.8	6.28 brs	103.3
2	6.34 dd (1.0, 3.0)	73.3	5.26 dd (1.0, 3.0)	70.0
3	4.80 dd (3.0, 9.5)	68.2	5.99 dd (3.0, 9.5)	73.3
4	5.83 t (9.5)	75.1	6.09 t (9.5)	72.0
5	4.5 dd (9.5, 6.0)	68.2	4.45 dd (9.5, 6.0)	68.2
6	1.45 d (6.0)	17.9	1.68 (6.0)	19.0
Glu'-1	5.11 d (8.0)	105.1	5.12 d (7.5)	105.6
2	3.96 dd (8.0, 8.5)	75.2	3.96 dd (8.0, 8.5)	75.2
3	4.07 dd (8.5, 8.5)	78.5	4.07 dd (8.5, 8.5)	78.5
4	4.41 dd (8.5, 9.5)	79	3.96 dd (8.5, 9.5)	71.5
5	3.80 ddd (3.0, 6.0, 9.5)	78.1	3.80 ddd (3.0, 6.0, 9.5)	78.1
6a	4.1 dd (6.0, 10.0)	63.0	4.1 dd (6.0, 10.0)	63.0
6b	4.46 dd (3.0, 10.0)		4.46 dd (3.0, 10.0)	
jal-1		173.2		173.4
2a	2.29 ddd (4.0, 7.0, 11)	34.3	2.30 t (8.0)	34.3
2b	2.49 ddd (4.0, 8.5, 14)	34.5	2.45 t (7.5)	34.5
11	3.85*	82.8	3.85*	82.8
16	0.84 t (7.0)	14.4	0.82 m*	14.4
deca-1		173.9		173.6
2	2.35 t (7.5)	34.6	2.28 t (7.5)	34.3
10	0.82 m*	14.4	0.82 m*	14.4
hexa-1		173.6		173.2
2	2.43 t (7.5)	34.6	2.32 t (8.0)	34.6
6	0.67 t (7.0)	14.0	0.76 (7.0)	14.0
Cna-1		166.9		166.5
2	6.38 d (16)	118.7	6.60 d (16)	118.6
3	7.66 d (16)	145.2	7.86 d (15.5)	145.4

^aDatos registrados a 500 MHz y 125.7 MHz en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. 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. Los patrones de acoplamiento están expresados como: 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 ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC).

^bAbreviaciones: fuc = fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanoilo, A = Unidad macrocíclica, B = Unidad glicosídica esterificante, deca = *n*-decanoilo, hexa = *n*-hexanoilo, cna = *trans*-cinamoilo.

7. CONCLUSIONES

- 7.1 El presente trabajo de investigación describe el primer estudio químico de las resinas glicosídicas intactas de la especie medicinal purgante *Ipomoea purga*. La cromatografía de líquidos de alta eficiencia representó una herramienta indispensable para lograr la purificación de los oligosacáridos individuales (pentasacáridos y dímeros tipo-éster) que componen las complejas mezclas de resinas glicosídicas aisladas del extracto clorofórmico del material vegetal en estudio.
- 7.2 La resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas fueron las técnicas analíticas utilizadas para la caracterización de las estructuras moleculares de los oligosacáridos en estudio. Los núcleos glicosídicos se caracterizaron como: el **ácido operculínico A** (11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico) y el **ácido operculínico B** (11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-*O*-[α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)]- β -D-glucopiranosido del ácido (11*S*)-11-hidroxihexadecanoico). El empleo de técnicas degradativas como la saponificación permitió la identificación de los ácidos isobutírico, 2-metilbutírico, *n*-hexanoico, *n*-octanoico, *n*-decanoico, *n*-dodecanoico y cinámico como los residuos acilantes de los ácidos glicosídicos.
- 7.3 Utilizando las técnicas en la cromatografía de líquidos en fase reversa (columna C₁₈, MeOH como fase móvil) como el corte de núcleo, el rasurado de picos y el reciclaje de la muestra, se obtuvieron siete glicolípidos novedosos, los **purginósidos I-IV (4-7)** y las **purginas I-III (8-10)**, mismos que componen las resinas glicosídicas solubles en cloroformo de las partes aéreas del material en estudio. La cromatografía de líquidos permitió resolver la mezcla compleja de resinas glicosídicas con una

homogeneidad cromatográfica (>95%) adecuada para el registro de sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas.

- 7.4 El empleo de diferentes técnicas en la resonancia magnética nuclear mono (^1H y ^{13}C) y bidimensional (COSY, TOCSY, HSQC, HMBC, NOESY y ROESY), en conjunto a la espectrometría de masas por bombardeo con átomos rápidos (FAB) y electrospray (ESI), permitió la elucidación estructural de estas nuevas moléculas con una compleja estructura. Los purginósidos I - IV (**4-7**) resultaron ser monómeros constituidos por el núcleo pentasacárido del ácido operculínico A, mientras que la purgina I (**8**) se identificó como un dímero tipo éster del ácido operculínico A. Las purginas II (**9**) y III (**10**) representan estructuras diméricas constituidas por dos unidades pentasacáridas del ácido operculínico B.
- 7.5 La localización de la aglicona de la macrolactona se estableció en la posición C_2 de la segunda unidad monosacárida (ram) para toda la serie de los **purginósidos I-IV** y para las **purginas I – III (8-10)**. La posición del éster que une las dos unidades A y B de las purginas I-III se estableció en la posición C_4 de la unidad de glucosa terminal.
- 7.6 En todos los lipooligosacáridos aislados se observaron residuos ácidos esterificando sus núcleos oligosacáridos, principalmente en las posiciones C_2 de la tercera unidad monosacárida (ram) y las posiciones C_2 ó C_3 y C_4 de la unidad de ramnosa terminal (ram'') identificados como el *n*-decanoilo, *n*-dodecanoilo, el *trans*-cinamoilo, el (2*S*)-2-metilbutanoilo y el *n*-hexanoilo.
- 7.7 Todos los purginósidos obtenidos de la especie *Ipomoea purga* son novedosos, y las principales diferencias entre ellos radican en el tipo de sustituyente acilante de las posiciones C_2 ó C_3 y C_4 de la unidad de ramnosa terminal (ram'') por los residuos

trans-cinamoilo, el (2*S*)-2-metilbutanoilo y el *n*-hexanoilo. Los **purginósidos I-II** y la **purgina I** se describieron como resultado del presente trabajo de investigación en el *Journal Natural Products* (Castañeda-Gómez J, Pereda-Miranda R. (2011). Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap. *J. Nat. Prod.* **74**: 1148–1153).

- 7.8 Las **purginas II-III** representan los primeros ejemplos de dímeros tipo éster del ácido operculínico B. La principal diferencia entre ellas se encuentra en el tipo de sustiyente ácido que se encuentra acilando la posición C₄ de la ramnosa terminal, por el 2*S*-2-metilbutanoilo o por el *n*-hexanoilo.

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M.; Moore, P. K. (2004) *Farmacología*; Quinta edición: Elsevier, Churchill Livingstone, p 2.
2. Shu, Y. Z. (1998) Recent Natural Products Based Drug Development: A Pharmaceutical Industry Perspective. *J. Nat. Prod.* **61**: 1053.
3. Packer, L.; Nam Ong, C.; Halliwell, B. (2004) *Herbal and Traditional Medicine. Molecular Aspects of Health*. Marcel Dekker:New York, p 53.
4. Monardes, N. (1990) Instituto Mexicano del seguro social. México, p 96
5. Pereda-Miranda, R.; Bah, M. (2003) Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr Top Med Chem.* **3**: 111.
6. Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J. (2010) In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer-Verlag: New York; Vol. **92**, Chapter 2, p 77.
7. Castañeda-Gómez, J.; Pereda-Miranda, R. (2011) Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap. *J. Nat. Prod.* **74**: 1148.
8. Davidow, J. (1999) *Infusions of Healing. A Treasury of Mexican-American Herbal Remedies*; Fireside: New York, p 134.
9. McDonald, A. (1994) *Flora de Veracruz*; Instituto de Ecología, A.C. Xalapa, University of California: Riverside, CA, Fascículo **77**: 98.
10. Osuna, L.; Ponces-Monter, H.; Campos, G. M.; Rojas, J.; Meckes, M. (1996) Effect of *Ipomoea intrapilosa* methanol extract on the serotonergic response in rat uterus. *Phytotherapy Research* **10**: 257.
11. Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R. (2006) Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **69**: 595.

12. Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R. (2006) Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **69**: 595.
13. 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. (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.
14. 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.
15. Ding, W.; Jiang, Z-H.; Wu, P.; Xu, L.; Wei, X. (2012) Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry En progreso*
16. León, I.; Mirón, G.; Alonso, D. (2006) Characterization of Pentasaccharide Glycosides from the Roots of *Ipomoea arborescens*. *J. Nat. Prod.* **69**: 896.
17. Takigawa, A.; Muto, H.; Kabata, K.; Okawa, M.; Kinjo, J.; Yoshimitsu, H.; Nohara, T.; Ono, M. (2011) Calysolins I-IV, Resin Glycosides from *Calystegia soldanella*. *J. Nat. Prod.* **74**: 2414.
18. Kitagawa, I.; In, N.; Ykokawa, Y.; Yoshikawa, M. (1996) Chemical Structures of Four New Resin-Glycosides, Meremosides F, G, H₁, and H₂, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **44**: 1693.
19. Ono, M.; Honda, F.; Karahashi, A.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1997) Resin Glycosides XXV. Multifidins I and II, New Jalapins, from the seed of *Quamoclit x multifida*. *Chem. Pharm. Bull.* **45**: 1955.

20. León, I.; Enriquez, R. G.; Nieto, D. A.; Alonso, D.; Reynolds, W. F.; Aranda, E.; Villa, J. (2005) Pentasaccharide Glycosides from the Roots of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **68**: 1141.
21. Yin, Y-Q.; Wang, J-S.; Luo, J-G.; Kong, L-Y. (2009) Novel acylated lipooligosaccharides from the tubers of *Ipomoea batatas*. *Carbohydr. Res.* 344:466.
22. 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.
23. Ono, M.; Fukuda, H.; Murata, H.; Miyahara, K. (2009) Resin Glycosides from the leaves and stems of *Ipomoea digitata*. *J. Nat. Med.* **63**: 176.
24. Bah, M.; Chérigo, L.; Cardoso, A.; Fragoso-Serrano, M.; Hammond, B.; Pereda Miranda, R. (2007) Intrapilosins I-VII, Pentasaccharides from the Seeds of *Ipomoea intrapilosa*. *J. Nat. Prod.* **70**: 1153.
25. Barnes, C. C.; Smalley, M. K.; Manfredi, K.P.; Kindscher, K.; Loring, H.; Sheeley, D. M. (2003) Characterization of an Anti-tuberculosis Resin Glycoside from the Prairie Medicinal Plant *Ipomoea leptophylla*. *J. Nat. Prod.* **66**: 1457.
26. Kitagawa, I.; Ohashi, K.; In, N.; Sakagami, M.; Yoshikawa, M.; Shibuya, H. (1997) Indonesian Medinal Plants. XIX. Chemical Structures of Four Additional Resin Glycosides, Mammosides A, B, H₁ and H₂, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* **45**: 786.
27. Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Jacobo-Herrera, N.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. (2008) Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **71**: 1037.

28. Ono, M.; Kubo, K.; Miyahara, K.; Kawasaki, T. (1989) Operculin I and II, New Ether Soluble Resin Glycosides (“Jalapin”) with Fatty Acid Ester Groups from Rhizoma Jalapae Braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **37**: 241.
29. Ono, M.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1991) Resin Glycosides XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII. New Ether-Soluble Resin Glycosides of Rhizoma Jalapae Braziliensis (Root of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **39**: 2534.
30. Noda, N.; Takahashi, T.; Kawasaki, T.; Miyahara, K.; Yang, C. R. (1994) Stoloniferins I-VII, Resin Glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* **36**: 365.
31. Ono, M.; Kuwabata, K.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides XVI. Quamoclines I-IV, New Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the Seeds of *Quamoclit pennata*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 2674.
32. Noda, N.; Tsuji, K.; Miyahara, K.; Yang, C. R. (1994) Resin Glycosides XXI. Tuguajalapins I-X, the Resin Glycosides Having Long-Chain Fatty Acid Groups from the Root of *Merremia hungaiensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **42**: 2011.
33. Escobedo-Martínez, C.; Pereda-Miranda, R. (2007) Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *J. Nat. Prod.* **70**: 974.
34. 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.
35. Ono, M.; Kuwabata, K.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides XVI. Quamoclines I-IV, New Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the Seeds of *Quamoclit pennata*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 2674.

36. Noda, N.; Yoda, S.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides XV. Simonins I-V, Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapins) from the Roots of *Ipomoea batatas*. *Chem. Pharm. Bull.* **40**: 3163.
37. 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.
38. Yin, Y.; Li, Y.; Kong, L. (2008) Pentasaccharide Glycosides from the Tubers of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *J. Agric. Food Chem.* **56**: 2363.
39. Tao, H.; Hao, X.; Liu, J.; Ding, J.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. (2008) Resin Glycoside constituents of *Ipomoea pescaprae* (Beach Morning Glory). *J. Nat. Prod.* **71**: 1998.
40. Gaspar, E. (1999) New Pentasaccharide Macrolactone from the European Convolvulaceae *Calystegia soldanella*. *Tetrahedron Lett.* **40**: 6861.
41. Ono, M.; Nakagawa, T.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1993) Woodrosins I and II, Ether-Insoluble Resin Glycosides from the stems of *Ipomoea tuberosa*. *Chem. Pharm. Bull.* **41**: 1925.
42. MacLeod, J. K.; Ward, A.; Oelrichs, P. B. (1997) Structural Investigation of Resin Glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *J. Nat. Prod.* **60**: 467.
43. Wagner, H.; Kazmaier, P. (1977) Struktur der Operculinsäure aus dem Harz von *Ipomoea operculata*. *Phytochemistry* **16**: 711.
44. Ono, M.; Nishioka, H.; Fukushima, T.; Kunimatsu, H.; Mine, A.; Kubo, H.; Miyahara, K. (2009) Components of Ether-Insoluble Resin Glycoside (Rhamnoconvulin) from Rhizoma *Jalapae Braziliensis*. *Chem. Pharm. Bull.*

- 57(3): 262.
45. Okabe, H.; Kawasaki, T. (1972) Studies on Resin Glycosides III. Complete Structures of Pharbitic Acids C and D. *Chem. Pharm. Bull.* **20**: 514.
46. Yin, Y-Q.; Huang, X-F.; Kong, L-Y.; Niwa, M. (2008) Three New Pentasaccharide Resin Glycosides from the roots of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Chem. Pharm. Bull.* **56**: 1670.
47. Pereda-Miranda, 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.
48. Ono, M.; Takigawa, A.; Mineno, T.; Yoshimitsu, H.; Nohara, T.; Ikeda, T.; Fukuda Teramachi, E.; Noda, N.; Miyahara, K. (2010) Acylated Glycosides of Hydroxy Fatty Acid Methyl Esters Generated from the Crude Resin Glycoside (Pharbitin) of Seeds of *Pharbitis nil* by Treatment with Indium(III) Chloride in Methanol. *J. Nat. Prod.* **73**: 1846.
49. Noda, N.; Tsuji, K.; Kawasaki, T.; Miyahara, K.; Hanazono, H.; Yang, C. R. (1995) A Novel Resin Glycoside, Merremmin (Tuguajalapin X Dimer), from *Merremia hungaiensis*. *Chem. Pharm. Bull.* **43**: 1061.
50. 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.
51. Rosas-Ramirez, D.; Escalante-Sanchez, E.; Pereda-Miranda, R. (2011) Batatins III-VI, glycolipid ester type-dimers from *Ipomoea batatas*. *Phytochemistry* **72**(8): 773.
52. León-Rivera, I.; Mirón-López, G.; Estrada-Soto, S.; Aguirre-Crespo, F.; Gutierrez,

M. C.; Molina-Salinas, G. M.; Hurtado, G.; Navarrete-Vásquez, G.; Montiel, E.
(2009) Glycolipid ester-type heterodimers from *Ipomoea tyrianthina* and their
pharmacological activity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**: 4652.

9. APÉNDICE

9.1 Artículos generados por la presente investigación

1. Jhon Castañeda-Gómez and Rogelio Pereda-Miranda R. (2010) Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (*Ipomoea purga*). *J. Nat. Prod.* **74**, 1148-1153
2. Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J (2010). *Resin Glycosides from the Morning Glory Family*. En: Kinghorn D, Falk H, Kobayashi J (eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer: New York, Vol. 92, p 77-152.
3. Jhon Castañeda-Gómez, Gabriela Figueroa-Gonzales and Rogelio Pereda-Miranda. **Purgin II**, A multidrug resistance inhibitor oligosaccharide in human breast cancer cells. En preparación

9.2 Trabajos presentados en congresos

Modalidad poster:

- Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (*Ipomoea purga*). Jhon Castañeda-Gómez and Rogelio Pereda-Miranda. En: The 52nd Annual Meeting of the American Society of Pharmacognosy. San Diego, California, USA, 2011.
- Oligosacáridos lipofílicos de la especie medicinal *Ipomoea purga*. Congreso QUIMIUNAM 2010, Universidad Nacional Autónoma de México

Presentación Oral

- Purgin II. A multidrug resistance inhibitor oligosaccharide in Human Breast Cancer Cell. QUIMIUNAM 2011, Universidad Nacional Autónoma de México.

10. ESPECTROS

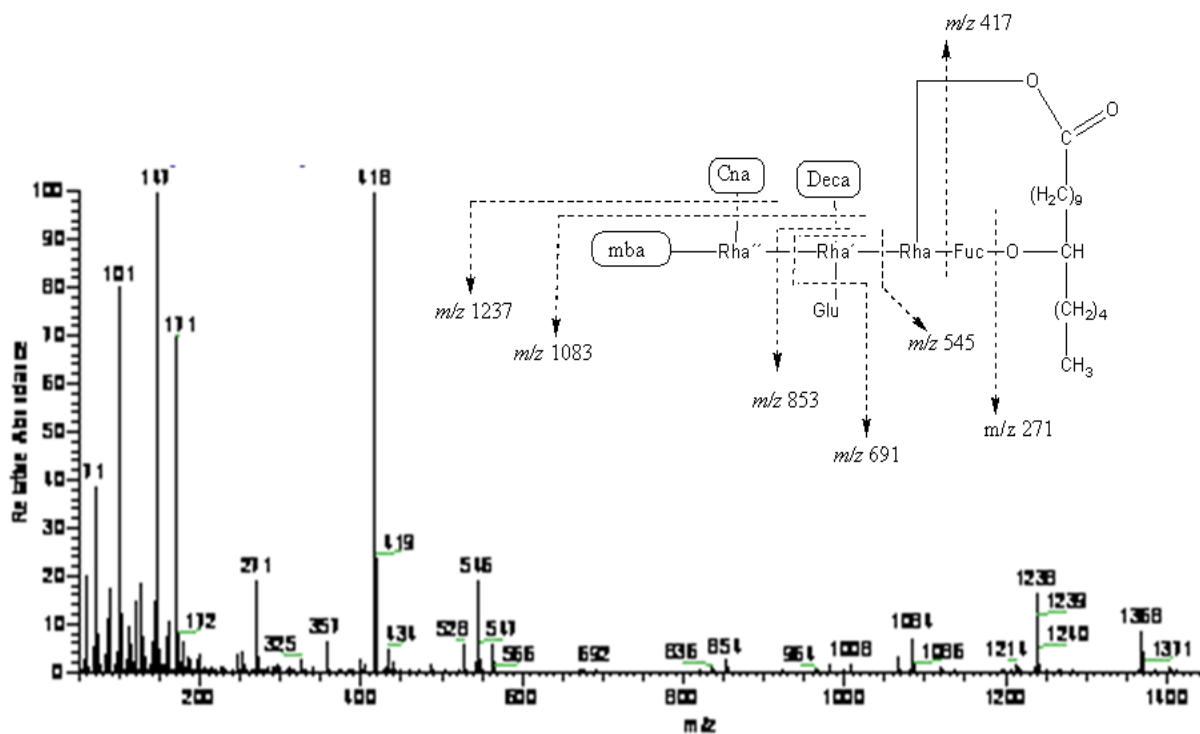


Figura I. Espectro de masas FAB en modo negativo del purginósido I (4)

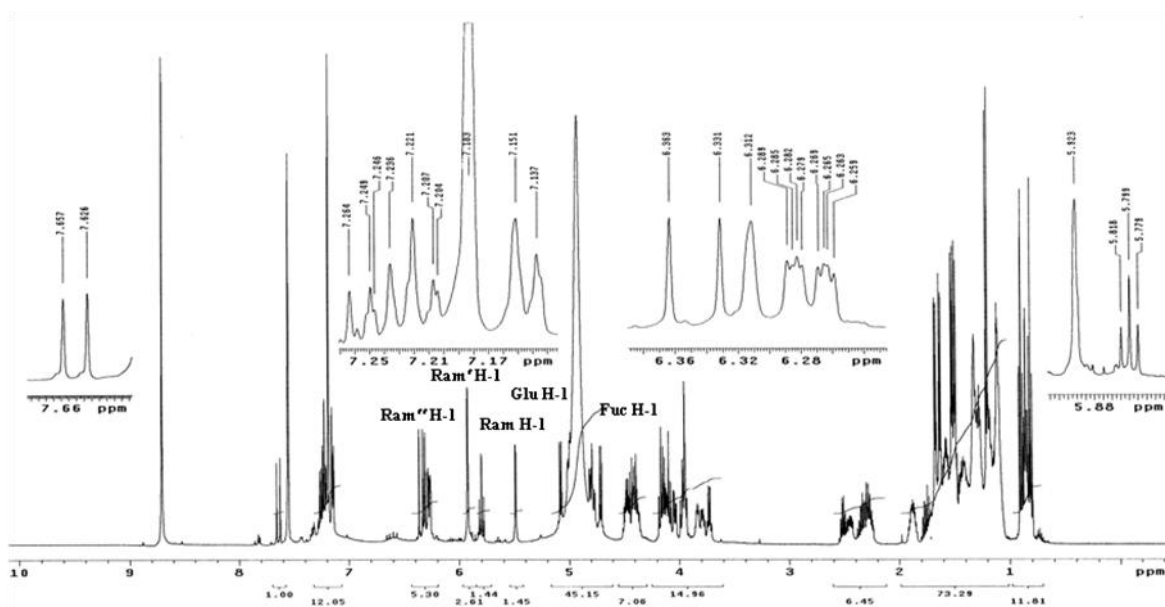


Figura II. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido I (4)

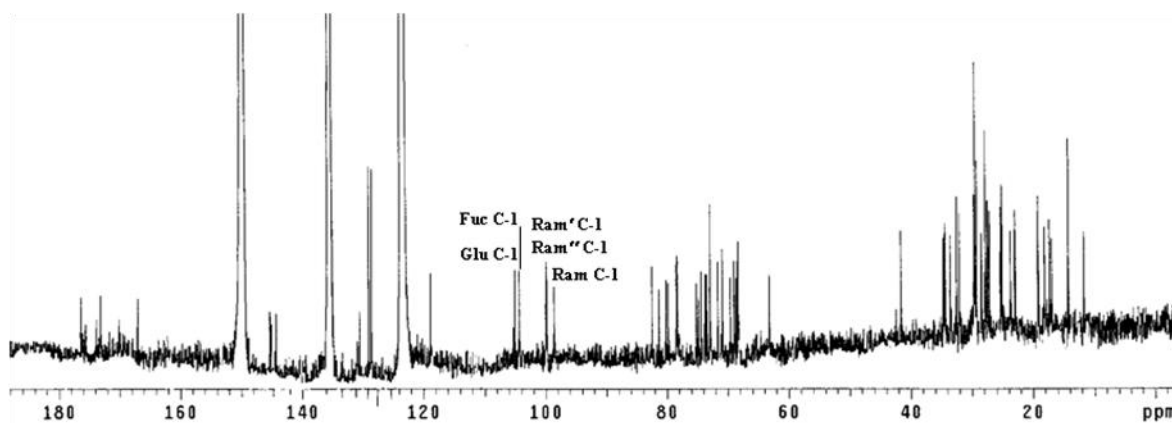


Figura III. Espectro de RMN ^{13}C (125.7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido I (4)

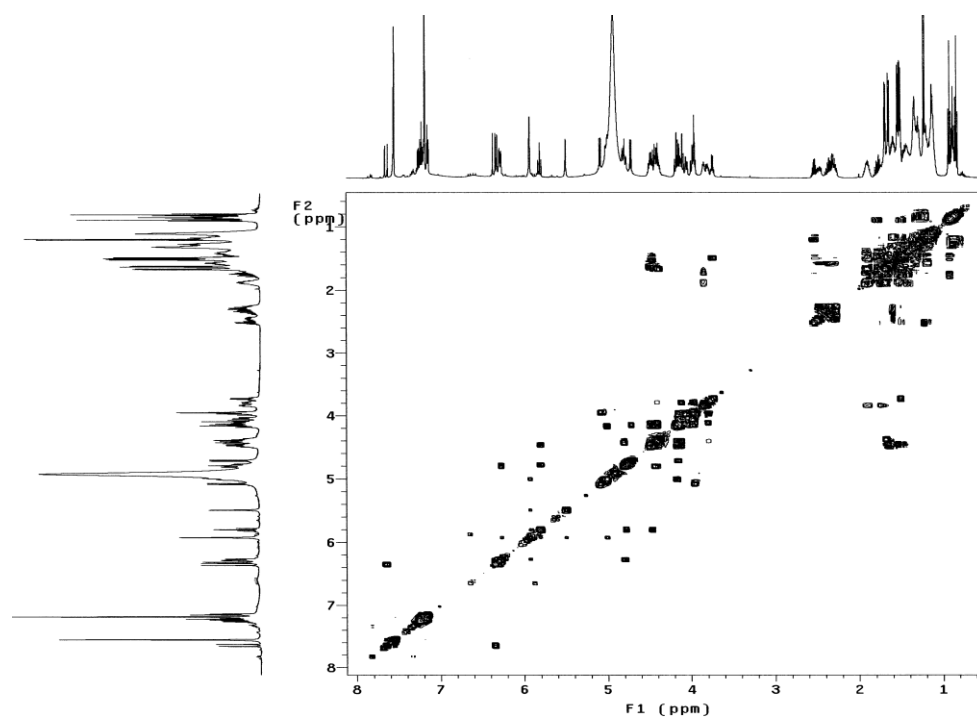


Figura IV. Espectro COSY (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido I (4)

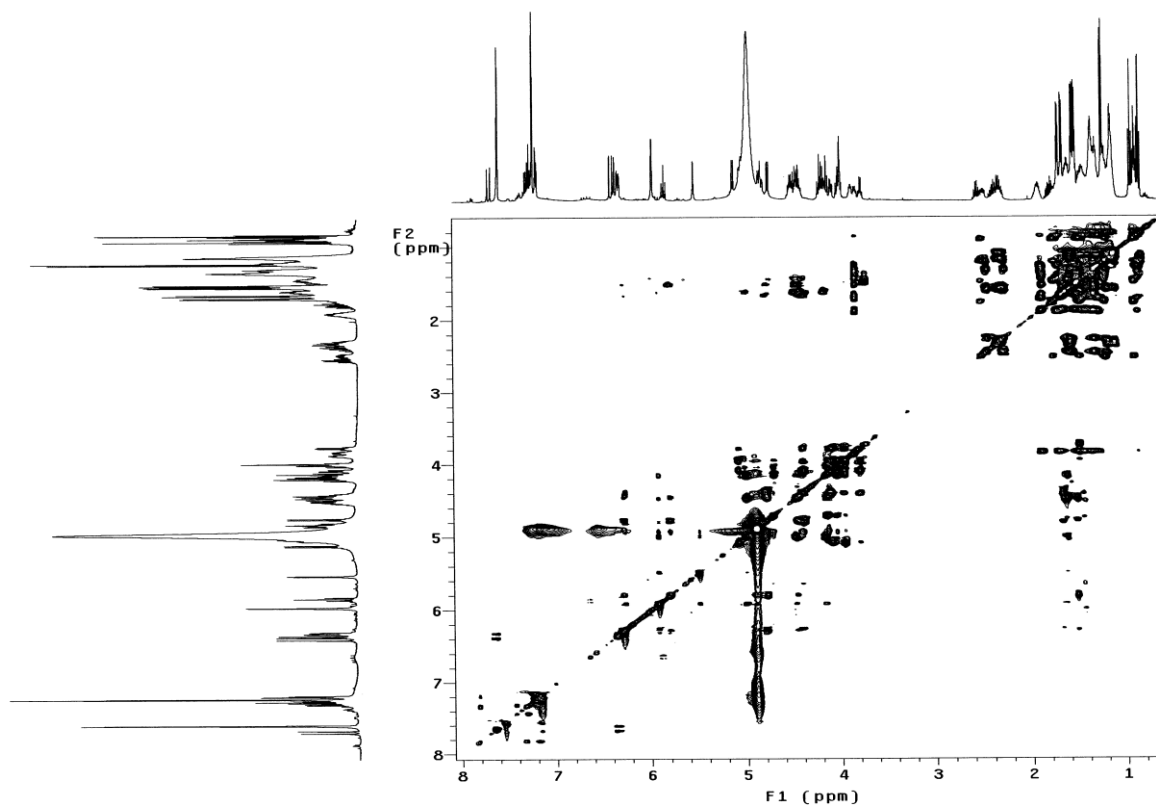


Figura V. Espectro TOCSY (500 MHz, C₅D₅N) del purginósido I (4)

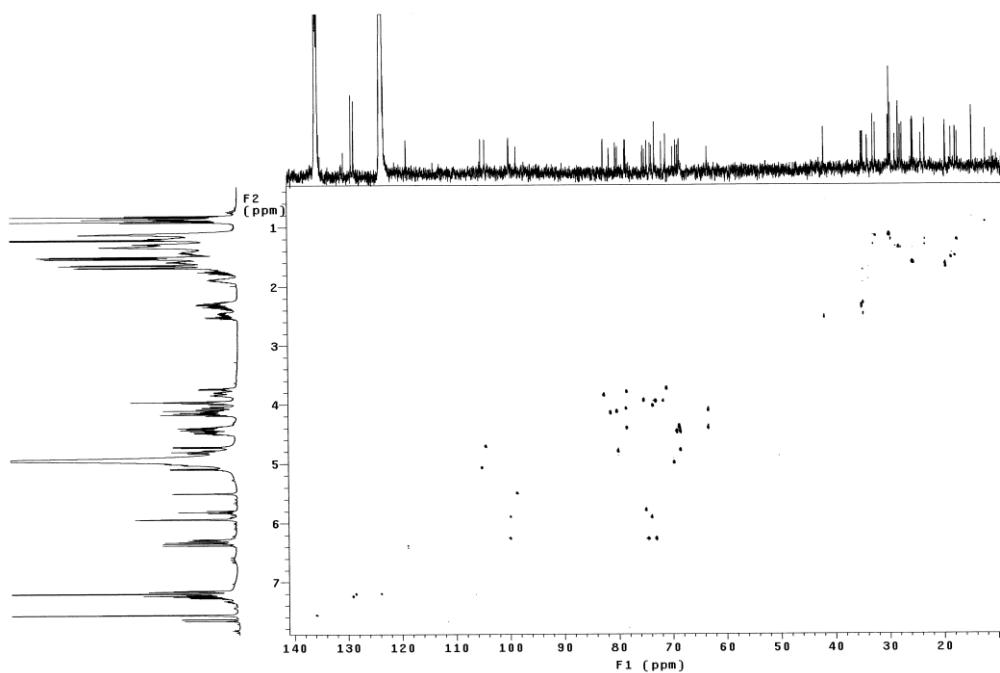


Figura VI. Espectro HSQC (500 MHz, C₅D₅N) del purginósido I (4)

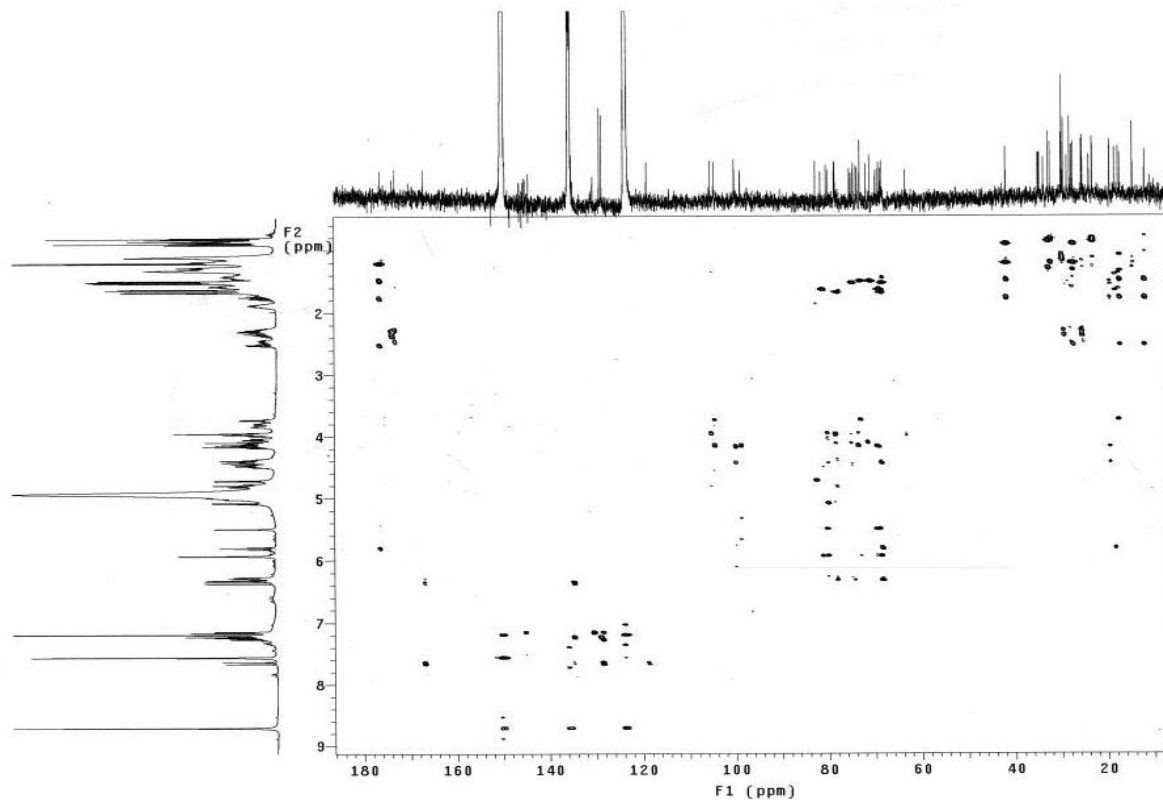


Figura VII. Espectro HMBC (500 MHz, C_5D_5N) del purginósido I (4)

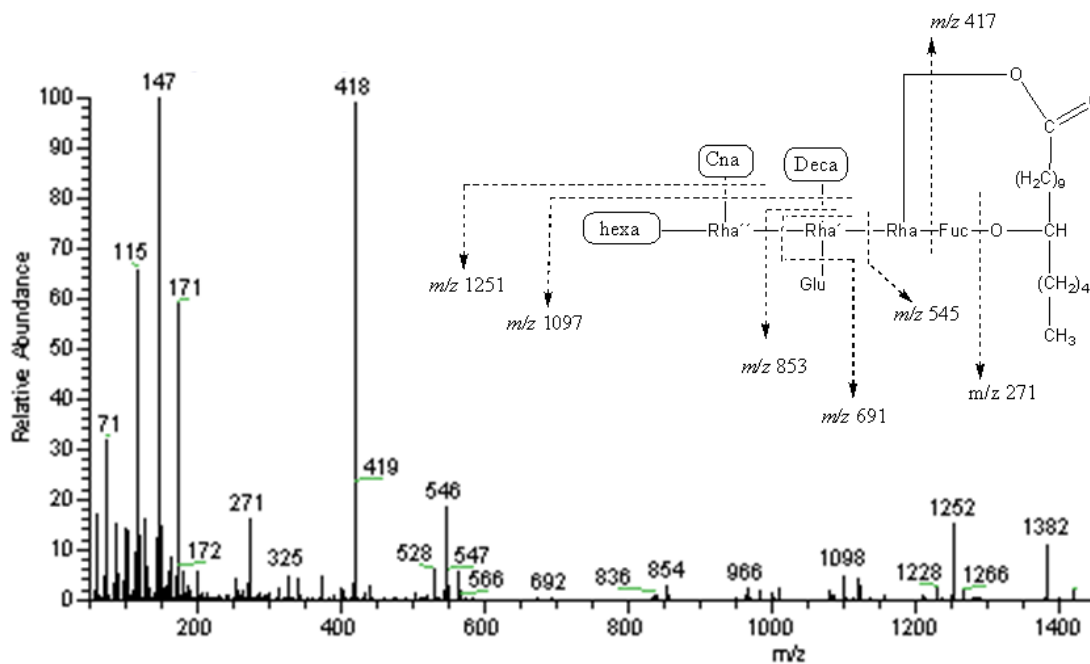


Figura VIII. Espectro de masas FAB en modo negativo del purginósido II (5)

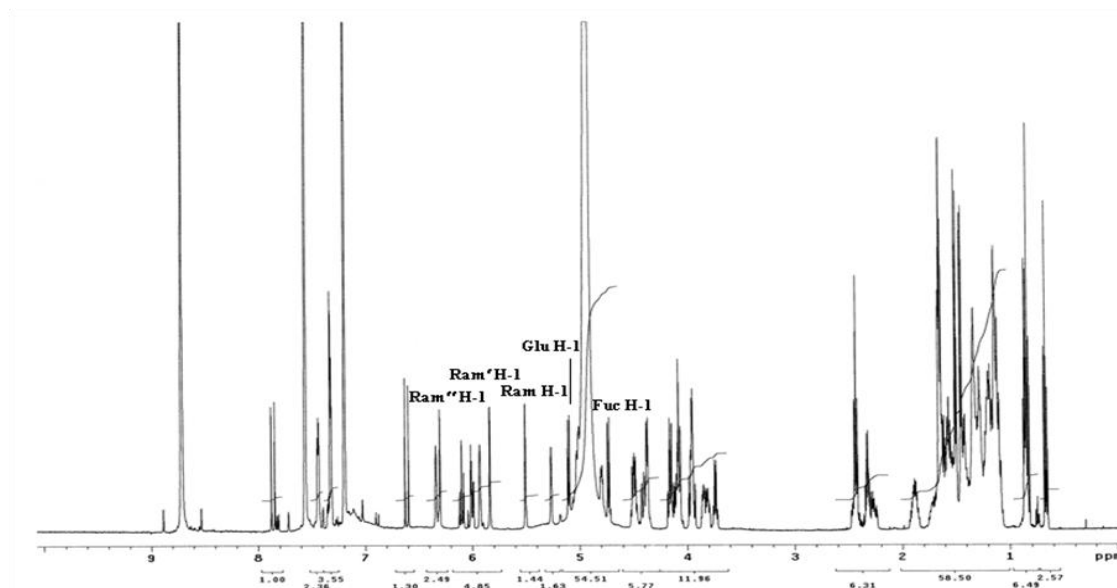


Figura IX. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido II (5)

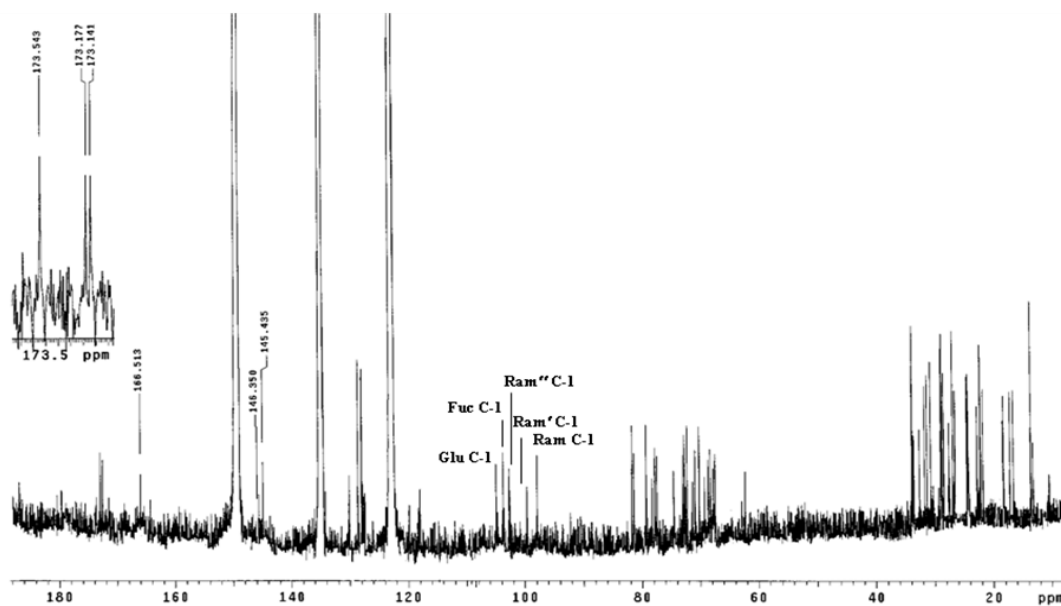


Figura X. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido II (5)

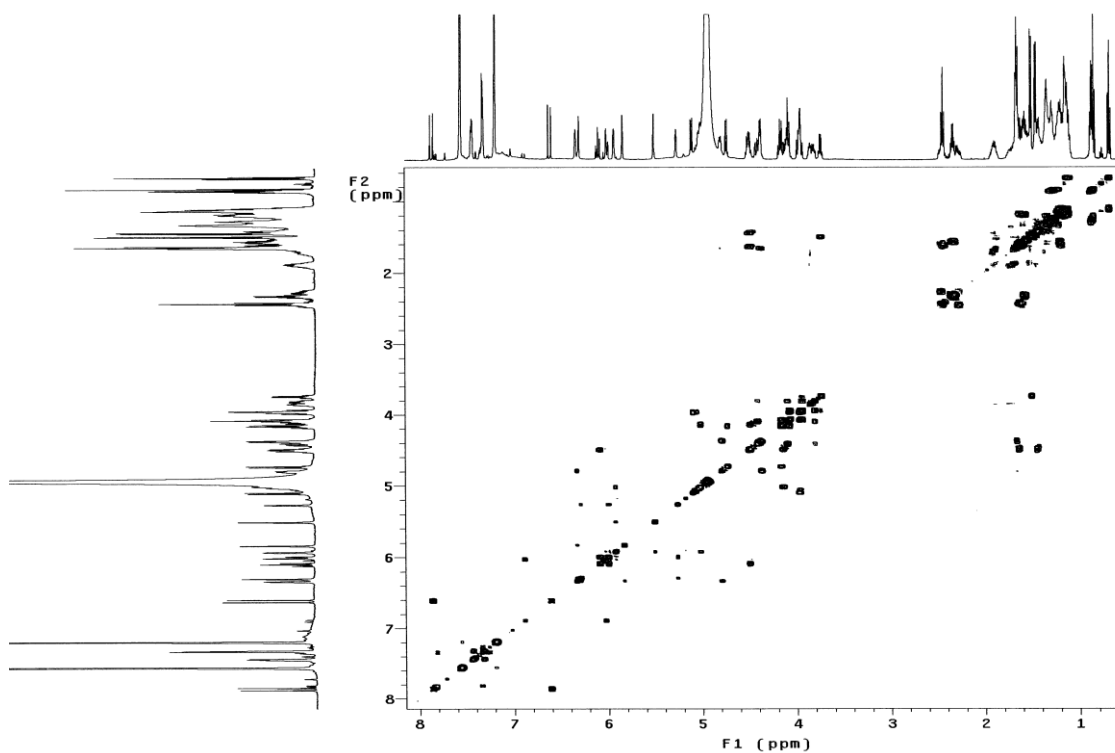


Figura XI. Espectro COSY (500 MHz, C₅D₅N) del purginósido II (5)

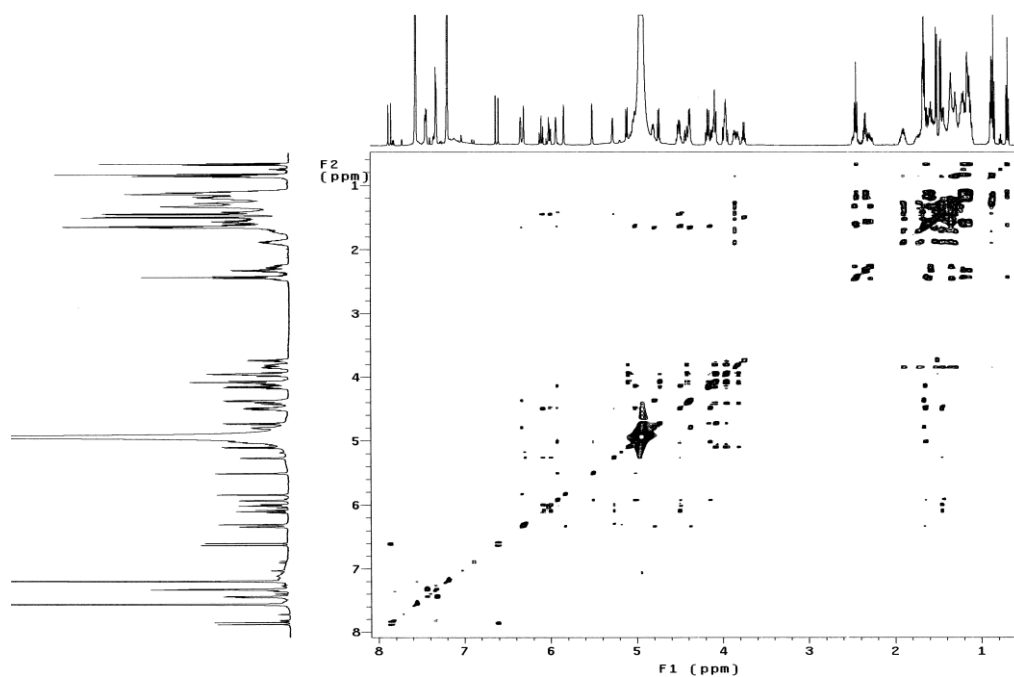


Figura XII. Espectro TOCSY (500 MHz, C₅D₅N) del purginósido II (5)

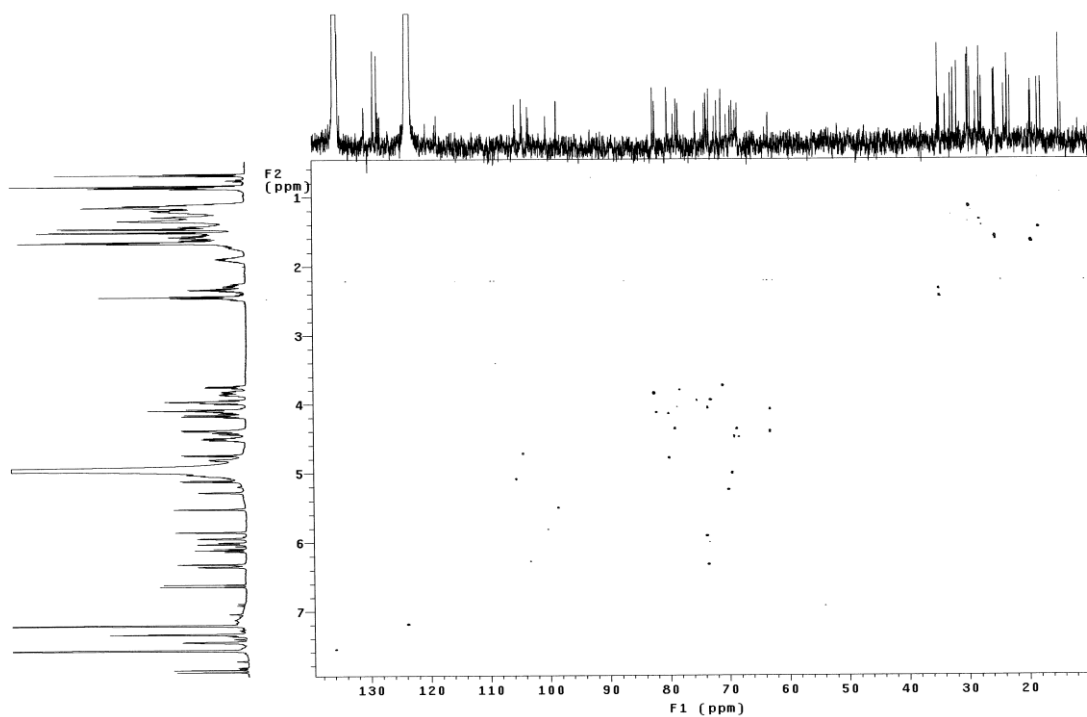


Figura XIII. Espectro HSQC (500 MHz, C₅D₅N) del purginósido II (5)

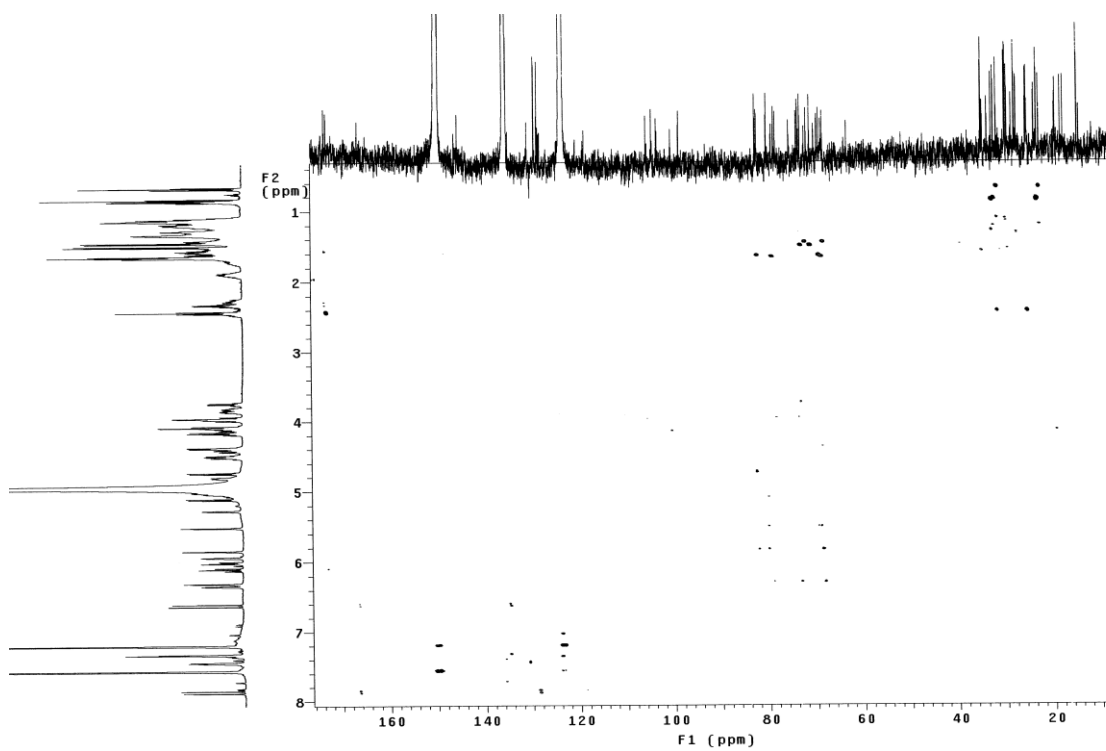


Figura XIV. Espectro HMBC (500 MHz, C₅D₅N) del purginósido II (5)

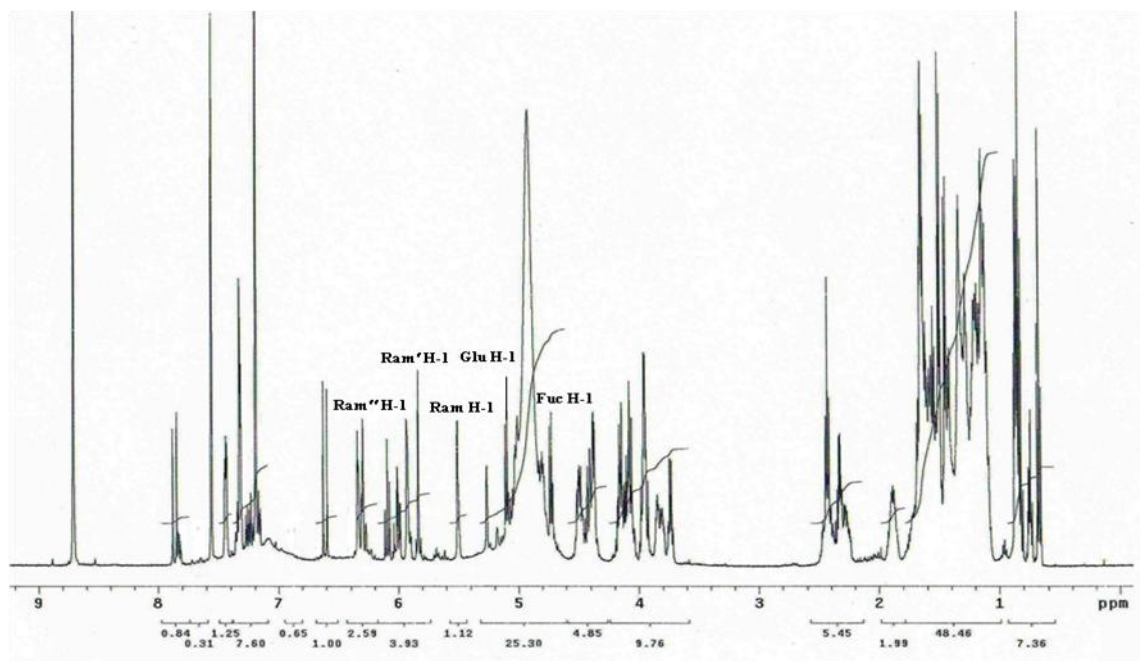


Figura XV. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido III (6)

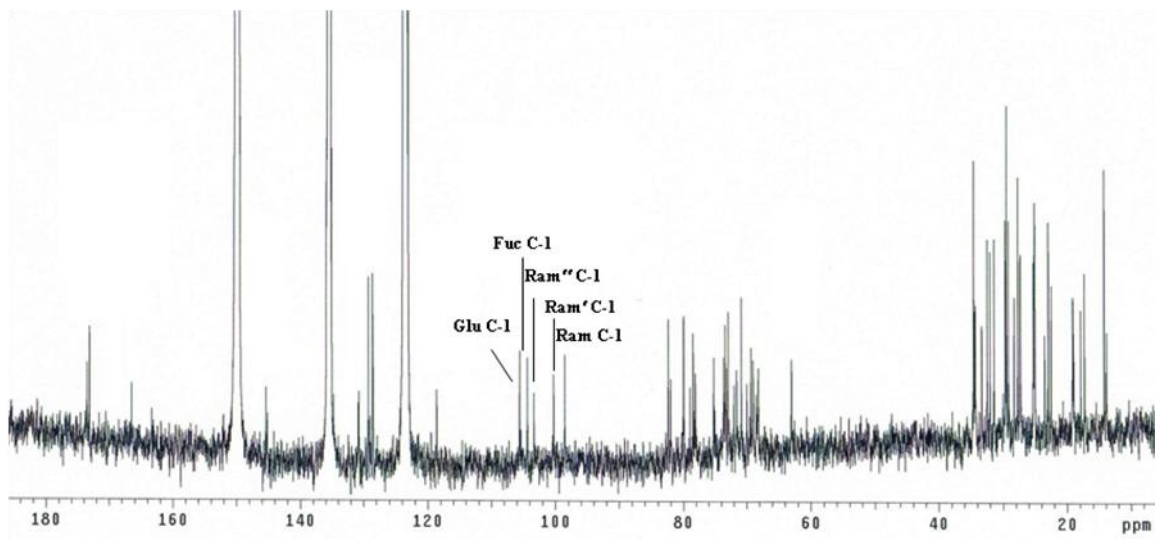


Figura XVI. Espectro de RMN ^{13}C (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido III (6)

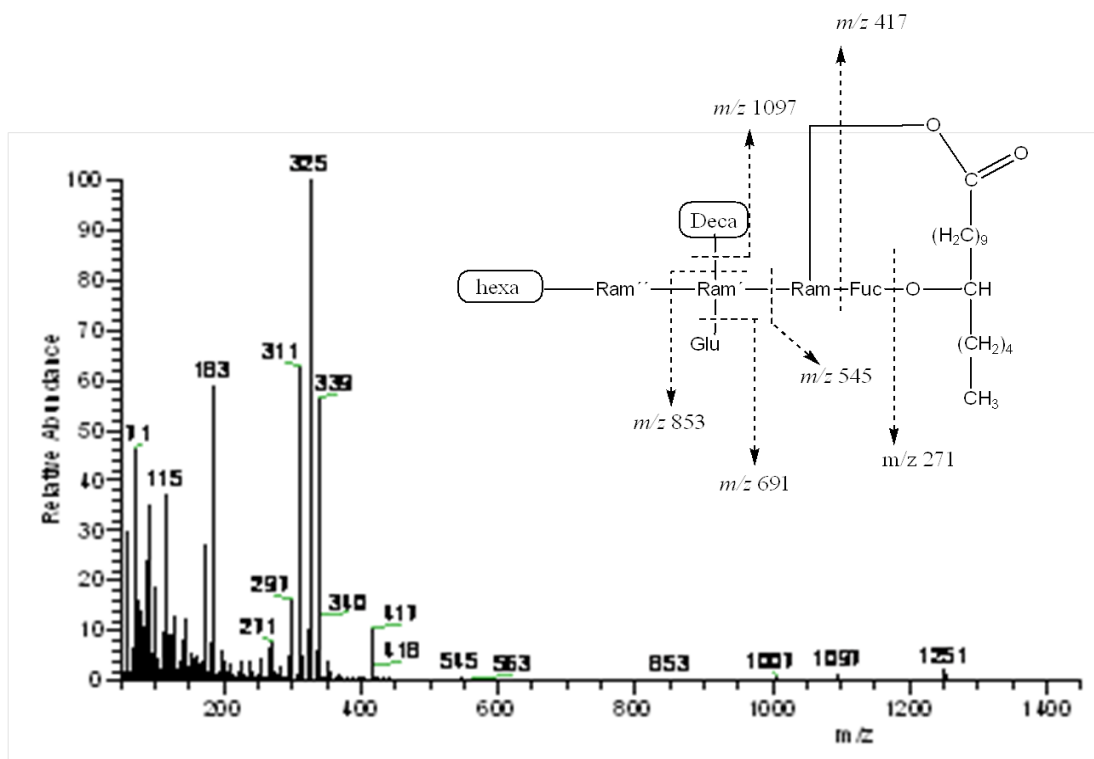


Figura XVII. Espectro de masas FAB en modo negativo del purginósido IV (7)

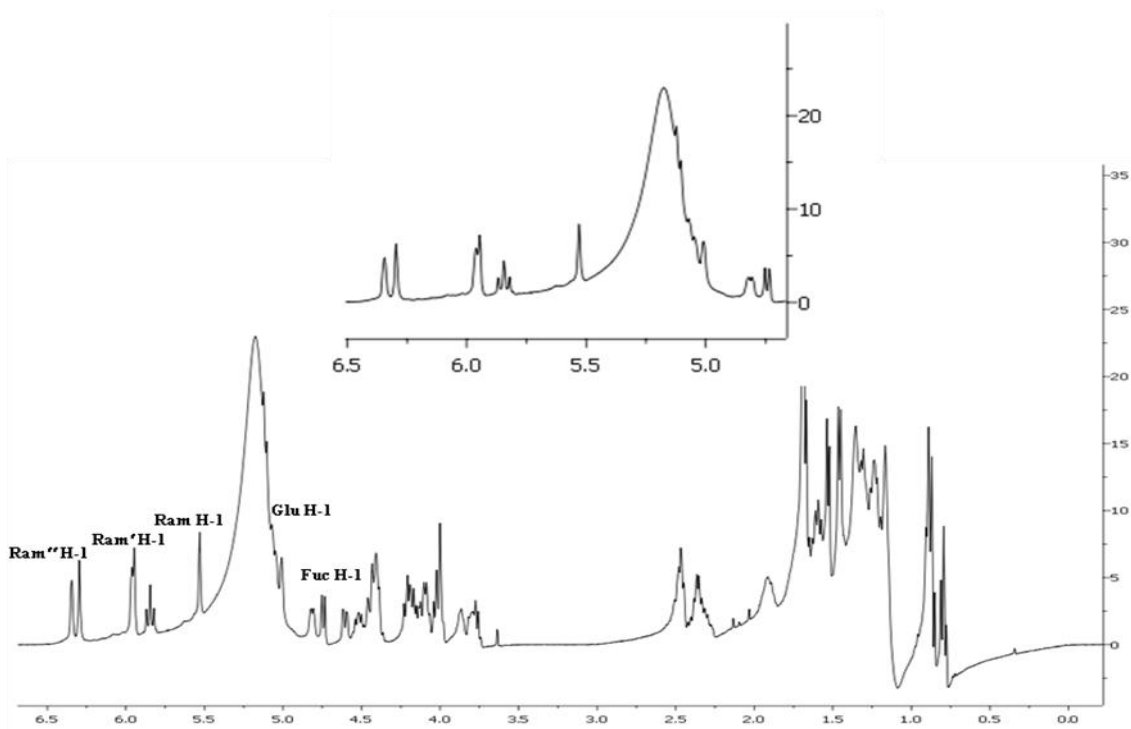


Figura XVIII. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido IV (7)

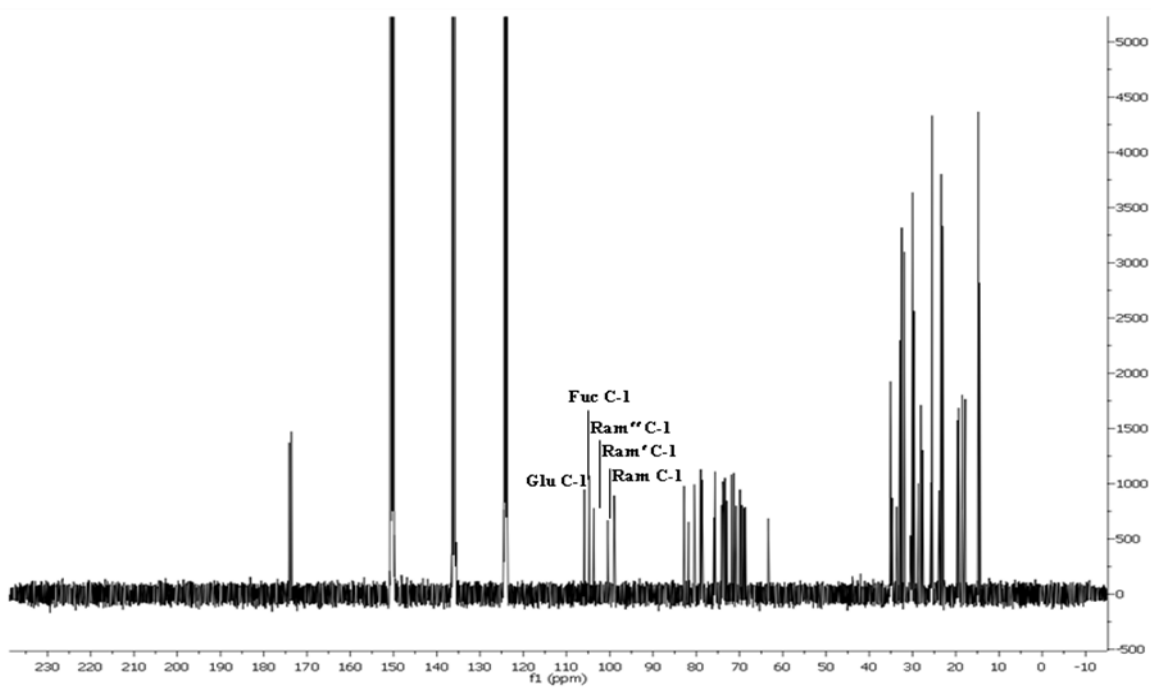


Figura XIX. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del purginósido IV (7)

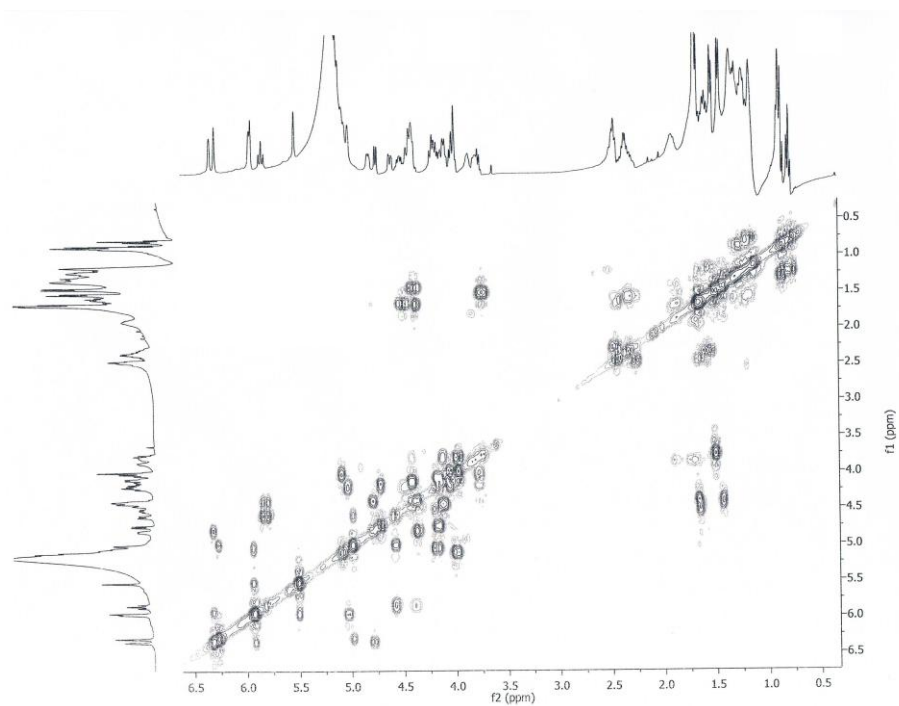


Figura XX. Espectro COSY del purginósido IV (7)

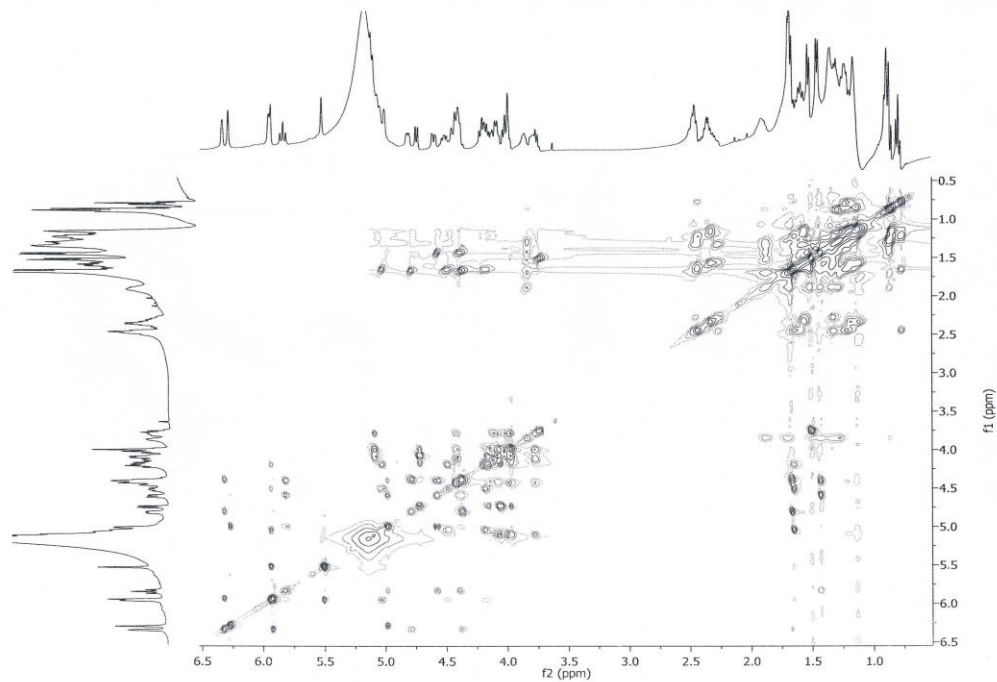


Figura XXI. Espectro TOCSY del purginósido IV (7)

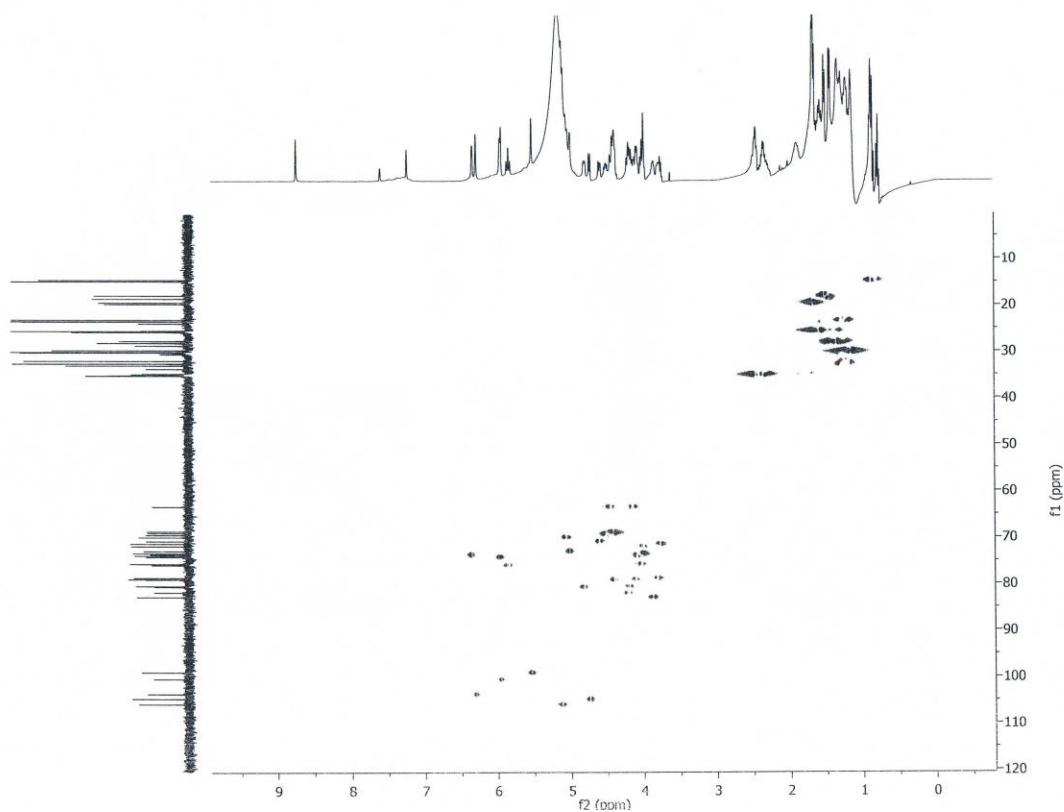


Figura XXII. Espectro HSQC del purginósido IV (7)

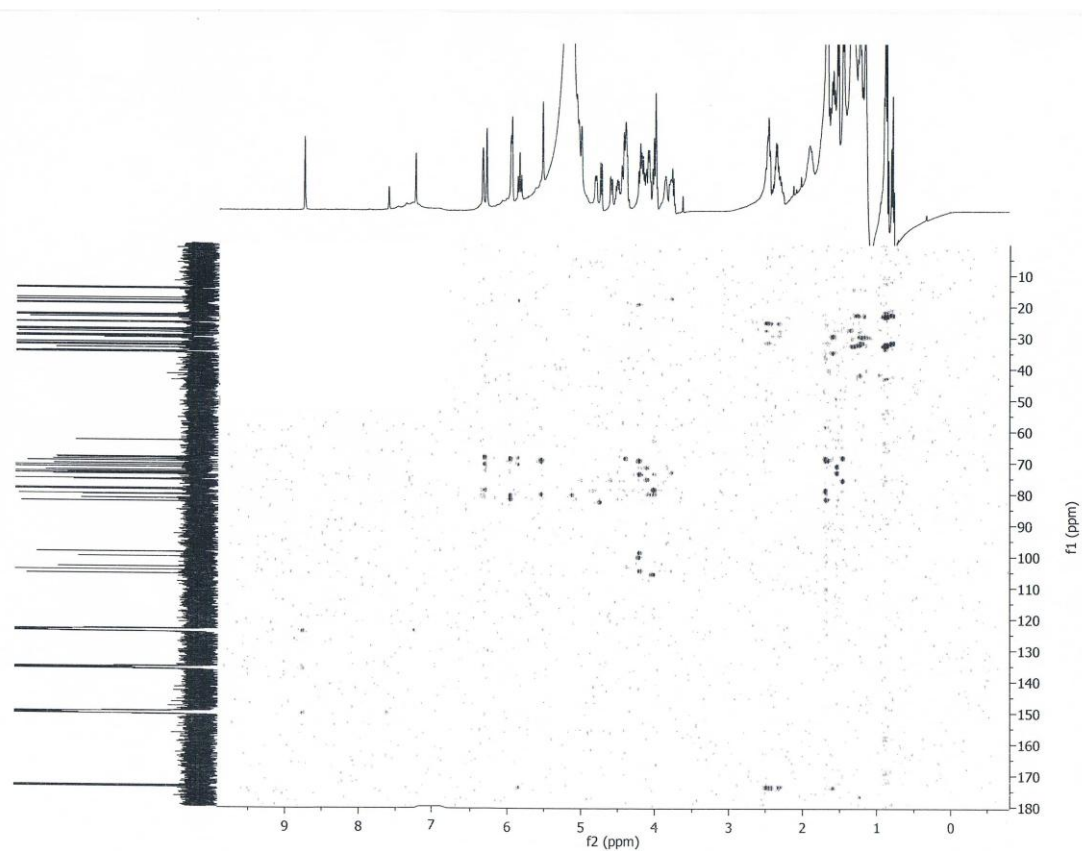


Figura XXIII. Espectro HMBC del purginósido IV (7)

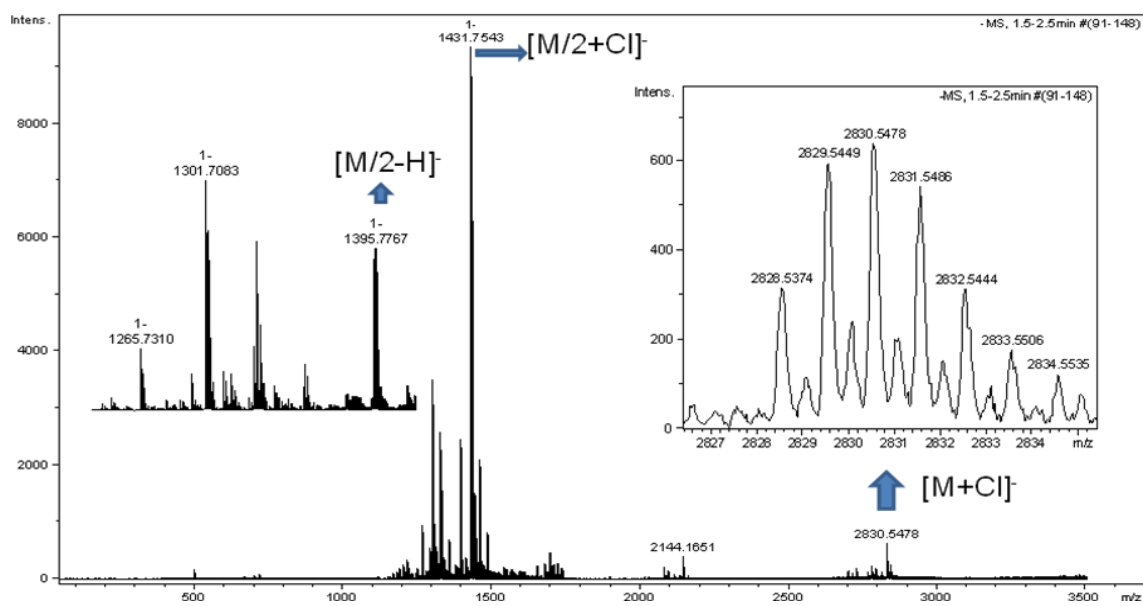


Figura XXIV. Espectro de masas HRESI de la purgina I (8)

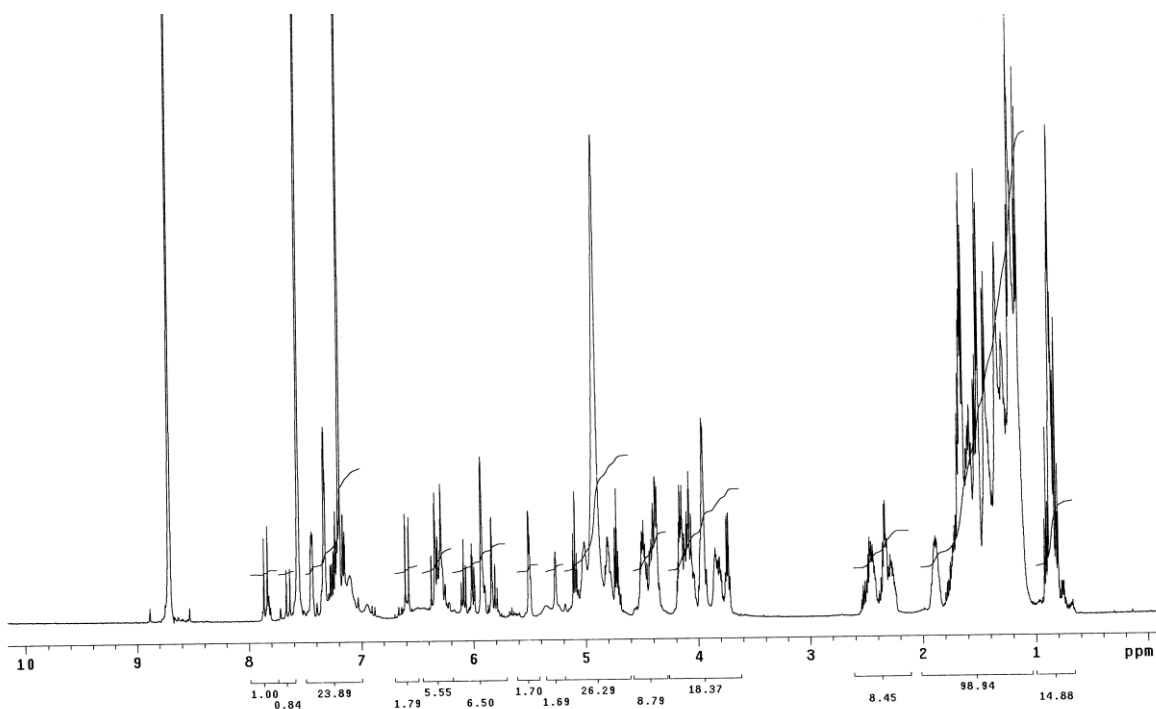


Figura XXV. Espectro de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la purgina I (8)

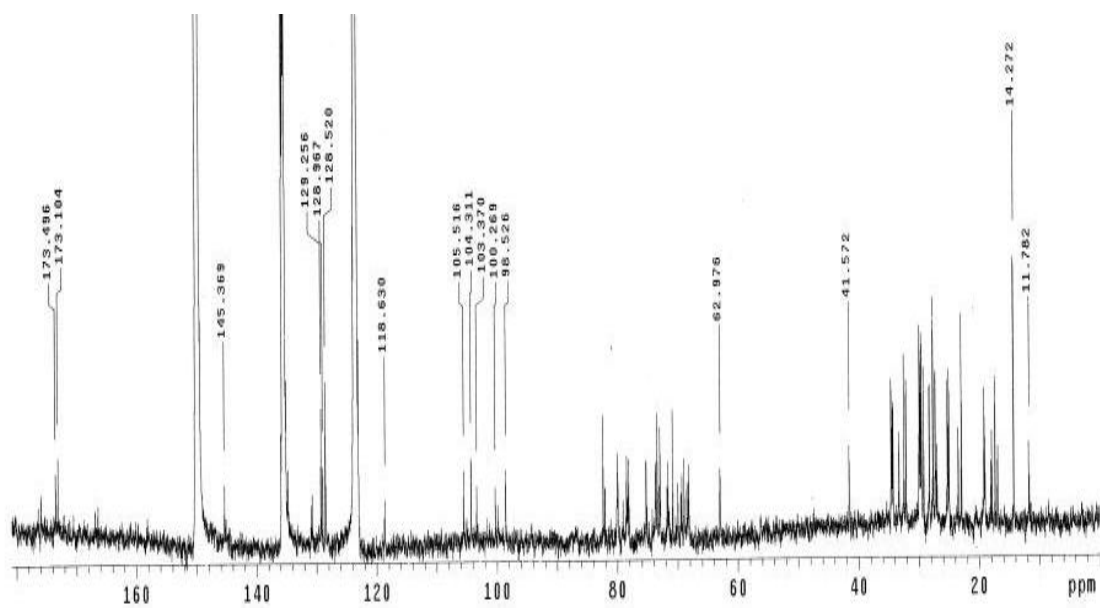


Figura XXVI. Espectro de RMN ^{13}C (125.7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la purgina I (8)

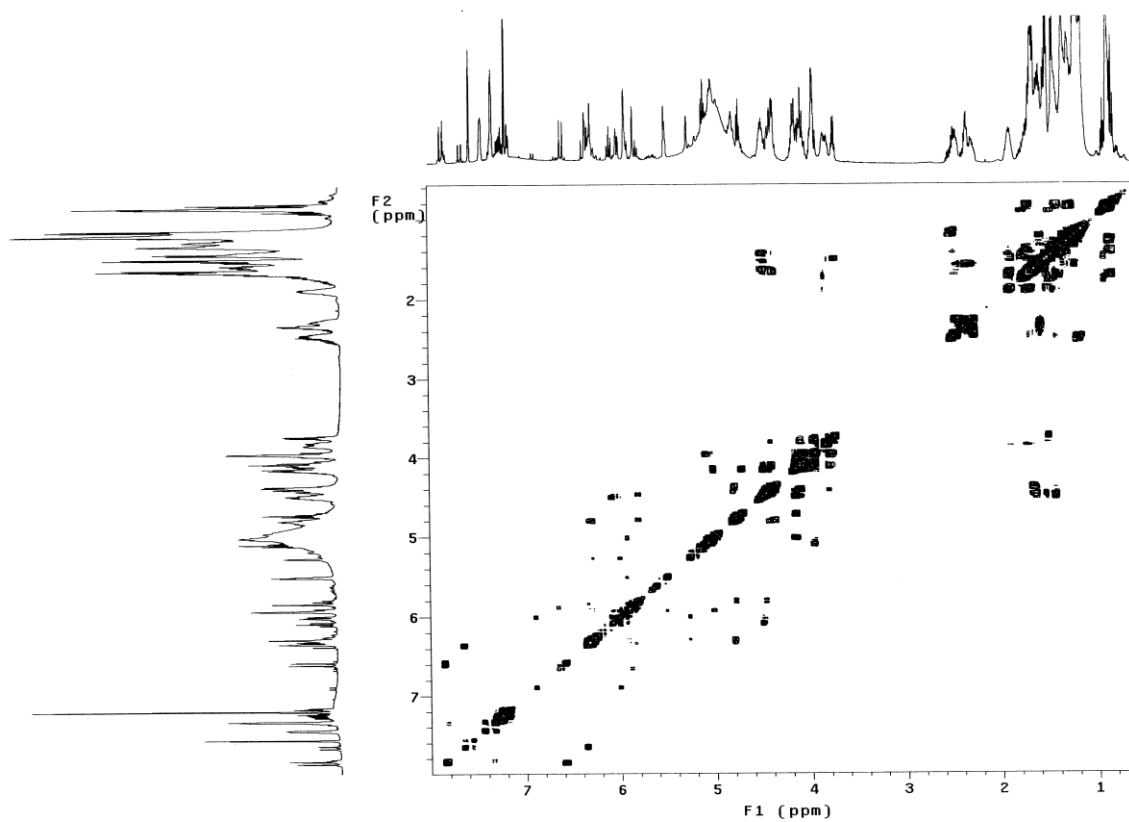


Figura XXVII. Espectro COSY (500 MHz, C₅D₅N) de la purgina I (8)

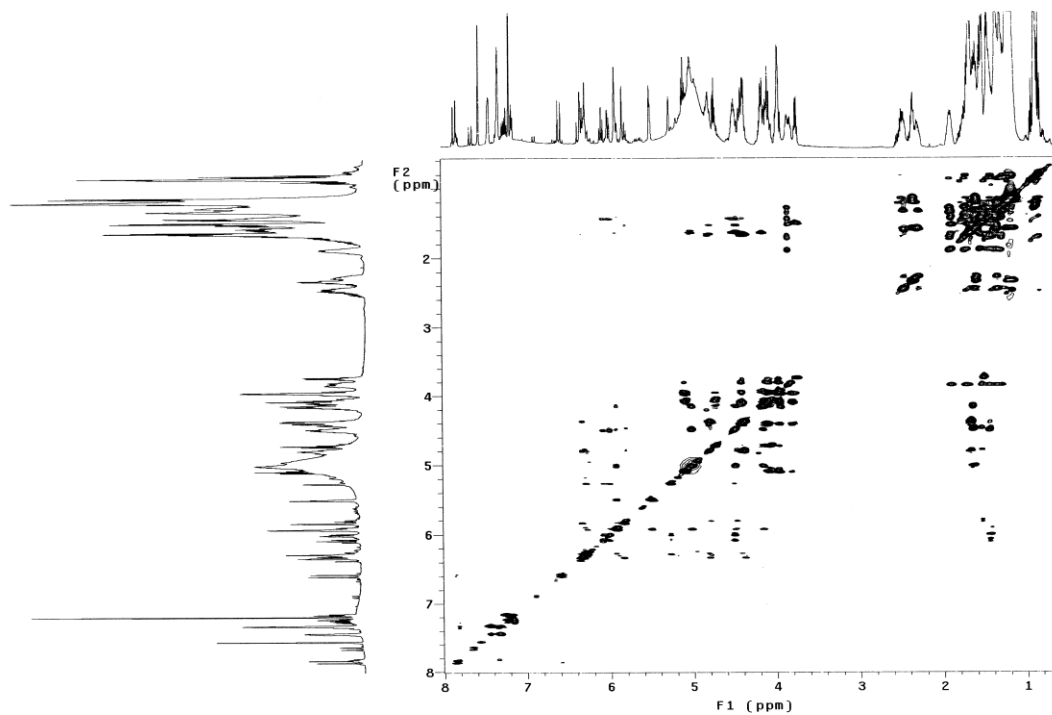


Figura XXVIII. Espectro TOCSY (500 MHz, C₅D₅N) de la purgina I (8)

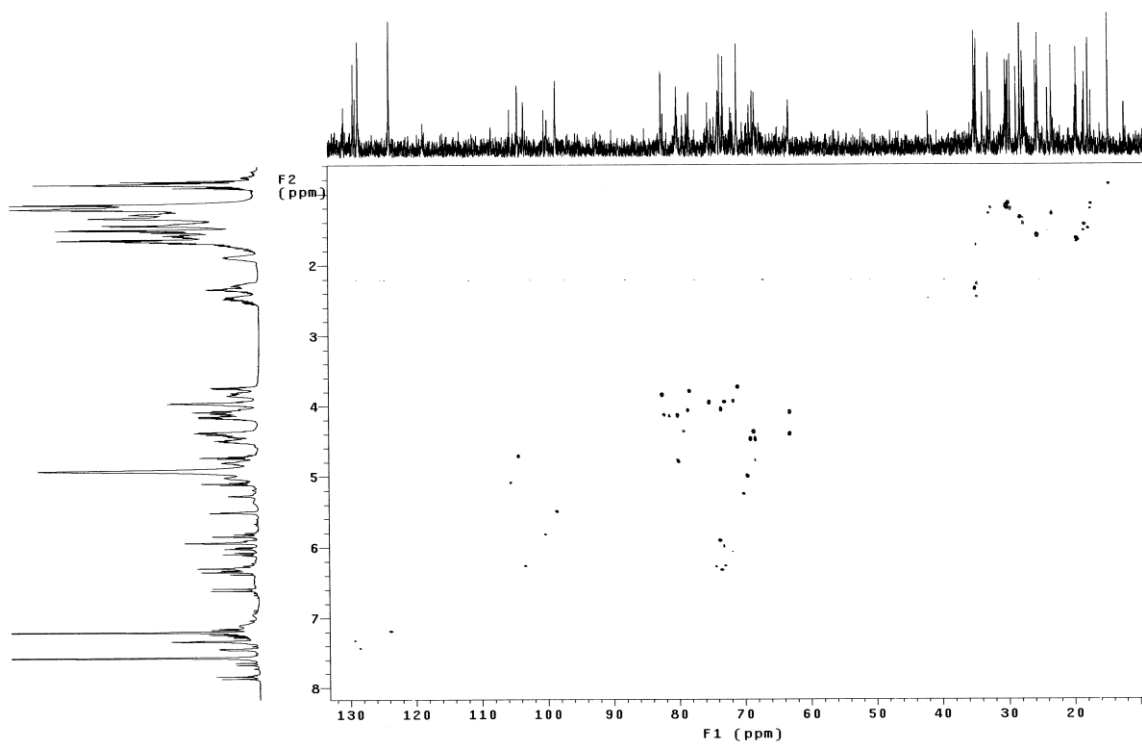


Figura XXIX. Espectro HSQC (500 MHz, C₅D₅N) de la purgina I (8)

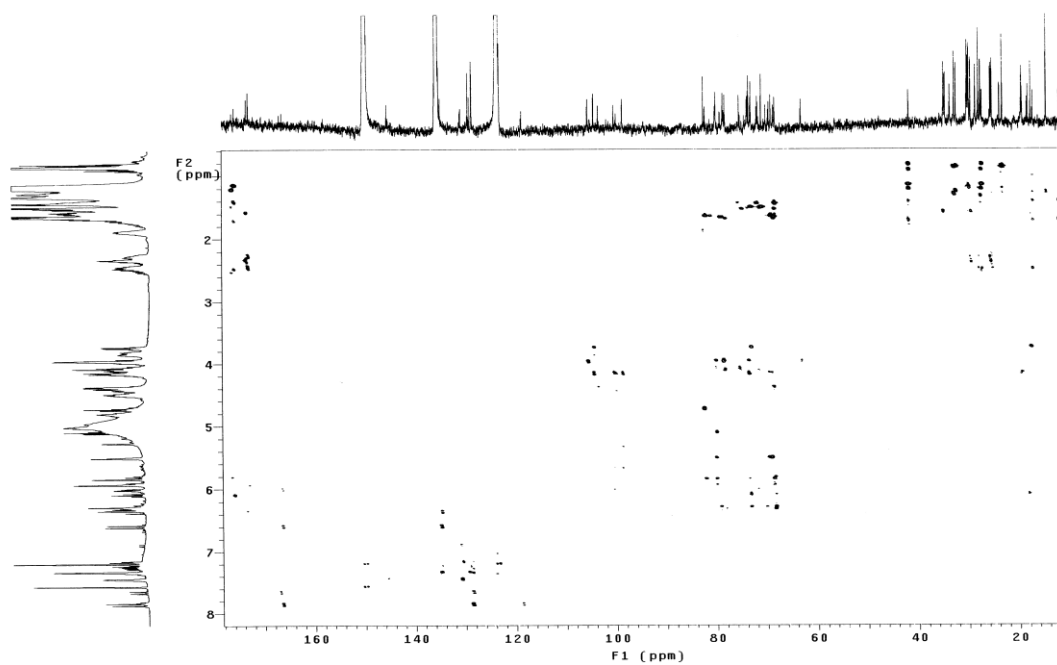


Figura XXX. Espectro HMBC (500 MHz, C₅D₅N) de la purgina I (8)

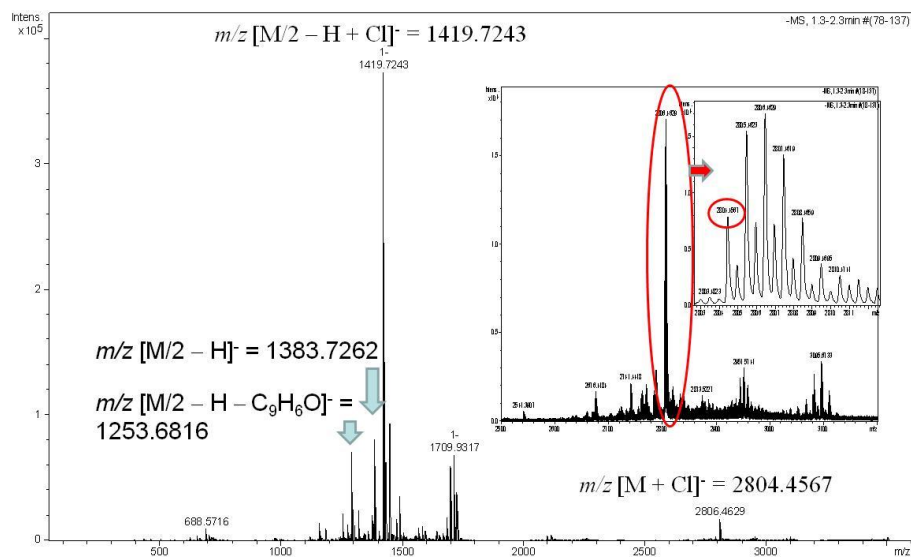


Figura XXXI. Espectro de masas HRESI de la purgina II (9)

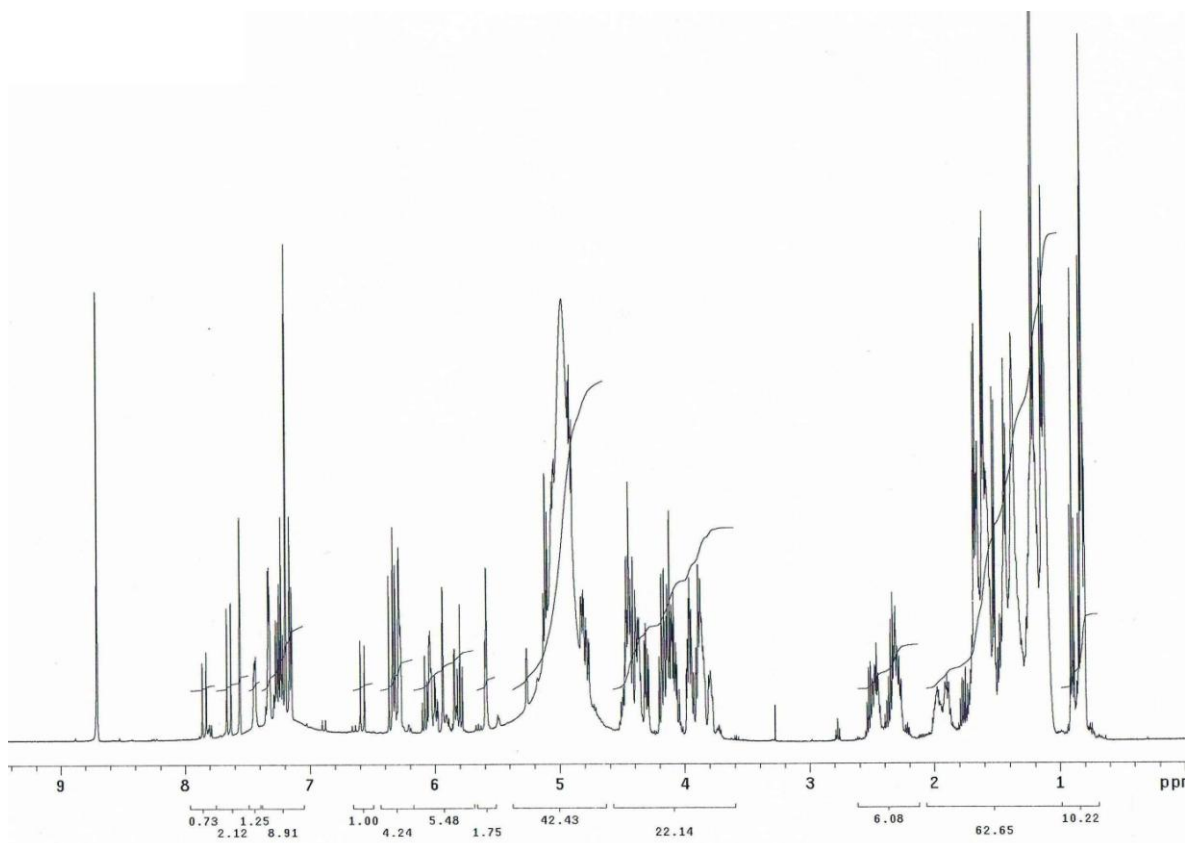


Figura XXXII. Espectro de RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N) de la purgina II (9)

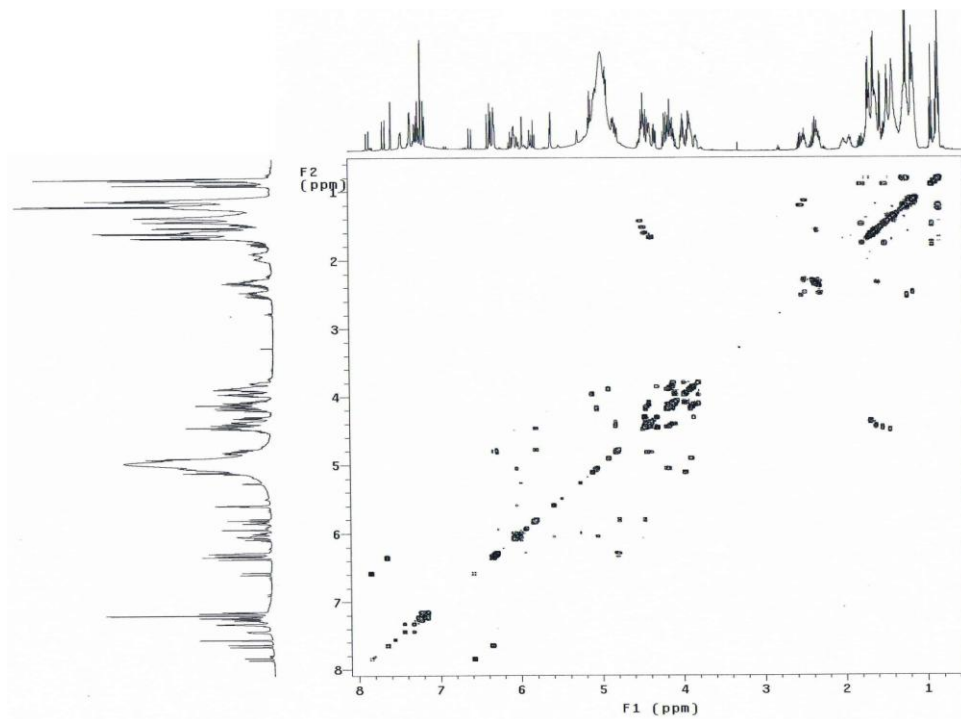


Figura XXXIII. Espectro COSY de la purgina II (9)

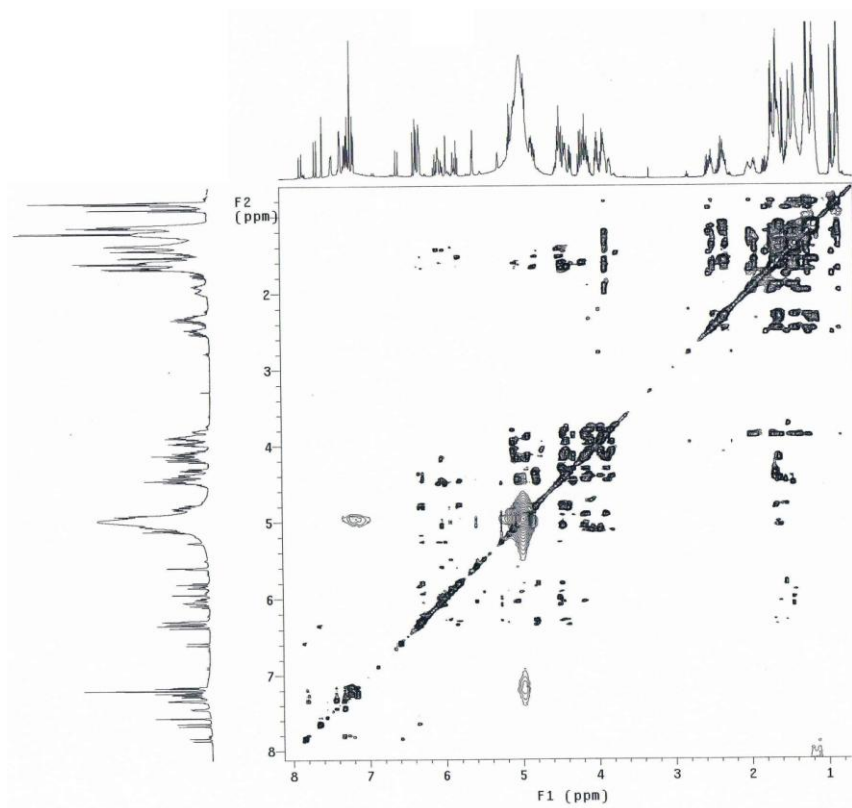


Figura XXXIV. Espectro TOCSY de la purgina II (9)

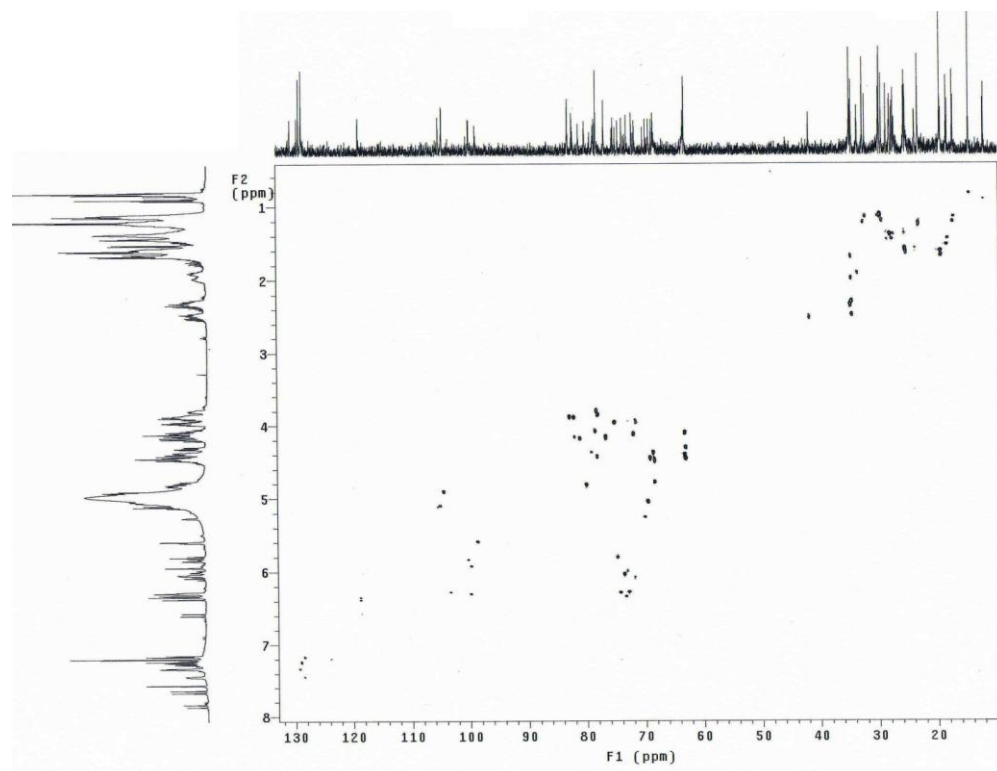


Figura XXXV. Espectro HSQC de la purgina II (9)

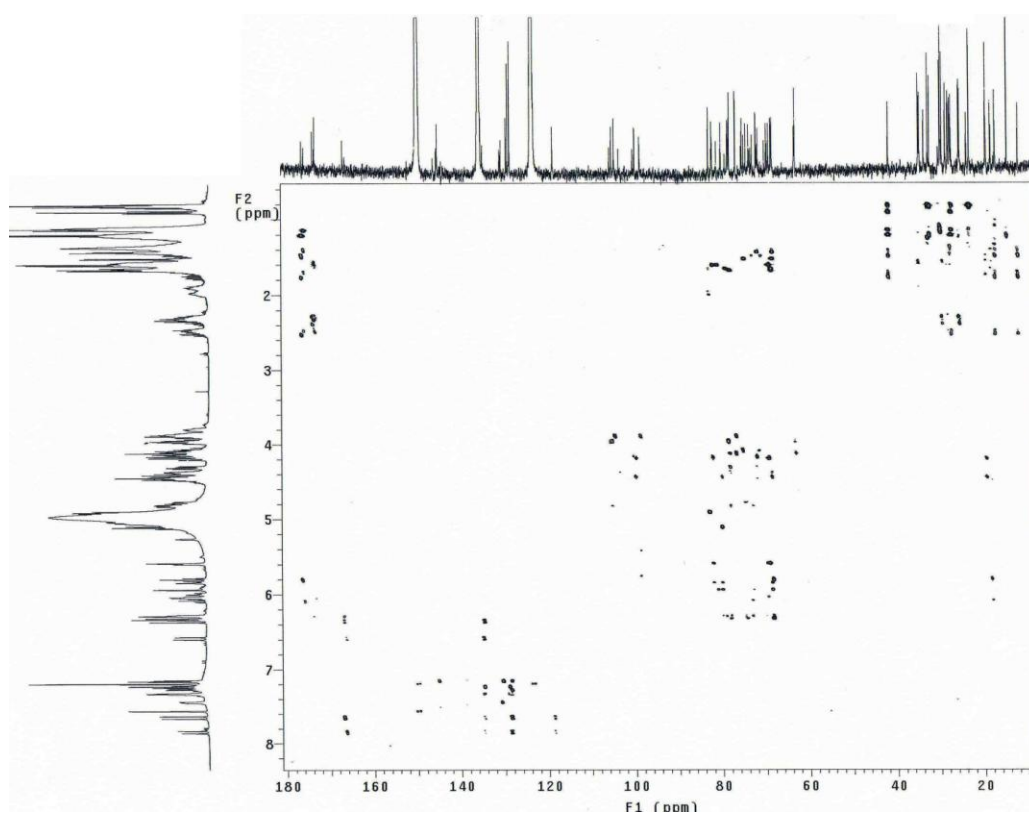


Figura XXXVI. Espectro HMBC de la purgina II (9)

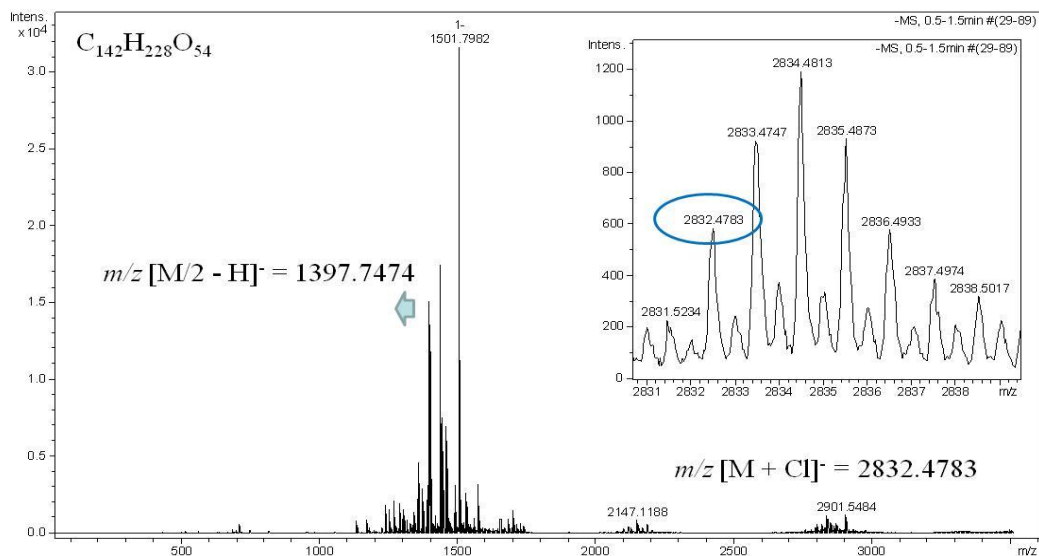


Figura XXXVII. Espectro de masas HRESI de la purgina III (10)

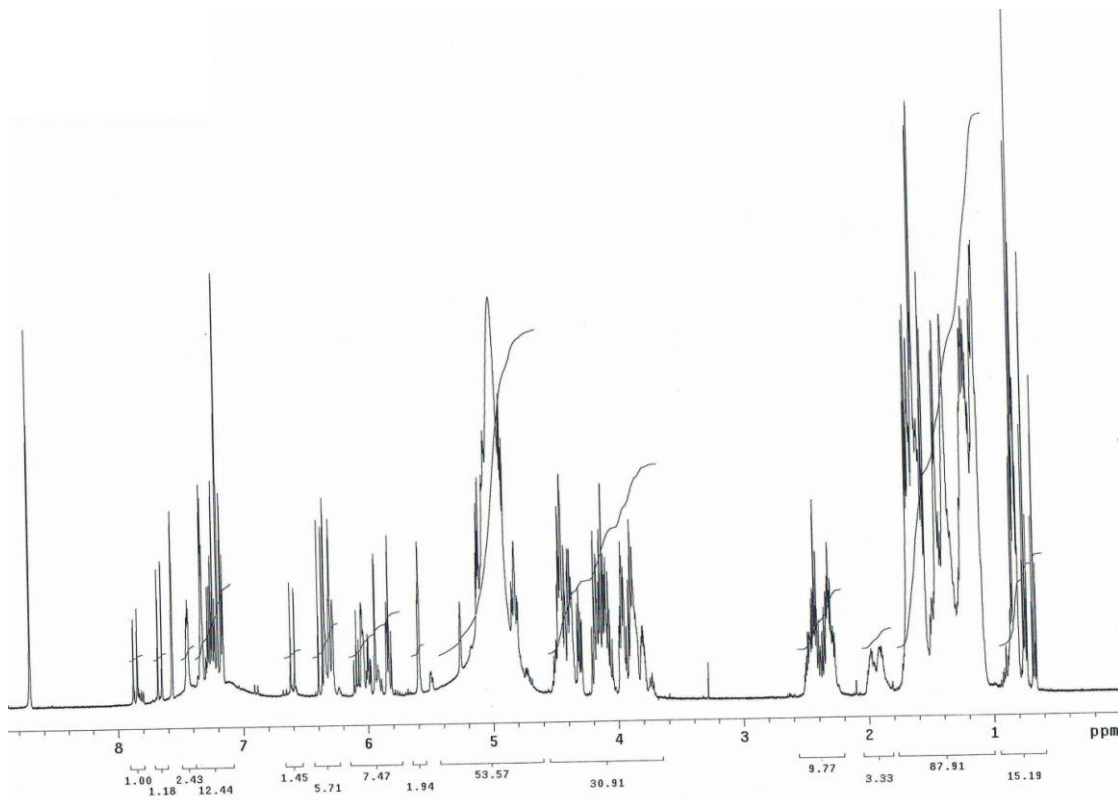


Figura XXXVIII. Espectro de RMN 1H (500 MHz, C_5D_5N) de la purgina III (10)

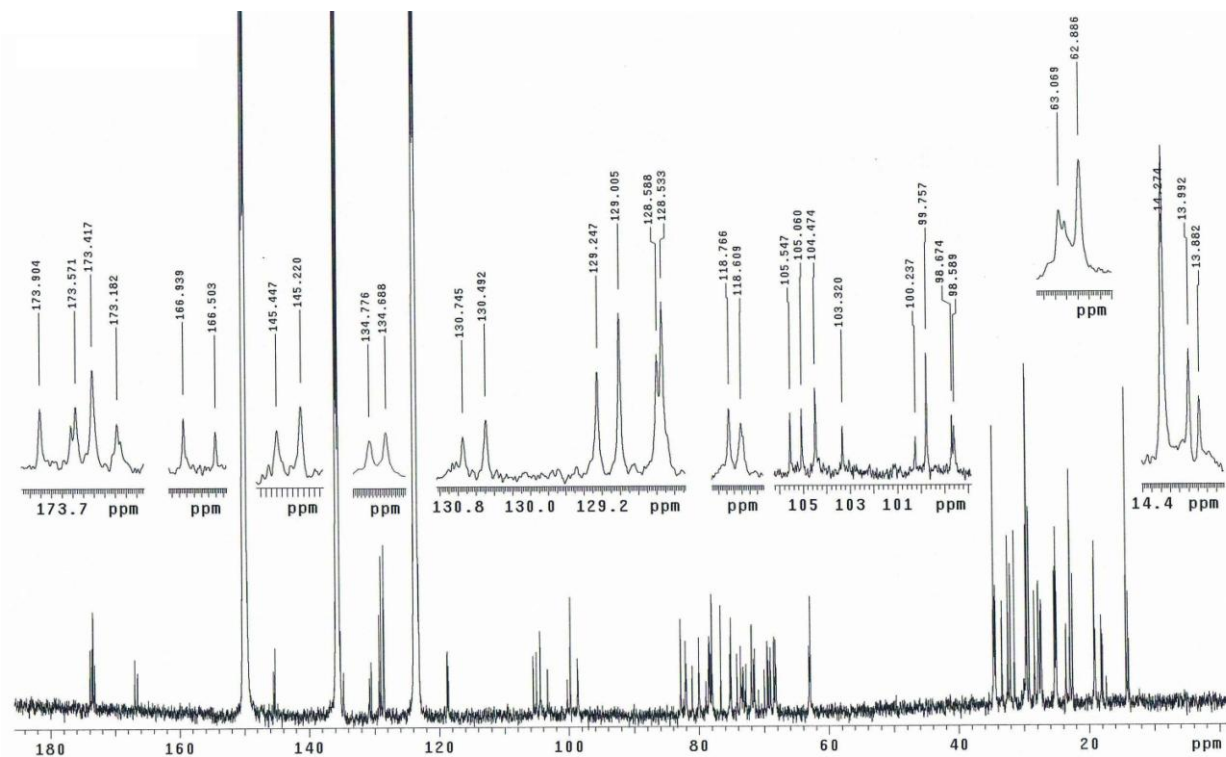


Figura XXXIX. Espectro de RMN ^{13}C (125.7 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la purgina III (10)

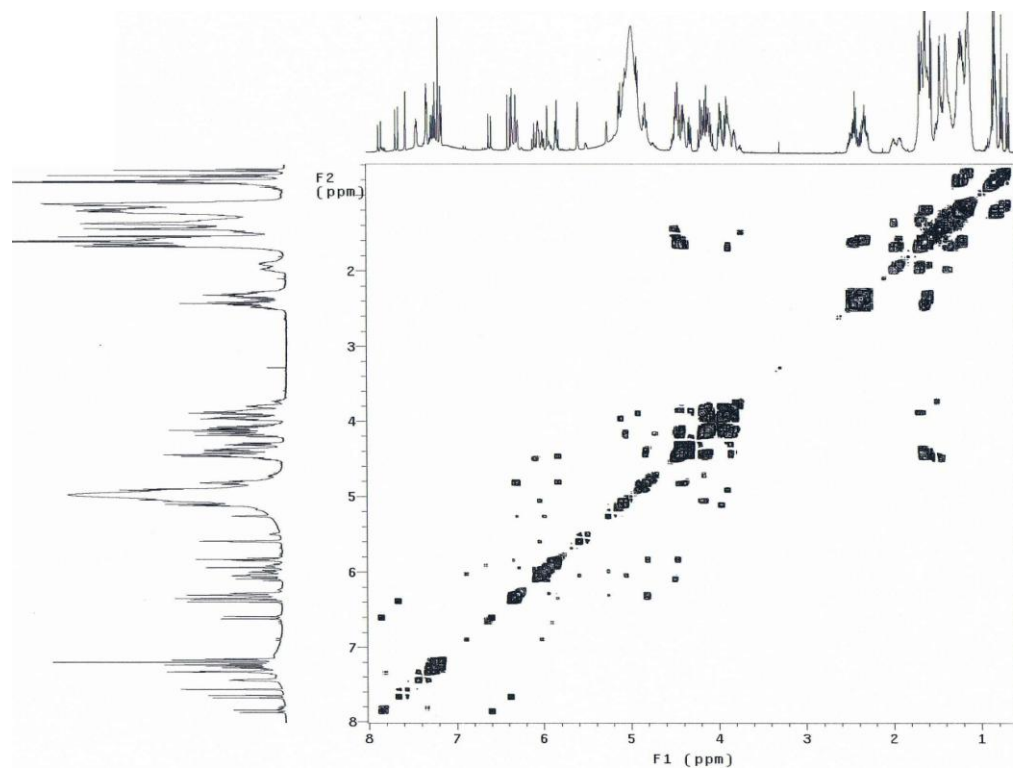


Figura XL. Espectro COSY de la purgina III (10)

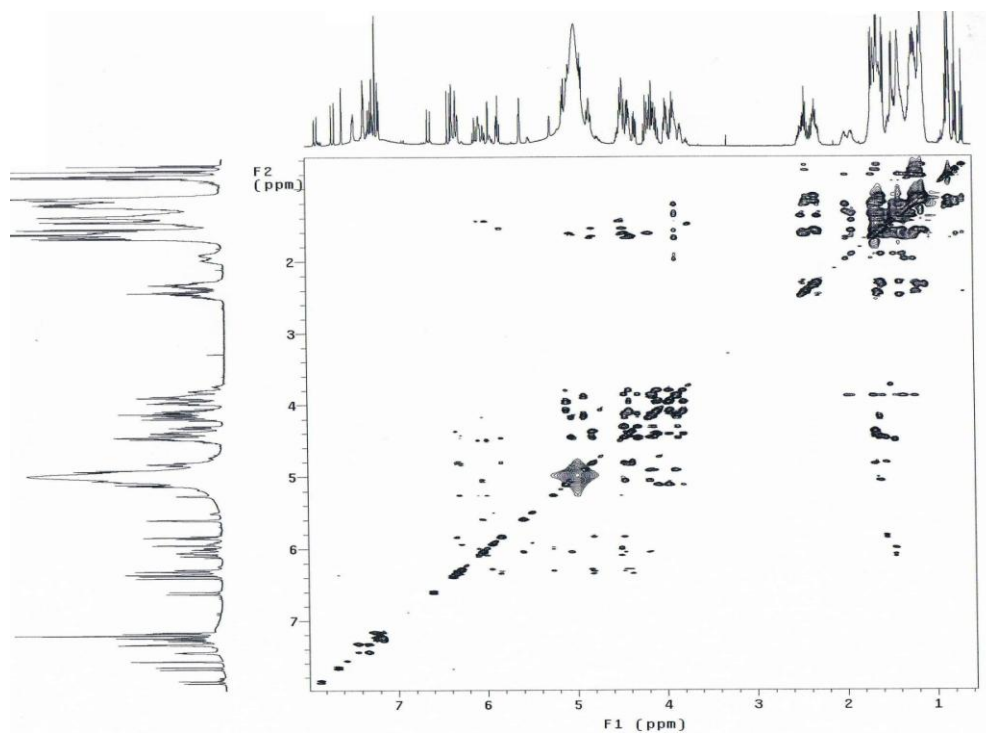


Figura XLI. Espectro TOCSY de la purgina III (10)

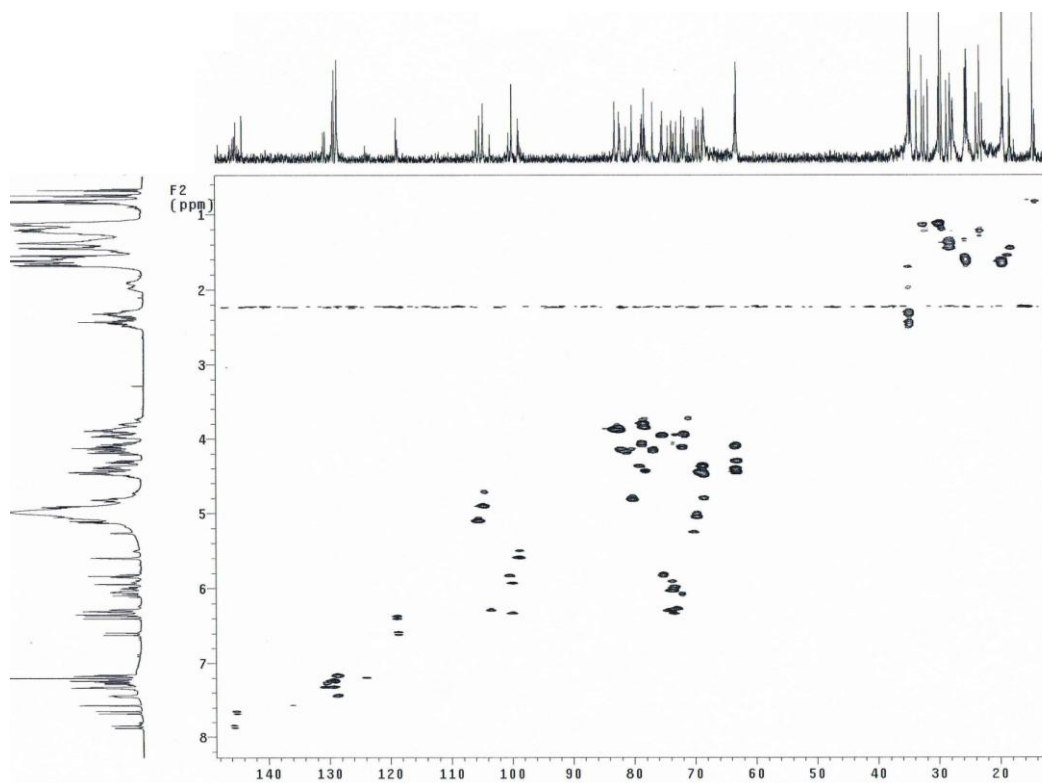


Figura XLII. Espectro HSQC de la purgina III (10)

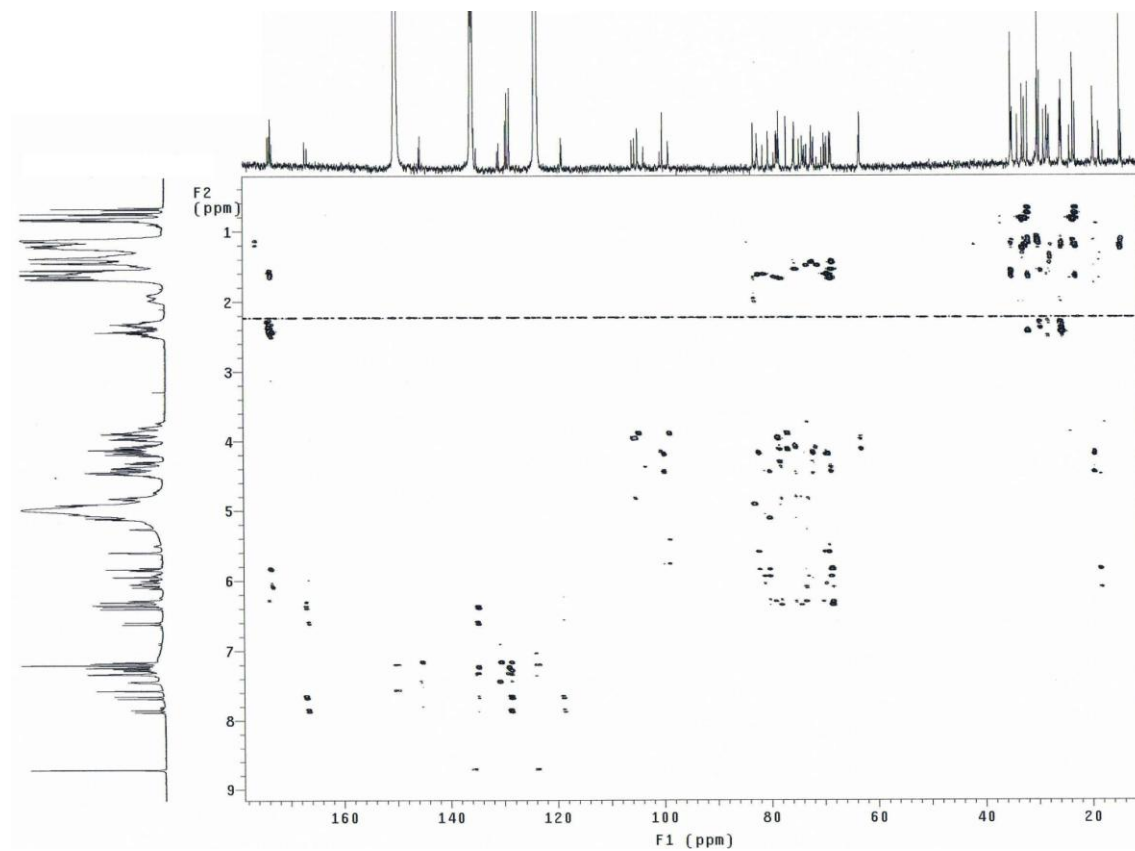


Figura XLIII. Espectro HMBC de la purgina III (10)

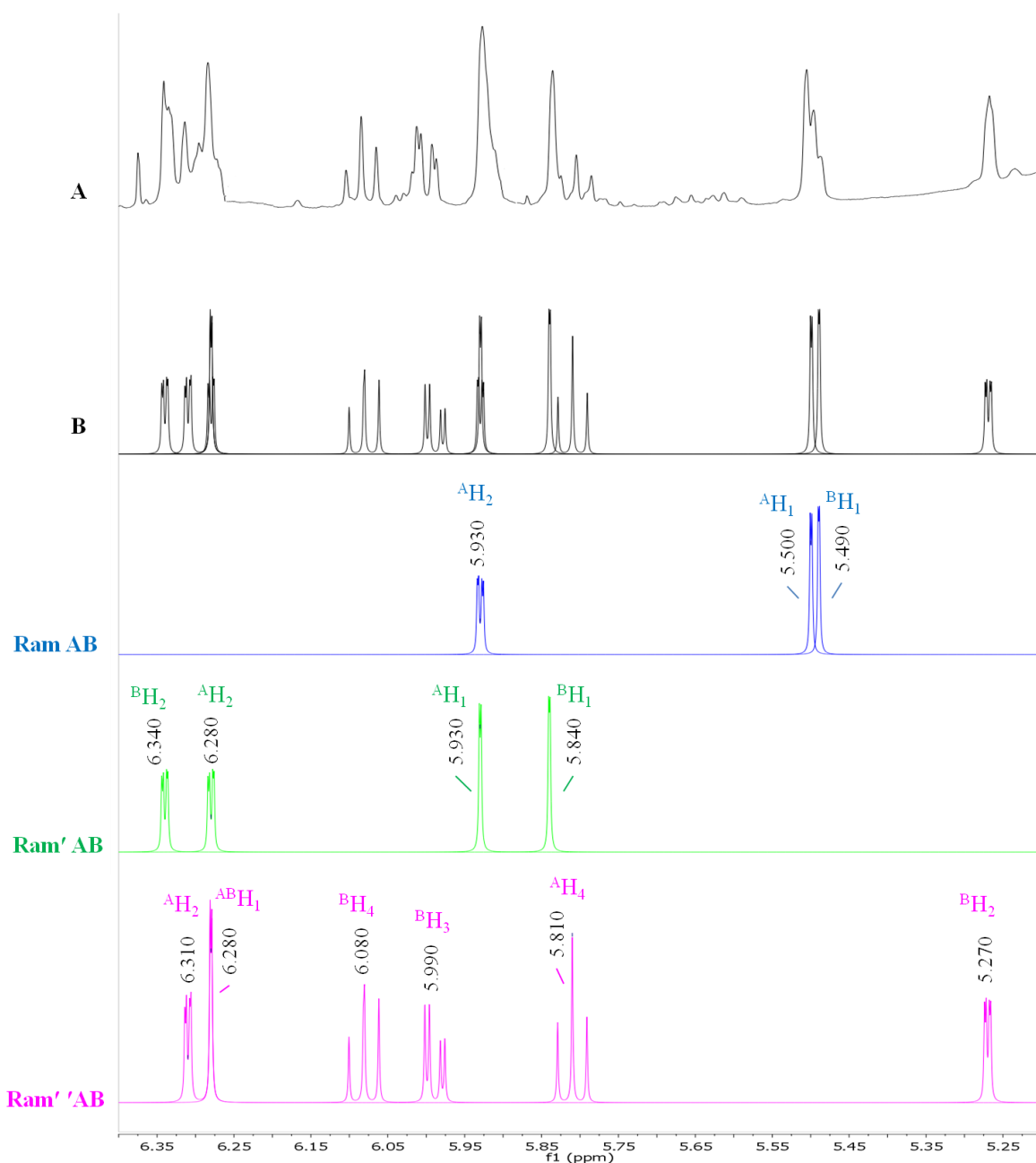


Figura XLIV. Simulación del espectro de RMN ^1H de la purina I para la zona de 5.20 a 6.40 ppm (8). A: Sección del espectro experimental (500 MHz), B: sección del espectro simulado (MestRe-C). La comparación se realiza con los espectros individuales simulados por iteración para cada una de las unidades de ramnosa. Cada color es asignado para diferenciar a cada unidad de azúcar. Las letras A y B denotan la unidad monomérica en donde se localizan las respectivas unidades de azúcar y H_n denota las posiciones exactas en cada unidad sacárida.

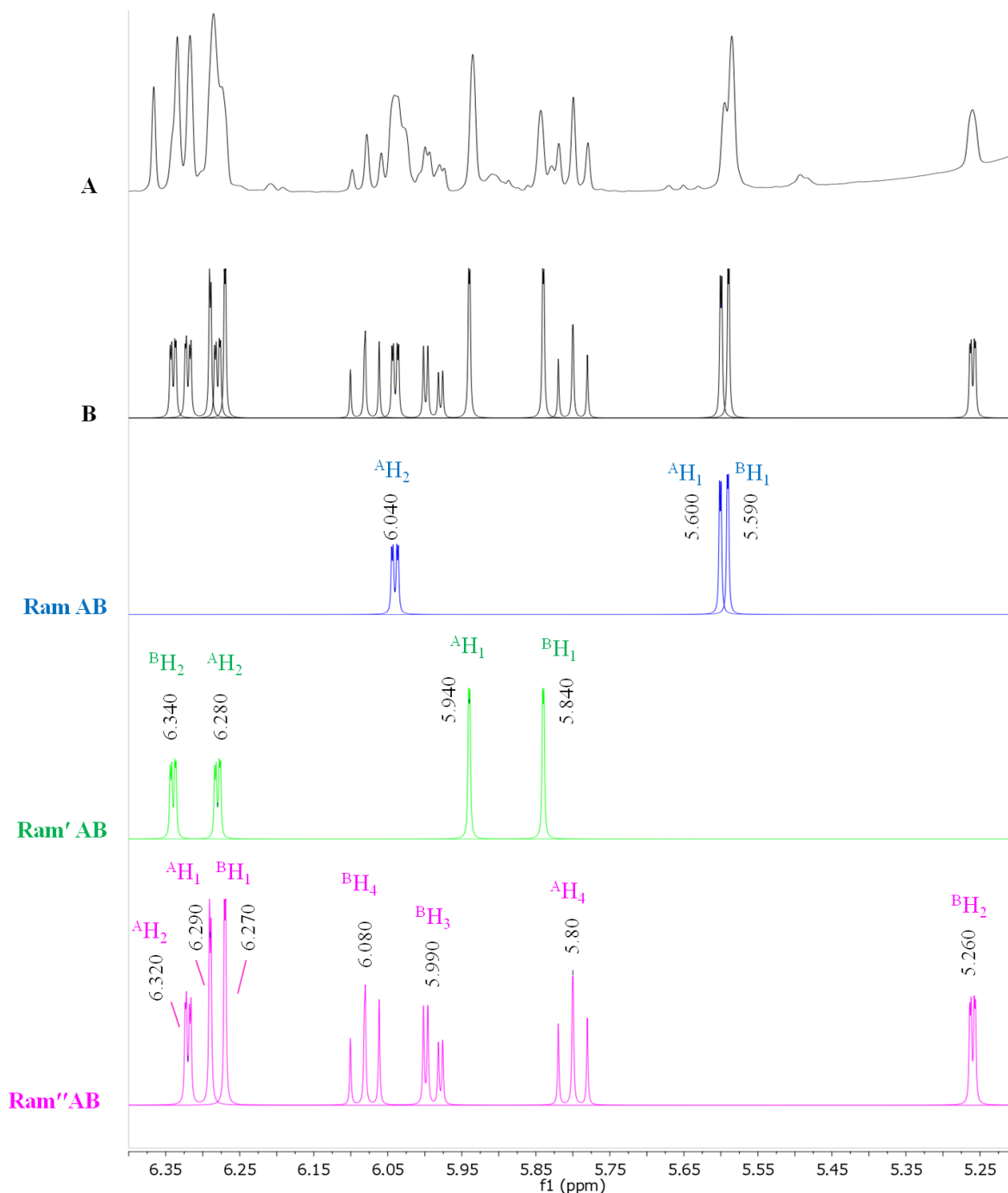


Figura XLV. Simulación del espectro de RMN ^1H de la purgina II para la zona de 5.20 a 6.40 ppm (8). A: Sección del espectro experimental (500 MHz), B: sección del espectro simulado (MestRe-C). La comparación se realiza con los espectros individuales simulados por iteración para cada una de las unidades de ramnosa. Cada color es asignado para diferenciar a cada unidad de azúcar. Las letras A y B denotan la unidad monomérica en donde se localizan las respectivas unidades de azúcar y H_n denota las posiciones exactas en cada unidad sacárida.

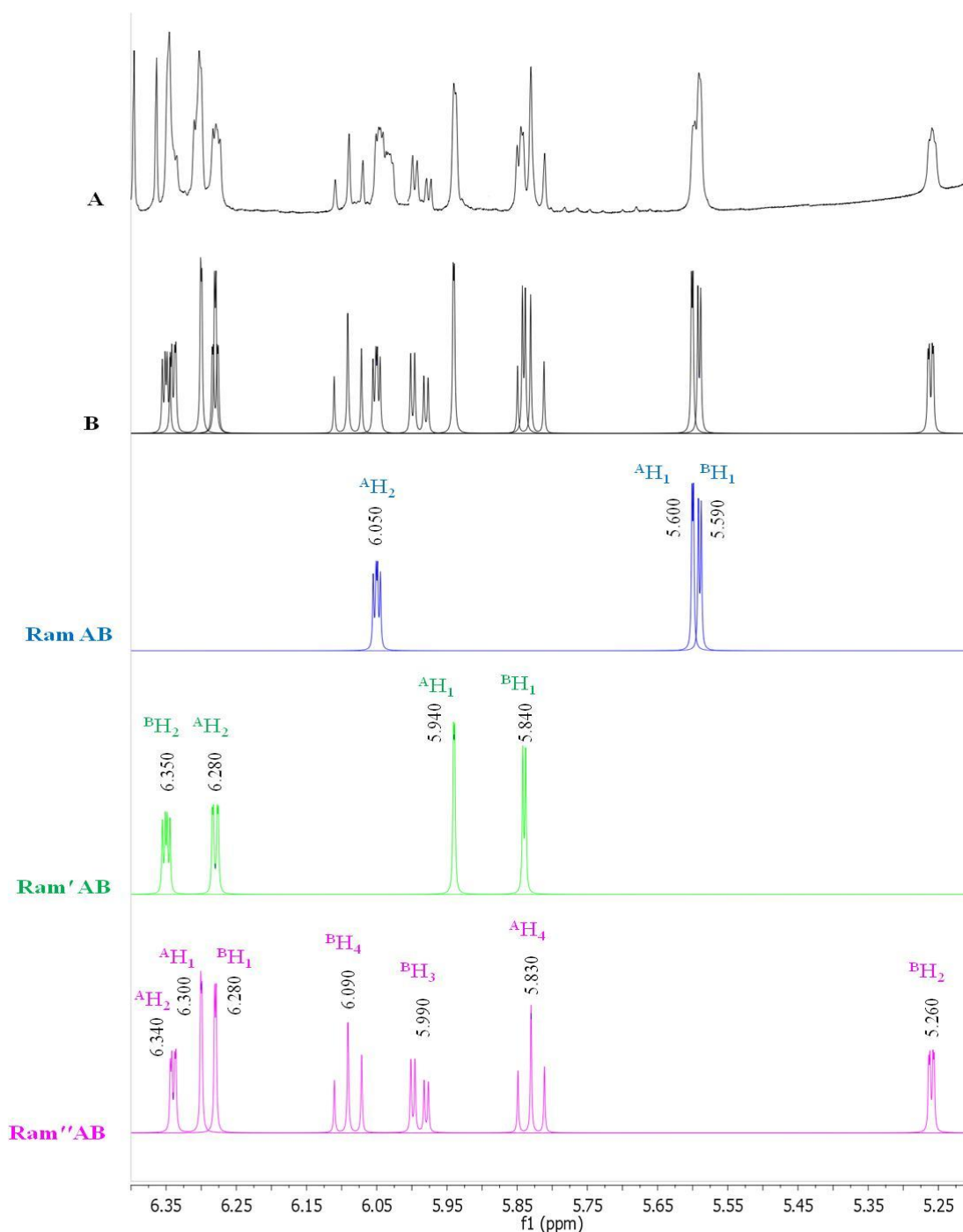


Figura XLVI. Simulación del espectro de RMN ¹H de la purgina III para la zona de 5.20 a 6.40 ppm (8). A: Sección del espectro experimental (500 MHz), B: sección del espectro simulado (MestRe-C). La comparación se realiza con los espectros individuales simulados por iteración para cada una de las unidades de ramnosa. Cada color es asignado para diferenciar a cada unidad de azúcar. Las letras A y B denotan la unidad monomérica en donde se localizan las respectivas unidades de azúcar y H_n denota las posiciones exactas en cada unidad sacárida.