



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

**"Aislamiento y purificación de resinas glicosídicas de *Ipomoea wolcottiana*"**

**T E S I S**  
**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE**  
**MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

**PRESENTA:**

**Q.F.B. Manuel Alejandro Aparicio Cuevas**

**TUTOR: Dr. Rogelio Pereda Miranda**

**Facultad de Química**

**México D.F.**

**Octubre de 2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

### **Jurado Asignado**

Presidente: Dr. Ricardo Reyes Chilpa

Vocal: Dr. José Federico del Río Portilla

Vocal: Dra. María Yolanda Ríos Gómez

Vocal: Alma Luisa Revilla Vázquez

Secretario: Mario Alberto Figueroa Saldívar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor: \_\_\_\_\_

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.

Supervisora técnica: \_\_\_\_\_

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano.

Sustentante: \_\_\_\_\_

Q.F.B. Manuel Alejandro Aparicio Cuevas.

**Agradecimientos:**

Agradezco el apoyo brindado a las siguientes personas e instituciones:

*Al CONACyT (220535) por la beca otorgada.*

*A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN212813) por el financiamiento parcial de ésta investigación.*

*M. en C. Georgina Duarte de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de los espectros de masas.*

*Miembros del jurado por sus observaciones, mismas que me permitieron la corrección del presente escrito.*

*A la Dra. Mabel Fragoso Serrano por su tiempo y dedicación a la realización de la presente investigación.*

*Al Dr. Rogelio Pereda por su inagotable paciencia y su guía invaluable.*

**Dedicatorias:**

*A mis padres y hermanos, ya que todos juntos hemos sido siempre y siempre seremos.*

*A Cecilia, por su invaluable presencia en mi día a día.*

*A mis amigos. Por que seguimos.*

## Contenido

Jurado Asignado .....	I
Agradecimientos: .....	II
Dedicatorias: .....	III
Lista de Símbolos y Abreviaturas .....	IX
1. Introducción .....	1
2. Antecedentes .....	3
2.1 Familia Convolvulaceae .....	3
2.2 El género <i>Ipomoea</i> .....	4
2.2.1 Usos tradicionales .....	4
2.2.2 Química y actividades biológicas.....	5
2.3 Resinas glicosídicas y complejidad estructural. ....	8
2.3.1 Algunas clasificaciones de las resinas glicosídicas. ....	8
2.4 Etnobotánica de <i>Ipomoea wolcottiana</i> .....	9
2.5 Métodos cromatográficos para la separación de resinas glicosídicas. ....	11
3. Justificación .....	13
4. Objetivos .....	13
4.1 Objetivo general .....	13
4.2 Objetivos particulares .....	13
5. Parte experimental.....	14
5.1. Determinación de los espectros de RMN y EM.....	14
5.2 Material vegetal. ....	15
5.3 Obtención de las resinas glicosídicas. ....	15
5.3.1 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.....	15
5.3.2 Fraccionamiento secundario de la subfracción V y VI .....	16
5.4. Identificación de las subfracciones de trabajo mediante CLAR. ....	17
5.5 Preparación de los derivados peracetilados. ....	19
5.5.1 Fracción lw 30 .....	19
5.5.2 Fracción lw 29.1 .....	19
5.6. Tratamiento de las diferentes fracciones de trabajo mediante CLAE.....	20
5.6.1 Fracción lw29 .....	20
5.6.1.1. Fracción lw29.1 .....	21
5.6.1.2. Aislamiento y purificación del componente lw 29.5.....	22

---

5.6.2. Fracción lw 30 .....	25
5.6.3 Fracción lw 30 peracetilada. ....	27
5.6.3.1 Esquema de cortes. ....	27
5.6.3.2 Purificación de los componentes mayoritarios de la fracción lw30 peracetilada. ...	28
6. Resultados y Discusión .....	30
6.1 Métodos cromatográficos. ....	30
6.2 Intrapilosina VII .....	31
6.2.1 Identificación de fragmentos y residuos acilantes por espectroscopia de masas. ....	32
6.2.2 Empleo de RMN de $^{13}\text{C}$ y $^1\text{H}$ en la elucidación estructural de la Intrapilosina VII. ....	33
6.2.2.1 Asignación de señales correspondientes al esqueleto oligosacárido. ....	33
6.2.2.2 Secuencia de glicosilación y posiciones de esterificación. ....	37
6.3 Componente lw29.1.2 .....	40
6.4 Empleo de espectrometría de masas. ....	43
6.4.1 Identificación de fragmentos y residuos acilantes por espectrometría de masas. ....	45
6.5 Resonancia Magnética Nuclear. ....	45
6.5.1 Asignación de señales de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ .....	45
6.5.2 Secuencia de glicosilación y posiciones de esterificación .....	49
6.6 Comparación con la literatura. ....	51
7. Conclusiones. ....	52
8. Bibliografía. ....	53

---

---

---

**Lista de Figuras**

Figura 1 Ilustración de <i>Ipomoea purga</i> , ingrediente utilizado como purgante en la medicina prehispánica, conocida como cacamotli tlanquinoni.	3
Figura 2. Tricolorina A y algunos derivados.	6
Figura 3. <i>Ipomoea wolcottiana</i> y su localización en Veracruz.	9
Figura 4. Árbol de <i>Ipomoea wolcottiana</i> en un terreno baldío en Veracruz.	10
Figura 5. Flores de <i>Ipomoea wolcottiana</i> .	11
Figura 6. Válvula de reciclaje de 3 posiciones.	12
Figura 7. Placa cromatográfica que muestra las fracciones ricas en resinas glicosídicas.	15
Figura 8. Placa cromatográfica de referencia de <i>I. murucoides</i> vs fracciones de <i>I. wolcottiana</i>	16
Figura 9. Placa cromatográfica de las fracciones con resinas glicosídicas .	16
Figura 10. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw28.	17
Figura 11. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción de lw29.	17
Figura 12. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw30.	18
Figura 13. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw31.	18
Figura 14. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw32.	19
Figura 15. Cromatograma a nivel preparativo de la subfracción lw 29.	20
Figura 16. Cromatograma de fracción lw29.1.	21
Figura 17. Purificación de la subfracción lw29.1.2.	22
Figura 18. Purificación componente lw29.5	23
Figura 19. Cromatograma a nivel analítico del componente lw29.5.2 utilizando una mezcla binaria de MeOH-THF 1:1.	24
Figura 20. Reciclaje de componente lw29.5.2 con mezcla ternaria MeOH-ACN-THF 8:2:2.	24
Figura 21. Reciclaje de componente lw29.5.2 con mezcla ternaria MeOH-ACN-THF 90:7.5:2.5.	25
Figura 22. Cromatograma a nivel preparativo subfracción lw 30.	25
Figura 23 Cromatograma analítico lw 30.5.	26
Figura 24. Cromatograma analítico lw 30.10.	27
Figura 25. Cromatograma analítico lw30.15 ACN-MeOH 1:1.	27
Figura 26. Esquema de cortes fracción lw 30 acetilada en MeOH.	28
Figura 27. Purificación del componente lw 30 ac 1.2.	29

---

---

---

Figura 28. Purificación componente lw 30 ac 1.3.	29
Figura 29 Placa cromatográfica donde se ilustran las fracciones que contienen resinas glicosídicas.	30
Figura 30. Esquema de separación fracción lw29.1.	31
Figura 31. Espectros de masas, componente lw29.1.4 (Intrapilosina VII).	33
Figura 32. Espectro HSQC, con ampliación en zona anomérica.	34
Figura 33. Espectro COSY, ilustrando el uso de cuadros de conectividad.	35
Figura 34. Espectro TOCSY. Protones a varios enlaces de distancia.	37
Figura 35. Espectro HMBC. Secuencia de glicosidación.	38
Figura 36. Intrapilosina VII.	39
Figura 37 Esquema de separación fracción lw30	41
Figura 38. Inyección corte lw30.10.	42
Figura 39. Reciclaje de corte acetilado. lw30ac1.2.	43
Figura 40. Fragmentación característica resina glicosídica.	44
Figura 41. Espectro RMN de $^1\text{H}$	46
Figura 42. Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ .	46
Figura 43. Ampliación espectro RMN HSQC, zona anomérica componente lw 29.1.2	47
Figura 44. Espectro bidimensional COSY componente lw29.1.2	48
Figura 45. Espectro bidimensional TOCSY componente lw 29.1.2	48
Figura 46. Espectro bidimensional HMBC que ilustra las posiciones de esterificación, con ampliación entre 173 y 174 ppm.	50
Figura 47. Wolcotinósido IV.	51

---

---

---

**Lista de Cuadros**

Cuadro 1. Especies de <i>Ipomoea</i> con actividad biológica.....	7
Cuadro 2. Esquema de cortes de la fracción lw29. ....	20
Cuadro 3. Esquema de corte de la fracción de trabajo lw29.1. ....	21
Cuadro 4. Resumen de condiciones de separación a nivel analítico ensayadas para la fracción lw29.5.2.....	23
Cuadro 5. Tiempos de retención subfracción lw 30.....	26
Cuadro 6 Datos espectroscópicos para RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C para el componente lw29.1.4. ....	36
Cuadro 7 . Esquema de cortes fracción lw30. ....	42
Cuadro 8. Datos espectroscópicos para RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C para el componente lw29.1.2 .....	49

## Lista de Símbolos y Abreviaturas

Abreviatura	Significado
$C_5D_5N$	Piridina Deuterada
$CHCl_3$	Cloroformo
CLAE	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Eficiencia.
COSY	Correlation Spectroscopy.
FAB	Fast Atom Bombardment.
g	Gramo.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy.
Hz	Hertz.
$J$	Constante de acoplamiento
m	Metro.
m/z	Relación masa carga.
MeOH	Metanol.
mg	Miligramo.
MHz	Megahertz.
min	Minuto.
ppm	Partes por millón.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN $^{13}C$	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN $^1H$	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno.
$t_R$	Tiempo de Retención.
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy
$\alpha$	Rotación óptica observada en el polarímetro.
$\delta$	Desplazamiento químico.

## 1. Introducción

Aunque no se sabe a ciencia exacta cuando fue que se empezaron a utilizar las plantas medicinales, como podríamos imaginar se dio en todas las culturas a la vez, mientras buscaban alguna manera de sanar o quizá asociadas con algún ritual mágico-religioso, las posibilidades son muchas; lo más factible es pensar que los descubrimientos fueron fruto de la serendipia, hallazgos afortunados, en la búsqueda de alimentos.

Históricamente, las plantas han sido una fuente importante en la obtención de fármacos y compuestos biodinámicos para su desarrollo en nuevos agentes fitofarmacéuticos como base de prototipos estructurales para la producción de nuevos compuestos semisintéticos (1).

En este campo, México es considerado “megadiverso” y por tanto, tiene mucho que compartir con el mundo; ya que es un país muy rico en especies vegetales ya que es poseedor del 10% de diversidad mundial de especies, y situado en el quinto lugar en cantidad de plantas vasculares (2).

Los géneros *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Operculina* y *Cuscuta* que pertenecen a la familia *Convolvulaceae* son de distribución cosmopolita y se distinguen por sus actividades medicinales, alucinógenas (rituales religiosos) y citotóxicas, por otra parte, la actividad purgante de algunos miembros del género *Ipomoea* se debe a su alto contenido de resinas glicosídicas (3).

Una resina glicosídica, desde el punto de vista químico, es una molécula que pertenece a la clase de compuestos denominados como glicolípidos o lipooligosacáridos. Estos compuestos de alto peso molecular son de naturaleza anfipática, es decir, solubles en disolventes polares (metanol) y apróticos no polares (cloroformo) y característicos de la familia de las convolvuláceas. La porción hidrofílica está constituida por la glicona formada por una variedad de monosacáridos (hexosas y metilpentosas) de su esqueleto oligosacárido (hasta siete para sus núcleos glicosídicos). La porción hidrofóbica o aglicona la constituye un ácido graso, principalmente el ácido jalapínico (11S-hidroxihexadecanoico) que forma un enlace glicosídico en la porción reductora del oligosacárido y establece un macrociclo a través de la esterificación del núcleo oligosacárido. También, las propiedades anfipáticas de estos azúcares complejos se encuentran asociadas a las cadenas

alifáticas de diversos tamaños que esterifican al núcleo oligosacárido incrementando su solubilidad en disolventes apolares como el hexano y el cloroformo (3).

Se ha encontrado que las resinas glicosídicas de algunas especies del genero *Ipomoea* poseen una actividad citotóxica marginal (4). Sin embargo, la mayoría de los compuestos inactivos como agentes citotóxicos ejercen una potente acción *in vitro* de reversión del fenotipo resistente a fármacos en células procarióticas (por ejemplo *Staphylococcus aureus* y *Salmoella enterica* sv. typhi) y eucarióticas [células humanas de cáncer de mama resistentes a vinblastina (MCF-7/Vin)]. También, se han descrito fitotoxicidad y actividades espasmogénicas, entre otras (3) (6).

La dificultad en la caracterización de estos metabolitos radica en que ningún método cromatográfico convencional, exceptuando la cromatografía de líquidos (HPLC), en el modo de reciclaje (3), proporciona una adecuada separación de los constituyentes individuales de los extractos poseedores de resinas glicosídicas, y esto se debe a que la variación entre ellas muchas veces sea en un sólo sustituyente, haciendo que la separación mediante métodos convencionales se haga imposible, es por eso que el desarrollo de métodos analíticos basados en HPLC es de vital importancia en el campo de investigación de las resinas glicosídicas.

## 2. Antecedentes

### 2.1 Familia Convolvulaceae.

También conocida como la familia de "Morning Glories" (las glorias de la mañana) en el idioma inglés, debido a la tendencia de las especies ornamentales a florecer durante la mañana, donde muestran su esplendor unas pocas horas antes de que caigan sus pétalos; sus miembros también se conocen como "campanitas" en algunos lugares, y hace referencia a la forma acampanada del cáliz que tienen las flores.

El nombre de la familia proviene del latín "convolvere", que significa "entrelazarse", y se refiere precisamente al modo en que sus miembros suelen crecer, en forma de enredadera. (3).

Esta familia consta de aproximadamente de 50 a 60 géneros y a su vez contiene de 1600 a 1700



**Figura 1 Ilustración de *Ipomoea purga*, ingrediente utilizado como purgante en la medicina prehispánica, conocida como cacamotli tlanquinoni.**

especies; y es de distribución cosmopolita, es decir, puede proliferar en ambientes muy variados, además de poseer especies endémicas en cada continente. (5).

Esta familia incluso está ilustrada en uno de los manuscritos más antiguos y representativos que se conocen sobre plantas medicinales en el nuevo mundo y que data del siglo XVI. Se trata del Manuscrito de De la Cruz-Badiano (**figura 1**) y son 7 las especies pertenecientes a la familia de las convolvuláceas que aparecen en dicho tratado que describe las propiedades curativas de las plantas empleadas entre los aztecas con una descripción en latín de sus propiedades curativas así como los remedios que se preparaban con las mismas (6).

La característica anatómica más notable de éstas es poseer células secretoras de resinas glicosídicas, en sus tejidos foliar y radicular. Dichas glicorresinas se encuentran confinadas a esta familia, y sirven

como un importante marcador quimiotaxonómico. Estos compuestos son responsables de la marcada actividad purgante de la familia (5).

Aunque la familia es mejor conocida por sus especies en clima templado (ej. *Calystegia*, *Convolvulus*), muchas variantes tropicales son valoradas como plantas de ornato, medicinales y como alimento. (7). Los miembros típicos de la familia son enredaderas perennes, con hojas actinomorfas, gamopétalas y pentámeras, y muchos miembros poseen alcaloides del ergot. (13)

Hablando más concretamente de nuestro país, encontramos que en México hay 15 géneros y 217 especies; al observar el patrón de distribución que tiene esta familia, se ha llegado a la conclusión de que tiene un origen bastante antiguo, anterior a la separación de Gondwana y el aislamiento de México desde el Paleoceno, al parecer, dio lugar a muchas subgéneros y especies propios de esta tierra y de ahí el alto endemismo de las especies de esta familia en México (7).

## **2.2 El género *Ipomoea*.**

El nombre de este género viene de las raíces griegas "ips" o "ipos", que significa "enredarse" o "enredadera" y "homoios" que significa "similar a" o "semejante a", y esto alude a la manera en la que crecen la mayor parte de sus especies, en forma de enredadera (8). La familia de las convolvuláceas comprende unas 1650 especies, predominantemente tropicales, y de éstas, el género *Ipomoea* consta aproximadamente de 500 a 600 especies, siendo éste el más abundante. Aunque predominan las especies tropicales, algunas alcanzan zonas templadas. Las especies de este género se encuentran distribuidas predominantemente en centro y Suramérica y territorios tropicales de África (9).

### **2.2.1 Usos tradicionales**

Algunas especies de éste género, desde tiempos inmemoriales, han sido utilizadas para diversos propósitos como nutricional, medicinal, ritual o para la agricultura y el conocimiento etnomédico de las mismas, han servido para la adecuada selección de plantas y su evaluación en numerosos estudios químicos (6).

Cuando nos referimos a algunas especies representativas de este género, es necesario hablar de *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Esta especie apareció en América central, en donde se domesticó y pasó a formar parte del cultivo de los pueblos nativos del continente y posteriormente consumida en todo el mundo, a partir de su introducción por los conquistadores españoles en Europa (10); por otra parte, la especie *I. aquática* Forsk es consumida como alimento en Sri Lanka, Hong Kong, Taiwán y China; esta especie es una de las fuentes más ricas en carotenoides y clorofilas y las hojas contienen la mayoría de los aminoácidos esenciales, comparables con otros alimentos como la soya, subrayando así la importancia de esta especie como posible complemento alimenticio, además, es también fuente de bioelementos tales como el calcio, magnesio, hierro, zinc y cobre. Otras especies de *Ipomoea* son utilizadas también como alimento, como son *I. alba* L. y también *I. albivenia* (Lindl.) Sweet (9). Asimismo, es posible mencionar al Xonequi de México, un platillo típico de la región de Xico en Veracruz que es elaborado con frijoles, bolas de masa y una aromática planta de la que recibe el nombre (la especie corresponde a *I. dumosa*). Muchas otra especies de *Ipomoea*, así como otros miembros de las convolvuláceas, han sido utilizadas por sus propiedades fitotóxicas, como es el caso de *I. tricolor*, que se utiliza en México por agricultores para combatir el crecimiento de algunas plantas indeseables (6).

Debido a que muchas especies de *Ipomoea* contienen alcaloides del ergot, éstas son utilizadas también como alucinógenos, y en algunas culturas precolombinas, se utilizaron en los rituales mágico-religiosos para adquirir estados alterados de conciencia que les permitieran hacer “adivinations”. Finalmente, numerosas especies de *Ipomoea* han sido utilizadas en la medicina tradicional de un gran número de países para el tratamiento de una variedad de enfermedades, siendo uno de los usos más comunes, el de las raíces de las ipomoeas, para tratar la constipación y como purgantes drásticos (6).

### **2.2.2 Química y actividades biológicas.**

Las primeras resinas aisladas de una fuente mexicana y cuya estructura se caracterizó íntegramente fueron las llamadas "tricolorinas" de *Ipomoea tricolor*, mismas que se evaluaron en ensayos in vitro de fitotoxicidad, encontrando que la tricolorina A era activa (6) (figura 2). Estudios posteriores pudieron establecer que había una relación entre su estructura con la actividad, al parecer, las resinas actúan como desacopladores en la cadena de electrones a nivel membranal, y que la presencia de la macrolactona intramolecular es clave, ya que su hidrólisis está asociada directamente con la pérdida de su bioactividad (11, 6). También se ha visto, que el tamaño de la

---

macrolactona no tiene relación con su actividad antibacteriana mientras que otros estudios sobre el mismo tema afirman que la mayor actividad bactericida coincide con su mayor carácter lipofílico, característica que cambia con sus similares hidrofóbicos. En cuanto a su actividad moduladora en la resistencia a fármacos, se sabe que el carácter anfipático de estos metabolitos facilita su entrada en las células, así como su interacción con las bombas de extrusión responsables de la eliminación del fármaco fuera del citoplasma para mantener la concentración por debajo de la toxicidad (12).

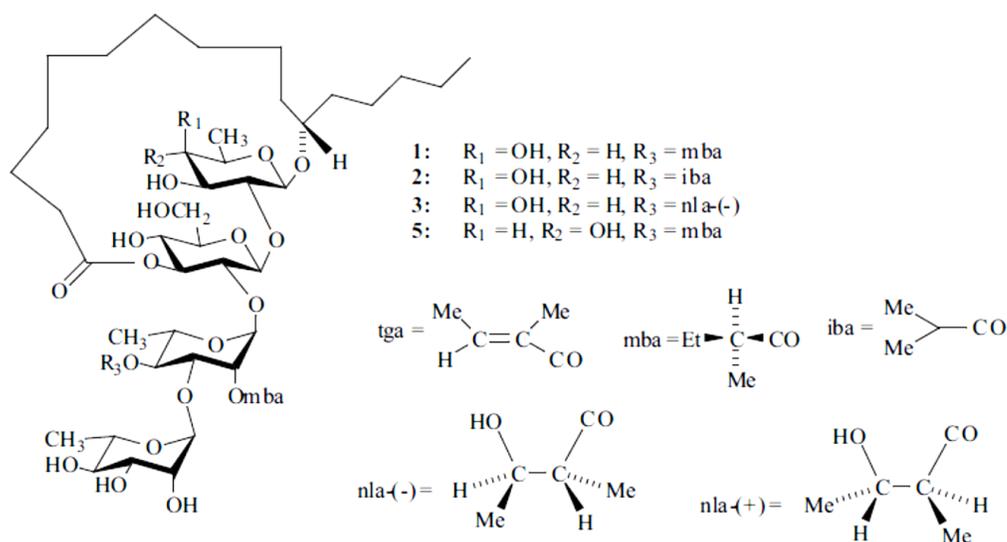


Figura 2. Tricolorina A y algunos derivados (6).

En el **cuadro 1** se resumen las principales actividades biológicas descritas para algunas especies representativas del género *Ipomoea*:

**Cuadro 1. Especies de *Ipomoea* con actividad biológica.**

	<i>I. stans</i>	<i>I. wolcottiana</i>	<i>I. pausiflora</i>	<i>I. orizabensis</i>	<i>I. pes-caprae</i>	<i>I. tricolor</i>	<i>I. intrapilosa</i>	<i>I. murucoides</i>	<i>I. batatas</i>	<i>I. purga</i>	<i>I. alba</i>	<i>I. stimulans</i>	<i>I. squamosa</i>	<i>I. purpurea</i>	<i>I. acquatica</i>	<i>I. campanulata</i>	<i>I. cairica</i>	<i>I. digitata</i>	<i>I. indica</i>	<i>I. nil</i>	<i>I. asarifolia</i>	<i>I. carnea</i>	<i>I. leptophylla</i>	<i>I. muricata</i>	<i>I. stolinifera</i>
Afrodisiaco									•									•							
Alucinógeno				•	•	*				•			•												
Analgésico.				•	•																			•	
Anticancerígeno	*	*		•	*	•			•				•							•					
Antidiabético									•						•			•							
Antídoto								8							8	9									
Antifúngico															•										
Anti-hipertensivo					•				7						•							•			
Anti-inflamatorio					•		•	•	•			•	•				•	•			•				•
Antipirético				•											•										
Citotóxicas.	•	•	•	•	•				•				•												
Coagulante													•	•											
Colagógo																		•							
Diurético													•	•											•
Fitotóxica	•					•																			
Fitotóxica																									
Galactogogo									•									•							
Infecciones cutáneas					•										•									•	
Modulador de resistencia a fármacos.				•	•	•	•	•		•															
Otros usos	1 1		4	5									6						1			1 0	2	3	
Purgante	•		•						•	•		•	•	•				•							

1. Sanar huesos rotos. 2. Su humo se usa contra los nervios, y la raíz contra el malestar estomacal y como tónico. 3. Preparaciones en glicerol de la droga cruda se usan contra la faringitis, y las preparaciones óticas contra la otitis externa. 4. Antihelmíntico, epilepsia, hidrocefalia, meningitis. 5. Reumatismo. 6. Sífilis. 7. Sólo una variante que se usa en Japón. 8. Antídoto contra veneno de algunos alacranes. 9. Antídoto contra veneno de algunas serpientes. 10. SIDA. 11. Crisis epilépticas, sedante, antiespasmódico. (9)

### 2.3 Resinas glicosídicas y complejidad estructural.

***Son derivados glicosilados de ácidos grasos de 14 y 16 átomos de carbonos mono y dihidroxilados; las cuales poseen la característica de ser anfipáticas, es decir, que tienen una porción hidrofóbica, debido a la presencia de agliconas de ácidos grasos, y una parte hidrofílica, dada por la parte sacárida de la molécula (3).***

La parte sacárida está compuesta por un esqueleto de no más de 6 unidades monosacáridas; los monosacáridos encontrados son D-glucosa y epímeros de pentosas (L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa y D-xilosa), en su forma de piranosa. El enlace O-glicosídico, se encuentra entre los monosacáridos y también ligando con la aglicona; también se ha observado que hay unidades disacáridas altamente conservadas, como son L-Rha-(1→2)-D-Fuc, L-Rha-(1→4)-L-Rha, D-Glc-(1→2)-D-Fuc. La complejidad estructural de estos metabolitos deriva del hecho de que existen varias formas de combinaciones entre las posiciones de los enlaces, por ejemplo, hay enlaces (1→2), (1→3), (1→4) y (1→6), además existe una amplia gama de ácidos alifáticos de cadena corta que también se han encontrado unidos a la cadena sacárida, como son el acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2S)-metilbutírico (mba), (-)-(2R,3R)-3-hidroxi-2-metilbutúrico (ácido nihilico, nla), y tíglico (tga), también se han encontrado ácidos arilalquílicos como el (*E*)-cinámico (ca), y ácidos grasos saturados de distintas longitudes, como el *n*-hexanoico (hexa) o caproico, el *n*-octanoico (octa) o caprílico, *n*-dodecanoico (dodeca) o láurico, *n*-hexadecanoico (hexadeca) o palmítico, *n*-octadecanoico (octadeca) o esteárico y el *n*-eicosanoico (eicosa) o araquídico son algunos de los residuos más comúnmente encontrados esterificando los núcleos oligosacáridos. La mayoría de estos núcleos oligosacáridos, contienen como aglicona al ácido jalapínico, (ácido 11S-hidroxihexadecanoico), que siempre se encuentra en forma de lactona macrocíclica, abarcando dos o más unidades sacáridas del esqueleto oligosacárido, y es precisamente esta característica la que confiere a este tipo de moléculas una mayor diversidad estructural al haber varios posibles sitios de unión dentro de un mismo núcleo (3).

#### 2.3.1 Algunas clasificaciones de las resinas glicosídicas.

Se pueden clasificar en dos grupos, de acuerdo a su solubilidad en éter: jalapina (soluble) y covolvulina (insoluble), y también de acuerdo al tamaño de sus núcleos oligosacáridos: **disacáridos** (como resinósido cuscútico A de *Cuscuta chinensis* o la muricata B de *I. muricata*), **trisacáridos** (como los ácidos cuscúticos A<sub>1</sub>-A<sub>3</sub> o el ácido tricolorínico C, de *I. tricolor*), **tetrasacáridos** (como los ácidos cuscúticos A al D, o el merremósido I de *Merremia mammosa* (lour), **pentasacáridos** (como

el ácido arborecínico, de *I. arborescens*), **hexasacáridos** (por ejemplo el ácido lonchofílico de *I. lonchophylla* J. Black y el ácido operculínico, de *I. operculata*), y por último, los **oligómeros tipo éster** (como las batatinas I, II, III y IV de *I. batatas*, o la merremina de *Merremia hungaiensis*) (3).

#### 2.4 Etnobotánica de *Ipomoea wolcottiana*

*Ipomoea wolcottiana* es también conocido como cazahuate verde, ozote, cazahuate veracruzano o simplemente cazahuate, se trata de un árbol pionero (es decir, que requiere de luz solar y es capaz de crecer en condiciones de abandono, donde se ha eliminado la vegetación) y se distribuye a lo largo de la costa occidental de México, desde Sonora hasta Chiapas, con ciertas poblaciones que alcanzan el centro de México en los estados de Veracruz, Puebla y Morelos (13), la **figura 3** muestra cómo se distribuye la planta en el estado de Veracruz.

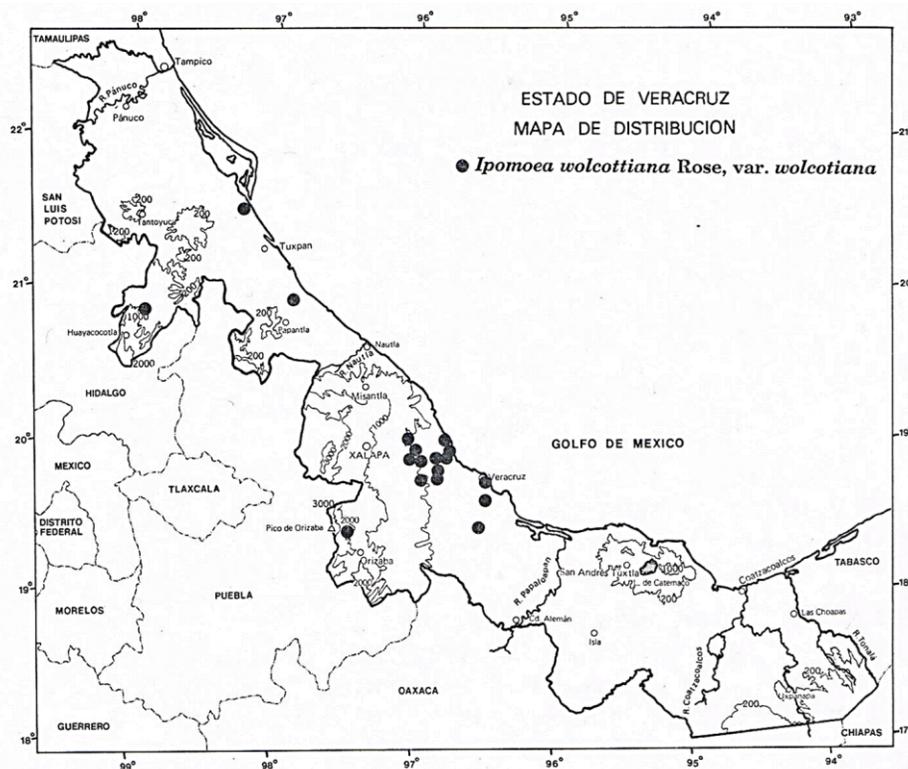


Figura 3. *Ipomoea wolcottiana* y su localización en Veracruz.

Los individuos adultos miden entre 3 y 13 metros de altura y presentan troncos relativamente grandes (aproximadamente 78.8 cm de diámetro), que ramifican desde la base cuando se encuentran en un suelo muy soleado. Los árboles, al ser pioneros son fácilmente encontrados en las

orillas de los caminos y en general en suelos perturbados, son muy escasos en el interior de la selva por su condición heliófita. La producción de hojas ocurre durante la época de lluvias entre los meses de Junio y Noviembre, y la floración inicia normalmente con la temporada de hojas secas que ocurre de Diciembre a Enero y termina hacia el mes de Marzo. Esta especie también posee flores gamopétalas con 5 anteras y un estigma, abren durante la noche y cierran durante la mañana como muchos otros miembros de la familia. Las **figuras 4 y 5** ilustran individuos adultos de la especie *I. wolcottiana* en su ambiente natural y en floración, respectivamente.



**Figura 4.** Árbol de *Ipomoea wolcottiana* en un terreno baldío en Veracruz.



Figura 5. Flores de *Ipomoea wolcottiana*.

## 2.5 Métodos cromatográficos para la separación de resinas glicosídicas.

La cromatografía es un método usado principalmente para la separación de componentes de una muestra, en la cual dichos componentes se distribuyen entre dos fases, una de las cuales es llamada estacionaria y la otra móvil; la fase estacionaria puede ser un sólido o un líquido retenido en un sólido o un gel; esta fase estacionaria puede estar en forma pelicular o como una capa. La fase móvil puede ser gaseosa, líquida o también un fluido supercrítico. Las resinas glicosídicas, presentan una gran dificultad para su aislamiento, ya que habitualmente se presentan en forma de mezclas complejas de homólogos de polaridad similar, que difieren la mayor parte del tiempo en las posiciones de acilación del núcleo oligosacárido, de manera que por métodos como columna abierta o placa preparativa no es posible lograr su separación, ni su purificación **(3)(14)**.

La cromatografía de líquidos de alta resolución es una buena técnica para resolver el problema que estas complejas mezclas de oligosacáridos suponen. Las variantes de esta técnica que han permitido mejorar el resultado de las purificaciones de estos complejos oligosacáridos son la aplicación del "rasurado de pico" y el "corte de núcleo" así como también el empleo de una válvula especialmente adaptada al equipo de CLAR **(figura 6)** para hacer que el disolvente con la mezcla de analitos circule

de nueva cuenta en la columna en lugar de salir directamente del cromatógrafo; este proceso brinda un aumento en la cantidad de platos teóricos a los que la muestra es sometida, mejorando así la separación y purificación **(32)**.

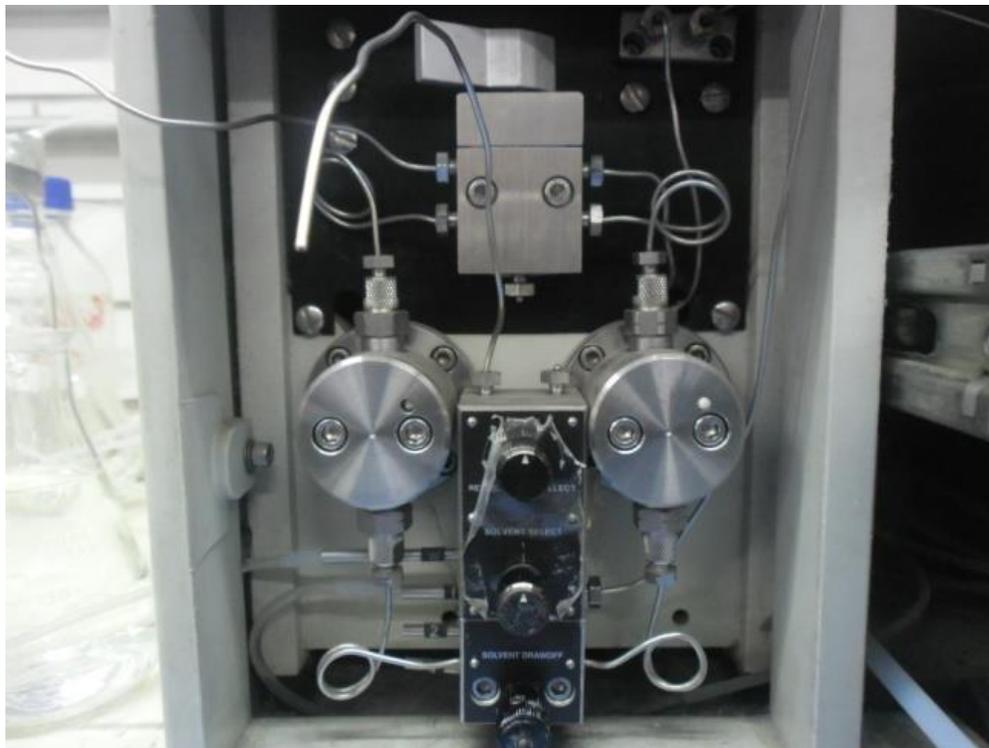


Figura 6. Válvula de reciclaje de 3 posiciones.

### 3. Justificación

Debido a las actividades biológicas demostradas para las resinas glicosídicas y a la falta de estudios químicos sobre la composición de los glicolípidos del cacahuate veracruzano, *Ipomoea wolcottiana*, es necesario contar con una metodología experimental adecuada para lograr la purificación a nivel preparativo de estos principios y posteriormente caracterizar la estructura molecular de nuevos metabolitos potencialmente activos y, de esa manera, contribuir al conocimiento de la diversidad estructural de esta clase de metabolitos poco estudiados.

### 4. Objetivos

#### 4.1 Objetivo general

Desarrollar una metodología adecuada para el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de metabolitos secundarios activos provenientes de subfracciones del extracto clorofórmico de *I. wolcottiana*, con objeto de purificar subfracciones de composición compleja.

#### 4.2 Objetivos particulares

- Realizar una segunda separación de la fracción clorofórmica del fraccionamiento primario, con el objetivo de simplificar su composición mediante cromatografía en columna abierta.
- Realizar controles cromatográficos en capa fina para separar las subfracciones similares.
- Establecer las condiciones analíticas necesarias para obtener cromatogramas adecuados de las subfracciones y determinar la subfracción de trabajo adecuada.
- Realizar los derivados necesarios con objetivo de obtener fracciones lipofílicas para su análisis mediante HPLC.
- Comparar entre los derivados elaborados y establecer la mejor forma de trabajo entre ellos.
- Realizar el escalamiento a nivel preparativo de las fracciones elegidas.
- Realizar la separación y purificación de los componentes dentro de las fracciones elegidas.
- Realizar la elucidación estructural de las moléculas aisladas por medio de los correspondientes análisis espectrométricos y espectroscópicos.

## 5. Parte experimental

### 5.1. Determinación de los espectros de RMN y EM

Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) y de carbono-13 ( $^{13}\text{C}$ ) se generaron en los equipos Varian, modelos VNMRS y MR, operando a una frecuencia de 400 MHz en  $^1\text{H}$  y 100 MHz en  $^{13}\text{C}$ . Se utilizó piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ) y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en partes por millón (ppm) utilizando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas se registraron 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.

### 5.2 Métodos cromatográficos

Los procedimientos seguidos durante este trabajo consistieron en la aplicación de la cromatografía en columna abierta, utilizando una columna de vidrio de 80 cm de largo y 9.5 cm de diámetro, empacada con gel de sílice 60 Merck F54 0.063-0.200 mm. Se utilizó una mezcla de disolventes de polaridad creciente comenzando por hexano, pasando por diclorometano y terminando con metanol, con el objetivo de separar distintos componentes de la fracción con base en sus polaridades. La reagrupación en fracciones de composición similar se realizó mediante un análisis en cromatografía en capa delgada, utilizando placas (4 × 10 cm) recubiertas de gel de sílice F254 Merck. Las placas cromatográficas resultantes fueron reveladas mediante el rociado homogéneo de una mezcla de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -sulfato cérico, como agente cromógeno, y se calentaron sobre una parrilla de calentamiento, cuya temperatura aproximada fue de 80°C.

Se utilizó un cromatógrafo de líquidos de alta resolución (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Miliford, MA, USA) está constituido por una bomba (Waters 600) adaptada con una válvula de reciclaje de muestra y un detector de índice de refracción (Waters 410), integrados a un equipo de cómputo (Pentium 4, Windows XP, marca Dell). El control del equipo, la adquisición, el proceso y la manipulación de la información cromatográfica se realizó mediante el software Empower 2. Las condiciones analíticas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución se determinaron en una columna Symmetry de fase reversa C-18 (4.6 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud, 5 $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula). El escalamiento a nivel preparativo, así como la purificación de los

compuestos, se llevaron a cabo en una columna de fase reversa Symmetry C-18 (19 mm de diámetro interno, 300 mm de longitud, 7  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula).

## 5.2 Material vegetal.

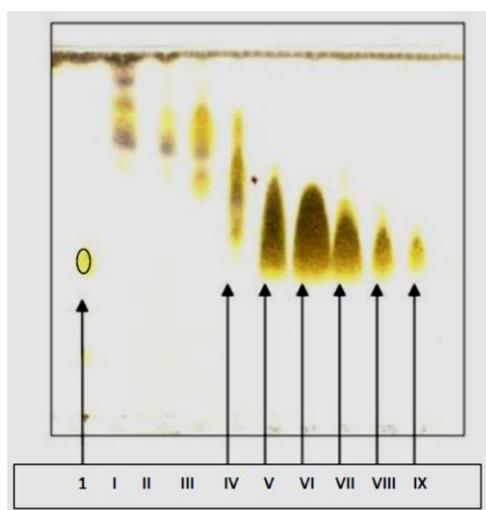
Las flores secas de *Ipomoea wolcottiana* (1103.3 g) fueron colectadas en el municipio del Carrizal, Emiliano Zapata, estado de Veracruz. La colecta del material fue hecha en el mes de Octubre de 2005 por la Dra. Blanca Nader y clasificada por el Biólogo Roberto Ortega Ortiz de la Universidad Veracruzana.

## 5.3 Obtención de las resinas glicosídicas.

El material seco y pulverizado se sometió a una extracción con cloroformo mediante un proceso de maceración en periodos de 3 días durante 3 semanas. Una vez concluido el tiempo de maceración, la solución se filtró y el disolvente se eliminó a presión reducida. Se obtuvieron **100.44 g** de extracto.

### 5.3.1 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.

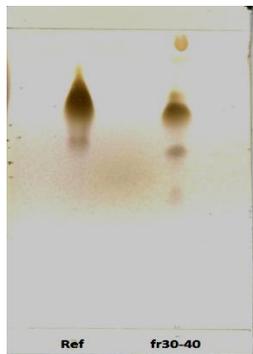
El fraccionamiento primario del extracto clorofórmico se realizó mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. La elución se inició con cloroformo incrementándose gradualmente la polaridad (5% MeOH en eluatos de 1 L), terminando con metanol. Se obtuvieron 54 fracciones primarias que fueron comparadas mediante CCF para reunir las semejantes y obtener 9 subfracciones. La **figura 7** muestra las fracciones que contienen oligosacáridos.



**Figura 7.** Placa cromatográfica que muestra las fracciones ricas en resinas glicosídicas. 1. Referencia de *I. murucoides*. I a IX fracciones obtenidas del fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de las hojas de *I. wolcottiana* donde las flechas apuntan a las fracciones ricas en oligosacáridos.

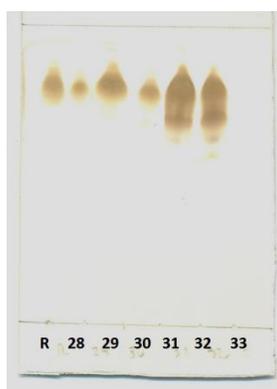
### 5.3.2 Fraccionamiento secundario de la subfracción V y VI

Tomando como referencia la CCF de las fracciones, se decidió unir las fracciones V y VI en una sola fracción, cuyo peso final fue de 28.35 g.



**Figura 8.** Placa cromatográfica de referencia de *I. muruoides* vs fracciones de *I. wolcottiana* ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH 8:2).

El fraccionamiento secundario de la fracción 30-40, se realizó con una columna abierta de 80 cm de largo y 9.5 cm de diámetro y empacada con gel de sílice 60 Merck F<sub>54</sub> 0.063-0.200 mm, se colectaron fracciones de 1 L con incrementos graduales de polaridad de 5%, comenzando con 100% cloroformo y terminando con 100% metanol. Se obtuvieron 117 subfracciones y mediante un control cromatográfico en capa fina se determinó que sólo las subfracciones de 28-32 contenían resinas glicosídicas (**Figura 9**).



**Figura 9.** Placa cromatográfica de las fracciones con resinas glicosídicas ( $\text{CHCl}_3$ -MeOH 80:20).

#### 5.4. Identificación de las subfracciones de trabajo mediante CLAR.

Las subfracciones elegidas (de la **28 a la 32**) se inyectaron a nivel analítico en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución (CLAR). Las condiciones ensayadas fueron: ACN 100%, siguiendo con 75% de ACN y 25% de H<sub>2</sub>O; posteriormente, se probó con 75 % de ACN y 25% de MeOH y finalmente MeOH 100%. Se eligió este último disolvente como fase móvil, utilizando una columna analítica C<sub>18</sub> Symmetry. Todo lo anterior se realizó siguiendo un esquema isocrático manual.

Las condiciones finales de análisis fueron las siguientes: volumen de inyección de 10 µL; concentración de la muestra de 10 mg/50 µL y un flujo de 0.4 mL/min, para obtener los cromatogramas que se ilustran en las **figuras 10 a la 14**.

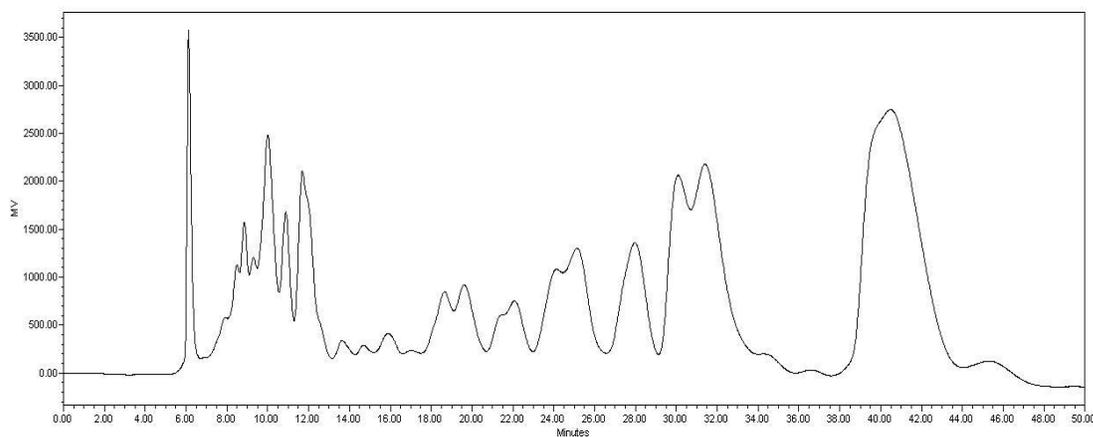


Figura 10. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw28.

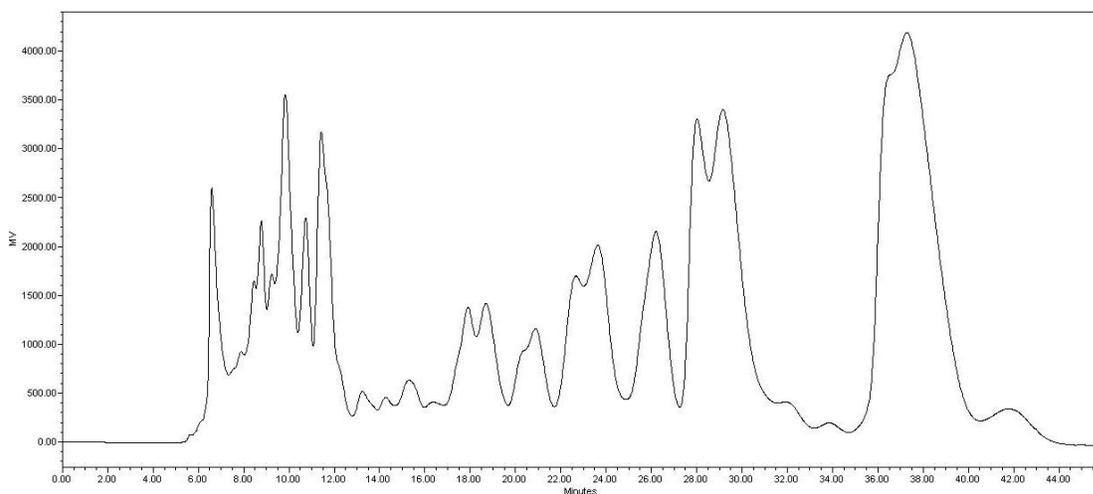


Figura 11. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción de lw29.

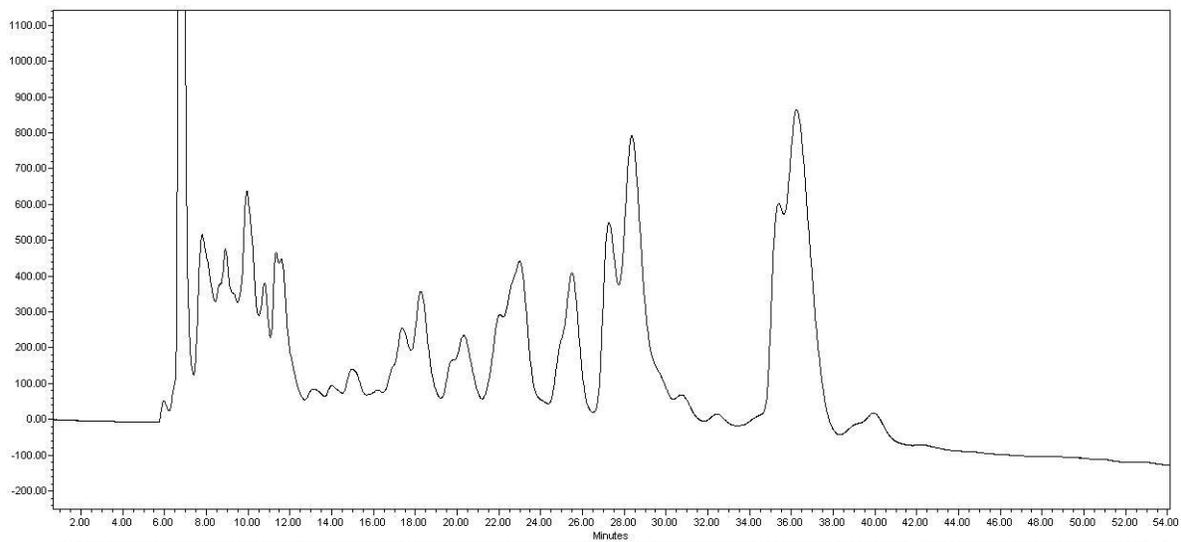


Figura 12. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw30.

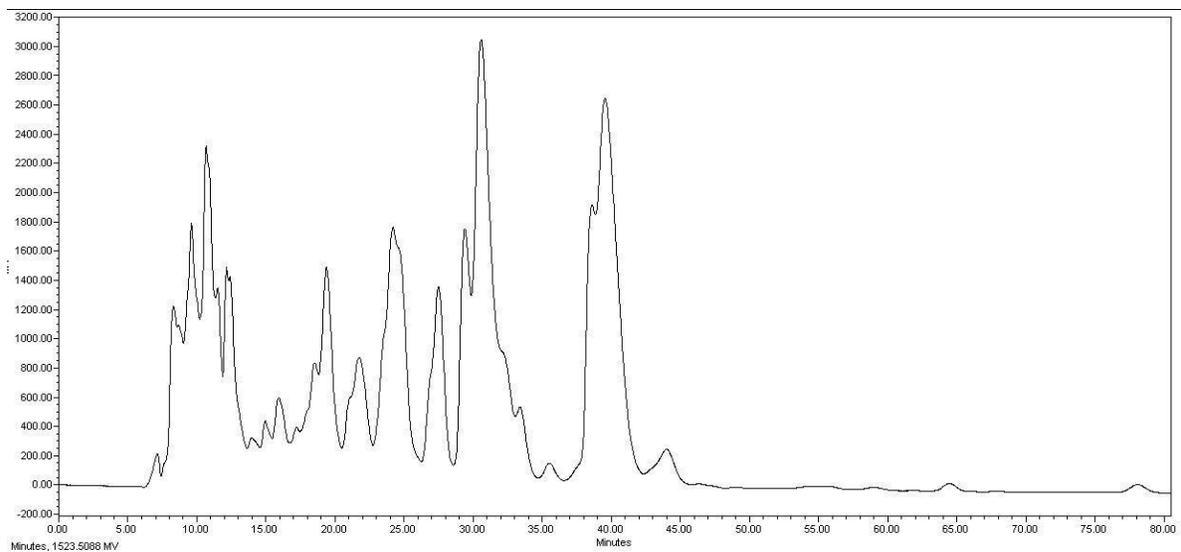


Figura 13. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw31.

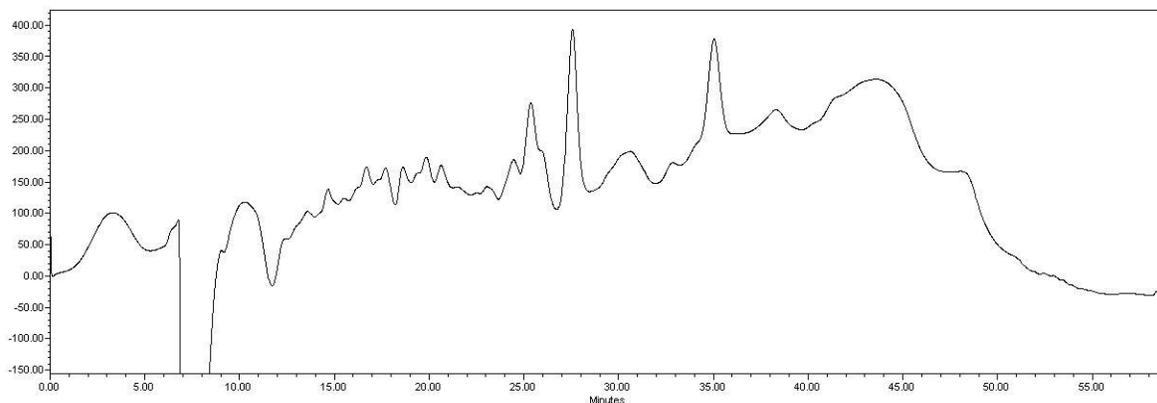


Figura 14. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw32.

De acuerdo a los cromatogramas obtenidos, se optó por trabajar con las fracciones lw29 e lw30 con un rendimiento de 12.9% (3.66 g) y 10.7% (3.04g) fracciones que se dividieron en varias partes según lo muestran las **figuras 15** y posteriormente en la **figura 26 (pág. 28)**, donde las líneas punteadas y las líneas rojas se refieren al esquema de corte seguido en cada caso. Las fracciones de trabajo, gracias a los tiempos de retención mostrados, fueron las subfracciones lw29.1 e lw30.1.

## 5.5 Preparación de los derivados peracetilados.

### 5.5.1 Fracción lw 30

Se tomaron 300 mg de la fracción lw 30 y se sometieron a un proceso de peracetilación con una mezcla de piridina y anhídrido acético, en una proporción de 1:2 con un volumen de 10 mL; posteriormente se dejó reaccionar por 24 hr y se monitoreó por CCF; al término de éste tiempo, se detuvo la reacción con 10 mL de agua fría. Posteriormente, se agregaron 20 mL de acetato de etilo, después se realizaron tres lavados consecutivos con una solución de HCL 0.1 N ( $3 \times 20$  mL) y después con una solución básica de bicarbonato de sodio 0.1 N ( $3 \times 20$  mL). Finalmente se hizo un último lavado con 20 mL de agua corriente y se secó *in situ* con sulfato de sodio anhidro, después de filtrar, la fase orgánica restante se concentró a presión reducida.

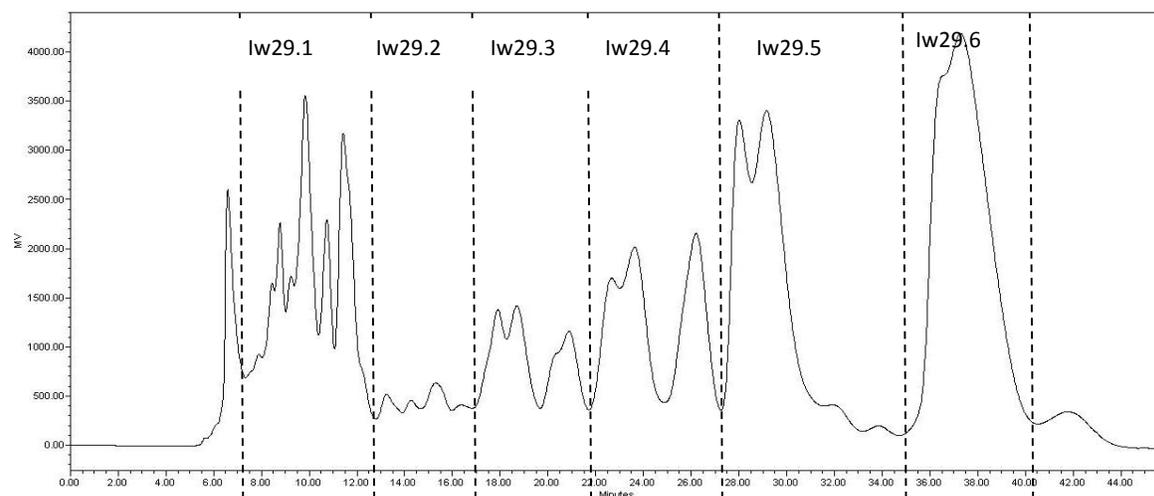
### 5.5.2 Fracción lw 29.1

Se tomaron 173 mg de la fracción lw 29.1 y se sometieron a un proceso de peracetilación similar al de la fracción lw 30, para este proceso, los volúmenes de los reactivos se utilizaron en una proporción del 50%.

## 5.6. Tratamiento de las diferentes fracciones de trabajo mediante CLAE.

### 5.6.1 Fracción lw29

El cromatograma a nivel analítico resultó ser idéntico con las nuevas condiciones preparativas como lo ilustra la **figura 15**:



**Figura 15. Cromatograma a nivel preparativo de la subfracción lw 29.**

Como ya se dijo anteriormente, las acotaciones que muestra la **figura 15** se refieren al esquema de corte seguido, debido a la complejidad de la fracción, siendo los intervalos de tiempo de retención aproximados los que se ilustran en el **cuadro 2**, para cada una de las subfracciones:

**Cuadro 2. Esquema de cortes de la fracción lw29.**

Nombre de la subfracción.	Intervalo de retención (min)
lw29.1	7.2-12.2
lw29.2	13-16.9
lw29.3	17.8-22.1
lw29.4	23-28
lw29.5	29-36
lw29.6	37-42

Debido al tiempo de retención y buen rendimiento obtenido, nos centramos en la purificación de los componentes, de la subfracción lw29.1 de la que se obtuvo un total de 301 mg.

### 5.6.1.1. Fracción lw29.1

Las condiciones utilizadas para la purificación fueron un flujo de 8.16 mL/min inyectando 90 mg en un volumen de inyección de 500 µL, utilizando una columna C-18 Symmetry 19 × 300 mm y un tamaño de partícula 7µm.

Se eligió la subfracción lw29.1 para la separación y purificación de sus productos mayoritarios, ya que obtuvimos un rendimiento del 8.22% (301.0 mg)

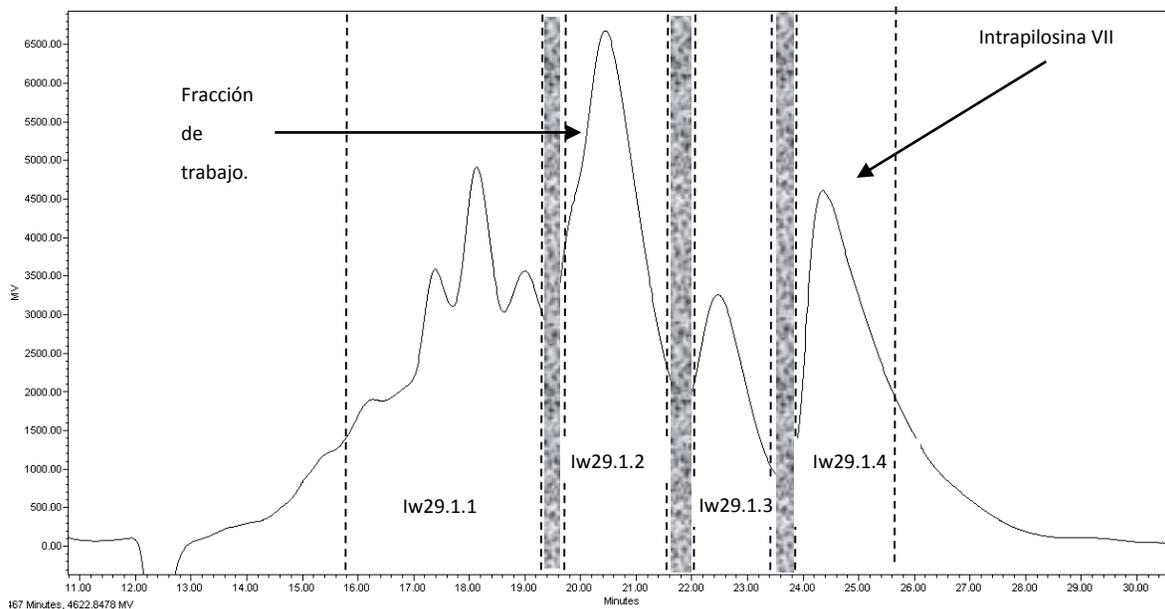


Figura 16. Cromatograma de fracción lw29.1.

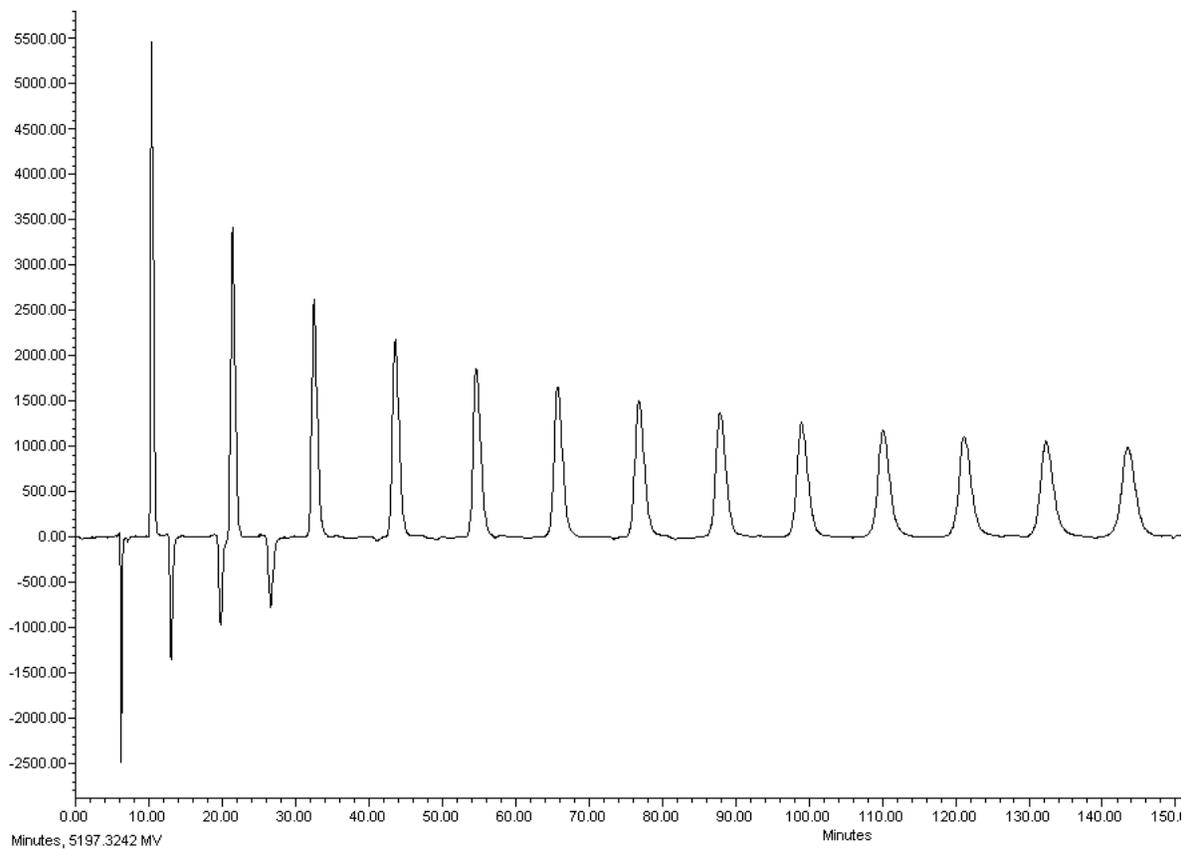
El esquema de corte que se siguió fue el que se ilustra en el **cuadro 3** así como en la **figura 16**.

Cuadro 3. Esquema de corte de la fracción de trabajo lw29.1.

Nombre de subfracción	Intervalo de tiempo de retención (min)
lw29.1.1	15.8-19.2
lw29.1.2	19.7-21.6
lw29.1.3	22.0-23.4
lw29.1.4	24.0-25.6

De la subfracción lw29.1, se seleccionó el componente con tiempo de retención de 20.4, nombrado como lw29.1.2. La subfracción lw29.1.2 se sometió a un doble esquema de reciclado, constando

cada uno de 13 ciclos de reciclado como muestra la **figura 17**. Se obtuvieron 11 mg de compuesto puro.



**Figura 17. Purificación de la subfracción lw29.1.2.**

#### **5.6.1.2. Aislamiento y purificación del componente lw 29.5**

Se comenzó utilizando como fase móvil solamente MeOH, sometiéndose a 11 ciclos de reciclado para finalmente obtener 20 mg de compuesto. El cromatograma de la **figura 18** ilustra el proceso seguido:

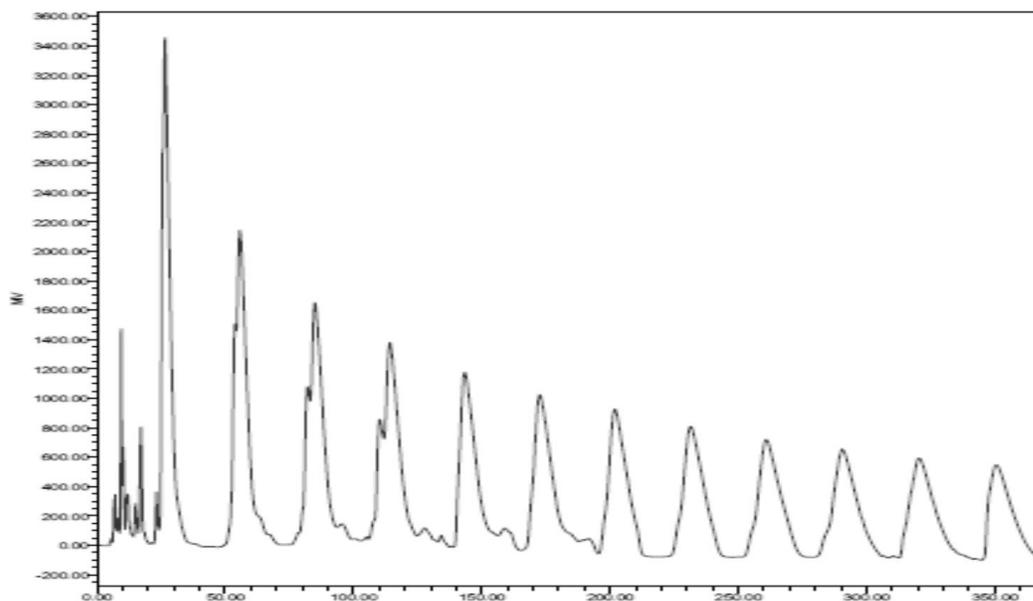


Figura 18. Purificación componente lw29.5

El resultado del reciclaje de pico y corte de núcleo fue prometedor, sin embargo, al someter el resultado de la purificación a las técnicas de RMN y EM, se llegó a la conclusión de que aún había impurezas en el componente, ya que su elucidación se tornó imposible, por lo que de nueva cuenta se comenzó con la búsqueda de condiciones a nivel analítico para lograr purificar el componente principal de esa subfracción. Se obtuvieron dos subfracciones, lw29.5.1 e lw29.5.2 de las cuales la más abundante fue la segunda con 10 mg.

Las condiciones experimentales ensayadas se resumen en el **cuadro 4**:

Cuadro 4. Resumen de condiciones de separación a nivel analítico ensayadas para la fracción lw29.5.2.

MeOH: ACN	MeOH:THF	MeOH:ACN:THF
9:1	9:1	8:1:1
1:1	8:2	90:7.5:2.5

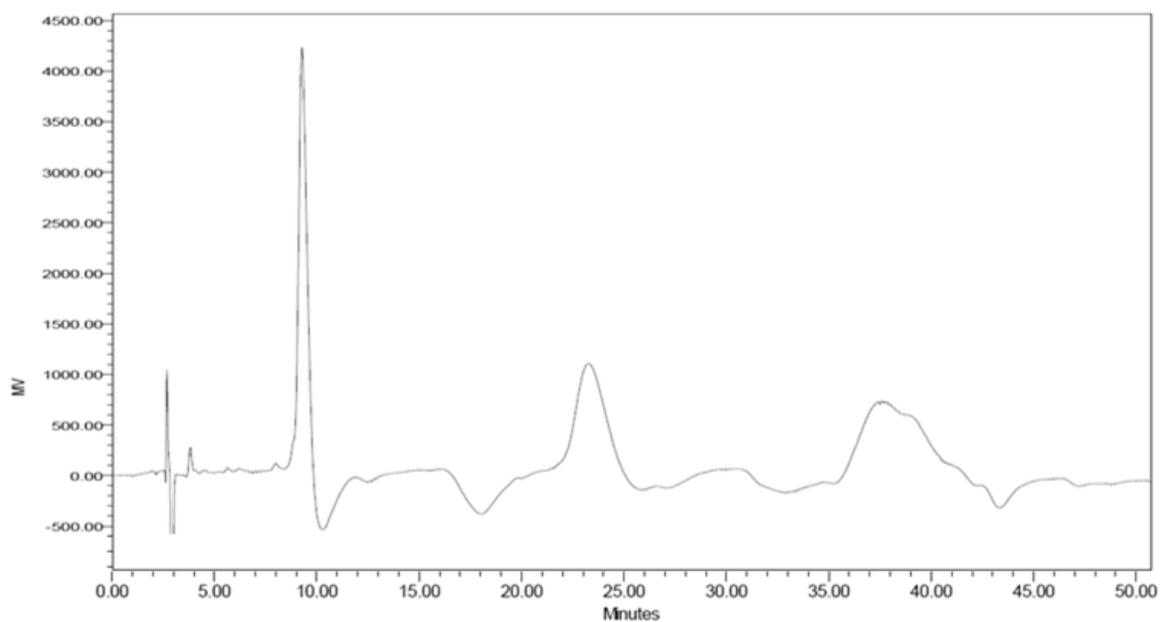


Figura 19. Cromatograma a nivel analítico del componente lw29.5.2 utilizando una mezcla binaria de MeOH-THF 1:1.

La **figura 19** muestra el comportamiento del componente con la fase binaria ensayada, se logró reducir el tiempo de retención de 25 min a 9 min, sin embargo no hubo mejoría en la resolución por lo que se optó por una mezcla ternaria de MeOH-ACN-THF (8:2:2); los cromatogramas obtenidos para dichas condiciones se muestran a continuación:

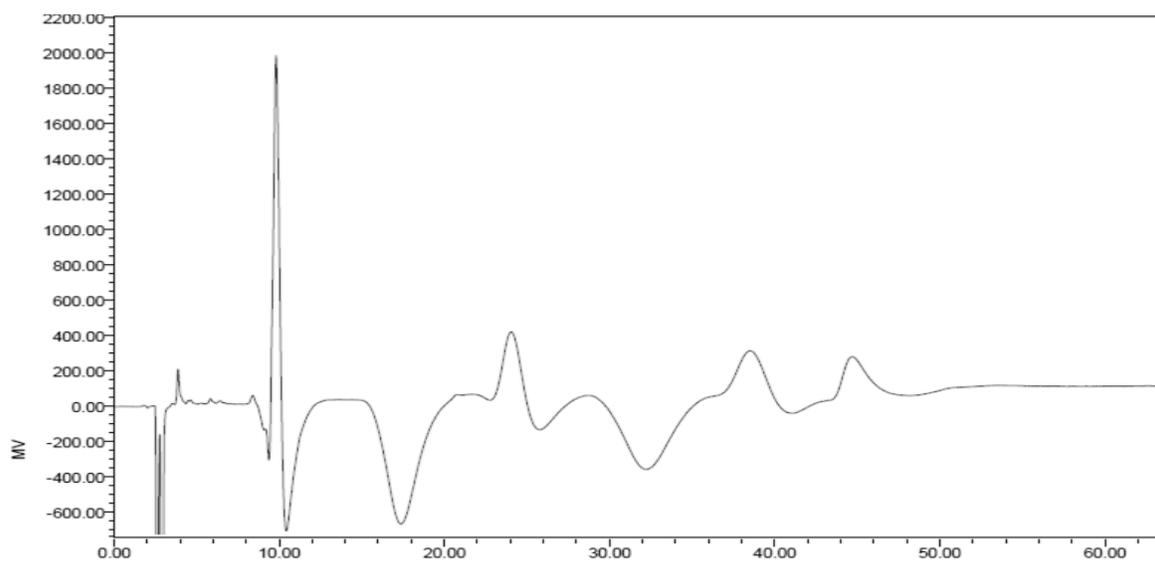


Figura 20. Reciclaje de componente lw29.5.2 con mezcla ternaria MeOH-ACN-THF 8:2:2.

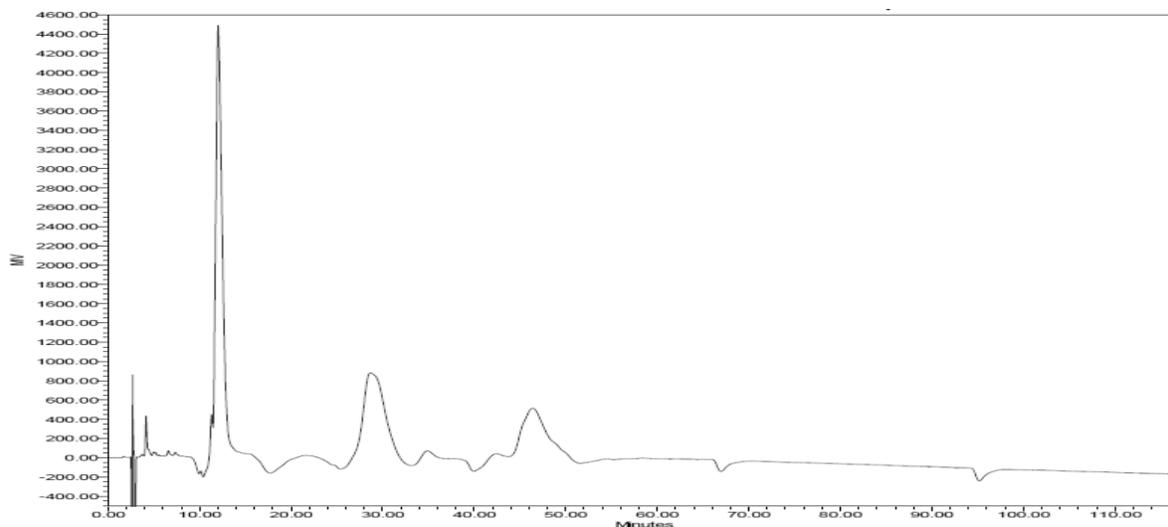


Figura 21. Reciclaje de componente lw29.5.2 con mezcla ternaria MeOH-ACN-THF 90:7.5:2.5.

### 5.6.2. Fracción lw 30

Las condiciones preparativas de separación para esta fracción fueron las mismas que para la fracción lw29 y el esquema de corte seguido es el siguiente:

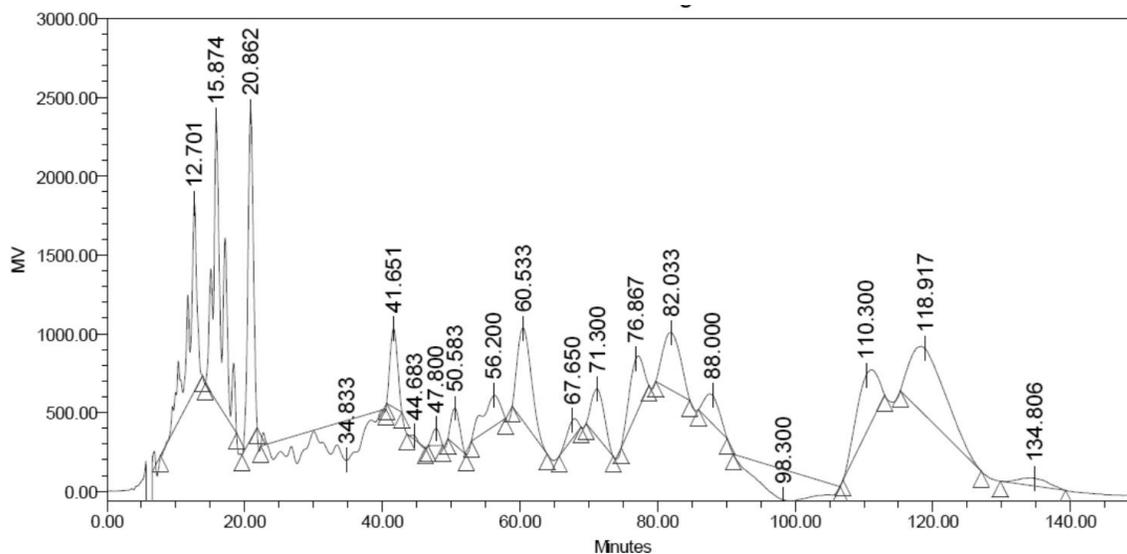


Figura 22. Cromatograma a nivel preparativo subfracción lw 30.

La fracción lw 30 se dividió en 19 partes, cuyos tiempos de retención se resumen en el siguiente cuadro:

Cuadro 5. Tiempos de retención subfracción lw 30.

Pico	t <sub>R</sub> (min)	Pico	t <sub>R</sub> (min)
<b>lw 30.1</b>	12.7	lw 30.11	67.6
<b>lw 30.2</b>	18.9	lw 30.12	71.3
<b>lw 30.3</b>	20.9	lw 30.14	73.9
<b>lw 30.4</b>	34.3	<b>lw 30.15</b>	<b>82</b>
<b>lw 30.5</b>	<b>41.7</b>	<b>lw 30.16</b>	<b>88</b>
<b>lw 30.6</b>	44.7	lw 30.17	98.3
<b>lw 30.7</b>	47.8	lw 30.18	110.3
<b>lw 30.8</b>	50.6	lw 30.19	118.9
<b>lw 30.9</b>	56.2	lw 30.20	134.8
<b>lw 30.10</b>	<b>60.5</b>		

Se resaltan con negritas los picos que se eligieron, que fueron el lw 30.5, lw30.15 e lw 30.16

Para obtener una mejor separación se ensayó utilizando una mezcla MeOH-ACN (1:1), y se obtuvieron los siguientes cromatogramas para las fracciones lw 30.5, lw 30.10 lw 30.15. (**Figuras 23-25**).

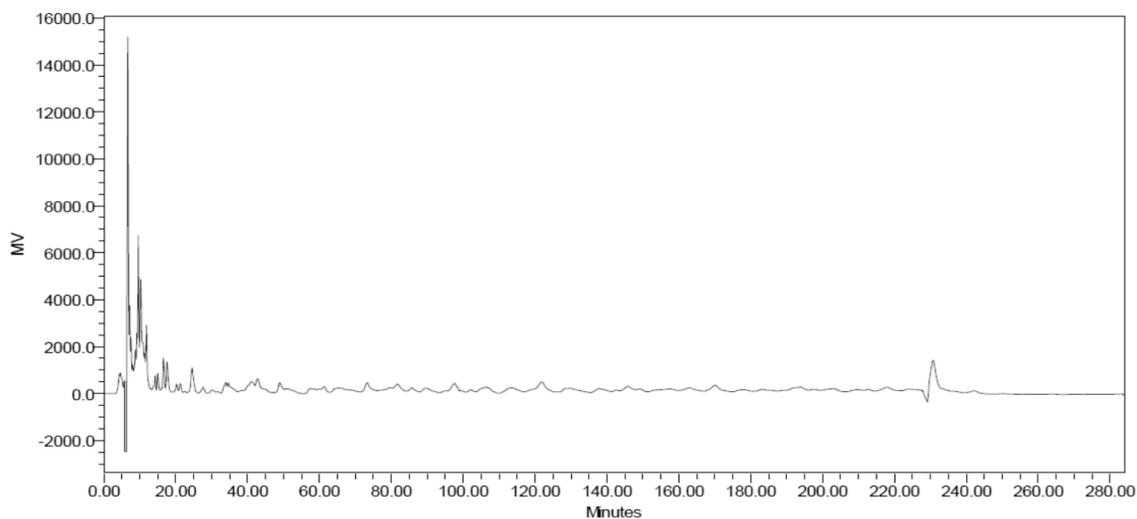


Figura 23 Cromatograma analítico lw 30.5.

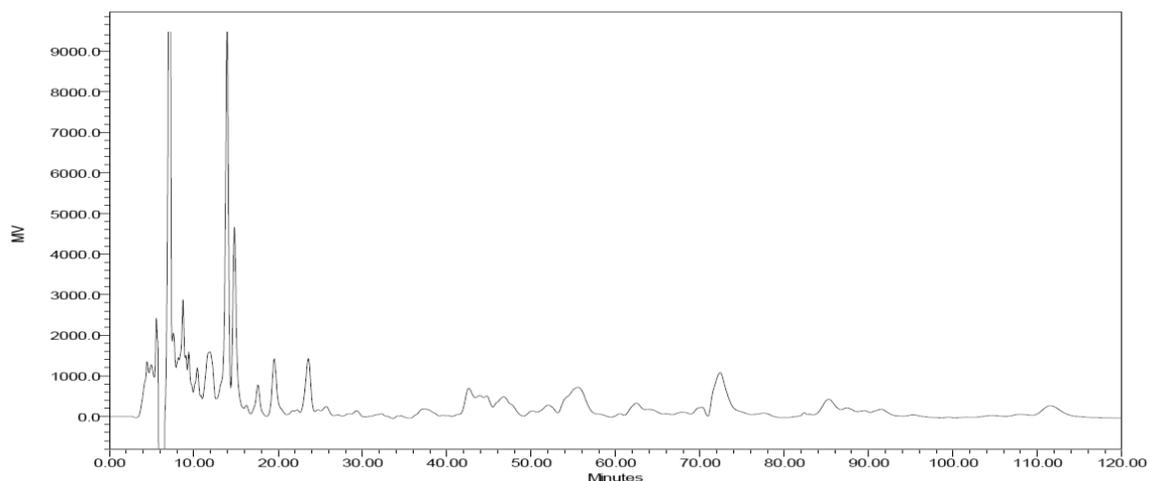


Figura 24. Cromatograma analítico Iw 30.10.

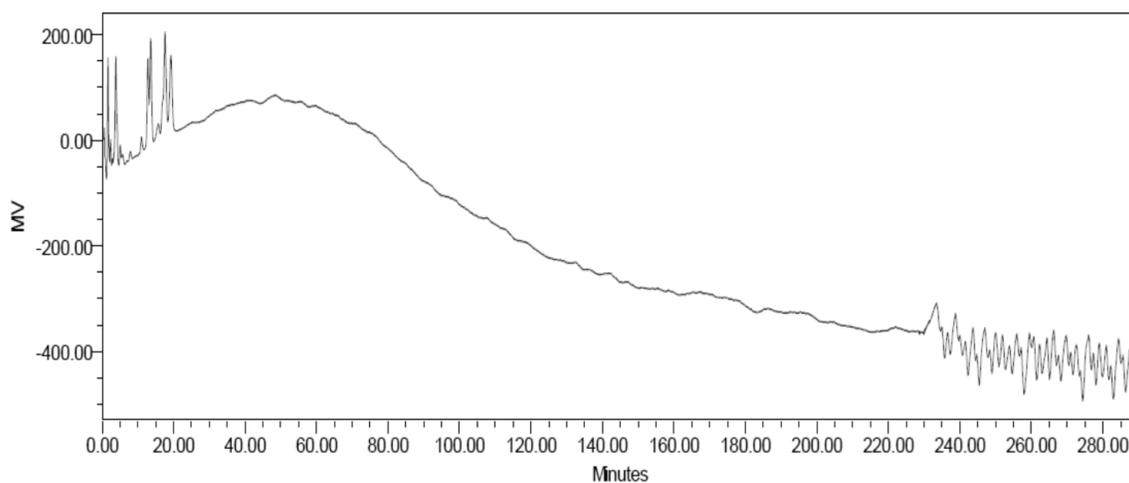


Figura 25. Cromatograma analítico Iw30.15 ACN-MeOH 1:1.

### 5.6.3 Fracción Iw 30 peracetilada.

#### 5.6.3.1 Esquema de cortes.

Se inició de nueva cuenta con varias condiciones de separación, probando distintas combinaciones de metanol y acetonitrilo; sin embargo, con ninguna se obtuvo un incremento en la resolución, por lo que se optó con seguir trabajando la fracción bajo condiciones simples de fase móvil, es decir, MeOH 100%. El cromatograma obtenido para la fracción Iw 30 después de someterse al proceso de peracetilado es el siguiente:

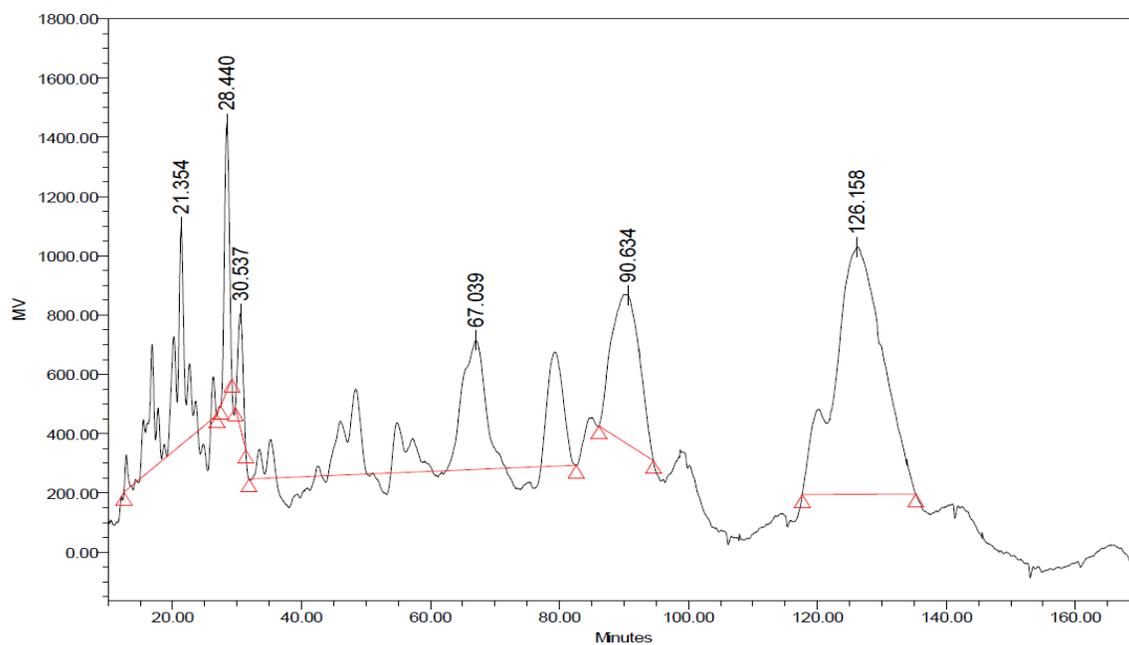


Figura 26. Esquema de cortes fracción lw 30 acetilada en MeOH.

Del cual, por forma y tiempo de retención, se eligieron los picos nombrados como lw 30 ac 1.2 con un  $t_R$  de 24.8 minutos, así como el pico nombrado como lw 30 ac 1.3 de un  $t_R$  de 30.53 minutos.

### 5.6.3.2 Purificación de los componentes mayoritarios de la fracción lw30 peracetilada.

El componente lw 30 ac 1.2 se sometió a un proceso de reciclaje de muestra y corte de núcleo, donde se llevaron a cabo 12 ciclos (**Figura 27**) para su purificación obteniéndose 15 mg de compuesto puro; el componente lw 30 ac 1.3 (**Figura 28**) también se sometió a 12 ciclos de reciclado y de éste se obtuvieron 11 mg de compuesto puro.

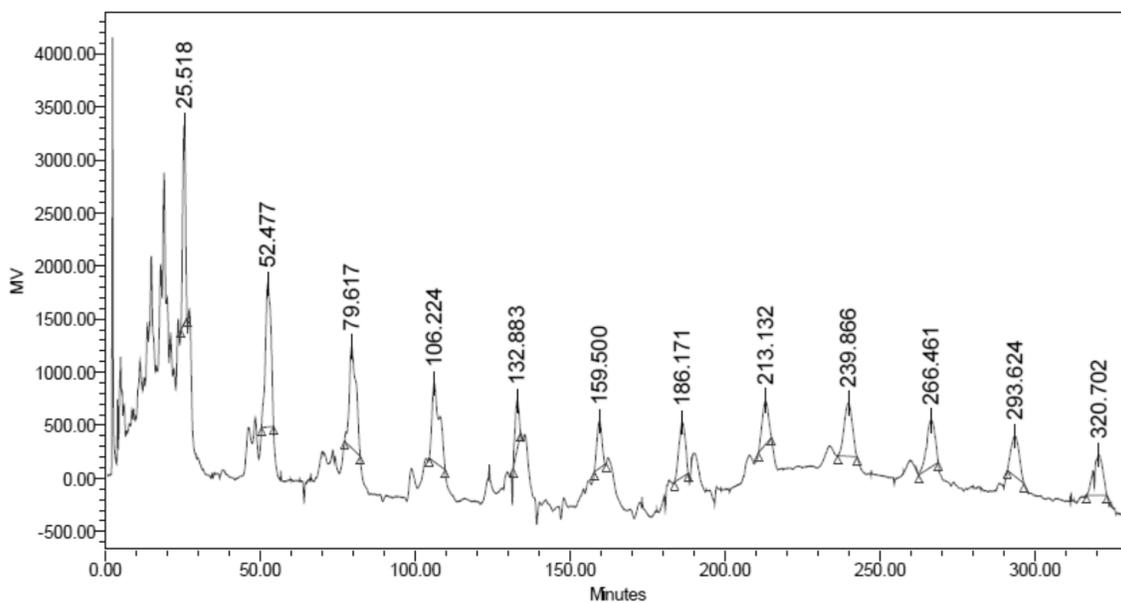


Figura 27. Purificación del componente lw 30 ac 1.2.

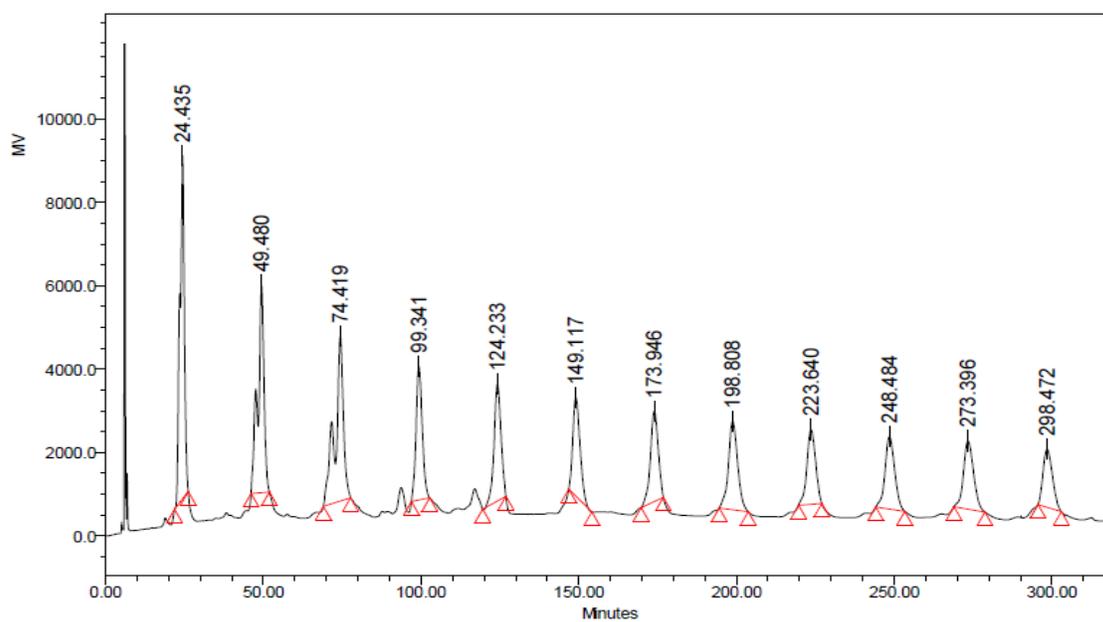


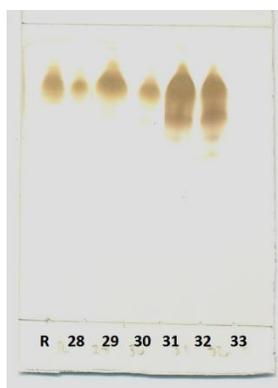
Figura 28. Purificación componente lw 30 ac 1.3.

## 6. Resultados y Discusión

### 6.1 Métodos cromatográficos.

La cromatografía en columna abierta, aunque sirvió inicialmente para una separación y limpieza preliminar en el presente trabajo, no representa el mejor método de separación para las resinas glicosídicas, debido a la similitud estructural entre los diferentes isómeros que componen las complejas fracciones que se analizaron en el presente trabajo (lw28-31)(3); es por eso que se optó por aplicar la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) como medio para conseguir una adecuada separación y purificación y, posteriormente, mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas, como son la RMN de carbono-13 y protón, así como espectrometría de masas en sus formas de ionización suave, como FAB-MS, ES-MS o MALDI, en sus modos tanto positivo como negativo, para su empleo en la elucidación estructural.

La cromatografía en capa fina es una útil herramienta en el seguimiento del proceso de purificación de resinas glicosídicas. Su empleo permite visualizar de manera preliminar y práctica la presencia de resinas en las fracciones que se estudian en un momento dado así como también, permite la visualización de posibles interferentes al analizar la forma de la mancha, la presencia de estelas, o la aparición misma de manchas con r.f. distinto; en el presente trabajo, se utilizó éste tipo de cromatografía para la elección de las subfracciones de trabajo que se ensayarían en el cromatógrafo de líquidos (**Figura 29**).



**Figura 29** Placa cromatográfica donde se ilustran las fracciones que contienen resinas glicosídicas.

Podemos observar a partir de la forma de las manchas así como de la cantidad de ellas en cada carril, que existe una diferencia en la complejidad de las fracciones, hecho que orienta a la elección de las fracciones 29 y 30 como fracciones de trabajo, dada la cantidad presente de compuesto, ilustrado por el tamaño de

la mancha, y la presencia de interferentes, ilustrada por la pequeña estela que existe en la parte superior de las manchas.

Las mejores condiciones, a nivel preparativo en el cromatógrafo de líquidos, quedan ilustradas en la **figuras 16 y 22**, donde se hace manifiesta la naturaleza aún compleja de las fracciones trabajadas, queda en estas figuras, plenamente justificado el uso del cromatógrafo de líquidos de alta resolución, ya que aún con su poder de separación, se logran observar picos encimados, y con formas no gaussianas, así como la aparición de ellos en tiempos de retención inconvenientes; contratiempo que queda parcialmente resuelto con el uso de las técnicas de rasurado de pico y corte de núcleo; en varias áreas de productos naturales, el empleo de dichas técnicas ha facilitado el aislamiento y purificación de más y más compuestos, ayudando con esto a conocer un poco más el universo de compuestos existente.

## 6.2 Intrapilosina VII

De las fracciones designadas como lw28-31, que obtuvieron durante la separación preliminar por columna abierta, se eligió con base en su rendimiento y complejidad, las fracciones 29 y 30; de la fracción lw29, se lograron aislar los componentes lw29.1.4 conocido como intrapilosina VII y el compuesto nombrado como lw29.1.2. La intrapilosina VII y el compuesto lw29.1.2 poseen un tiempo de retención parecido, aunque lo suficientemente distinto como para lograr su resolución mediante cromatografía de líquidos.

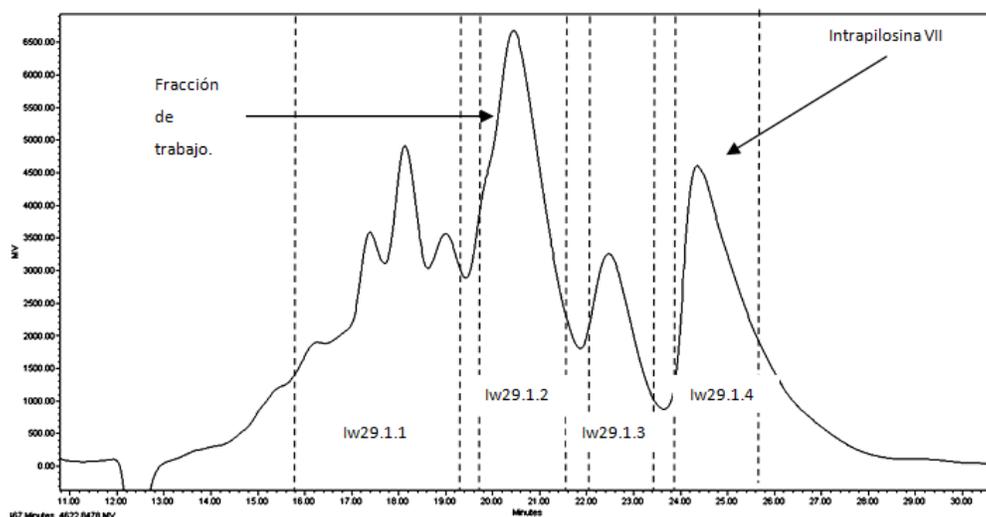


Figura 30. Esquema de separación fracción lw29.1.

La técnica de rasurado de pico y corte de núcleo proporciona una herramienta útil en la purificación de constituyentes problemáticos, ya que al girar la válvula de reciclaje y someter a la muestra a varios ciclos dentro de la columna, se gana un gran número de platos teóricos, lo que se traduce en un mayor poder de separación.

La purificación de este compuesto resultó complicada, ya que como se ilustra en la **figura 30**, la fracción de trabajo (Iw29.1) era de naturaleza compleja, debido a la baja resolución que sus componentes presentaron, además de la existencia de procesos de transesterificación del grupo cinamoilo (**15**), a causa del disolvente utilizado, en este caso metanol, que convertían a la purificación de estas muestras, mediante su reciclaje, en un proceso difícil de realizar al observar la aparición de picos inesperados en el momento de reinyectar los fraccionamientos preliminares; sin embargo, a pesar de esta dificultad, fue posible purificar 11 mg del compuesto Iw29.1.4.

### 6.2.1 Identificación de fragmentos y residuos acilantes por espectroscopia de masas.

Dado que las resinas glicosídicas no son compuestos volátiles, se optó por utilizar una técnica de ionización suave, como lo es la de bombardeo rápido de átomos o en inglés, fast atom bombardment (FAB), y se sabe también que la modalidad negativa de esta técnica proporciona resultados adecuados, al permitir la precisa identificación de los iones fragmentos que surgen mediante las rupturas de los enlaces glicosídicos que componen al núcleo oligosacárido; en este caso, se determinó que el ion molecular corresponde a un valor  $m/z$  de 1437  $[M - H]^-$  además, se encontró el fragmento con  $m/z$  de 1307, mismo que corresponde a la pérdida de un residuo trans-cinamoilo ( $C_9H_6O$ ) con una diferencia de 130 unidades de masa a partir del peso del ion de  $m/z$  1437; el fragmento con  $m/z$  1181 pertenece a la pérdida de un residuo octanoilo ( $C_8H_{14}O$ ) al observar la diferencia de 126 unidades de masa en comparación al peso del ion de  $m/z$  1307; el fragmento de  $m/z$  1035 corresponde a la pérdida de una unidad de metilpentosa ( $C_6H_{10}O_4$ ) con una diferencia de 146 unidades de masa comparando con el peso del ion  $m/z$  1181; el fragmento de  $m/z$  999 se relaciona a la pérdida un residuo dodecanoilo ( $C_{12}H_{22}O$ ) con una variación de 182 unidades en comparación al peso del ion de  $m/z$  1181; el fragmento con  $m/z$  853 corresponde a la pérdida de otra unidad de metilpentosa ( $C_6H_{10}O_4$ ) con una diferencia de 146 unidades de masa con respecto al peso del ion con peso de  $m/z$  999; el segmento de  $m/z$  545 corresponde a las pérdidas consecutivas de una unidad de metilpentosa ( $C_6H_{10}O_4$ ) y una unidad de hexosa ( $C_6H_{12}O_6$ ) con una diferencia de 308 unidades en relación al peso del ion de  $m/z$  853; el fragmento de  $m/z$  417 corresponde a la pérdida de una unidad de metilpentosa ( $C_6H_{10}O_4 + H_2O$ ) con una diferencia de 128

unidades de masa con respecto al peso del ion de  $m/z$  545, por último, el fragmento correspondiente a una  $m/z$  271 pertenece a la pérdida de una unidad de metilpentosa ( $C_6H_{10}O_4$ ) debido a la diferencia encontrada de 146 unidades de masa con en relación al peso del ion de  $m/z$  417 **figura 31** ilustra este patrón de fragmentación.

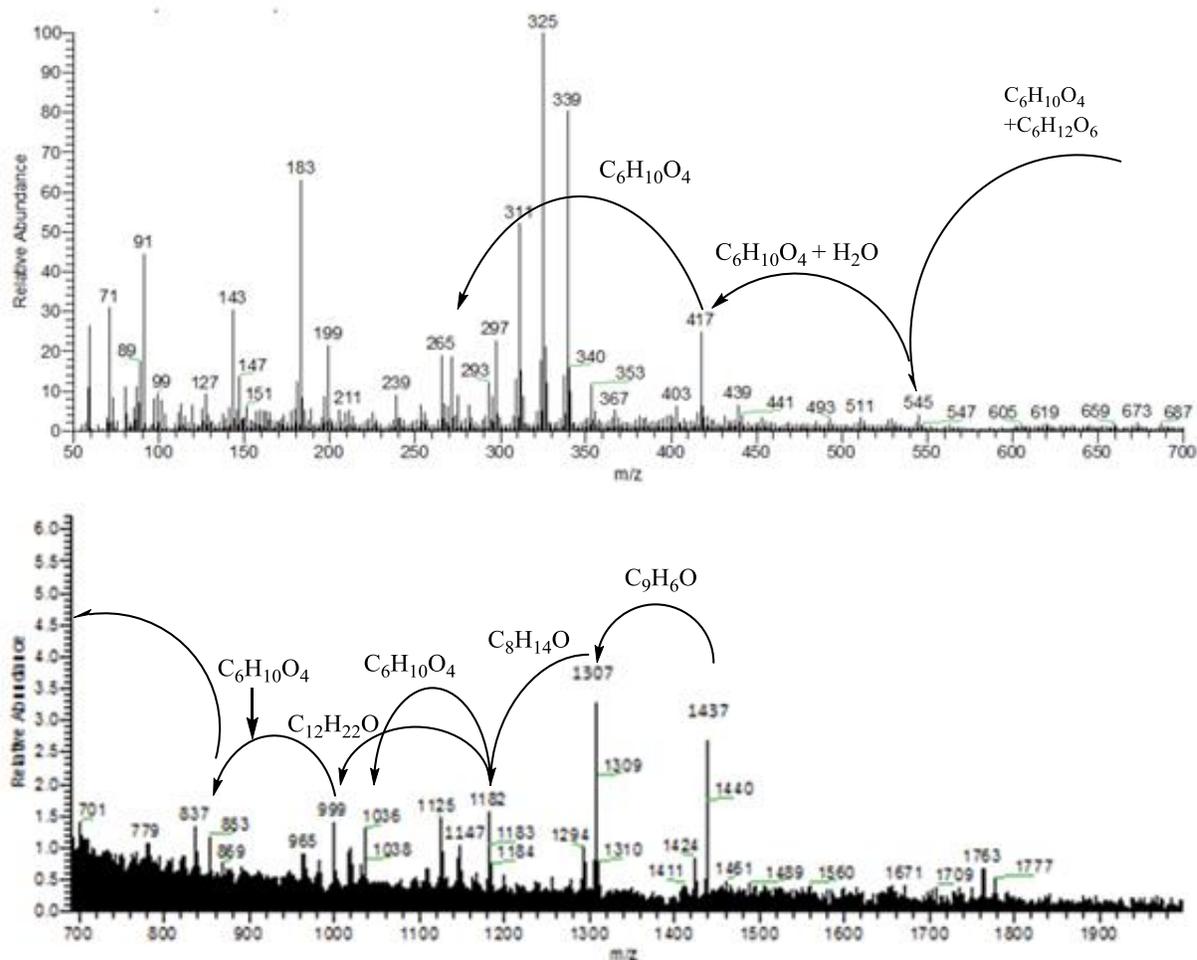


Figura 31. Espectros de masas, componente lw29.1.4 (Intrapilosina VII).

## 6.2.2 Empleo de RMN de $^{13}C$ y $^1H$ en la elucidación estructural de la Intrapilosina VII.

### 6.2.2.1 Asignación de señales correspondientes al esqueleto oligosacárido.

En primer lugar, se verificó que se trataba de un núcleo pentasacárido debido a que se encontraron cinco señales anoméricas, que se encuentran en un desplazamiento químico característico en el

espectro de  $^{13}\text{C}$ , en la zona de 95 a 105 ppm. (3). Posteriormente, mediante el uso de la técnica espectroscópica heteronuclear HSQC (Figura 32), se asociaron las señales anoméricas de carbono con las respectivas señales en el espectro de hidrógeno, que también se localizan en una región característica comprendida entre 4.5 y 6.5 ppm. (3).

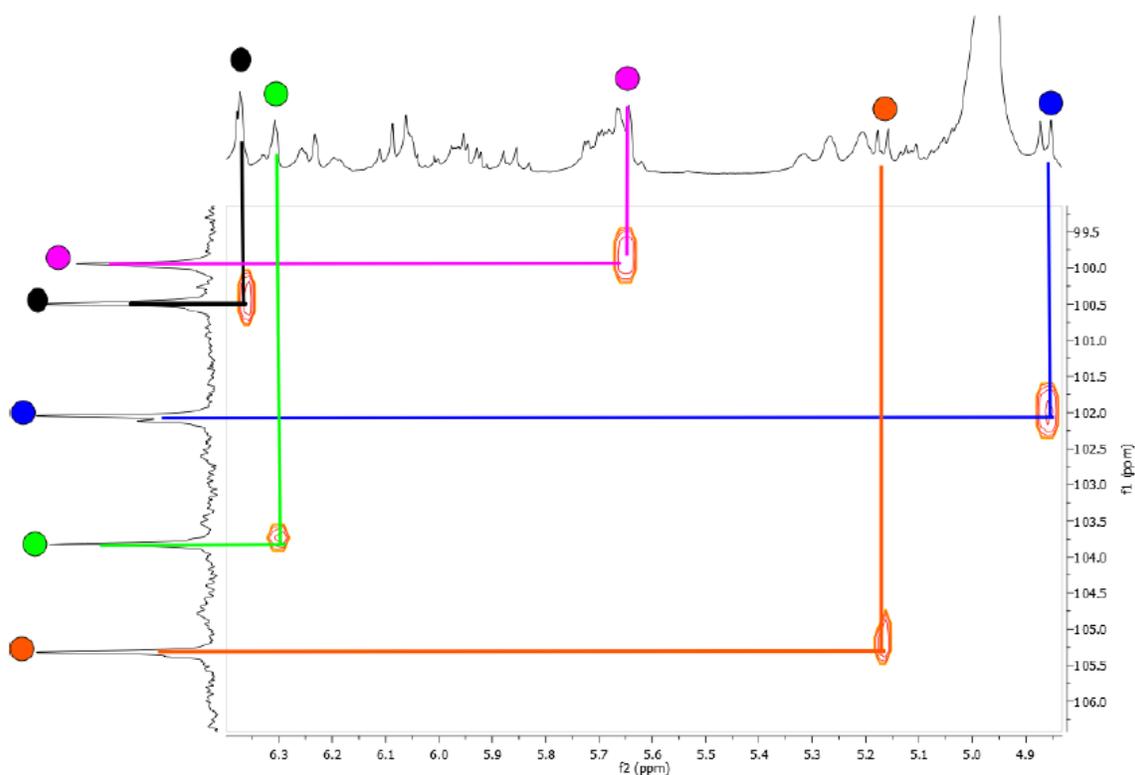


Figura 32. Espectro HSQC, con ampliación en zona anomérica.

Después de la asignación de los protones anoméricos, se continuó con la asignación de los protones vecinales de cada unidad sacárida, mediante el empleo de las técnicas RMN bidimensionales homonucleares COSY y TOCSY; con el espectro COSY (Figura 33), mediante el uso de cuadros de conectividad, es posible ir asociando uno a uno los protones vecinales de las unidades sacáridos.

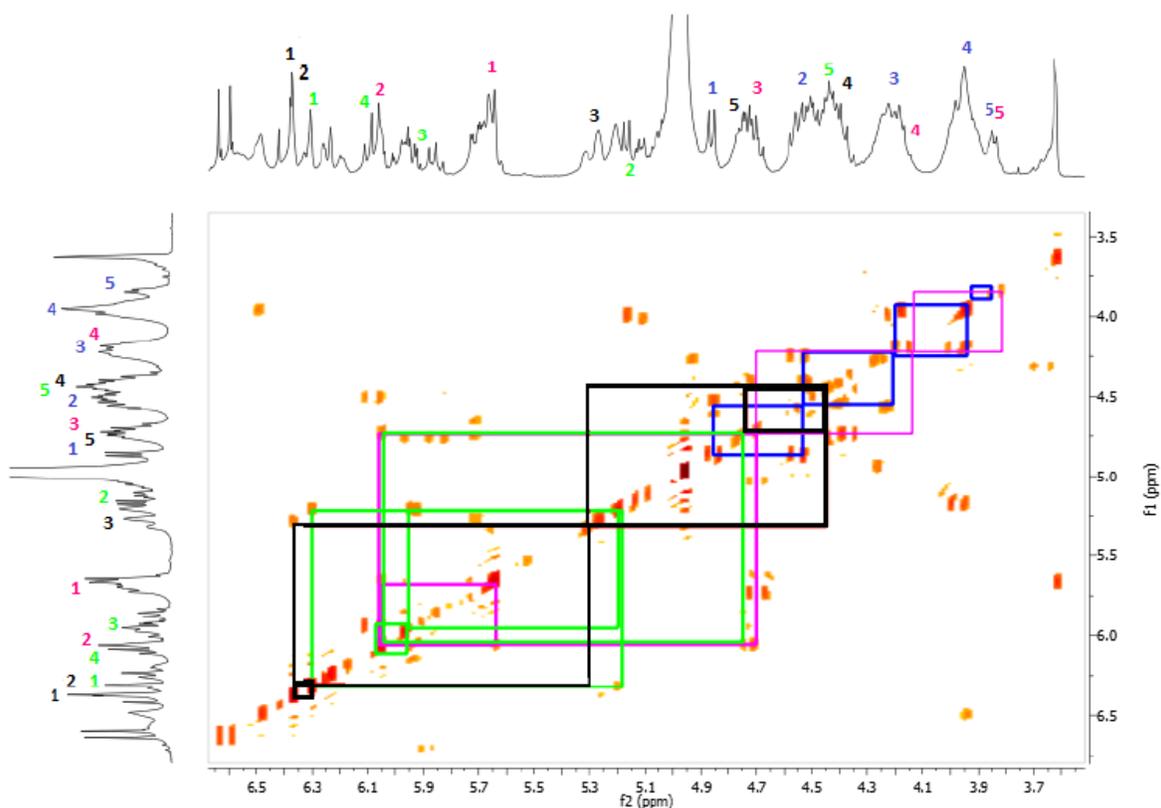


Figura 33. Espectro COSY, ilustrando el uso de cuadros de conectividad. (Claves coloridas: azul=fucosa; fucsia=ram; negro=ram'; verde=ram''; anaranjado=glucosa).

Paralelamente a la asignación anterior, con cada protón asignado, se utilizó de nueva cuenta el espectro bidimensional HSQC, para asociar también, cada uno de los protones encontrados, con su respectivo carbono, dichas asignaciones se encuentran enlistadas en el **cuadro 6**.

Cuadro 6 Datos espectroscópicos para RMN1H y 13C para el componente lw29.1.4.

Posición <sup>2</sup>	$\delta_c$	$\delta_H$	HMBC	Posición <sup>2</sup>	$\delta_c$	$\delta_H$	HMBC
<b>Fuc-1</b>	4.86 d (7.6)	101.9	C-11 Jal (173.5)	Ram <sup>1</sup> -1	6.30 sa	103.7	C-4 Ram <sup>1</sup> (79.4)
<b>2</b>	4.54 d (9.6-7.6)	77.4		2	5.19 m*	70.3	
<b>3</b>	4.24 dd (10-3.6)	71.2		3	5.94 dd (10,3.0)	73.4	C-1 Cna (166.5)
<b>4</b>	3.96 d (3.6)	74.1		4	6.09 t (9.6)	72.7	C-1 Octa (174.9)
<b>5</b>	3.84 q (6.6)	71.6		5	4.44 dq (8.0, 6.0)	68.4	
<b>6</b>	1.54 d (6.4)	17.6		6	1.57 d (6.0)	18.3	
<b>Gluc-1</b>	5.17 d (7.6)	105.2	C-3 Ram <sup>1</sup> (5.11)	Jal-1		173.5	
<b>2</b>	3.96 t (8.8)	75.6		2a	2.5 m*	34.9	
<b>3</b>	4.03 t (9.2)	78.2		2b	2.78 m*	34.9	
<b>4</b>	3.93 t (9.6)	71.6		11	3.85 m	80.4	
<b>5</b>	3.84 ddd (10,6.4,3.6)	80.0		16	0.81 t (6.8)	84.9	
<b>6a</b>	4.39 m* (62.9)	62.9		Dodeca-1		173.8	
<b>6b</b>	4.49 m*	62.9		2	2.45 t (6.8)	35.0	
<b>Ram-1</b>	5.64 (sa)	99.9	C-2 Fuc (77.4)	12	12 0.88 t (6.4)	14.6	
<b>2</b>	6.06 dd (4.0,2.4)	72.4	C-1 Jal (173.5)	Octa-1		174.9	
<b>3</b>	4.71 dd (9.6,3.2)	70.3		2	2 2.75 m*	34.6	
<b>4</b>	4.17 t (9.2)	78.6	C-1 Ram <sup>1</sup> (100.5)	8	8 0.75 (6.8)	14.5	
<b>5</b>	4.0 m*	68.0		Cna		166.5	
<b>6</b>	1.65 d (6.4)	19.2		2	6.61 d (16)	119.6	
<b>Ram<sup>1</sup>-1</b>	6.37 sa	100.5	H-4 Ram <sup>1</sup> (4.17)	3	7.89 d (16)	145.6	
<b>2</b>	6.37 sa	74.0	C-1 Dodeca (173.8)				
<b>3</b>	5.11 m*	78.1					
<b>4</b>	4.47 m*	79.2					
<b>5</b>	4.74 dq (9.2,5.6)	68.0					
<b>6</b>	1.65 d (6.0)	19.5					

<sup>1</sup>Datos registrados a 400MHz y 100 MHz en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran entre paréntesis y se reportan en Hz. Los desplazamientos químicos señalados con asterisco (\*) indican señales sobrepuestas. Los patrones de acoplamiento están indicados como: s= singulete, sa=señal ancha, d=señal doble, t=señal triple, m=señal múltiple. Todas las asignaciones se hicieron por medio de experimentos de correlación homonuclear <sup>1</sup>H-<sup>1</sup>H (COSY, TOCSY) y heteronuclear (HMBC, HSQC).

<sup>2</sup> Abreviaturas: fuc=fucosa, ram=ramnosa, glu=glucosa, jal=11-hidroxihexadecanoilo, octa=n-octadecanoilo, dodeca=n-dodecanoilo.

Debido a que existe superposición de señales, el espectro TOCSY es de gran ayuda, ya con él, es posible conectar señales a tres, cuatro y dependiendo de la rigidez de la molécula, hasta cinco enlaces de distancia, lo que proporciona una herramienta sumamente útil contra el problema de la sobreposición de señales (**Figura 34**).

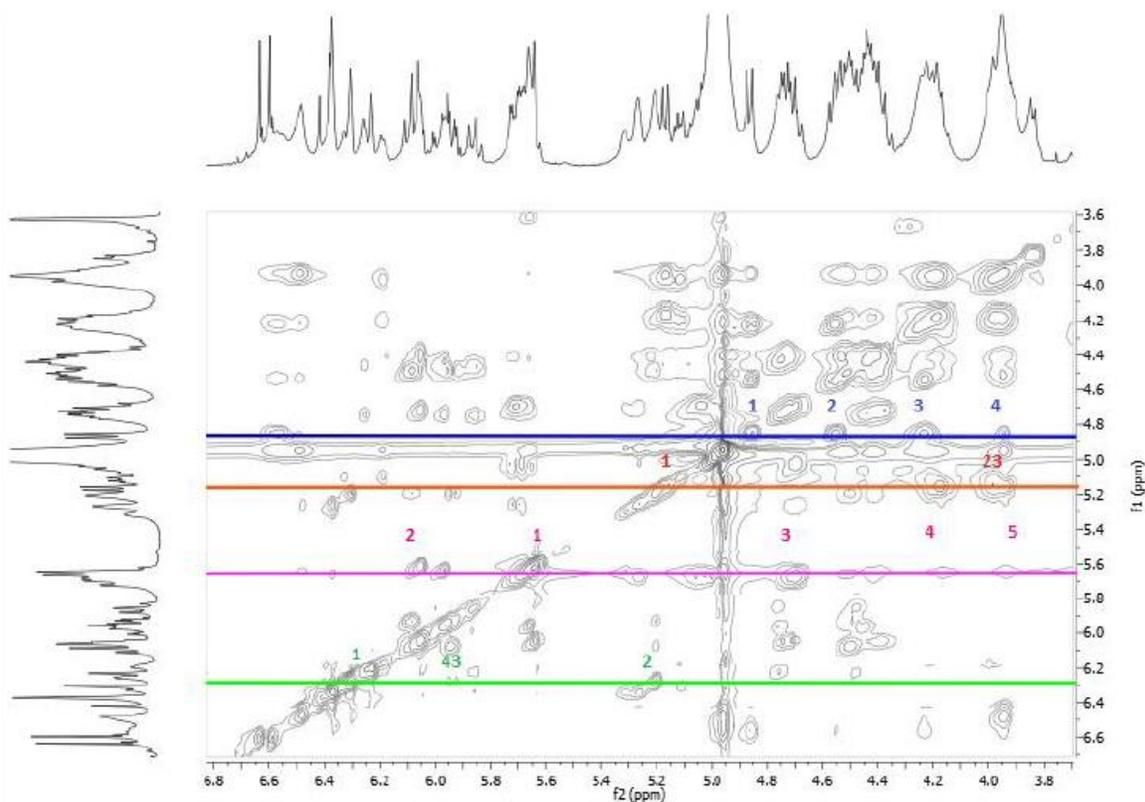


Figura 34. Espectro TOCSY. Protones a varios enlaces de distancia.

### 6.2.2.2 Secuencia de glicosilación y posiciones de esterificación.

Terminada completamente las asignaciones de protón y carbono de los azúcares, se encuentra que no existe aún ninguna estructura consolidada; es por esto que la técnica bidimensional heteronuclear HMBC es de suma utilidad, ya que nos proporciona los acoplamientos  $^{13}\text{C}-^1\text{H}$  a tres enlaces de distancia ( $^3J_{\text{CH}}$ ), entre ambos átomos. Esta interacción nos brinda una valiosa información acerca de cómo cada una de las unidades estructurales están integradas para constituir la molécula en estudio; en este caso, se buscan las interacciones entre átomos pertenecientes a las unidades sacáridas diferentes, de esta manera, y considerando que las uniones glicosídicas entre las unidades monoméricas son altamente conservadas (**3**), se encontraron uniones L-Rha-(1→2)-D-Fuc, L-Rha-(1→4)-L-Rha así como la unión entre gluc-1 y Ram-3; las posiciones de esterificación se localizaron debido a que existe un carbono perteneciente a un grupo carbonilo de un residuo acilante que provoca un efecto de desprotección de los protones en donde se realiza la sustitución en el núcleo sacárido. Esta desprotección suele desplazar dichos protones a posiciones a campo bajo características que oscilan entre los 6.5 y 5.6 ppm. También fue posible observar la posición de

lactonización (C-11 del jalapinolato, en  $\delta=80.4$  ppm) situada en el carbono anomérico de la unidad de fucosa (H-1 de la fucosa  $\delta=4.86$  ppm).

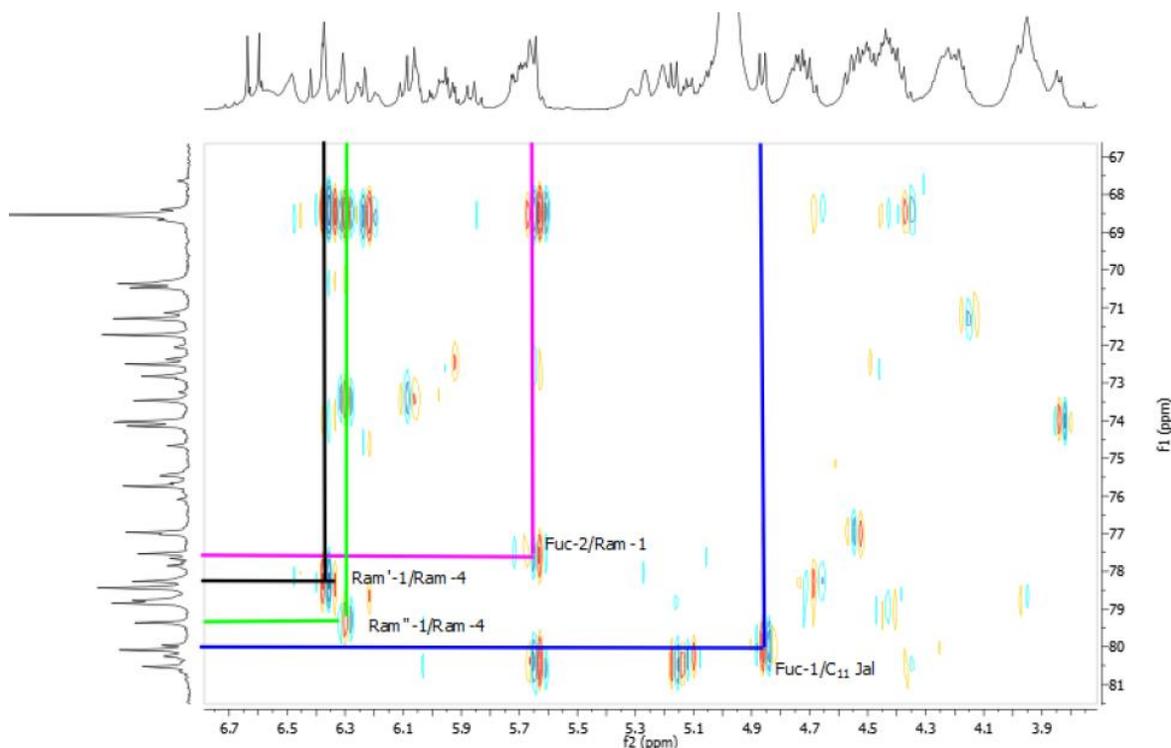


Figura 35. Espectro HMBC. Secuencia de glicosidación.

Las posiciones de esterificación se verificaron mediante el análisis de los desplazamientos químicos de protón (**cuadro 6**), así como con los acoplamientos con los respectivos carbonilos de cada uno de los sustituyentes, es decir, las posiciones ram-2 ( $\delta=6.06$  dd  $J=4.0, 2.4$ ), ram'-2 ( $\delta=6.37$  sa), ram''-3 ( $\delta=5.94$  dd  $J=10,3.0$ ) y ram''-4 ( $\delta=6.09$  t  $J=9.6$ ). De esta forma, la aglicona de la macrolactona (es decir, el ácido jalapínico) esterifica la posición C-2 de la ramnosa interna superior (ram) dada la correlación observada entre el primer carbono del jalapinolato (C-1 Jal,  $\delta=173.5$  ppm) y el segundo protón de la ramnosa interna superior (H-2 Ram,  $\delta=6.06$  ppm). El sustituyente dodecanoilo (Dodeca) se localizó en la posición C-2 de la tercera unidad monosacárida (ram') ya que se observó una correlación entre su grupo carbonilo ( $\delta=173.8$  ppm) y el segundo protón de la segunda unidad de ramnosa (H-2 Ram,  $\delta=6.37$  ppm); el grupo cinamoilo (Cna) se situó en la tercera posición (C-3) de la ramnosa terminal (ram'') por la correlación existente entre su grupo carbonilo ( $\delta=166.5$  ppm) y el tercer protón de la ramnosa terminal (H-3 Ram'',  $\delta=5.94$  ppm). El sustituyente octanoilo se localizó

en la cuarta posición (C-4) de la ramnosa terminal (ram'') ya que existe una correlación entre su grupo carbonilo ( $\delta=174.9$  ppm) y el protón cuatro (H-4) de la ramnosa terminal ( $\delta=6.09$  ppm). Con todo lo antes señalado, se construyó la estructura indicada en la **figura 36** misma que coincide con la del ácido operculínico A como el núcleo glicosídico pentasacárido, al poseer una unidad de fucosa (azul), como azúcar inicial, seguido de 3 unidades de ramnosa (fucsia, negro y verde, respectivamente) y unida a la segunda unidad sacárida, una unidad de glucosa (anaranjado); y los residuos acilantes que se encuentran esterificando el núcleo son el dodecanoilo, el octanoilo y el grupo trans-cinamoilo. (3) Este análisis permitió identificar al constituyente lw 29.1.4 como la Intrapilosina VII, previamente aislada a partir de las flores de *Ipomoea intrapilosa* (16).

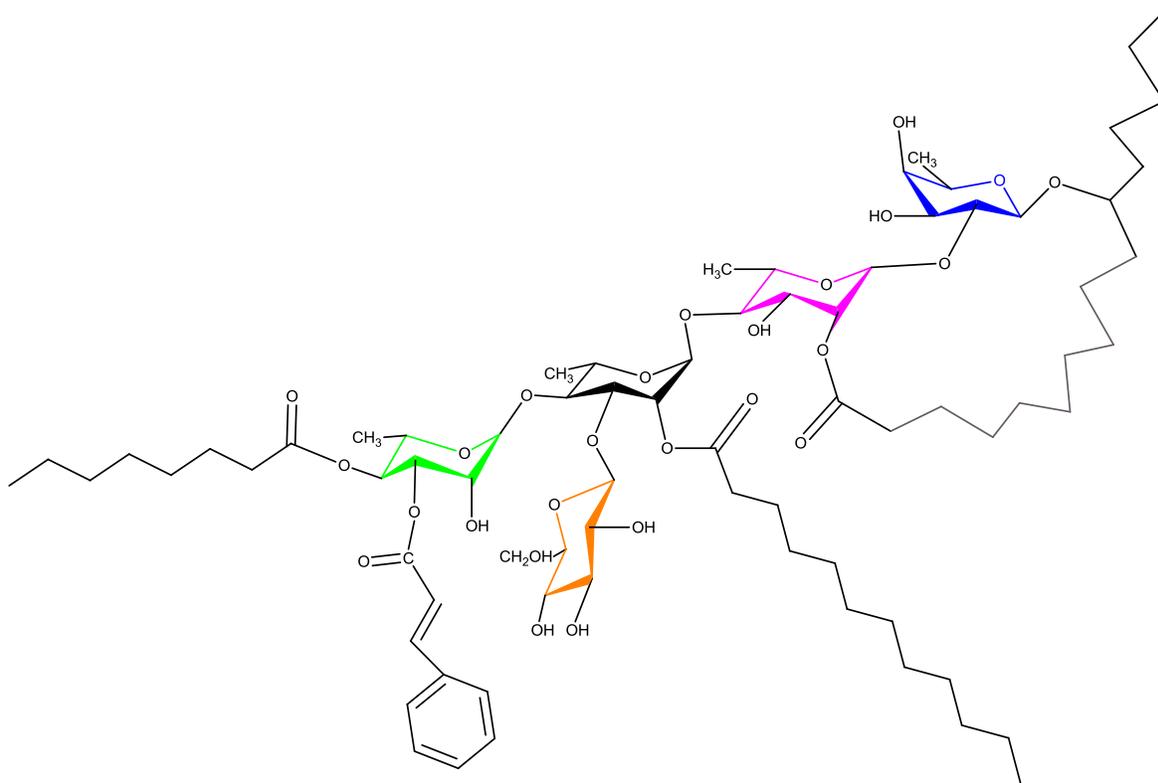


Figura 36. Intrapilosina VII.

### 6.3 Componente lw29.1.2

A pesar de los esfuerzos por simplificar la mezcla compleja de oligosacáridos, queda demostrado que la columna abierta no es un método adecuado para su aislamiento y purificación cuando se trata de resinas glicosídicas ya que por su similitud estructural, que en muchos casos es sólo de isomería posicional, sus tiempos de retención son muy similares y se sobrepone siendo inseparables; solamente una técnica como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) ofrece los medios necesarios para una separación de mezclas complejas de glicoconjugados como las resinas glicosídicas (3).

Al ensayar las condiciones analíticas de separación, se debe escoger una mezcla de disolventes adecuada, con objeto que los tiempos de retención ( $t_R$ ), sean los óptimos, de manera que se pueda obtener una separación ideal; sin embargo, debido a las características de solubilidad y reactividad de los componentes lw 29.1.2 e intrapilosina VII (lw29.1.4), fue muy difícil la estandarización de las condiciones instrumentales a nivel analítico; debido a que por la baja solubilidad de estos compuestos, es imposible utilizar agua como único disolvente, y su uso queda delegado sólo a ser un auxiliar en las mezclas ensayadas, y nunca en proporciones más allá del 10%, ya que ocurre la indeseable precipitación de las resinas. En el caso del acetonitrilo, un disolvente polar aprótico, las resinas en estudio fueron solubles; sin embargo, cuando se usó como única fase móvil, fue imposible visualizar los componentes inyectados debido a la selectividad misma del disolvente que hizo que los componentes se retuvieran en demasía, ocasionando los coleos característicos de la sobrerretención; así, los tiempos de análisis aumentaron considerablemente, lo que obligó a replantear el empleo del acetonitrilo como la fase móvil y seguir en la búsqueda de un disolvente más adecuado.

Para las resinas provenientes de las subfracciones estudiadas (lw29.1, lw29 ac, lw30, e lw30ac), el empleo del acetonitrilo como fase móvil, sólo se consideró como una parte minoritaria del sistema de elución en algunas mezclas ensayadas, procurando no superar el 20% de acetonitrilo y seleccionando al metanol como el constituyente restante de las mezclas de elución. El empleo del acetonitrilo como aditivo, podría considerarse si los tiempos de retención no aumentan demasiado en comparación con metanol.

Otro disolvente ensayado en fase reversa y, que de hecho, se utilizó en la búsqueda de las condiciones de purificación en este trabajo, fue el tetrahidrofurano (THF), que dado su alto poder

solubilizador, se esperaba disminuir los tiempos de retención para algunos componentes y, posteriormente, mediante las técnicas de rasurado de pico y corte de núcleo (**14**), habrían proporcionado unas condiciones óptimas. Sin embargo, esto no se cumplió, ya que para los componentes ensayados, el uso de este disolvente dio lugar en primera instancia a una disminución dramática del tiempo de retención (de 35 a 15 min, aproximadamente) y, posterior al giro de la válvula de reciclaje, parecía que los componentes se retuvieron progresivamente con mayor fuerza con cada reciclamiento, ocasionando un ensanchamiento considerable de la banda y la consecuente retención del analito en la columna, a pesar de que el THF sólo se utilizó en una ínfima proporción en todos los ensayos donde se vio involucrado; al final, el disolvente con el que se decidió trabajar fue el mismo con el que se había comenzado, es decir el metanol; ya que, aunque los tiempos de retención no fueron tan pequeños (por ejemplo, 20 min aproximadamente, para el componente lw29.1.2), los procesos posteriores de purificación pudieron llevarse a cabo con algunas complicaciones; por ejemplo, la existencia de procesos de transesterificación en moléculas donde existe un grupo cinamoilo (**17**) que llevó a purificaciones infructíferas, donde hubo pérdida de muestra y el rendimiento de esta fracción (lw29.1.2) fue realmente poco comparando los casi 3 kg de material vegetal con los que se comenzó todo este trabajo. Con el objetivo de contrarrestar este problema, se recurrió a someter a las resinas nativas a un proceso de peracetilación con anhídrido acético y piridina para inactivar la capacidad nucleofílica de los hidroxilos libres del núcleo oligosacárido mediante la formación de sus derivados peracetilados y, de esta forma, los residuos de cinamoilo propensos a cambiar de posición producto de una transesterificación intramolecular, mantuvieran sus posiciones originales de esterificación y, al mismo tiempo, se facilitó el proceso de separación de las resinas.

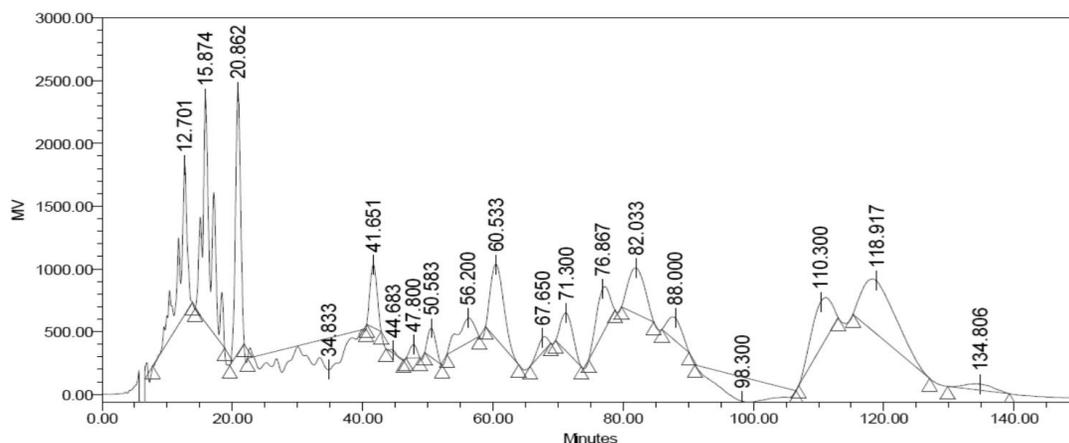


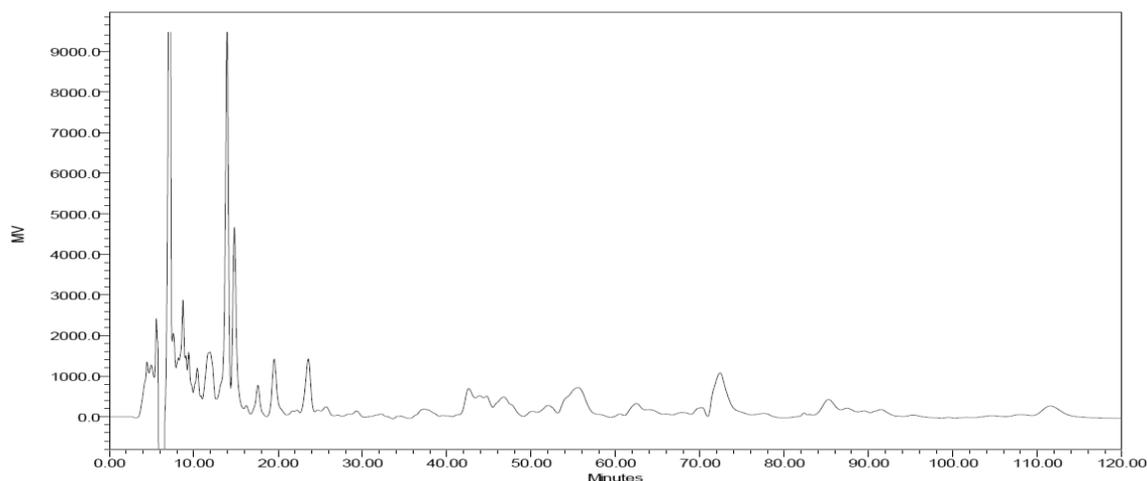
Figura 37 Esquema de separación fracción lw30

La **figura 37** muestra el cromatograma resultante de la inyección de la fracción lw 30, en el que es evidente la complejidad que posee; el proceso habitual de separación es dividir o "cortar" dicha fracción en partes más pequeñas, procurando tener en dichos cortes la menor cantidad de componentes posibles; en el caso de la fracción anterior, el esquema de corte se muestra en la siguiente tabla:

**Cuadro 7 . Esquema de cortes fracción lw30.**

Pico	t <sub>R</sub> (min)	Pico	t <sub>R</sub> (min)	Pico	t <sub>R</sub> (min)	Pico	t <sub>R</sub> (min)
lw 30.1	12.7	lw 30.11	67.6	lw 30.6	44.7	lw 30.17	98.3
lw 30.2	18.9	lw 30.12	71.3	lw 30.7	47.8	lw 30.18	110.3
lw 30.3	20.9	lw 30.14	73.9	lw 30.8	50.6	lw 30.19	118.9
lw 30.4	34.3	<b>lw 30.15</b>	<b>82</b>	lw 30.9	56.2	lw 30.20	134.8
<b>lw 30.5</b>	<b>41.7</b>	<b>lw 30.16</b>	<b>88</b>	lw 30.10	<b>60.5</b>		

Al reinyectar los picos nombrados como lw30.5 e lw30.10 se obtuvieron muchos otros picos inesperados; la **figura 38** es un ejemplo de esta situación, provocada por una transesterificación del residuo del cinamoilo, evento que no es descabellado y que fue descrito por Tao & Hao en 2008 (17).



**Figura 38. Inyección corte lw30.10.**

Con la peracetilación, se inactivó el carácter nucleofílico de los hidroxilos libres del esqueleto oligomérico, de forma que, es presumible que los residuos acilantes, quedaron estables en su posición original, aseveración que se comprueba en el proceso de reciclaje del pico acetilado lw30 ac 1.2, (**figura 39**), donde no hubo aparición de nuevos picos y cuya purificación fue exitosa.

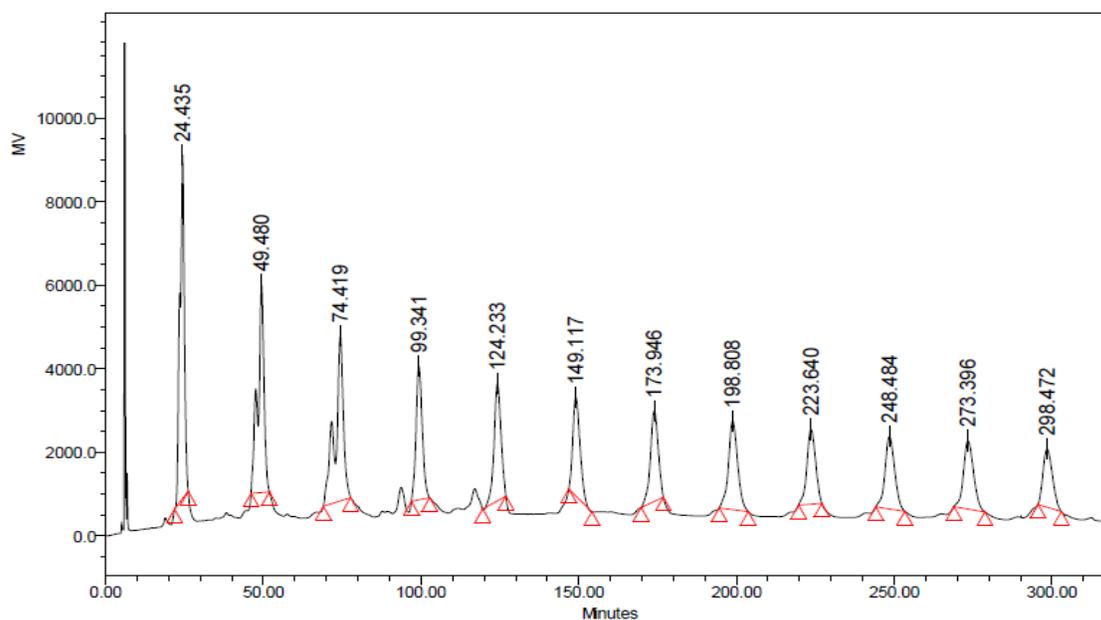


Figura 39. Reciclaje de corte acetilado. lw30ac1.2.

Las columnas Symmetry C18 proporcionan un método eficaz de separación, esto se debe, entre otros factores, al reducido tamaño de partícula (5  $\mu\text{m}$ ), su uniformidad en el empaquetamiento y en general la calidad que la compañía Waters® provee, a diferencia de los estudios realizados de separación sobre gel Sephadex, la columna en lecho abierto, intercambio iónico o filtración en gel (3).

El flujo del disolvente utilizado, después de algunas pruebas, fue el de 8.16 mL/min, ya que, aunque es sabido que el cambio de caudal no interfiere con la resolución que un par de compuestos dados puedan tener dentro de un mismo cromatograma, ciertamente ayudaba a que el tiempo de análisis fuera un poco más corto (18). Para las muestras peracetiladas que se obtuvieron, se volvieron a buscar las condiciones de separación a nivel analítico y para la mezcla acetonitrilo/metanol (1:4) se obtuvo una buena separación, a reserva de que los tiempos de análisis eran demasiado largos, por lo que se optó en utilizar de nueva cuenta al metanol, disolvente que disminuyó considerablemente el tiempo de análisis, aunque no se obtuvo la separación óptima de la mezcla, dificultad que fue resuelta mediante el incremento en los ciclos de reciclado del analito.

#### 6.4 Empleo de espectrometría de masas.

Para el núcleo del ácido operculínico A (19), el cual consta de tres unidades de ramnosa, una unidad de glucosa y como unidad inicial del esqueleto oligosacárido, una fucosa, las fragmentaciones

características son las siguientes: en primera instancia, aquellas que producen los aniones de una relación  $m/z$  de 545, 417 y 271, correspondientes en el primer caso a la pérdida de las dos unidades de metilpentosas externas (ramnosas), así como a la eliminación de la unidad de hexosa (glucosa); en segundo lugar, la pérdida de una unidad adicional de metilpentosa (ramnosa) genera el fragmento de  $m/z$  417; cuando la unidad de macrolactona se ionizó, esta presentó una relación de  $m/z$  271 como resultado de la eliminación de la última unidad de metilpentosa (fucosa).

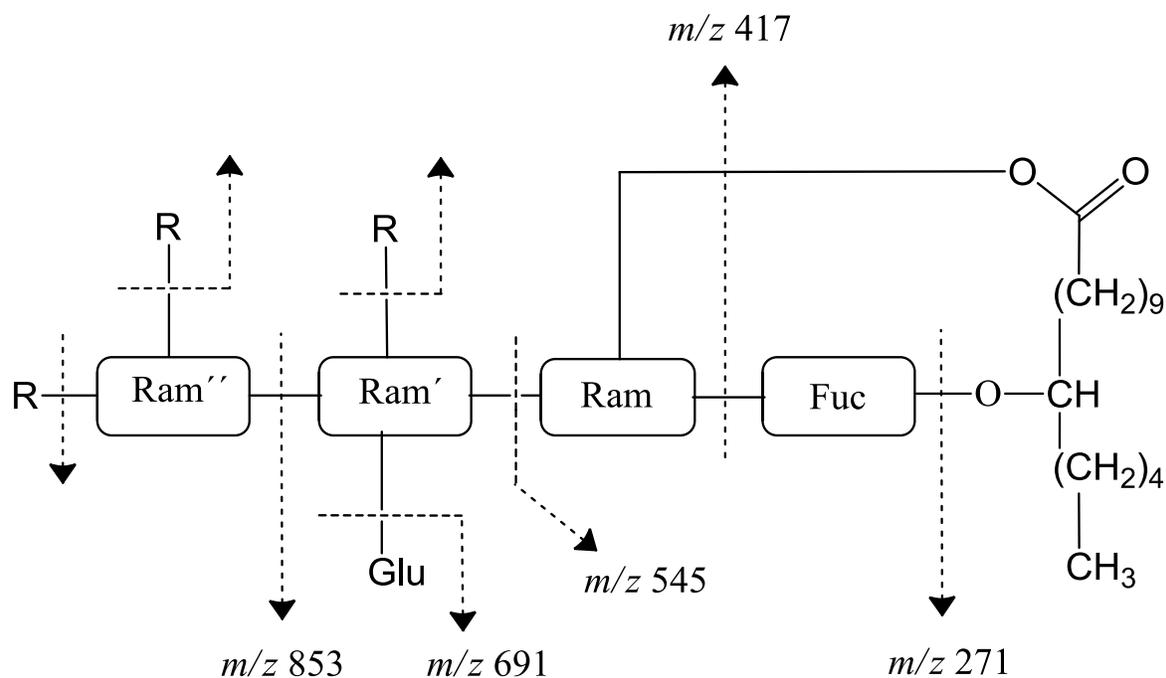


Figura 40. Fragmentación característica resina glicosídica.

El análisis de los espectros de masas generados por alguna técnica de ionización suave como FAB, MALDI y/o electrospray (en sus modalidades positiva y negativa) en etapas tempranas de la elucidación estructural de los constituyentes puros de las resinas glicosídicas es clave, ya que para los fragmentos antes mencionados tiene un carácter diagnóstico en la identificación del núcleo oligosacárido (14, 19).

#### 6.4.1 Identificación de fragmentos y residuos acilantes por espectrometría de masas.

A pesar de que la técnica EM-FAB en su modalidad negativa es la que proporciona los mejores resultados en cuanto a la observación de los patrones de fragmentación (**3**), se sabe que en algunos casos, la modalidad positiva de esta técnica también es de utilidad para la identificación del ion pseudomolecular (quasimoleculares) como fue el caso para el compuesto Iw 29.1.2 que presentó una  $m/z$  de 1411 para la molécula protonada  $[M+H]^+$ , además se observó la pérdida de un residuo *trans*-cinamoilo ( $C_9H_6O$ ), con una diferencia de 130 unidades de masa con respecto del fragmento anterior de 1411 unidades; el fragmento de  $m/z$  de 1257 corresponde a una pérdida de un residuo de decanoilo ( $C_{10}H_{18}O$ ) con una diferencia de 154 unidades con respecto del ion molecular  $m/z$  1411; también, se observa la pérdida de un fragmento octanoilo ( $C_8H_{14}O$ ), de  $m/z$  1000, con una diferencia de 127 unidades de masa con respecto del fragmento  $m/z$  1127  $[M- C_{10}H_{18}O-C_9H_5O]$ ; el fragmento de  $m/z$  con valor de 1000 proviene de la pérdida de los 3 residuos acilantes, generando al esqueleto oligosacárido; a partir de este punto, se producen las eliminaciones consecutivas de los residuos sacáridos mediante rupturas de enlace glicosídico como se ilustra en la **figura 40**.

#### 6.5 Resonancia Magnética Nuclear.

##### 6.5.1 Asignación de señales de RMN $^1H$ y $^{13}C$

La asignación de las señales tanto de  $^1H$  como  $^{13}C$  se llevó a cabo mediante el análisis de los espectros de RMN unidimensionales de  $^1H$  y de  $^{13}C$ , además del uso de los espectros bidimensionales homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HSQC y HMBC).

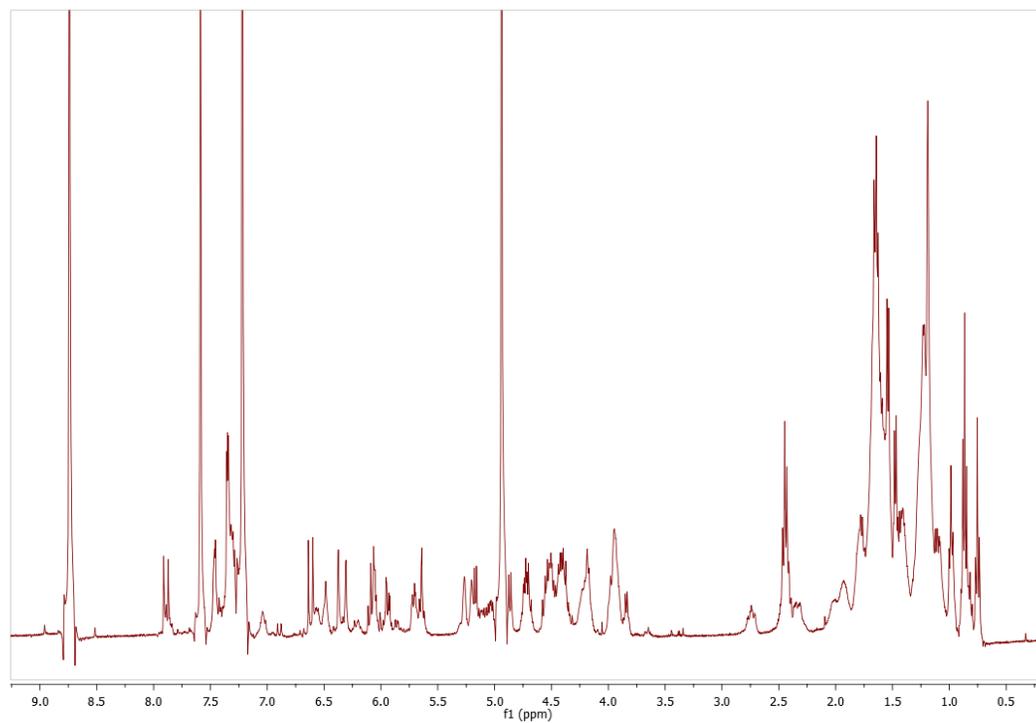


Figura 41. Espectro RMN de <sup>1</sup>H

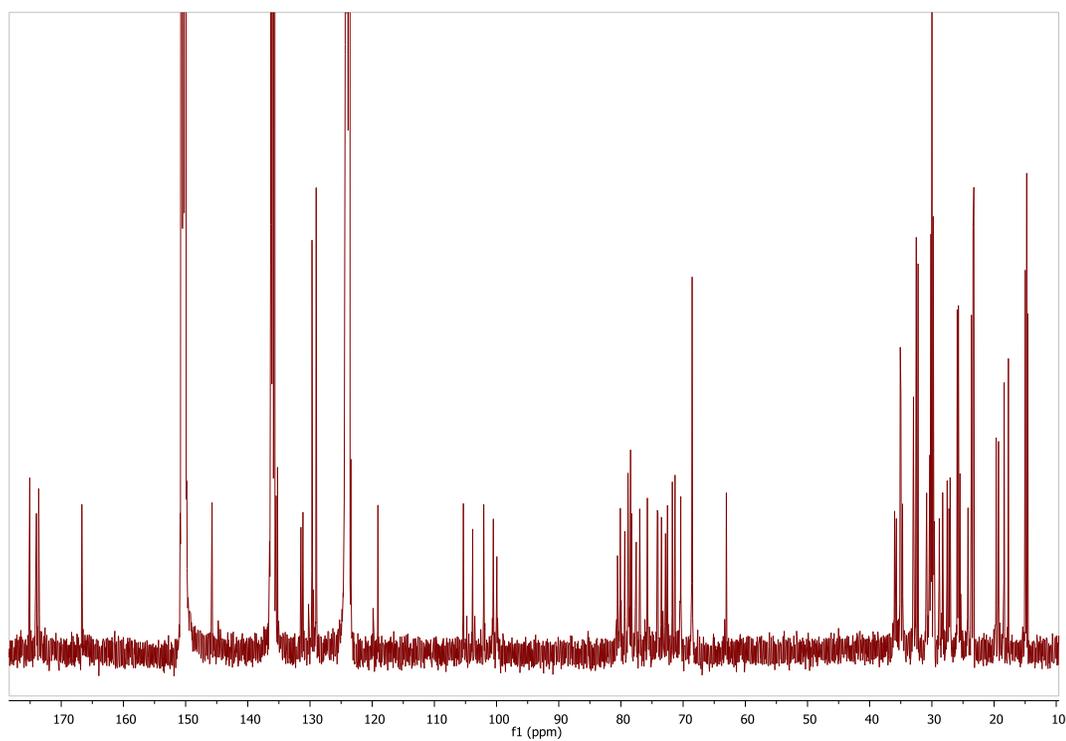
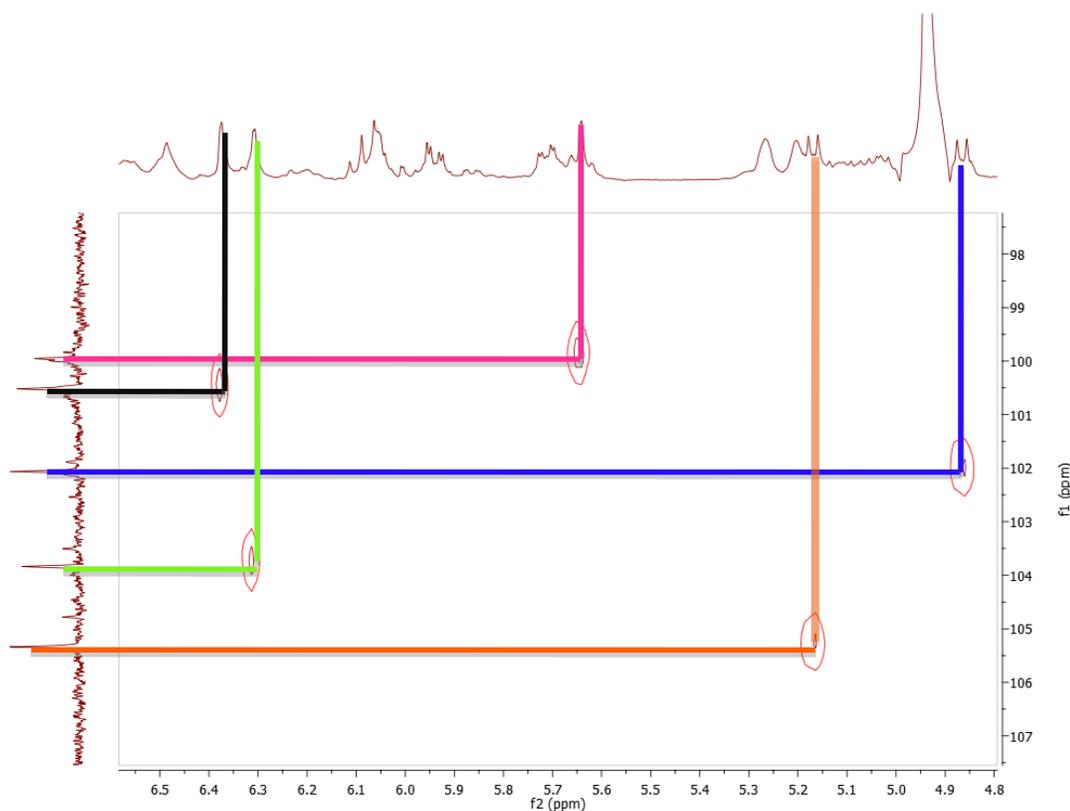


Figura 42. Espectro RMN de <sup>13</sup>C.

En primera instancia, se localizaron las señales correspondientes a los carbonos anoméricos del esqueleto oligosacárido, que se encuentran en una región característica que va desde 98 hasta 105 ppm (**Figura 42**), de este modo se llegó a la conclusión de que la molécula en cuestión es un pentasacárido; posteriormente, mediante el empleo de la técnica bidimensional heteronuclear HSQC fue posible correlacionar cada señal de carbono con su correspondiente señal en el espectro de protón (**Figura 43**).



**Figura 43.** Ampliación espectro RMN HSQC, zona anomérica componente lw 29.1.2 (Claves coloridas: azul=fucosa; fucsia=ram; negro=ram'; verde=ram''; anaranjado=glucosa).

Después de haber asignado las señales anoméricas de protón y carbono, se asignaron las señales de los protones pertenecientes a las unidades sacáridas del núcleo mediante las técnicas bidimensionales homonucleares COSY (**Figura 44**) y TOCSY (**Figura 45**). Con el espectro COSY se observaron los acoplamientos de hidrógeno vecinales, mientras que el espectro bidimensional homonuclear TOCSY sirvió para identificar todos los protones que integran cada unidad sacárida, permitiendo corroborar las asignaciones anteriormente realizadas.

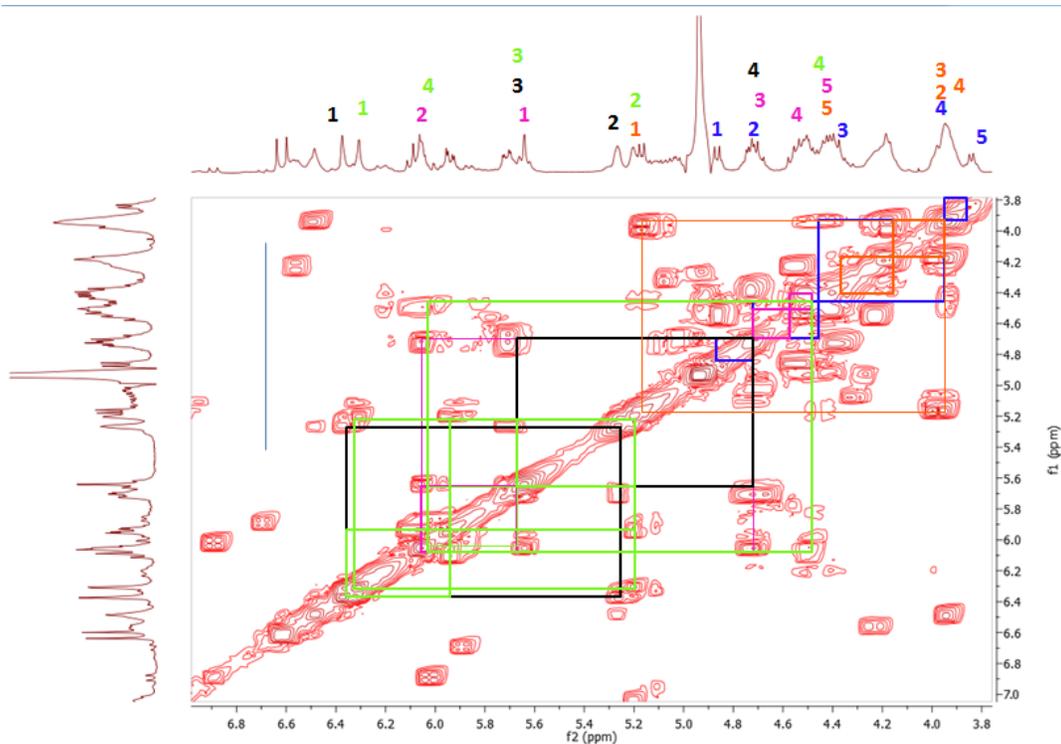


Figura 44. Espectro bidimensional COSY componente lw29.1.2

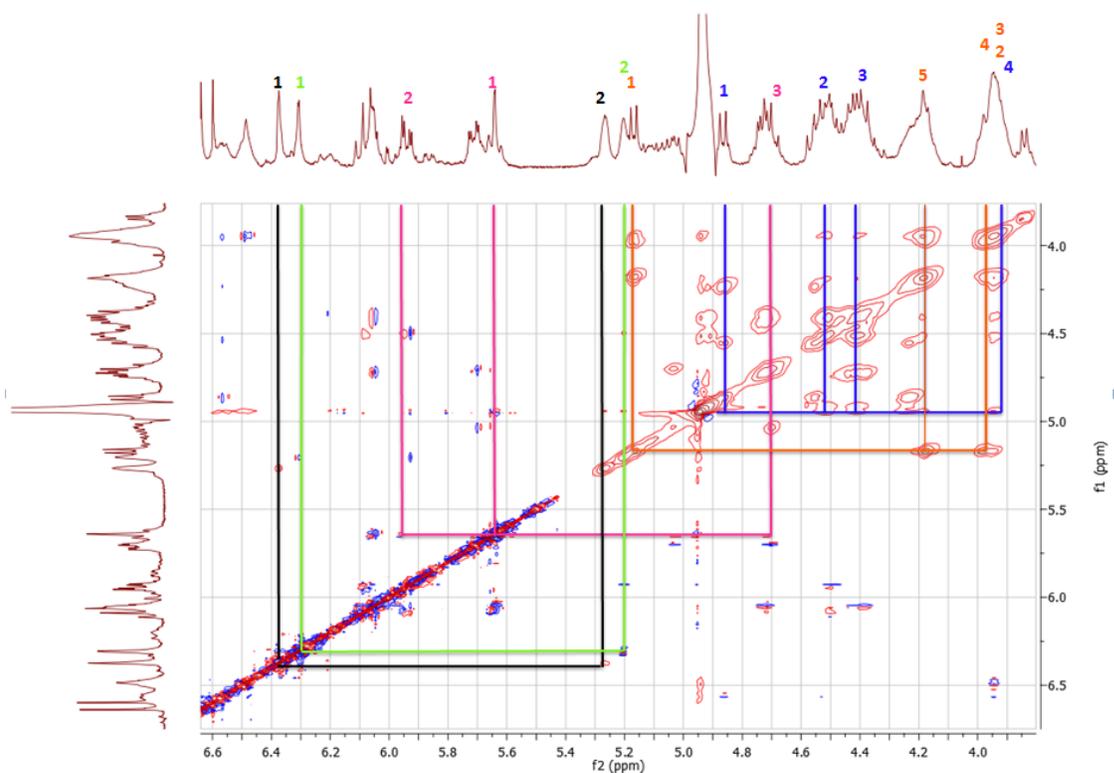


Figura 45. Espectro bidimensional TOCSY componente lw 29.1.2

Cuadro 8. Datos espectroscópicos para RMN<sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C para el componente lw29.1.2<sup>1</sup>

Posición n <sup>2</sup>	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub>	HMBC	Posición n <sup>2</sup>	δ <sub>c</sub>	δ <sub>H</sub>	HMBC
<b>Fuc-1</b>	102.1	4.87 d (7.85)	Jal-1 (80.1)	Glc-1	105.3	5.17 d (7.7)	C-3 Ram <sup>1</sup> (80.5)
2	77.5	4.54 dd (9.5, 7.9)	H-1 Ram (5.64)	2	74.1	3.94 t (10.1)	
3	68.5	4.42 dd (11.2, 5.8)		3	78.5	3.98 t (8.0)	
4	78.4	3.9 d (3.5)		4	75.7	3.97 t (8.8)	
5	71.7	3.8 q (6.6)		5	77.0	4.23 ddd (11.2, 6.3, 3.5)	
6	17.7	1.54 d (6.3)		6 <sup>a</sup>	63.0	4.5 m*	
<b>Ram-1</b>	100.0	5.64 sa	C-2 Fuc (77.5)	6b	63.0	4.4 m*	
2	72.8	5.64 sa	C-1 Jal (175.1)	Jal-1	175.1		
3	80.5	4.7 dd (9, 3.7)		2 <sup>a</sup>	34.7	2.3 m*	
4	74.1	4.55 ddd (9.5, 7.9, 4.6)	C-1 Ram <sup>1</sup> (100.5)	2b	34.7	2.7 m*	
5	68.5	4.50 dq (9.5, 6.1)		11	80.1	3.91 m*	
6	19.3	1.47 d (6.1)		16	14.7	0.87 t (6.76)	
<b>Ram<sup>1</sup>-1</b>	100.5	6.37 sa	H-4 Ram (4.55)	Deca-1	174.0		
2	70.5	5.26 dd (4.3, 2.7)	C-1 Octa (173.6)	2	34.7	2.43 t (7.6)	
3	80.5	3.9		10	15.0	0.99 t (6.9)	
4	79.4	4.37 m*		Octa-1	173.6		
5	68.5	4.37 m*		2	35.0	2.46 t (7.4)	
6	19.1	1.65 d (5.9)		8	14.6	0.75 t (6.8)	
<b>Ram<sup>1</sup>-1</b>	103.8	6.31 d (1.69)	C-4 Ram <sup>1</sup> (79.4)	Cna	166.7		
2	70.4	5.20 m*		2	35.1	2.43 t (7.6)	
3	73.5	5.94 dd (9.8, 3.1)	C-1 Cna (166.7)	3	14.9	0.99 t (6.9)	
4	72.5	6.09 t (9.7)	C-1 Deca (174)				
5	68.5	4.50 dq (4.6, 7.9)					
6	18.4	1.49 d (6.2)					

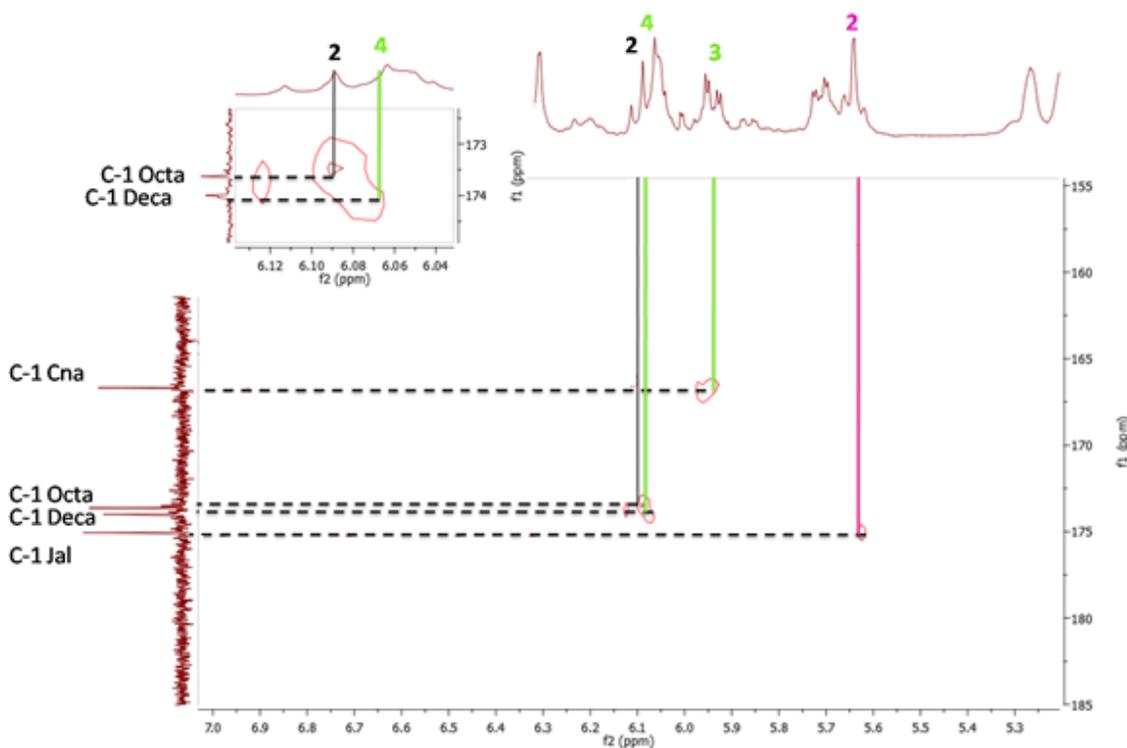
<sup>1</sup> Datos registrados a 400MHz y 100 MHz en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran entre paréntesis y se reportan en Hz. Los desplazamientos químicos señalados con asterisco (\*) indican señales sobrepuestas. Los patrones de acoplamiento están indicados como: s= singulete, sa=señal ancha, d=señal doble, dq=doblete cuarteteado, t=señal triple, m\*=señal múltiple. Todas las asignaciones se hicieron por medio de experimentos de correlación homonuclear: H-H (COSY, TOCSY) y heteronuclear (HMBC, HSQC).

<sup>2</sup> Abreviaturas: fuc=fucosa, ram=ramnosa, glu=glucosa, jal=11-hidroxihexadecanoilo, octa=n-octadecanoil, deca=n-decanoil, Cna=trans-cinamoilo.

### 6.5.2 Secuencia de glicosilación y posiciones de esterificación

Con el uso del espectro bidimensional heteronuclear HMBC, se logró establecer las posiciones de esterificación de la molécula, así como la secuencia de glicosilación: se observó una interacción entre C-

2 Fuc ( $\delta=77.5$  ppm) y H-1 Ram ( $\delta=5.64$  ppm) con lo que se establece enlace glicosídico entre las dos primeras unidades sacáridas; la señal de conectividad entre H-4 Ram ( $\delta=4.55$  ppm) y C-1 Ram' ( $\delta=100.5$  ppm) confirmó la unión de la siguiente unidad sacárida (Ram'), para las uniones glicosídicas entre la Ram' y la Ram'', se observaron las interacciones entre C-4 Ram' ( $\delta=79.4$  ppm) con H-1 Ram'' ( $\delta=6.31$  ppm); para la unidad de glucosa se encontró la señal entre H-1 Gluc ( $\delta=5.17$  ppm) con C-3 Ram' ( $\delta=80.5$  ppm). De esta forma, se continuó con la asignación de las posiciones de esterificación: para el jalapinolato, se verificó su ubicación observando la interacción entre H-2Ram ( $\delta=6.0$  ppm) y C-1 Jal ( $\delta=175.1$  ppm), al observar que existe una señal de carbono interactuando con H-1 fuc ( $\delta=4.87$  ppm), se designó a dicha señal como C-11 del Jal ( $\delta=80.1$  ppm) con lo que las uniones de la lactona macrocíclica quedan cubiertas; por otro lado, el grupo cinamoilo se localizó en la posición C-3 de la unidad de ramnosa externa (Ram'') ya que existe una señal entre C-1 de este residuo ( $\delta=166.7$  ppm) y H-3 de esta unidad (Ram'',  $\delta=5.94$  ppm); en la posición C-4 de Ram'' se localizó el residuo octanoilo, por la señal entre C-1 de este residuo ( $\delta=174$  ppm) y H-4 Ram'' ( $\delta=6.09$  ppm); la última posición de esterificación, correspondiente al residuo de decanoilo, que se localizó en C-2 de Ram', ya que existe una señal entre C-1 Deca ( $\delta=174$  ppm) y H-2 Ram'' ( $\delta=5.26$  ppm). La **Figura 46** ilustra las correlaciones  $^3J_{CH}$  descritas en el párrafo anterior.



**Figura 46.** Espectro bidimensional HMBC que ilustra las posiciones de esterificación, con ampliación entre 173 y 174 ppm.

### 6.6 Comparación con la literatura.

Sólo se han aislado 39 moléculas derivadas del ácido operculínico A: el batatinósido VI, el batatóside H y elbatatóside I de *I. Batatas* (20,21), las intrapilosinas I-VII de *I. intrapilosa* (16), las leptofilinas A y B de *I. leptophylla* (22), las operculinas I, II, V, VII, y VIII de *I. Operculata* (23, 24), las estoloniferinas IV-VII de *I. stolonifera* (25), los mamósidos H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub> de *I. mammosa* (sin. *Merremiamammosa*) (26), las murucoidinas IV, V, y XI de *I. murucoides* (15, 27), la quamoclina IV de *I. quamoclit* (sin. *Quamoclitpennata*) (28), las tuguajalapinas I-X de *M. hungaiensis* (29), la digitatajalapina I de *I. digitata* L. (30) y la wolcotina I (31) y comparando sus residuos acilantes además de las posiciones en que estos se encuentran en cada una de las moléculas antes señaladas, se llegó a la conclusión de que se trata de una nueva resina glicosídica del ácido operculínico A, cuyo nombre trivial se asignó como "wolcotinósido IV", utilizando como base su fuente natural.

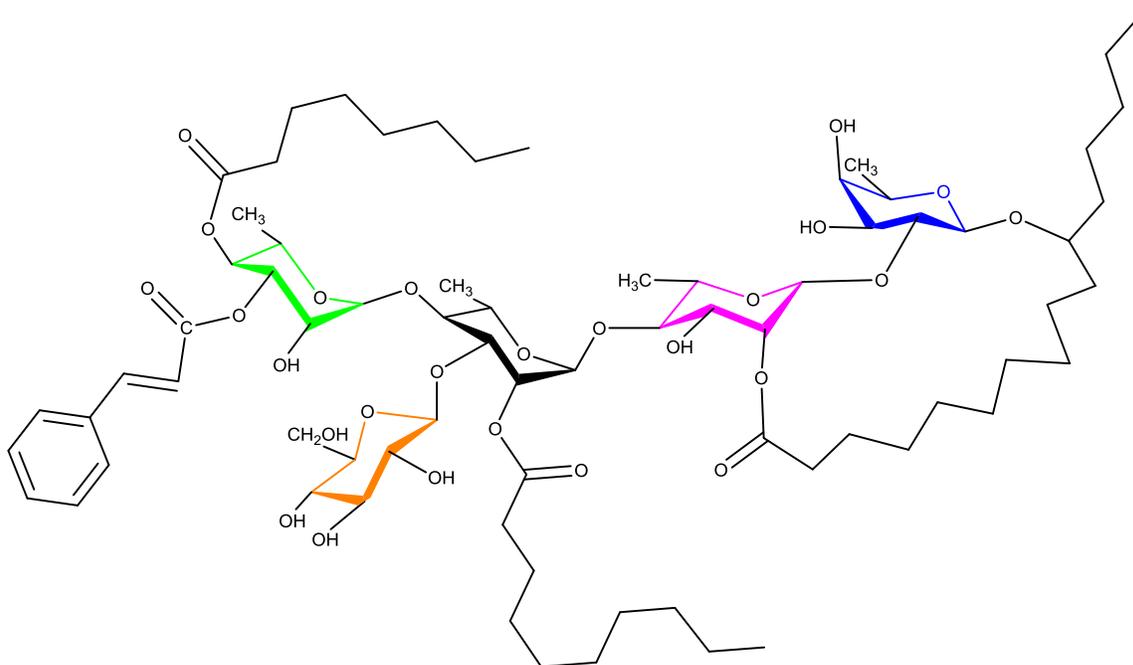


Figura 47. Wolcotinósido IV.

## 7. Conclusiones

- Se contribuyó al estudio químico de los glicolípidos presentes en las fracciones de mediana polaridad de las flores de *Ipomoea wolcottiana*, ya que se lograron aislar y purificar, mediante el uso de cromatografía de líquidos de alta eficiencia, 2 glicolípidos de los cuales uno es novedoso: el wolcotinósido IV.
- Se purificó también, un glicolípido ya conocido, extraído previamente de *Ipomoea intrapilosa*, cuyo nombre trivial es **Intrapilosina VII**, cuyos datos espectroscópicos coinciden perfectamente con los reportados en la literatura.
- Tanto el wolcotinósido IV como la Intrapilosina VII contienen el mismo núcleo oligosacárido: el ácido operculínico A, mismos que difieren solamente en la longitud de la cadena del residuo acilante de la posición 2 de la ramnosa central, siendo ácido octanoico y dodecanoico respectivamente.
- La reacción de peracetilación es una alternativa útil para la resolución de mezclas complejas de glicolípidos, al aumentar el tiempo de retención y evitar reacciones de transesterificación en moléculas propensas a dicha conversión cuando se trabaja con metanol.

---

## 8. Bibliografía.

1. Heinrich, Michael, Joanne Barnes, and Simon Gibbons. 2012. *Fundamentals of Pharmacognosy and Phytotherapy*. 2nd ed. Elsevier.
2. CONABIO/ Biodiversidad <http://www.biodiversidad.gob.mx/pais/quees1.html> consultado el 27 de Enero de 2014.
3. Budzikiewicz, H., Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramírez, D., & Castañeda-Gómez, J. (2010). *Progress in the Chemistry of Natural Products*. (A. D. Kinghorn, H. Falk, & J. Kobayashi, Eds.) (p. 185). Springer Wien NewYork.
4. Alonso-Castro A. J., Villarreal M. L. , Salazar-Olivo L. A., Gomez-Sanchez M, Dominguez F, Garcia-Carranca A., Mexican medicinal plants used for cancer treatment: Pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies, *Journal of Ethnopharmacology*, 2011, pp 952.
5. Mendoza-García, A. D. (2011). *“Purificación mediante cromatografía líquida de los glicolípidos presentes en las semillas de Ipomoea alba.”* Universidad Nacional Autónoma de México.
6. Pereda-Miranda, R., & Bah, M. (2003). Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 3(2), 111–131.
7. Stefanovic´, S., Krueger, L. y Olmtead, R. (2002). Monophylly of the *Convolvulaceae* and circumscription of their major lineales based on DNA sequences of multiple chloro-plast loci. *American Journal of Botany* 89, 1510-1522.
8. Castañeda-Gómez, J. (2012). *Tesis para para optar por el grado de Doctor en Ciencias químicas “Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de Ipomoea purga.”*
9. Meira, M., Pereira, E., David, J. M., & David, J. P. (2011). Review of the genus *Ipomoea* : traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal Of Pharmacognosy*, 32.
10. Linares E.; Bye R.; Rosas-Ramírez, D.; Pereda-Miranda, R. El camote. CONABIO. *Biodiversitas*. 2008, 81, 11-15.
11. Lotina-Hennsen, B., King-Díaz, B., & Pereda-Miranda, R. (2013). Tricolorin A as a natural herbicide. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 18(1), 778–88.

12. Corona-Castañeda, B., & Pereda-Miranda, R. (2012). Morning glory resin glycosides as modulators of antibiotic activity in multidrug-resistant gram-negative bacteria. *Planta Medica*, 78(2), 128–31.
13. McDonald, A. (1991). Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Instituto de Biología*, 62(1), 65–82.
14. Pereda-Miranda, R., & Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC Isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron*, 58(16), 3145–54.
15. Chérigo L, Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Jacobo-Herrera N, Kaatz GW, Gibbons S. (2008) Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J Nat Prod* 71: 1037
16. Bah M, Chérigo L, Cardoso A, Fragoso-Serrano M, Hammond GB, Pereda-Miranda R (2007) Intrapilosins I-VII, Pentasaccharides from the Seeds of *Ipomoea intrapilosa*. *J Nat Prod* 70: 1153.
17. Tao, H., Hao, X., Liu, J., Ding, J., Fang, Y., Gu, Q., & Zhu, W. (2008). Resin glycoside constituents of *Ipomoea pes-caprae* (Beach Morning Glory). *Journal of Natural Products*, 71(12), 1998–2003.
18. Quattrocchi, O. A., Abelaira de Adrizzi, S., & Laba, R. F. (1992). *Introducción a la HPLC: Aplicación y Práctica* (p. 405).
19. Rosas-Ramírez, D., & Pereda-Miranda, R. (2013). Resin glycosides from the yellow-skinned variety of sweet potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(39), 9488–94.
20. Yin Y-Q, Wang J-S, Luo J-G , Kong L-Y (2009) Novel acylated lipo-oligosaccharides from the tubers of *Ipomoea batatas*. *Carbohydr Res* 344: 466
21. Escalante-Sánchez E, Rosas-Ramírez D, Linares E, Bye R, Pereda-Miranda R (2008) Batatinosides II-VI, Acylated Lipooligosaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. *J Agric Food Chem* 56: 9423
22. Barnes CC, Smalley MK, Manfredi KP, Kindscher K, Loring H, Sheeley DM (2003) Characterization of an Anti-tuberculosis Resin Glycoside from the Prairie Medicinal Plant *Ipomoea leptophylla*. *J Nat Prod* 66: 1457

- 
23. 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
  24. 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
  25. Noda N, Takahashi T, Kawasaki T, Miyahara K, Yang CR (1994). Stoloniferins I-VII, Resin Glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* 36: 365
  26. Kitagawa I, Ohashi K, In N, Sakagami M, Yoshikawa M, Shibuya H (1997) Indonesian Medicinal Plants. XIX. Chemical Structures of Four Additional Resin-Glycosides, Mammosides A, B, H1 and H2, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem Pharm Bull* 45: 786
  27. Chérigo L, Pereda-Miranda R (2006) Resin Glycosides from the Flowers of *Ipomoea murucoides*. *J Nat Prod* 69: 595.
  28. Ono M, Kuwabata K, Kawasaki T, Miyahara K (1992) Resin Glycosides XVI. Quamoclins I-IV, New Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the Seeds of *Quamoclit pennata*. *Chem Pharm Bull* 40: 2674.
  29. Noda N, Tsuji K, Miyahara K, Yang CR (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.
  30. Ono M, Fukuda H, Murata H, Miyahara K. (2009) Resin glycosides from the leaves and stems of *Ipomoea digitata*. *J Nat Med* 63: 176
  31. Corona-Castañeda, B., (2013). Tesis para optar por el grado de Doctor en Ciencias. "Resinas glicosídicas de las convolvuláceas como agentes moduladores de la actividad antibiótica en cepas multifármaco resistentes."
  32. Kubo, I.; Nakatsu, T., (1990), Recent examples of Preparative-Scale Recycling High Performance Liquid Chromatography in Natural Products Chemistry, *LC-GC*, 8, 933-939.
-