



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

PURIFICACIÓN DE LAS RESINAS GLICOSÍDICAS DE LAS SEMILLAS DE *IPOMOEA TRICOLOR* Y
EVALUACIÓN DE SU POTENCIAL MODULADOR SOBRE EL FENOTIPO DE RESISTENCIA MÚLTIPLE A
FÁRMACOS EN CÉLULAS DE CARCINOMA DE MAMA HUMANO

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. PEDRO LAVIAS HERNÁNDEZ

DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, OCTUBRE DE 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

| | |
|-------------------|---|
| PRESIDENTE | Dra. Rachel Mata Essayag |
| VOCAL | Dr. José Federico del Río Portilla |
| VOCAL | Dra. María Isabel Aguilar Laurents |
| VOCAL | Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa |
| SECRETARIO | Dr. José Fausto Rivero Cruz |

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

AGRADECIMIENTOS.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación y la beca otorgada (Número de becario: 583498) durante el periodo Agosto 2015 - Febrero 2017.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN215016) por el financiamiento parcial de ésta investigación.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda, por permitirme ser parte de su equipo, por el apoyo, atención y asesoría recibidas durante la maestría.

A la Dra. Mabel Fragoso Serrano, por las asesorías y observaciones recibidas.

Al Dr. Jhon Castañeda Gómez por la asesoría, consejos y conocimientos brindados durante su estancia.

A los miembros del jurado, por las observaciones y correcciones sugeridas para la mejora del presente texto.

A mis compañeros de laboratorio y maestría, por su apoyo, enseñanza, consejos, convivencia y por los buenos ratos que compartimos a lo largo de dos años.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la formación profesional que me han brindado.

*A Dios, por la oportunidad de vivir cada día con
personas extraordinarias.*

A la vida, por asombrarme con cada acontecimiento.

*A mis padres, de quienes he aprendido la alegría de
vivir y seguir siempre adelante.*

*A mi hermano, con quien he compartido la
complicidad, confianza y diversión que sólo él me ha
podido dar.*

*A Dalia, por llegar, permanecer, enriquecer y
compartir el camino de vida.*

CONTENIDO.

| | |
|---|-----------|
| AGRADECIMIENTOS..... | i |
| CONTENIDO..... | iii |
| ABREVIATURAS..... | v |
| LISTA DE CUADROS..... | vii |
| LISTA DE FIGURAS..... | viii |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 10 |
| 2. MARCO TEÓRICO..... | 11 |
| 2.1. <i>Ipomoea tricolor</i> | 11 |
| 2.1.1. Historia, descripción botánica y usos..... | 11 |
| 2.2. <i>Resinas glicosídicas</i> | 15 |
| 2.2.1. Generalidades..... | 15 |
| 2.2.2. Resinas glicosídicas alelopáticas de <i>Ipomoea tricolor</i> | 17 |
| 2.2.3. Separación de resinas mediante HPLC: la modalidad de reciclaje como técnica de purificación..... | 19 |
| 2.2.4. Uso de la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS) para la elucidación estructural..... | 21 |
| 3. HIPÓTESIS..... | 22 |
| 4. OBJETIVOS..... | 22 |
| 5. PARTE EXPERIMENTAL..... | 23 |
| 5.1. <i>Material vegetal</i> | 23 |
| 5.2. <i>Extracción</i> | 23 |
| 5.3. <i>Selección de extracto y pruebas de solubilidad</i> | 23 |
| 5.4. <i>Selección de las condiciones cromatográficas</i> | 24 |
| 5.5. <i>Generación de perfiles cromatográficos</i> | 24 |
| 5.6. <i>Separación mediante HPLC</i> | 25 |
| 5.7. <i>Análisis por UPLC-MS para los cortes realizados a nivel preparativo</i> | 25 |
| 5.8. <i>Análisis espectrométrico de alta resolución para la mezcla F7</i> | 26 |
| 5.9. <i>Líneas y cultivos celulares</i> | 26 |
| 5.10. <i>Citotoxicidad</i> | 26 |
| 5.11. <i>Ensayos de modulación</i> | 26 |
| 6. RESULTADOS Y ANÁLISIS..... | 27 |
| 6.1. <i>Separación por HPLC</i> | 27 |
| 6.2. <i>Escalamiento a nivel preparativo</i> | 29 |
| 6.3. <i>Reciclaje y elucidación estructural del pico mayoritario (F10 → P10)</i> | 32 |
| 6.4. <i>Reciclaje y elucidación estructural de P6</i> | 35 |

| | | |
|------|---|----|
| 6.5. | <i>Reciclaje y elucidación estructural del corte F1.</i> | 37 |
| 6.6. | <i>Reciclaje del corte F7 y elucidación estructural de P7.1 y P7.2.</i> | 39 |
| 6.7. | <i>Citotoxicidad y ensayos de modulación.</i> | 47 |
| 7. | CONCLUSIONES. | 49 |
| 8. | BIBLIOGRAFÍA. | 50 |
| 9. | ANEXOS. | 52 |
| 9.1. | <i>Análisis UPLC-ESI-MS de los cortes realizados en el extracto 1.</i> | 52 |
| 9.2. | <i>Espectros 2D para el pico P1 (Disolvente: Piridina-d₅).</i> | 56 |
| 9.3. | <i>Espectros 2D para el pico P6 (Disolvente: Piridina-d₅).</i> | 57 |
| 9.4. | <i>Espectros 2D para el pico P7.1 (Disolvente: Piridina-d₅).</i> | 59 |
| 9.5. | <i>Espectros 2D para el pico P10 (Disolvente: Piridina-d₅).</i> | 61 |

ABREVIATURAS.

| ABREVIATURA | SIGNIFICADO |
|------------------------|---|
| μg | microgramo |
| μm | micrómetro |
| 2D | Dos dimensiones |
| ACN | Acetonitrilo |
| C | cuarteto |
| CaOV3 | Adenocarcinoma de ovario |
| CI₅₀ | Concentración de inhibición media |
| COSY | Correlation spectroscopy |
| d | doblete |
| dc | doble cuarteto |
| dd | doble de doble |
| ddd | doble de doble de doble |
| dt | doble triplete |
| ESI | Electrospray ionization |
| FAB | Fast atom bombardment |
| FR | Factor de reversión |
| Fuc | Fucosa |
| g | gramo |
| Glu | Glucosa |
| HCT-15 | Carcinoma de colon |
| HeLa | Carcinoma de cérvix |
| HMBC | Heteronuclear multiple bond correlation |
| HPLC | High performance liquid chromatography |
| HSQC | Heteronuclear single quantum correlation |
| <i>J</i> | Constante de acoplamiento |
| L | Litro |
| LSD | Dietilamida de ácido lisérgico |
| m | multiplete |
| <i>m/z</i> | Relación masa/carga |
| MALDI | Matrix-assisted laser desorption/ionization |
| MCF-7 | Carcinoma de mama |
| MCF-7/Vin | Carcinoma de mama resistente a vinblastina |

| | |
|--------------------------------------|---|
| MCF-7/Vin⁻ | Carcinoma de mama resistente a vinblastina con posterior crecimiento en ausencia del mismo |
| MCF-7/Vin⁺ | Carcinoma de mama resistente a vinblastina con posterior crecimiento en presencia del mismo |
| MDR | Resistencia múltiple a fármacos |
| MeOH | Metanol |
| mg | miligramo |
| MHz | Megahertz |
| min | minuto |
| mL | mililitro |
| mm | milímetro |
| MS | Mass spectrometry |
| Piridina-<i>d</i>₅ | Piridina deuterada |
| ppm | partes por millón |
| q | cuinteto |
| Ram | Ramnososa |
| R_f | Relación de frentes |
| RMN | Resonancia magnética nuclear |
| RMN ¹³C | Resonancia magnética nuclear de carbono-13 |
| RMN ¹H | Resonancia magnética nuclear de hidrógeno-1 |
| RPMI-1640 | Medio Roswell Park Memorial Institute |
| s | singulete |
| sept | septeto |
| SFB | Suero fetal bovino |
| t | triplete |
| TAB | Mezcla de tricolorinas, polvo blanco |
| TAC | Mezcla de tricolorinas, polvo café |
| TOCSY | Total correlation spectroscopy |
| TSN | Número de serie taxonómico |
| UPLC | Ultra performance liquid chromatography |
| v/v | Relación volumen/volumen |
| δ | Desplazamiento químico |

LISTA DE CUADROS.

| Cuadro | Título |
|--------|--|
| 2.1 | Diversos usos del género <i>Ipomoea</i> . |
| 5.1 | Fracciones de <i>Ipomoea tricolor</i> . |
| 5.2 | Condiciones de separación por HPLC fase reversa nivel analítico. |
| 5.3 | Fracciones y estándares de <i>Ipomoea tricolor</i> . |
| 6.1 | Pruebas de solubilidad para el extracto 1. |
| 6.2 | Resultados del análisis por HPLC del extracto 1. |
| 6.3 | Picos distintivos en cada extracto. |
| 6.4 | Masa recolectada de cada corte y análisis por UPLC-ESI-MS. |
| 6.5 | Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina A y P10. |
| 6.6 | Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina C y P6. |
| 6.7 | Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina G y P1. |
| 6.8 | Desplazamientos químicos y multiplicidades para el núcleo oligosacárido de la tricolorina B y P7.1. |
| 6.9 | Desplazamientos químicos y multiplicidades para las agliconas de la tricolorina B y P7.1. |
| 6.10 | Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina B y P7.2. |
| 6.11 | Evaluación de la citotoxicidad de los glicolípidos. CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$). |
| 6.12 | Ensayos de modulación de la actividad de la vinblastina sobre las células sensibles (MCF-7) y resistentes (MCF-7/Vin). |

LISTA DE FIGURAS.

| Figura | Título |
|--------|---|
| 2.1 | Flores de <i>Ipomoea tricolor</i> cultivar “heavenly blue”. |
| 2.2 | Estructura general de un glicolípido. |
| 2.3 | Carbohidratos comunes en las resinas glicosídicas. |
| 2.4 | Efecto de la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de <i>Echinochloa crus-galli</i> . |
| 2.5 | Condiciones instrumentales utilizadas en HPLC en fase reversa para la resolución de la fracción alelopática del extracto clorofórmico de <i>Ipomoea tricolor</i> : tricolorinas A (t_R 19.7 min), B (t_R 21.7 min), C (t_R 32.0 min), D (t_R 14.6 min) y E (t_R 16.0 min). |
| 2.6 | Estructura química de las tricolorinas A-E. |
| 2.7 | Válvula de reciclaje (izquierda) y cromatograma generado mediante reciclaje (derecha) de una muestra conteniendo dos compuestos diastereoisoméricos por HPLC. |
| 6.1 | Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de las semillas. Extracto 1 vs muestra de referencia (tricolorina A). |
| 6.2 | Cromatograma extracto 1. Fase móvil, acetonitrilo:agua 9:1. Picos detectados: 16. |
| 6.3 | Cromatograma extracto 1. Fase móvil, acetonitrilo:agua 4:1. Picos detectados: 16. |
| 6.4 | Cromatograma comparativo. Extracto 1 (Trazo negro) vs TAB (Trazo azul). |
| 6.5 | Cromatograma comparativo. Extracto 2 (Trazo negro) vs TAB (Trazo azul). |
| 6.6 | Cromatograma comparativo. Extracto 3 (Trazo negro) vs TAB (Trazo azul). |
| 6.7 | Cromatograma del extracto 1 en HPLC a nivel preparativo. |
| 6.8 | Cromatograma de reciclaje de F10 y obtención de P10. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C ₁₈ : 7 μ m 19 \times 300 mm; flujo: 10 mL/min; fase: ACN (100%); detector: índice de refracción. |
| 6.9 | Espectro de RMN ¹ H para P10 (400 MHz, piridina- <i>d</i> ₅). |
| 6.10 | Espectro de RMN ¹³ C para P10 (100 MHz, piridina- <i>d</i> ₅). |
| 6.11 | Cromatograma de reciclaje de F6 y obtención de P6. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C ₁₈ : 7 μ m 19 \times 300 mm; flujo: 6 mL/min; fase: ACN:Agua (9:1); detector: índice de refracción. |
| 6.12 | Espectro de RMN ¹ H para P6 (500 MHz, piridina- <i>d</i> ₅). |
| 6.13 | Espectro de RMN ¹³ C para P6 (125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅). |
| 6.14 | Cromatograma de reciclaje de F1 y obtención de P1. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C ₁₈ : 7 μ m 19 \times 300 mm; flujo: 6 mL/min; fase: ACN:Agua (9:1); detector: índice de refracción. |
| 6.15 | Espectro de RMN ¹ H para P1 (500 MHz, piridina- <i>d</i> ₅). |
| 6.16 | Cromatograma de reciclaje de F7 y obtención de P7.1 y P7.2. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C ₁₈ : 7 μ m 19 \times 300 mm; flujo: 6 mL/min; fase: ACN (100%); detector: índice de refracción. |
| 6.17 | Espectro de RMN ¹ H para P7.1 (Trazo superior: 500 MHz, piridina- <i>d</i> ₅) y la tricolorina A (Trazo inferior: 400 MHz, piridina- <i>d</i> ₅). |
| 6.18 | Espectro de ¹³ C para P7.1 (125 MHz, piridina- <i>d</i> ₅). |

| | |
|-------------|--|
| 6.19 | Espectro HMBC para P7.1 en la región de los carbonilos (172-177 ppm). Se destaca con líneas perpendiculares la correlación a tres enlaces ($^3J_{CH}$) en H-4 (δ 5.71) de la ramnosa interna y C-1 (δ 176.1) del residuo de metilbutirato. |
| 6.20 | Espectro de 1H para P7.2 (700 MHz, piridina- d_5). |
| 6.21 | Espectro de ^{13}C para P7.2 (175 MHz, piridina- d_5). |
| 6.22 | Estructura de los compuestos mayoritarios, las tricolorinas A (t_R 31.03 min; $R_1 = R_2 = mba$) y B (t_R 24.69 min; $R_1 = mba$, $R_2 = iba$), y de los nuevos miembros minoritarios de la serie homóloga, las tricolorinas K (t_R 21.98 min; $R_1 = iba$, $R_2 = mba$) y L (t_R 20.25 min; $R_1 = R_2 = iba$). |

1. INTRODUCCIÓN.

Ipomoea tricolor Cav. (*Convolvulaceae*), también conocida como hiedra, manto, quiebraplatos o bodongás, es una planta trepadora perenne originaria de América tropical. Sus principales características anatómicas son sus hojas alternadas acorazonadas, flores en forma de embudo que pueden ser de color azul, púrpura, rojo o blanco y semillas en forma de cápsula.

Su principal uso alrededor del mundo es como una planta ornamental y, en ocasiones, las semillas se utilizan como alucinógeno, ya que contienen sustancias psicodélicas parecidas a la dietilamina del ácido lisérgico (LSD) y que pertenecen a la familia de alcaloides tipo ergolina. En México, se utiliza para el control del crecimiento de plantas nocivas en la agricultura, debido a la presencia de sustancias alelopáticas.^{1,2}

El conocimiento y uso de plantas con fines medicinales ha propiciado una intensa búsqueda e investigación de principios activos que puedan ser rentables en la medicina y la agricultura moderna para su producción a nivel industrial. Una planta contiene una gran cantidad de metabolitos que pueden ser potencialmente utilizados con fines farmacológicos, en el caso de los carbohidratos (cuya función principal en los organismos vivos es servir de energía inmediata) existe un tipo de glicolípidos conocidos como resinas glicosídicas las cuales son moléculas anfipáticas que han demostrado previamente ser sustratos para las bombas de eflujo relacionadas con el fenotipo de la resistencia múltiple a fármacos (MDR) en células procariotas y eucariotas.^{3,4}

Para la separación y purificación de este tipo de mezclas de carbohidratos complejos se ha utilizado la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) a nivel preparativo mediante el empleo de la modalidad de reciclaje de muestra.⁵

2. MARCO TEÓRICO.

2.1. *Ipomoea tricolor*.

2.1.1. Historia, descripción botánica y usos.

La familia *Convolvulaceae* toma su nombre del verbo latino *convolvere* que significa entrelazarse (enrollarse); cuenta con 40 géneros y alrededor de 1,500 especies con una amplia distribución en regiones tropicales y templadas de nuestro país, aunque principalmente se encuentran en regiones que presentan temporadas de sequía. Algunas de sus especies son conocidas como manto de la virgen, glorias de la mañana (haciendo referencia a que por la noche se cierran las flores) o campanitas, teniendo efectos benéficos o perjudiciales para el hombre.⁶ La mayoría son enredaderas, plantas rastreras o erectas, las cuales en ocasiones son parásitos de otros vegetales, pero también hay árboles, arbustos y hierbas. Los miembros de esta familia pueden reconocerse fácilmente por sus flores en forma de un embudo radial y simétrico. Estos tienen cinco sépalos, con corola de cinco pétalos unidos y cinco estambres. Las flores son hipóginas (teniendo un ovario súpero). El vástago de estas plantas generalmente está enrollado, de ahí su nombre latino (*convolvere* = enrollar). Las hojas son simples y alternas, de forma acorazonada, sin estípulas y casi siempre presentan látex; sus inflorescencias se presentan en forma de monocasio (cuando la ramificación se continúa constantemente por una rama lateral) y con frecuencia se presenta una flor solitaria que puede variar en tamaño y forma, siendo grandes y vistosas.⁷ Una de las características anatómicas más sobresalientes de esta familia es la presencia de hileras de células secretoras de resinas glicosídicas, las cuales representan un complejo de glicolípidos de alto peso molecular de entre 500 y 2000 g/mol.⁸ Los géneros más representativos son *Argyreia*, *Ipomoea*, *Cuscuta*, *Stictocardia* y *Turbina*.

Las especies del género *Ipomoea* están relacionadas con la historia y tradición cultural de nuestro país desde tiempos prehispánicos y han tenido diversos usos, por ejemplo: alucinógenos; anuncios mágicos del comienzo de la temporada de lluvias con el desarrollo de los cacahuates (especies arborescentes de *I. murucoides*)⁹; aditivos, para la fabricación de hule utilizando el látex de *Ipomoea alba*; alimentos, tal es el caso del xonequi (*Ipomoea dumosa*) y la raíz del camote (*Ipomoea batatas*), que contiene grandes cantidades de almidón, vitaminas, fibras (celulosa y pectinas) y minerales con un alto contenido de potasio; y como parte de rituales

religiosos, como el ololiuhqui (*Turbina corymbosa*), el cual fue perseguido por la Inquisición, limitando la transmisión del conocimiento del uso de muchas especies a las generaciones futuras.

Actualmente, en Tolimán, Querétaro, los indígenas otomíes recogen las flores de *Ipomoea tricolor* para molerlas en metate e incorporarlas a la masa de maíz para producir tortilla morada, mientras que para la obtención de tortilla amarilla se utiliza el camote (*Ipomoea batatas*). En Puebla y Veracruz, se utiliza el camote para preparar dulces o como ingrediente en la preparación de guisados.⁶ También, existen otros usos de las diferentes especies de *Ipomoea*, los cuales se resumen en el Cuadro 2.1.

| Cuadro 2.1. Diversos usos del género <i>Ipomoea</i> . ⁶ | | | | | |
|--|----------|---------|-------------|------------------------|-------------|
| Especie | Purgante | Laxante | Alucinógeno | Otros usos medicinales | Alimenticio |
| <i>I. acuminata</i> | x | | | | |
| <i>I. alba</i> | | x | | | |
| <i>I. aquatica</i> | x | | | | x |
| <i>I. arborescens</i> | | | x | | |
| <i>I. batatas</i> | | | | | x |
| <i>I. dumosa</i> | | | | | x |
| <i>I. hederacea</i> | x | | | | |
| <i>I. nil</i> | x | | | x | |
| <i>I. orizabensis</i> | x | | | | |
| <i>I. pes-caprae</i> | x | x | | | |
| <i>I. purga</i> | x | | | | |
| <i>I. purpurea</i> | x | x | x | | |
| <i>I. quamoclit</i> | x | | | | |
| <i>I. stans</i> | x | | | | |
| <i>I. tricolor</i> | | | x | | |
| <i>I. tuberosa</i> | | x | | | |
| <i>I. turpethum</i> | x | x | | | |

De acuerdo con el Sistema Integrado de Información Taxonómica (2016), *Ipomoea tricolor* tiene el número de serie taxonómico (TSN) 30820, siendo su clasificación científica la siguiente:

| | |
|-------------|------------------------------|
| TSN | 30820 |
| Reino | <i>Plantae</i> |
| Subreino | <i>Viridaeplantae</i> |
| Infrareino | <i>Streptophyta</i> |
| División | <i>Tracheophyta</i> |
| Subdivisión | <i>Spermatophytina</i> |
| Clase | <i>Magnoliopsida</i> |
| Superorden | <i>Asteranae</i> |
| Orden | <i>Solanales</i> |
| Familia | <i>Convolvulaceae</i> |
| Género | <i>Ipomoea</i> |
| Especie | <i>Ipomoea tricolor</i> Cav. |

Esta especie es una enredadera muy vistosa que se encuentra principalmente en la vegetación natural del trópico seco, aunque también en campos de cultivo, plantíos e incluso en casas como una planta ornamental. Presenta otros sinónimos, como *Ipomoea rubrocaerulea* Hook. e *Ipomoea violacea* L. En México, se le conoce con los nombres populares de badho negro, badongás en Oaxaca, en tanto en el Bajío y centro del país se usa hidra, manto, manto de la virgen o quiebraplatos; en inglés, se conoce como “heavenly blue morning glory”. Numerosos cultivares de *I. tricolor* con diferencias en la coloración de las flores se han seleccionado para su comercialización como plantas ornamentales: “blue star”, “flying saucers”, “Rainbow Flash”, “summer skies”, “wedding bells”. Esta planta es nativa de nuestro país, distribuyéndose en la Ciudad de México, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Estado de México, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Tabasco, Veracruz, y Yucatán. *Ipomoea tricolor* es una planta herbácea de vida corta, extendiéndose en el suelo o trepando arboles de 8 a 10 metros de altura; sus hojas miden de 5 a 15 cm de largo, son alternadas y acorazonadas con el ápice (punta) puntiagudo; su inflorescencia se presenta en grupos de flores sostenidas por pedúnculos (rabillos) ubicados en las axilas (ángulo que se forma por la unión de dos ramas) de las hojas; las flores pueden ser de un color azul, púrpura, rojo, blanco o multicolor y tienen una forma de embudo o trompeta, de 4 a 9 cm de diámetro, muy comúnmente azul con el centro blanco a

dorado, de ahí el epíteto latino *tricolor* utilizado para esta especie que significa “con tres colores” (Fig. 2.1); los frutos se presentan como una cápsula seca que se abre para liberar cuatro semillas. Debido a su velocidad de crecimiento y prodigiosa producción de semillas es considerada una especie invasora en los cultivos de cempasúchil, leguminosas forrajeras, mango y sorgo. Su principal uso es ornamental, mientras que las semillas son utilizadas como alucinógeno por contener una sustancia parecida al LSD.¹⁰



Figura 2.1. Flores de *Ipomoea tricolor* cultivar “heavenly blue”.

2.2. Resinas glicosídicas

2.2.1. Generalidades.

Además de servir como combustibles de reserva (almidón, glucógeno y dextrano) o como elementos estructurales (celulosa, quitina, peptidoglucanos), los polisacáridos y oligosacáridos pueden formar glicoconjugados con proteínas (glicoproteínas) y lípidos (glicolípidos), que son utilizados como transportadores de información dentro y fuera de la célula como transporte y localización de organelos, destrucción de proteínas malformadas, eliminación de bacterias o virus, reconocimiento y adhesión celular, entre otros.¹¹

Dentro de los glicolípidos, existen un tipo de moléculas conocidas como resinas glicosídicas, las cuales presentan alto peso molecular y contienen una porción hidrofílica que está compuesta de un núcleo oligosacárido de dos a seis unidades de azúcar, los cuales con frecuencia se encuentran esterificados por ácidos grasos saturados con diferentes longitudes de cadena y una porción hidrofóbica que consiste en una aglicona que está representada por un ácido graso mono o di hidroxilado de 14 o 16 átomos de carbono unidos a través de un éster cíclico intramolecular (Fig. 2.2).¹² Esta diversidad estructural causa que en la mayoría de veces resulte difícil su aislamiento.

Estos carbohidratos complejos se forman mediante enlaces glicosídicos que resultan de la unión covalente entre un hemiacetal (proveniente de un azúcar) y un alcohol (proveniente de otro azúcar) para originar un acetal, el cual es resistente a una hidrólisis básica y no una hidrólisis ácida.

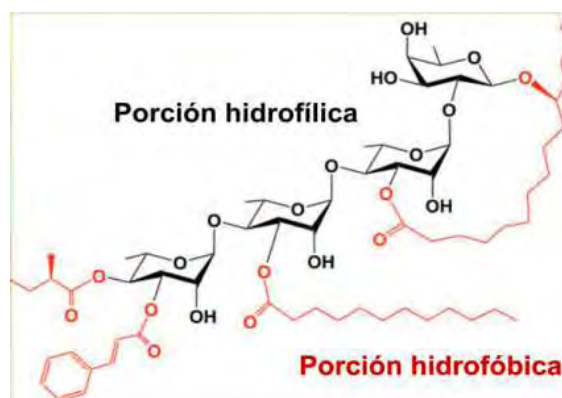


Figura 2.2. Estructura general de un glicolípido.

Los principales azúcares que conforman a las resinas son D-glucosa, L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa y, en 2010, se describió la presencia de la D-xilosa,¹³ todas ellas en su forma de piranósidos¹² (Fig. 2.3); en tanto que los sustituyentes que esterifican los núcleos oligosacáridos, por lo regular, son los residuos de los ácidos acético, propiónico, butírico, isobutírico, 2-metilbutanoico, 3-hidroxi-2-metilbutanoico, tíglico, hexanoico, caproico, decanoico y dodecanoico. En cuanto a la complejidad en su estructura, ésta se debe principalmente a variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas, la secuencia de glicosidación, la posición de lactonización y en el tipo, número y posición de los residuos esterificantes.¹²

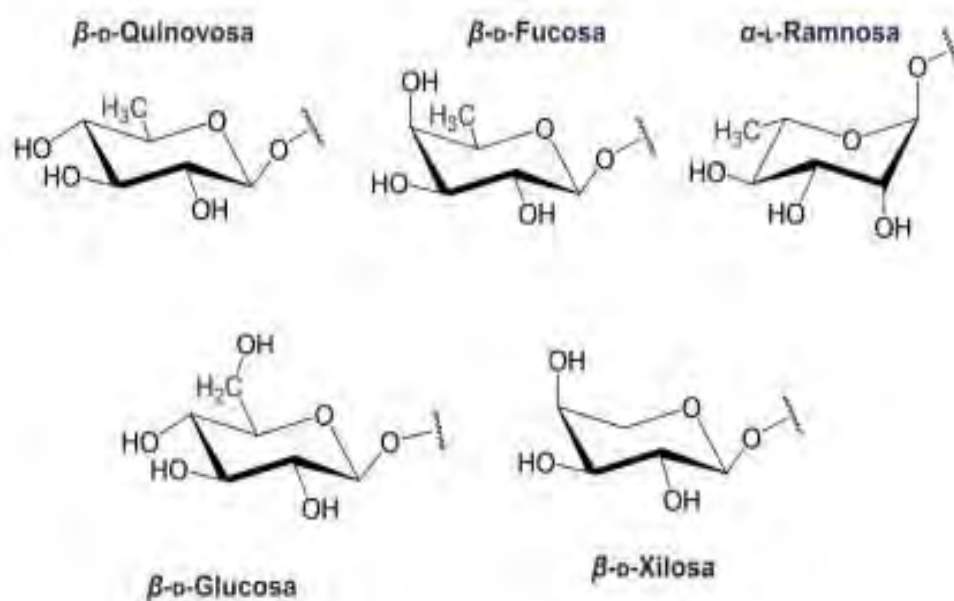


Figura 2.3. Carbohidratos comunes en las resinas glicosídicas.

De acuerdo a su solubilidad, las resinas glicosídicas se clasifican en dos categorías: aquellas que son solubles en éter, conocidas como jalapinas, y aquellas que no lo son, llamadas convolvulinas.¹⁴

2.2.2. Resinas glicosídicas alelopáticas de *Ipomoea tricolor*.

De acuerdo con Pereda-Miranda (1994) se ha demostrado el potencial alelopático de la enredadera *Ipomoea tricolor*, utilizada en la agricultura tradicional como un control de las malas hierbas mediante ensayos de inhibición de la germinación y el crecimiento radicular de malezas (*Amaranthus leucocarpus* y *Echinochloa crus-galli*).^{1,2} El fraccionamiento biodirigido del extracto clorofórmico activo permitió el aislamiento del principio alelopático, el cual resultó ser una mezcla de resinas glicosídicas. La estructura del compuesto mayoritario,¹ la tricolorina A se elucidó como un tetrasacárido del ácido jalapínico como: (11*S*) ácido hidroxihexadecanoico 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-[2-*O*-(2*S*-metilbutiril)-4-*O*-(2*S*-metilbutiril)]-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido-(1,3"-lactona). Bioensayos en cajas de Petri^{1,2} demostraron que el crecimiento radicular de las malezas de prueba se inhibía con valores de IC₅₀ = 12-37 μ M (Fig. 2.4).



Figura 2.4. Efecto de la tricolorina A sobre el crecimiento radicular de *Echinochloa crus-galli*.^{1,2}

La resolución de la compleja mezcla de principios alelopáticos se realizó de forma exitosa mediante la aplicación de HPLC empleando una columna de fase reversa amino (NH₂, columna para carbohidratos)¹⁴ que contiene gel de sílice en donde los grupos silanol residuales se encuentran desactivados por alquilación con ligandos de aminopropilsilano. Las interacciones polares de la columna conjuntamente con las interacciones de fase reversa retienen a los compuestos de naturaleza sacárida y lo resuelve de muchas impurezas. La separación utilizó una fase móvil de agua/acetonitrilo y se utilizó un detector de UV (Fig. 2.5). La fracción mayoritaria

que concentró la actividad biológica permitió el aislamiento de cinco constituyentes mayoritarios, las tricolorinas A-E (Fig. 2.6, 1-5), todas ellos con un núcleo tetrasacárido macrocíclico y con el ácido 11-hidroxihexadecanoico como la aglicona.

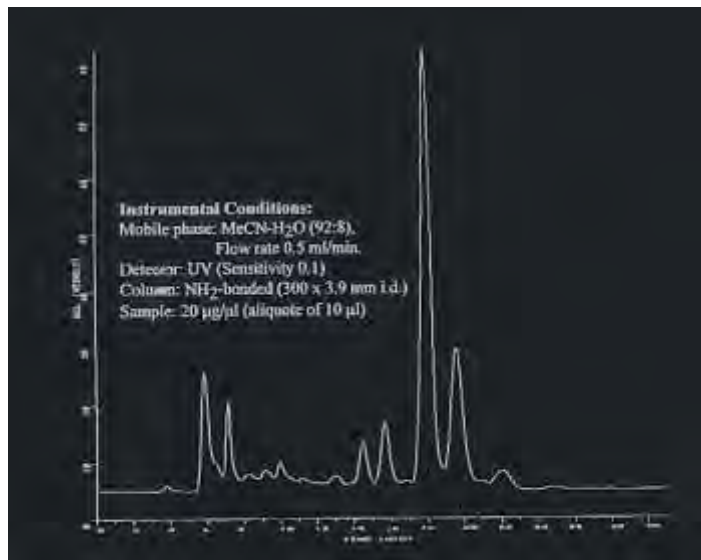


Figura 2.5. Condiciones instrumentales utilizadas en HPLC en fase reversa para la resolución de la fracción alelopática del extracto clorofórmico de *Ipomoea tricolor*: tricolorinas A (t_R 19.7 min), B (t_R 21.7 min), C (t_R 32.0 min), D (t_R 14.6 min) y E (t_R 16.0 min).¹⁴

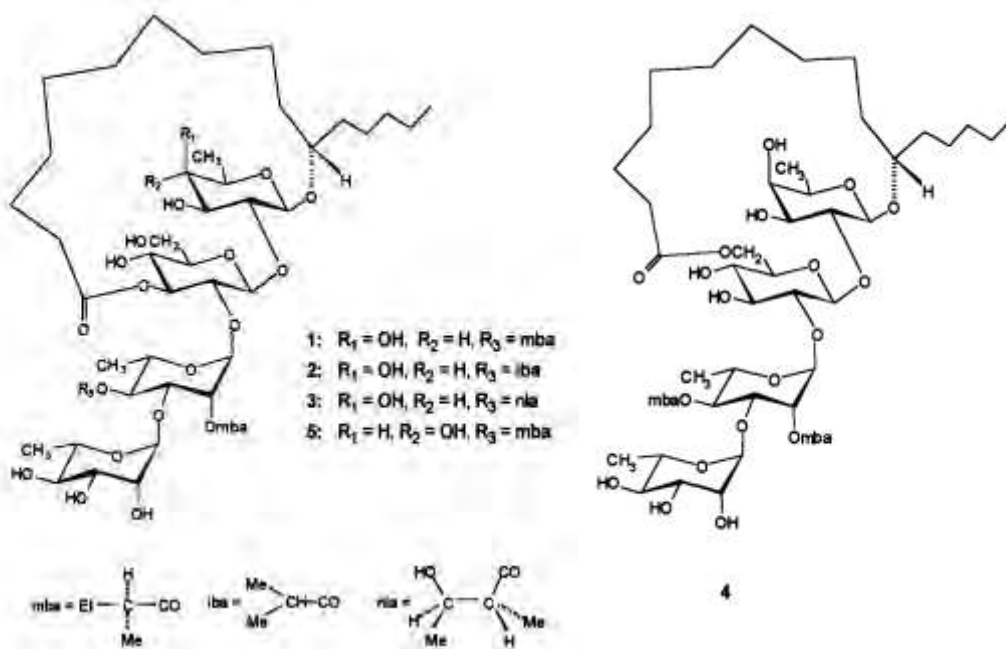


Figura 2.6. Estructura química de las tricolorinas A-E

2.2.3. Separación de resinas mediante HPLC: la modalidad de reciclaje como técnica de purificación.

Las resinas glicosídicas poseen estructuras diversas y se presentan en mezclas complejas de homólogos anfipáticos de polaridad similar, preferentemente solubles en disolventes orgánico próticos como el metanol, lo cual les confiere una mayor dificultad para su separación y purificación por métodos clásicos,¹² sin embargo, la cromatografía de líquidos de alta resolución y sus variantes han resuelto este problema mediante el uso de la técnica de rasurado de pico, corte de núcleo y reciclaje.^{5, 15} El rasurado consiste en la eliminación de las impurezas que acompañan al pico de interés, mientras que el corte de núcleo se basa en la recolección del pico una vez eliminados los contaminantes; por otra parte, el reciclado se utiliza para purificar el núcleo cortado previamente, y para lograrlo se recircula dicho pico tantas veces sea necesario a través de la columna para asegurar la presencia de un analito único, es decir, cromatográficamente homogéneo.¹⁶ A continuación, se describe la instrumentación general que conforma un equipo de HPLC¹⁷ adaptado para el reciclaje de muestra:

1. Uno o varios recipientes que contienen disolventes para la fase móvil.
2. Una columna de separación que contiene el empaque necesario para efectuar la separación deseada.
3. Una bomba para suministrar la fase móvil a la columna. Dicha bomba debe ser capaz de tolerar altas presiones y desgastes, además de proporcionar estabilidad en el flujo para evitar fluctuaciones en la línea base.
4. Válvula de muestreo para inyectar la muestra en el flujo de la fase móvil y que ingrese a la columna.
5. De manera opcional, una precolumna o guardacolumna cuya función es impedir la contaminación de la columna por partículas pequeñas.
6. Un manómetro para monitorear la presión del sistema.

7. Válvula de reciclaje (Fig. 2.7) cuya función es recircular el disolvente con la mezcla de analitos hacia la columna para aumentar el número de platos teóricos y mejorar la separación y purificación.¹⁵
8. Detector.
9. Software especializado para la interpretación de los datos.

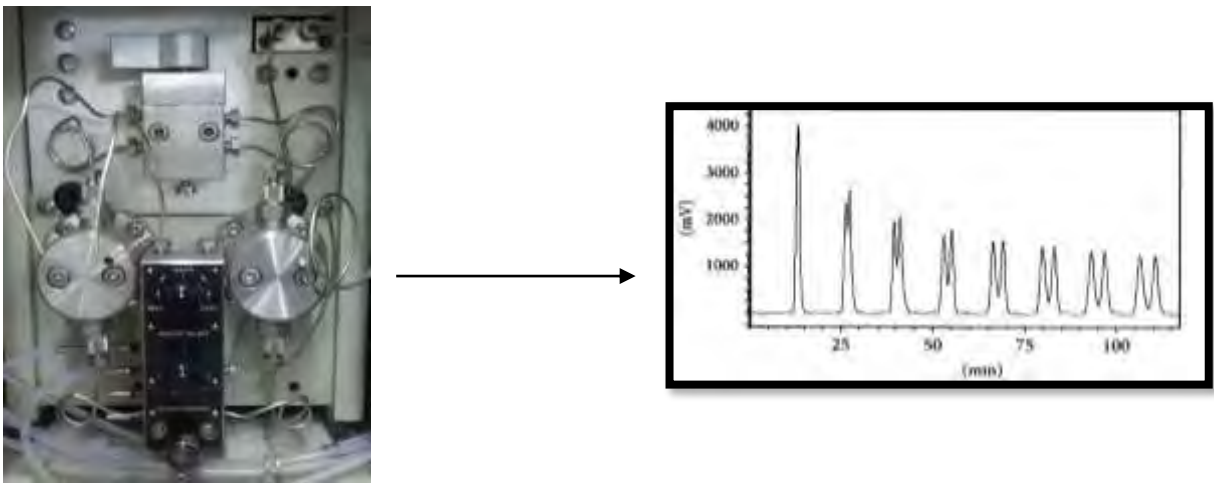


Figura 2.7. Válvula de reciclaje (izquierda) y cromatograma generado mediante reciclaje (derecha) de una muestra conteniendo dos compuestos diastereoisoméricos por HPLC.

2.2.4. Uso de la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (MS) para la elucidación estructural.

Uno de los principales métodos para la elucidación estructural de las resinas glicosídicas involucra el uso de reacciones químicas degradativas, con la posterior identificación de los constituyentes estructurales. Otra aproximación consiste en el uso directo de técnicas espectroscópicas, como la resonancia magnética nuclear, y espectrométricas; ésta última se utiliza para conocer el peso molecular del glicolípido en análisis y, mediante comparación con los datos en la literatura científica, determinar si se trata de un compuesto inédito. Para la determinación del peso molecular se puede utilizar una técnica de ionización suave de alta resolución (FAB, MALDI, ESI) que permite el registro del conjunto isotópico de la molécula a través de la generación de especies protonadas $[M+H]^+$, cationizadas $[M+Na/K]^+$ y desprotonadas $[M-H]^-$ para el establecimiento de la fórmula molecular exacta.¹² FAB-MS en modo negativo se utiliza para registrar el patrón de fragmentación de los compuestos puros, ya que éste es el único procedimiento entre las técnicas de ionización suave que proporciona una secuencia clara de la fragmentación a lo largo del núcleo oligosacárido; de ésta forma, abundan los picos resultantes de la segmentación anomérica en conjunto con los producidos por la eliminación de los residuos esterificantes. En consecuencia, la intensidad de algunos de los iones correspondientes a la molécula desprotonada $[M-H]^-$ es baja.

Dentro de las técnicas espectroscópicas, se cuenta con la resonancia magnética nuclear de 1H y ^{13}C en las modalidades mono y bidimensionales homonucleares y heteronucleares para la elucidación estructural de las resinas glicosídicas. Existen señales diagnósticas en la RMN ^{13}C que indican la presencia de un glucósido, así como el número de unidades sacáridas constitutivas; estas señales que corresponden a los carbonos anoméricos se encuentran presentes alrededor de δ 95-105 ppm y se utilizan como “señales reporteras”¹² para dar inicio a la identificación de cada una de las señales que constituyen las unidades monosacáridas del oligosacárido a través de las conectividades identificadas en los espectros COSY, TOCSY, HSQC y HMBC.¹²

3. HIPÓTESIS.

El potencial antitumoral de la especie vegetal en estudio (*Ipomoea tricolor*) está asociada a la presencia de un alto contenido de principios bioactivos de posible aplicación oncológica ya que las resinas glicosídicas de la familia de las convolvuláceas son glicolípidos anfipáticos que han demostrado ser sustratos para las bombas de eflujo relacionadas con el fenotipo de la resistencia múltiple a fármacos en células procariotas y eucariotas.

4. OBJETIVOS.

General.

Optimizar un procedimiento analítico para la purificación mediante HPLC a nivel preparativo de los glicolípidos constitutivos de las resinas glicosídicas y evaluar su potencial modulador del fenómeno de la resistencia cruzada a fármacos en células resistentes a vinblastina derivadas de carcinoma humano mamario (MCF-7).

Particulares.

- Aplicar una metodología para la separación de los glucósidos presentes en la fracción clorofórmica de las semillas de *Ipomoea tricolor* mediante HPLC a nivel analítico.
- Realizar el escalamiento a nivel preparativo para la recolección de los componentes de la fracción clorofórmica.
- Purificar los componentes mayoritarios mediante la técnica de reciclaje para su posterior elucidación estructural utilizando RMN de ^{13}C y ^1H .
- Evaluar la citotoxicidad y el potencial de modulación de las resinas purificadas en líneas celulares de carcinoma de mama, adenocarcinoma de ovario, carcinoma de cérvix y carcinoma de colon.

5. PARTE EXPERIMENTAL.

5.1. Material vegetal.

Semillas de *Ipomoea tricolor* (“Heavenly blue morning glory”, ítem # 01049-PK-P1) fueron adquiridas directamente de la compañía Park Seed (3507 Cokesbury Road, Hodges, South Carolina, 29653, EE. UU.) en enero de 2010.

5.2. Extracción.

Las semillas (167.9 g) se pulverizaron en un molino para granos de café de uso doméstico y se depositaron en un matraz Erlenmeyer conteniendo 2.5 L de hexano para llevar a cabo una extracción durante 3 días. Pasado este tiempo, se filtró el disolvente y se agregó cloroformo y una mezcla de cloroformo-metanol (1:1) para obtener los siguientes extractos:

| Número | Descripción |
|--------|-------------------------------------|
| 1 | CHCl ₃ |
| 2 | CHCl ₃ -MeOH |
| 3 | CHCl ₃ -MeOH precipitado |

5.3. Selección de extracto y pruebas de solubilidad.

Se utilizaron los tres extractos de las semillas, decidiendo trabajar con aquellos que mostraran la presencia de resinas glicosídicas, las cuales se identificaron mediante una cromatografía en capa fina. Se utilizaron placas de 4 × 10 cm recubiertas de gel de sílice F₂₅₄ Merck y fueron reveladas mediante el rociado homogéneo de una mezcla de H₂SO₄-Ce₂(SO₄)₄ como agente cromógeno; enseguida se sometieron a calentamiento (80 °C). El extracto que presentó bandas con una coloración amarilla y una similitud cromatográfica con una muestra estándar de la tricolorina A,¹ se eligió como el extracto de trabajo inicial. De esta forma, se realizaron pruebas de solubilidad utilizando diferentes sistemas de disolventes constituidos por mezclas de agua, acetonitrilo y metanol en diversas proporciones.

5.4. Selección de las condiciones cromatográficas.

Se preparó la muestra disolviéndola en su totalidad en el mejor disolvente para su posterior análisis mediante HPLC a nivel analítico y determinar la mejor fase móvil que permitiera la resolución de la mezcla. Cada una de las separaciones se realizó por triplicado en un mismo día. En el Cuadro 5.2 se detallan las condiciones utilizadas para la separación inicial.

| Cuadro 5.2. Condiciones de separación por HPLC fase reversa nivel analítico. | | |
|---|--------------|------------------------------|
| Columna | Flujo | Fase Móvil |
| SymmetryPrep™ C ₁₈ 5μ 4.6 x 250 mm | 0.4 mL/min | MeOH:H ₂ O (19:1) |
| | | MeOH:H ₂ O (4:1) |
| | | ACN:H ₂ O (9:1) |
| | | ACN:H ₂ O (4:1) |

5.5. Generación de perfiles cromatográficos.

Establecidas las condiciones iniciales de separación, éstas se aplicaron al resto de los extractos, utilizando dos muestras de referencia denominadas TAB y TAC (Cuadro 5.3). Se compararon sus perfiles cromatográficos y se eligió de forma definitiva a la fracción 1 como la mejor para escalar la separación a nivel preparativo debido a la presencia de una mayor cantidad de picos diferenciales; se llevó a cabo el corte de todos los picos presentes en dicho cromatograma (12 picos), se recolectaron, se eliminó el disolvente, se pesaron y se registró la cantidad obtenida de cada uno de ellos.

| Cuadro 5.3. Fracciones y estándares de <i>Ipomoea tricolor</i> . | |
|---|-------------------------------------|
| Número | Descripción |
| 1 | CHCl ₃ |
| 2 | CHCl ₃ -MeOH |
| 3 | CHCl ₃ -MeOH precipitado |
| TAB | Mezcla de tricolorinas |
| TAC | Mezcla de tricolorinas |

5.6. Separación mediante HPLC.

Las condiciones de separación en fase reversa a nivel preparativo fueron las siguientes:

Columna SymmetryPrep™ C-18; 7 μm 19 \times 300 mm

Flujo: 8 mL/min

Detector: Índice de refracción.

5.7. Análisis por UPLC-MS para los cortes realizados a nivel preparativo.

Cada uno de los cortes se analizaron por UPLC-MS para determinar el peso de los analitos mayoritarios presentes en cada una de ellas. Se empleó la técnica de ionización mediante electrospray en un equipo Waters Acquity UHPLC-H class system (Waters Co., Milford, MA, USA) equipado con un detector de arreglo de fotodiodos y acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo simple SQD2 ajustado para coleccionar datos de 150 a 2000 m/z . El voltaje para ambos modos de ionización positivo y negativo fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador a 25 bar junto con un gas auxiliar a 5 bar. Para el segmento UPLC, se utilizó una columna BEH C-18 (2.1 \times 100 mm \times 1.7 μm); la velocidad de flujo se llevó a 0.3 mL/min con fase móvil que consistió en $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$ previamente acidificada con ácido fórmico 1%, comenzando con un 15% de CH_3CN hasta incrementarlo linealmente a 100% en un lapso de 8 minutos. Para el detector de fotodiodos las condiciones fueron ajustadas para un barrido de 200-500 nm con 4 nm de resolución. Para la preparación de la muestra, ésta se disolvió en MeOH para obtener una concentración final de 2 mg/mL con un volumen de 150 μL . Se determinó la presencia de compuestos conocidos o alguna resina novedosa mediante los valores de m/z para las especies $[\text{M}+\text{Na}]^+$, $[\text{M}+\text{H}]^+$, $[\text{M}+\text{EtO}]^-$ y $[\text{M}-\text{H}]^-$ en el espectro de masas generado. Una vez seleccionados los cortes de interés, se procedió con la purificación de cada uno de ellos utilizando la técnica de HPLC y la modalidad de reciclaje, tomándose en cuenta los tiempos de elución que mantuvieron su homogeneidad cromatográfica durante seis ciclos continuos, colectándose para su posterior análisis espectroscópico mediante RMN de ^1H y ^{13}C .

5.8. *Análisis espectrométrico de alta resolución para la mezcla F7.*

Se utilizó un equipo LQT XL Orbitrap (Thermo Fisher) en el modo de infusión directa: voltaje de nebulización, 6 KV; temperatura del capilar, 350 °C; voltaje del capilar, 35 V; volumen de muestra: 10 µL de la solución del compuesto puro preparada conforme se describió en la sección anterior; fase, mezcla de MeOH:H₂O (9.5:0.5) suplementado con ácido fórmico (0,1%).

5.9. *Líneas y cultivos celulares.*

La línea celular MCF-7 parental derivada de cáncer de mama fue obtenida de la American Type Culture Collection (ATCC HTB-22). La contraparte resistente MCF-7/Vin se desarrolló a través de exposición continua a vinblastina. Las células se mantuvieron en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de SFB a 37 °C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 100% de humedad. Las células MCF-7/Vin⁺ se cultivaron en medio conteniendo 0.192 µg/mL de vinblastina. También, se mantuvieron células MCF-7/Vin⁻ en medio libre de vinblastina.¹⁸

5.10. *Citotoxicidad.*

La citotoxicidad y el factor de reversión de las resinas glicosídicas se determinaron con el método de la sulforodamina B.¹⁹ Las células se cosecharon en la fase logarítmica de su crecimiento y se trataron por triplicado con varias concentraciones de los compuestos de prueba (0.2 – 25 µg/mL) e incubadas por 72 h a 37 °C en atmósfera con 100% humedad y 5% de CO₂. Los valores se estimaron a partir de una curva semilogarítmica de la concentración del fármaco (µg/mL) contra el porcentaje de inhibición de crecimiento.¹⁸

5.11. *Ensayos de modulación.*

Las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin fueron sembradas en placas de 96 pozos y tratadas con varias concentraciones de vinblastina (0.00064 – 10 µg/mL) en presencia o ausencia de glicolípidos a 25 y 5 µg/mL por 72 h. El factor de reversión (FR, como un parámetro de potencia) se calculó dividiendo la CI₅₀ de la vinblastina entre la CI₅₀ de la vinblastina en presencia del compuesto de prueba.¹⁸

6. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

6.1. Separación por HPLC.

Al comparar cada uno de los extractos mediante sus R_f en cromatografía en capa fina contra un control (tricolorina A, R_f 0.60), se determinó que el extracto clorofórmico contenía resinas glicosídicas lipofílicas de menor polaridad que la tricolorina A (Fig. 6.1)

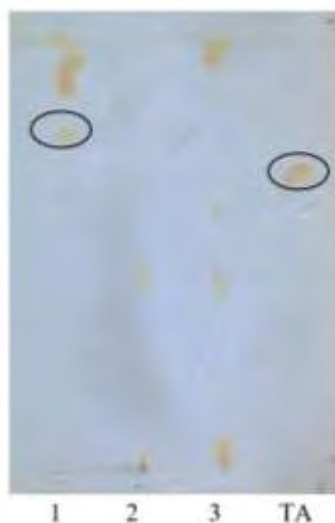


Figura 6.1. Cromatografía en capa fina de los extractos orgánicos de las semillas.
Extracto 1 vs muestra de referencia (tricolorina A).

A continuación, se realizaron pruebas de solubilidad para el extracto clorofórmico (Extracto 1) bajo diferentes condiciones; los resultados fueron los siguientes:

| Cuadro 6.1. Pruebas de solubilidad para el extracto 1. | | | |
|--|------------------|-------------|--|
| Disolvente | Proporción (v/v) | Solubilidad | Observación |
| Metanol | 100 | -- | Precipitado blanquecino |
| Acetonitrilo | 100 | + | Mejor disolución |
| Metanol:Acetonitrilo | 1:1 | - | Separación en dos fases |
| Agua | 100 | - | Líquido turbio ligeramente amarillento |
| Agua:Acetonitrilo | 1:1 | - | Líquido turbio blanquecino. |

-- Insoluble; - Poco soluble; + Soluble.

Con base en estos ensayos, se decidió disolver la muestra en ACN 100% y prepararla a una concentración de 3.0 mg en 100.0 μ L para ser analizada por HPLC. Para optimizar el método de separación, se modificaron los siguientes parámetros instrumentales:

- Flujo de la fase móvil. Este parámetro aumenta o disminuye el tiempo de análisis.
- Composición de la fase móvil. Esta variable modifica la polaridad del disolvente y, por tanto, el poder de elución (y las interacciones) para las sustancias a analizar, que finalmente también se traduce en una mayor o menor eficiencia en la separación.
- Resolución del detector. Al aumentarla, el detector es capaz de distinguir la separación entre dos picos cromatográficos.

En el Cuadro 6.2 se resumen los resultados de los diferentes análisis realizados (Figs. 6.2 y 6.3), así como el número de picos identificados:

| Cuadro 6.2. Resultados del análisis por HPLC del extracto 1. | | | | |
|---|-------------------|-------------------------|--------------------------------|-----------------------------|
| Fase Móvil | Resolución | Picos detectados | Tiempo de corrida (min) | Detección de picos |
| MeOH:agua (19:1) | 512 | 12 | 65 | Regular |
| MeOH:agua (4:1) | 512 | 3 | 70 | Pésima |
| ACN:agua (9:1) | 512 | 12 | 55 | Buena |
| | 1024 | 16 | 55 | Muy buena. Fig. 6.2. |
| ACN:agua (4:1) | 1024 | 16 | 60 | Buena. Fig. 6.3. |

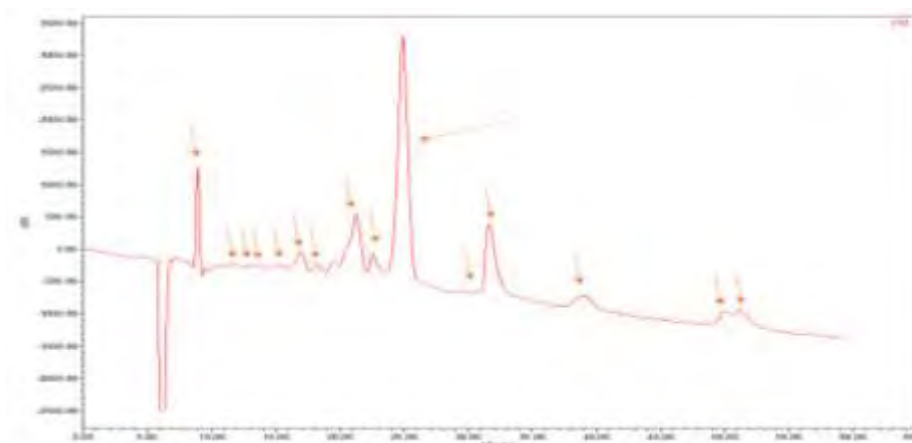


Figura 6.2. Cromatograma extracto 1. Fase móvil, acetonitrilo:agua 9:1. Picos detectados: 16.

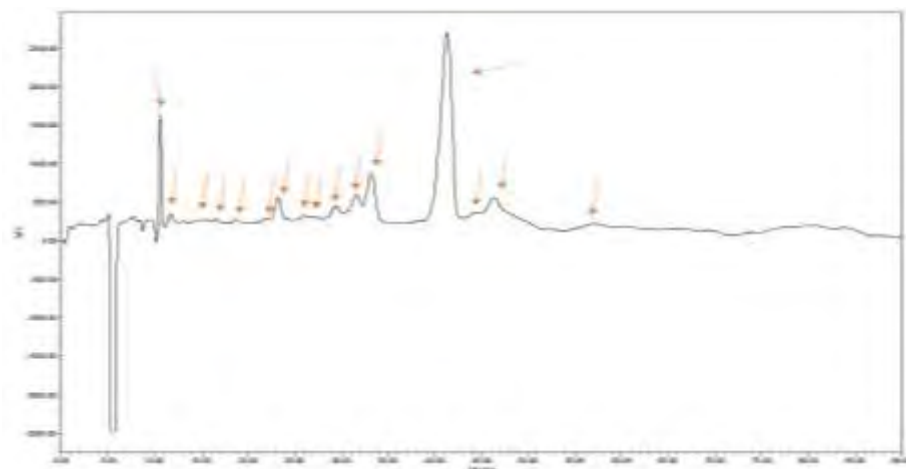


Figura 6.3. Cromatograma extracto 1. Fase móvil, acetonitrilo:agua 4:1. Picos detectados: 16.

Tomando en cuenta la cantidad de picos detectados, su resolución, así como el tiempo de análisis, se determinó que la mejor fase móvil para llevar a cabo la separación era la constituida por ACN:agua en proporción 9:1. Esta fase se utilizó para la generación del resto de los perfiles cromatográficos.

6.2. Escalamiento a nivel preparativo.

A continuación, se ilustran los perfiles cromatográficos para las diferentes fracciones (Fig. 6.4-6.6), señalando con flechas los picos diferenciados, es decir, aquellos que están presentes sólo en las fracciones de las semillas de *Ipomoea tricolor* respecto a las referencias (partes aéreas).

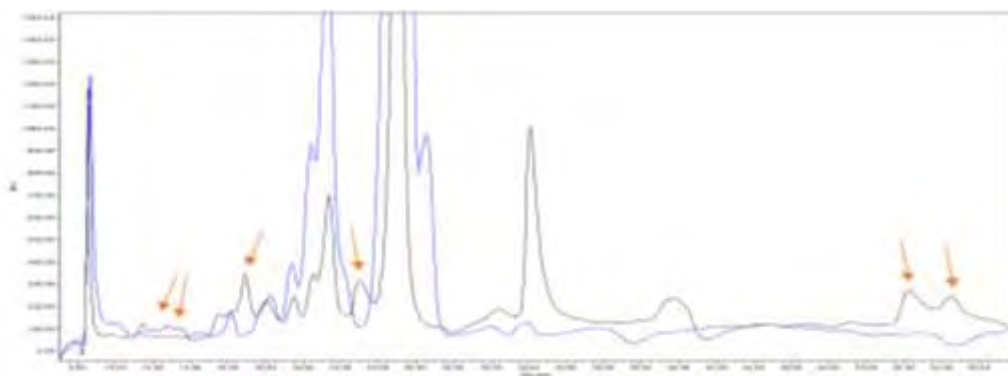


Figura 6.4. Cromatograma comparativo. Extracto 1 (Trazo negro) vs TAB (Trazo azul).

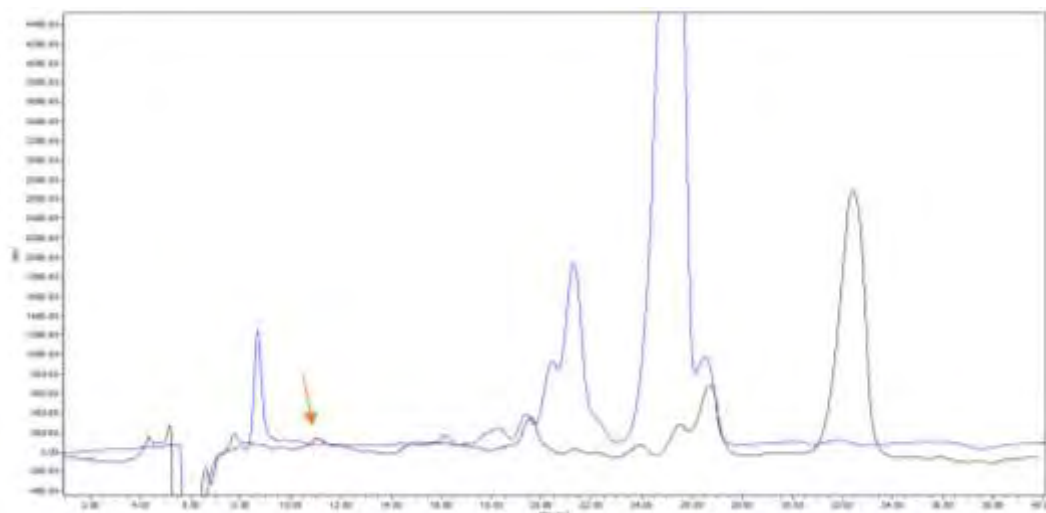


Figura 6.5. Cromatograma comparativo. Extracto 2 (Trazo negro) vs TAB (Trazo azul).

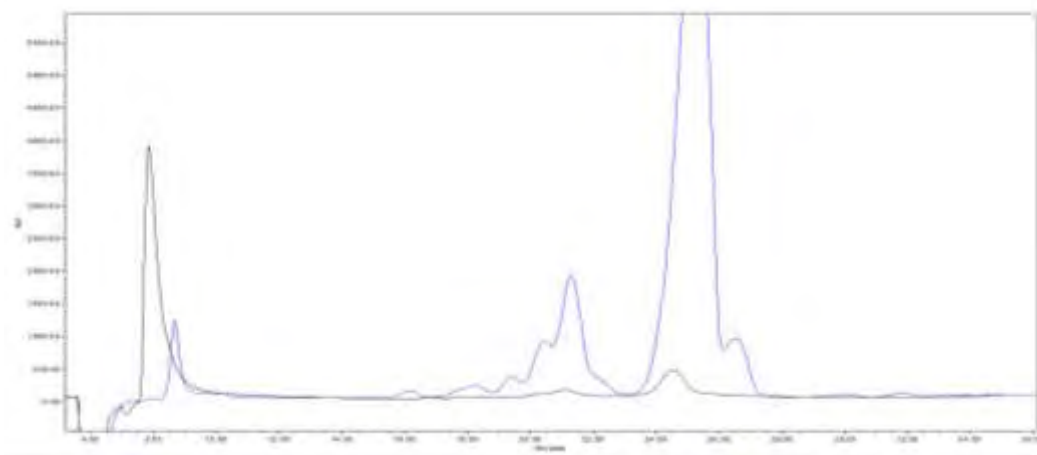


Figura 6.6. Cromatograma comparativo. Extracto 3 (Trazo negro) vs TAB (Trazo azul).

Al realizar un comparativo del número de picos adicionales para cada uno de los extractos respecto a la referencia TAB (Cuadro 6.3), se determinó que el extracto 1 presenta un mayor número de picos, por lo que se decidió trabajar con esta muestra a nivel preparativo.

Cuadro 6.3. Picos distintivos en cada extracto.

| Extracto | Número de picos |
|----------|-----------------|
| 1 | 5 |
| 2 | 1 |
| 3 | 0 |

El cromatograma a nivel preparativo se muestra a continuación y se decidió realizar doce cortes, de los cuales en el Cuadro 6.4 se indica la masa obtenida, así como los pesos moleculares obtenidos por UPLC-ESI-MS de acuerdo con los procedimientos descritos previamente para las resinas glicosídicas de *Ipomoea alba*.²⁰ Se seleccionaron e identificaron los picos que tuvieran una mayor probabilidad de presentar un compuesto abundante en función de su rendimiento para evaluar el potencial modulador de la resistencia a fármacos en una línea de células tumorales resistentes a diversos agentes terapéuticos (MCF-7, carcinoma de mama).

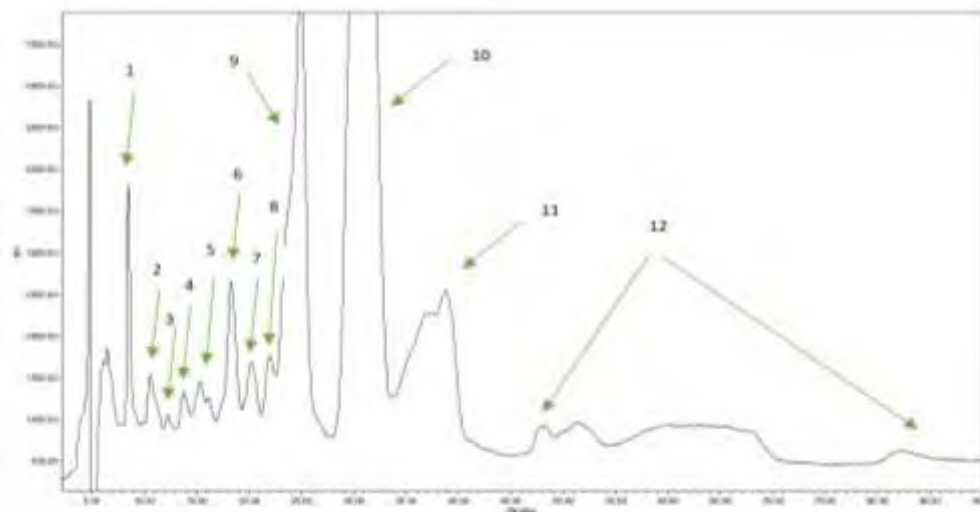


Figura 6.7. Cromatograma del extracto 1 en HPLC a nivel preparativo.

La presencia de compuestos conocidos o alguna resina novedosa se estableció mediante los valores de m/z para las especies $[M+Na]^+$, $[M+H]^+$, $[M+EtO]^-$ y $[M-H]^-$ en el espectro de masas generado mediante electrospray en las modalidades positiva²⁰ para la detección de la molécula cationizada $[M+Na]^+$ o de la molécula desprotonada $[M-H]^-$ en el modo negativo (Cuadro 6.4). En el modo negativo se observó el aducto con EtOH que debió ocluirse con la muestra durante los procesos de purificación.

Una vez que fueron seleccionados los cortes para su purificación, se procedió con el reciclaje mediante HPLC a nivel preparativo. Los tiempos de elución que mantuvieron su homogeneidad cromatográfica durante seis ciclos continuos se colectaron y fueron analizados mediante la técnica espectroscópica de RMN 1H y ^{13}C .

| Cuadro 6.4. Masa recolectada de cada corte y análisis por UPLC-ESI-MS. | | | | | | | | |
|--|-----------|---------------------------|---|--------------------------|----------------------------|---------------------------|-----------------------|--|
| Corte | Peso (mg) | Tiempo de retención (min) | Peso (uma) | [M-H] ⁻ (m/z) | [M+EtO] ⁻ (m/z) | [M+Na] ⁺ (m/z) | ¿Tricolorina posible? | |
| F1 | 7.04 | 8.45 | 708 | 707 | 753 | ND | G | |
| F2 | 4.47 | 10.57 | 708 | 707 | 753 | ND | F | |
| F3 | 3.20 | 12.23 | 808 | 807 | 853 | 831 | Nuevo | |
| F4 | 5.91 | 13.73 | 1038 | ND | 1083 | 1061 | Isómero C | |
| F5 | 5.93 | 15.71 | 1038 | ND | ND | 1061 | Isómero C | |
| F6 | 13.23 | 18.30 | 1038 | 1037 | 1083 | ND | C | |
| F7 | 8.64 | 20.25 | 994 | ND | ND | 1017 | Novedoso | |
| | | | 1008 | 1007 | 1053 | 1031 | Isómero B | |
| F8 | 8.44 | 21.98 | 1008 | 1007 | 1053 | 1031 | Isómero B | |
| F9 | 39.57 | 24.69 | 1008 | 1007 | 1053 | 1031 | B | |
| F10 | 95.01 | 31.03 | 1022 | ND | ND | ND | A | |
| F11 | 21.87 | 33.45-54.03 | No corresponden a resinas glicosídicas. | | | | | |
| F12 | 37.94 | 54.57-60.00 | | | | | | |
| * ND ion no detectado | | | | | | | | |

6.3. Reciclaje y elucidación estructural del pico mayoritario (F10 → P10).

El siguiente paso consistió en reciclar el corte mayoritario F10 para obtener un pico totalmente puro denominado P10 (Fig. 6.8), y que permitiera el adiestramiento en el empleo de las técnicas de rasurado y corte de núcleos acopladas al reciclaje de la muestra en HPLC.^{5, 16}

Este producto se obtuvo con homogeneidad cromatográfica como un polvo blanco cuyo punto de fusión corresponde a 120-122 °C y rotación óptica de $[\alpha]_D -30$; éste se analizó mediante resonancia magnética nuclear de ¹H (Fig. 6.9) y ¹³C (Fig. 6.10) para la elucidación de la estructura molecular. La comparación de los desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) con los previamente descritos para la tricolorina A (Cuadro 6.5) permitieron su identificación. Además, este tetrasacárido también representa el constituyente mayoritario de las semillas de *Ipomoea tricolor*.¹

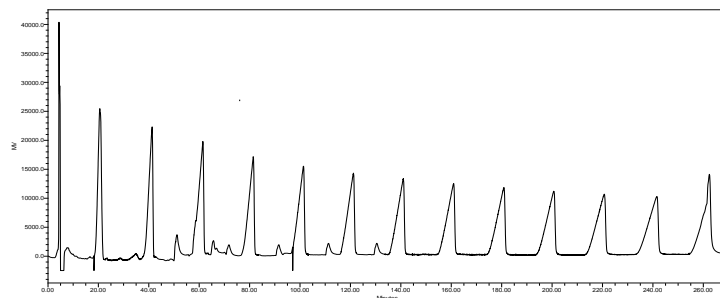


Figura 6.8. Cromatograma de reciclaje de F10 y obtención de P10. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C₁₈: 7 μm 19 × 300 mm; flujo: 10 mL/min; fase: ACN (100%); detector: índice de refracción.

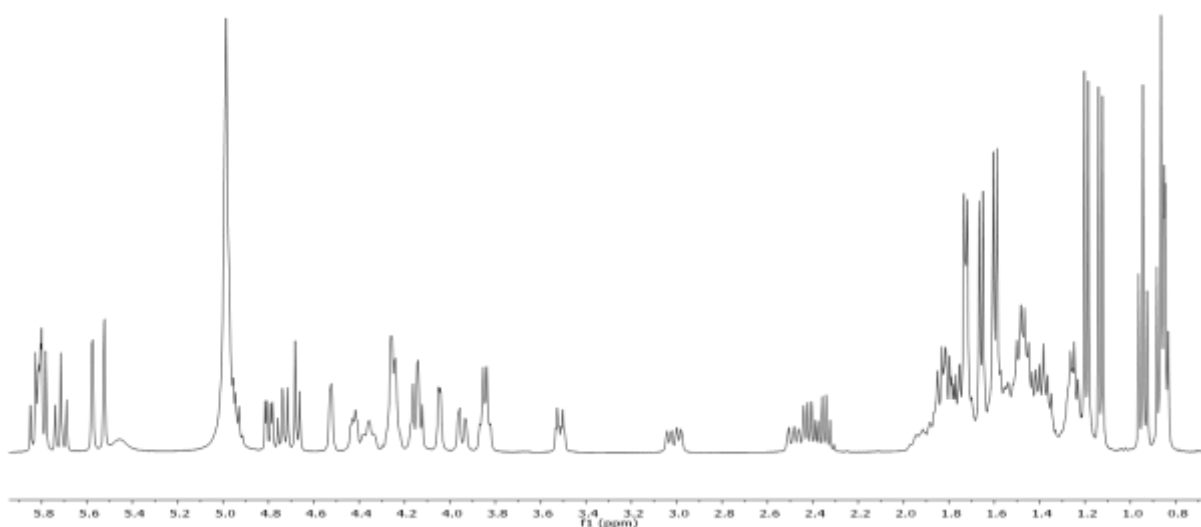


Figura 6.9. Espectro de RMN ¹H para P10 (400 MHz, piridina-*d*₅).

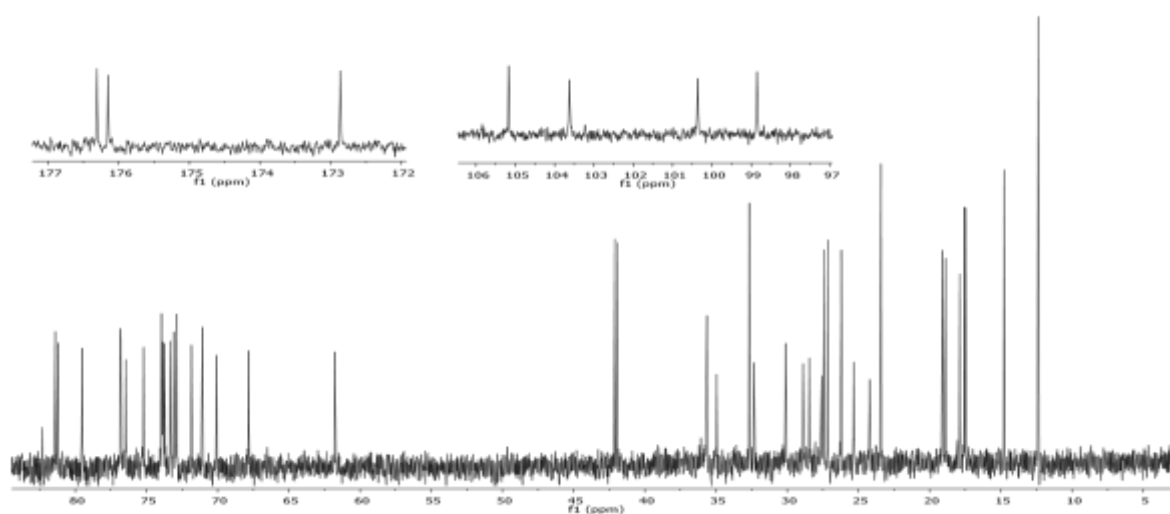


Figura 6.10. Espectro de RMN ¹³C para P10 (100 MHz, piridina-*d*₅)

Cuadro 6.5. Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina A y P10.

| Unidad | Datos descritos por Pereda (1994) ¹⁷ | | | | Resultados obtenidos | | | |
|---------------|---|----------------------|---------------|---------------|-----------------------|----------------------|---------------|---------------|
| | ¹³ C (ppm) | ¹ H (ppm) | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) | ¹³ C (ppm) | ¹ H (ppm) | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) |
| Fuc-1 | 103.09 | 4.68 | d | 7.8 | 103.62 | 4.67 | d | 7.80 |
| 2 | 74.62 | 4.78 | dd | 7.8, 8.0 | 75.21 | 4.74 | dd | 7.88, 9.24 |
| 3 | 76.16 | 4.26-4.28 | m | - | 76.79 | 4.24-4.29 | m | - |
| 4 | 73.12 | 4.06 | d | 3.2 | 73.73 | 4.05 | d | 2.80 |
| 5 | 71.24 | 3.84-3.86 | m* | - | 71.84 | 3.85 | dd | 6.08, 12.52 |
| 6 | 17.24 | 1.6 | d | 6 | 17.89 | 1.60 | d | 6.36 |
| Glu-1 | 99.76 | 5.81 | d | 7.2 | 100.36 | 5.79 | d | 7.44 |
| 2 | 80.6 | 4.15 | dd | 7.2, 8.0 | 81.21 | 4.16 | d* | - |
| 3 | 78.96 | 5.85 | - | - | 79.53 | 5.80-5.84 | m* | - |
| 4 | 69.62 | 4.38 | dd | 9.3 | 70.09 | 4.36 | dd | 8.72 |
| 5 | 76.25 | 3.5 | dt | 1.9, 9.3 | 76.83 | 3.51 | dt | 3.04, 9.72 |
| 6 | 61.31 | 3.93 | dd | 1.9, 11.0 | 61.76 | 4.14 | dd | 7.72, 8.76 |
| | | 4.16 | m* | - | | 3.95 | dd | 2.12, 11.56 |
| Ram-1 | 98.2 | 5.58 | d | 1.1 | 98.85 | 5.58 | d | 0.96 |
| 2 | 72.74 | 5.85 | m* | - | 73.33 | 5.80-5.84 | m* | - |
| 3 | 75.84 | 4.81 | dd | 3.0, 9.9 | 76.46 | 4.80 | dd | 3.24, 9.92 |
| 4 | 73.3 | 5.74 | dd | 9.9 | 73.94 | 5.72 | t | 9.90 |
| 5 | 67.23 | 4.98 | dq | 6.0, 9.9 | 67.82 | 4.94 | dd | 10.08, 6.10 |
| 6 | 18.25 | 1.68 | d | 6 | 19.10 | 1.66 | d | 6.20 |
| Ram'-1 | 104.49 | 5.54 | d | 1 | 105.17 | 5.52 | d | 1.20 |
| 2 | 72.25 | 4.55 | dd | 1.0, 3.0 | 72.88 | 4.52 | s | - |
| 3 | 72.46 | 4.44 | dd | 3.0, 10.0 | 73.07 | 4.42 | dd | 3.16, 8.4 |
| 4 | 73.34 | 4.26-4.28 | m* | - | 73.87 | 4.24-4.29 | m* | - |
| 5 | 70.44 | 4.26-4.28 | m* | - | 71.08 | 4.24-4.29 | m* | - |
| 6 | 18.48 | 1.72 | d | 6 | 18.88 | 1.73 | d | 5.64 |

*Picos sobrepuestos.

6.4. Reciclaje y elucidación estructural de P6.

Como resultado del proceso de reciclaje del corte F6 (Fig. 6.11), se obtuvo un polvo blanco cuyo punto de fusión es de 122-124 °C y su rotación óptica es de $[\alpha]_D -29$; éste se analizó mediante resonancia magnética nuclear de ^1H (Fig. 6.12) y ^{13}C (Fig. 6.13) para la elucidación de su estructura. La comparación de los desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) permitieron la identificación de este segundo constituyente mayoritario P6 de las semillas como la tricolorina C (Cuadro 6.6), la cual fue previamente descrita por Bah y Pereda-Miranda.¹⁴

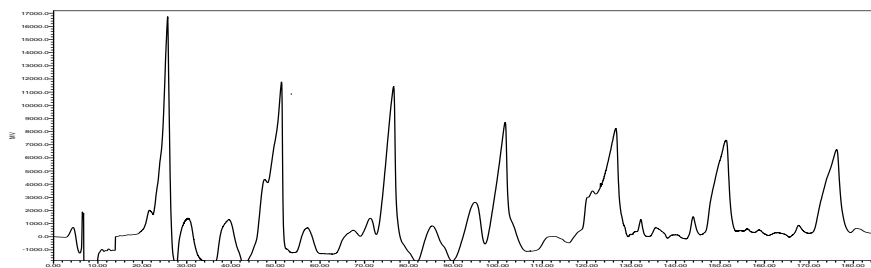


Figura 6.11. Cromatograma de reciclaje de F6 y obtención de P6. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C18: 7 μm 19 \times 300 mm; flujo: 6 mL/min; fase: ACN:Agua (9:1); detector: índice de refracción.

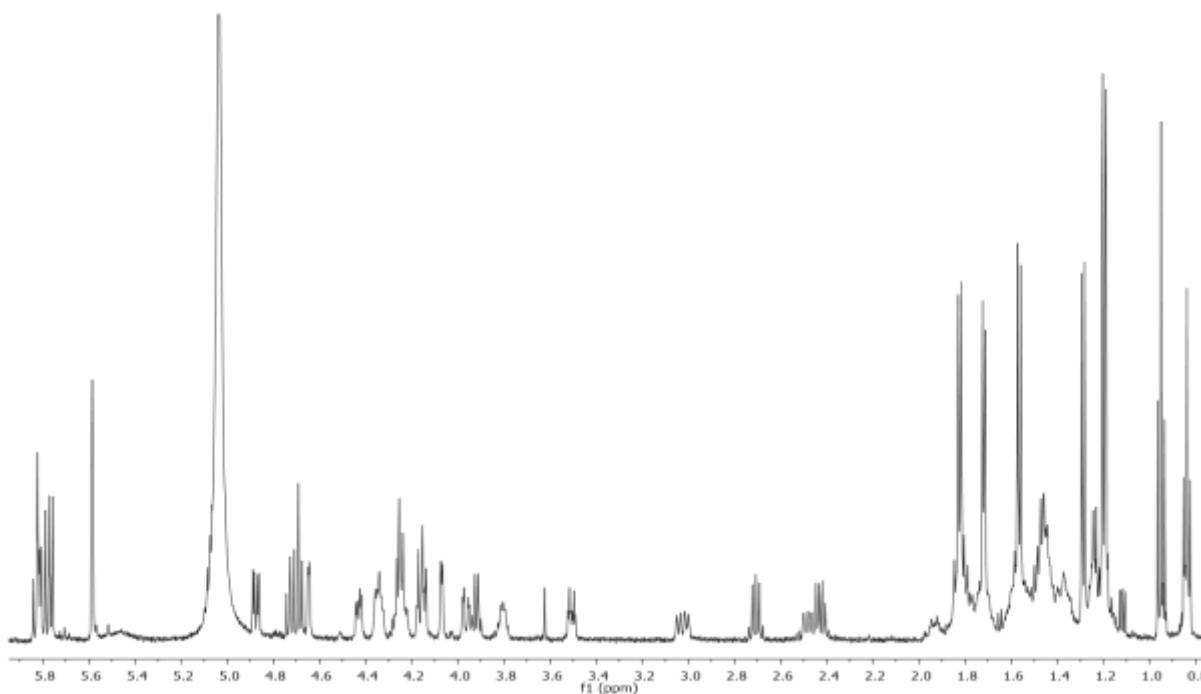


Figura 6.12. Espectro de RMN ^1H para P6 (500 MHz, piridina- d_5).

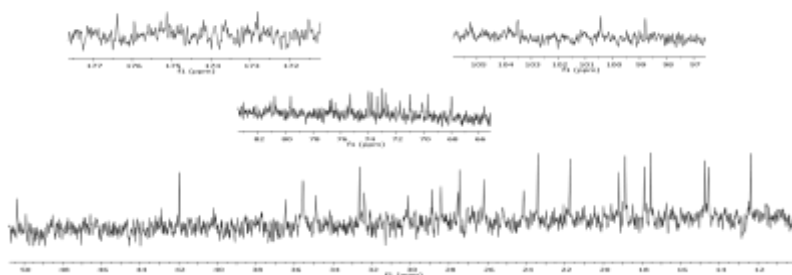


Figura 6.13. Espectro de RMN ^{13}C para P6 (125 MHz, piridina- d_5).

| Cuadro 6.6. Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina C y P6. | | | | | | | | |
|--|---|------------------|---------------|-----------|-----------------------|------------------|---------------|------------|
| Unidad | Datos reportados por Bah (1996) ¹⁷ | | | | Resultados obtenidos | | | |
| | ^{13}C (ppm) | ^1H ppm | Tipo de señal | J (Hz) | ^{13}C (ppm) | ^1H ppm | Tipo de señal | J (Hz) |
| Fuc-1 | 103.00 | 4.63 | d | 7.90 | 103.50 | 4.68 | d | 7.70 |
| 2 | 74.80 | 4.68 | dd | 7.9, 8.4 | 75.31 | 4.70 | dd | 7.75, 9.0 |
| 3 | 76.10 | 4.25-4.35 | m* | - | 76.63 | 4.35-4.32 | m* | - |
| 4 | 73.20 | 4.02 | d | 3.10 | 74.01 | 4.07 | d | 3.05 |
| 5 | 71.20 | 3.87 | q | 6.40 | 71.72 | 3.91 | q | 6.50 |
| 6 | 17.30 | 1.51 | d | 6.40 | 17.89 | 1.56 | d | 6.45 |
| Glu-1 | 99.90 | 5.71 | d | 7.40 | 100.43 | 5.76 | d | 7.35 |
| 2 | 80.30 | 4.10 | dd | 7.4, 9.0 | 80.78 | 4.15 | dd | 7.5, 8.75 |
| 3 | 79.10 | 5.77 | dd | 9.0, 9.0 | 79.62 | 5.84-5.80 | m* | - |
| 4 | 69.60 | 4.25-4.34 | m* | - | 71.01 | 4.35-4.32 | m* | - |
| 5 | 76.20 | 3.47 | dt | 2.7, 9.7 | 76.77 | 3.50 | dt | 3.15, 9.8 |
| 6 | 61.30 | 4.10 | m* | - | 61.81 | 4.17-4.13 | m* | - |
| | | 3.93 | dd | 2.7, 11.6 | | 3.96 | dd | 2.6, 11.75 |
| Ram-1 | 98.20 | 5.53 | s* | - | 98.78 | 5.58 | s* | - |
| 2 | 72.80 | 5.77 | m* | - | 73.42 | 5.84-5.76 | m* | - |
| 3 | 75.80 | 4.82 | dd | 3.3, 9.8 | 76.41 | 4.87 | dd | 3.3, 9.8 |
| 4 | 73.40 | 5.73 | dd | 9.8, 9.8 | 73.79 | 5.84-5.76 | m* | - |
| 5 | 67.50 | 4.99 | dq | 6.2, 9.8 | 67.99 | 5.09-5.06 | m* | - |
| 6 | 18.60 | 1.77 | d | 6.20 | 19.20 | 1.82 | d | 6.30 |
| Ram'-1 | 104.60 | 5.53 | s* | - | 105.23 | 5.58 | s* | - |
| 2 | 72.20 | 4.59 | dd | 1.9, 3.3 | 72.78 | 4.64 | dd | 1.4, 3.25 |
| 3 | 72.50 | 4.37 | dd | 3.3, 8.5 | 73.05 | 4.43 | dd | 3.75, 8.9 |
| 4 | 73.50 | 4.17-4.24 | m* | - | 73.97 | 4.35-4.32 | m* | - |
| 5 | 69.20 | 4.17-4.24 | m* | - | 69.74 | 4.35-4.32 | m* | - |
| 6 | 18.30 | 1.67 | d | 5.60 | 18.80 | 1.71 | d | 5.70 |

*Picos sobrepuestos

6.5. Reciclaje y elucidación estructural del corte F1.

Al reciclar el corte F1 (Fig. 6.14), se obtuvo un polvo blanco cuya rotación óptica corresponde a $[\alpha]_D -42$ y presentó un punto de fusión de 98-100 °C; posteriormente se analizó por resonancia magnética nuclear para su elucidación estructural (Fig. 6.15). La comparación de los desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) determinó que la molécula P1 corresponde a la tricolorina G (Cuadro 6.7).¹⁷ La asignación de los desplazamientos de ^{13}C se realizó de manera indirecta utilizando el espectro bidimensional HSQC.

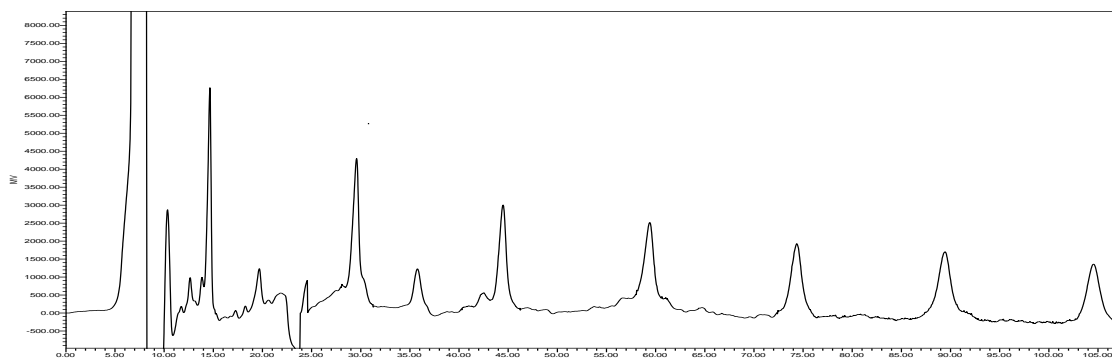


Figura 6.14. Cromatograma de reciclaje de F1 y obtención de P1. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C18: 7 μm 19 \times 300 mm; flujo: 6 mL/min; fase: ACN:Agua (9:1); detector: índice de refracción.

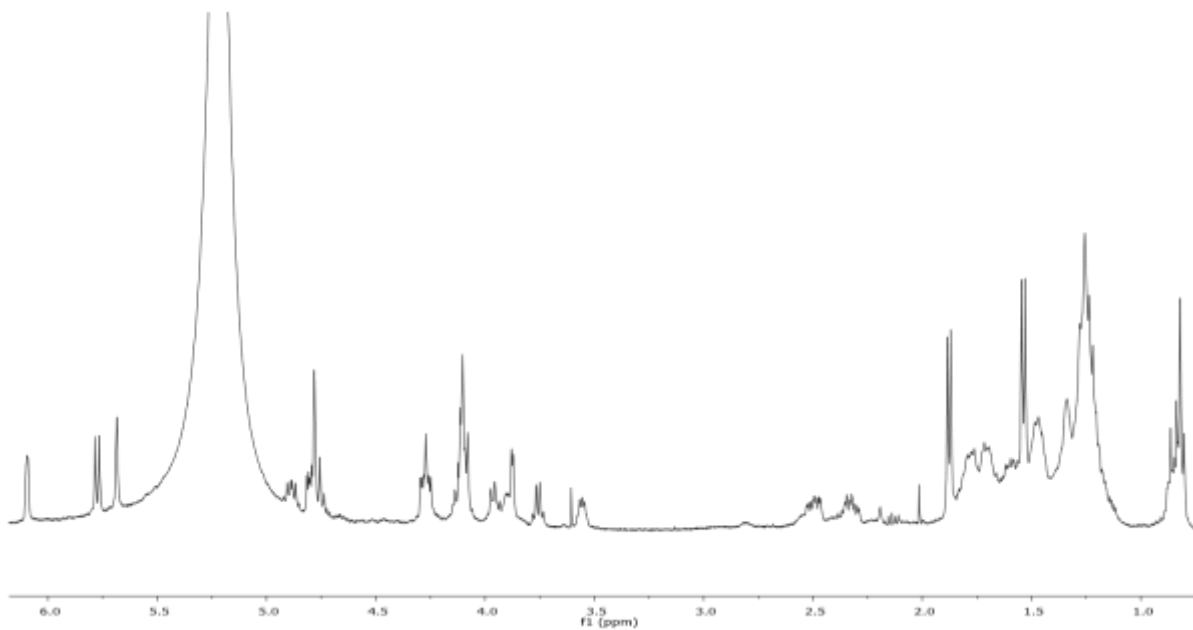


Figura 6.15. Espectro de RMN ^1H para P1 (500 MHz, piridina- d_5).

Cuadro 6.7. Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina G y P1.

| Unidad | Datos reportados por Bah (1996) ¹⁷ | | | | Resultados obtenidos | | | |
|--------------|---|--------------------|---------------|---------------|-----------------------|--------------------|---------------|---------------|
| | ¹³ C (ppm) | ¹ H ppm | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) | ¹³ C (ppm) | ¹ H ppm | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) |
| Fuc-1 | 102.60 | 4.80 | d | 8.00 | 102.82 | 4.78 | s | - |
| 2 | 76.00 | 4.75 | dd | 8.0, 9.0 | 76.56 | 4.75 | t* | 9.75 |
| 3 | 76.40 | 4.27 | dd | 3.5, 9.0 | 76.75 | 4.28 | dd* | 3.95, 8.45 |
| 4 | 73.20 | 3.86 | d | 3.50 | 73.45 | 3.87 | d | 3.60 |
| 5 | 71.30 | 3.77 | q | 6.50 | 71.63 | 3.75 | q | 7.90 |
| 6 | 17.20 | 1.55 | d | 6.50 | 17.63 | 1.53 | d | 7.95 |
| Glu-1 | 101.5 | 5.80 | d | 8.00 | 101.36 | 5.77 | d | 9.60 |
| 2 | 84.80 | 3.98 | dd | 8.0, 9.0 | 85.29 | 3.96 | d | 9.60 |
| 3 | 77.70 | 4.12 | m* | - | 77.87 | 4.13-4.08 | m* | - |
| 4 | 72.60 | 4.12 | m* | - | 72.56 | 4.13-4.08 | m* | - |
| 5 | 76.90 | 3.55 | dt | 4.2, 9.5 | 77.02 | 3.55 | dt* | 4.35, 10.05 |
| 6 | 62.90 | 4.09 | m* | - | 62.44 | 4.13-4.08 | m* | - |
| | | 4.09 | m* | - | | 4.13-4.08 | m* | - |
| Ram-1 | 101.4 | 5.71 | d | 2.00 | 101.28 | 5.68 | s | - |
| 2 | 74.10 | 6.15 | dd | 2.0, 3.5 | 74.34 | 6.09 | dd | 2.2, 3.95 |
| 3 | 70.40 | 4.80 | dd | 3.5, 9.5 | 70.72 | 4.80 | dd | 4.1, 7.65 |
| 4 | 74.70 | 4.29 | dd | 9.5, 9.5 | 74.94 | 4.29 | dd* | 4.55, 7.2 |
| 5 | 70.10 | 4.89 | dq | 6.0, 9.5 | 69.97 | 4.88 | dq* | 7.75 |
| 6 | 19.30 | 1.90 | d | 6.00 | 19.43 | 1.87 | d | 7.70 |

*Picos sobrepuestos.

6.6. Reciclaje del corte F7 y elucidación estructural de P7.1 y P7.2.

Al reciclar el corte F7 (Fig. 6.16) se obtuvieron dos compuestos incoloros que inicialmente fueron denominados como P7.1 (pico mayoritario) y P7.2 (pico minoritario).

El espectro ESI-MS de alta resolución en modo positivo para la mezcla F7 registró la molécula cationizada $[M+Na]^+$ de m/z 1031.5473 para el constituyente mayoritario (Ver anexos) indicando la presencia de una resina glicosídica cuyo peso molecular corresponde a 1008 uma; la diferencia de 14 unidades de masa por debajo del peso registrado para la tricolorina A, manifestó la presencia de un grupo isobutirato y un metilbutirato, por lo tanto, la estructura para dicho compuesto debería corresponder a un isómero de la tricolorina B.

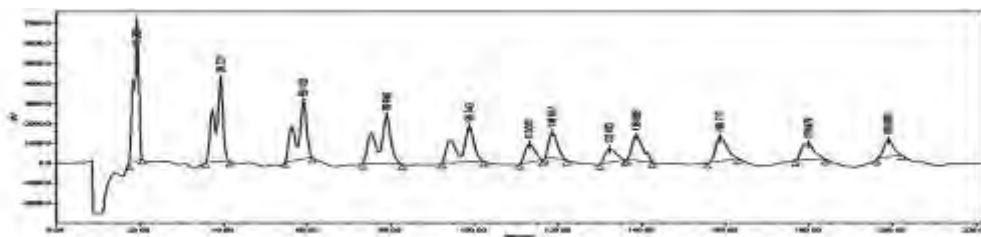


Figura 6.16. Cromatograma de reciclaje de F7 y obtención de P7.1 y P7.2. Condiciones instrumentales: Columna Symmetry C18: $7\mu\text{m}$ 19×300 mm; flujo: 6 mL/min; fase: ACN (100%); detector: índice de refracción.

La comparación de los desplazamientos químicos en la resonancia magnética nuclear ^1H entre la tricolorina A y este compuesto indicó el mismo patrón de sustitución para las posiciones de esterificación y macrolactonización del ácido tricolórico A, el núcleo oligosacárido constitutivo (Fig. 6.17). El análisis del espectro de RMN ^1H y HMBC indicaron que las posiciones de esterificación también corresponden a las posiciones C-2 (δ 5.81) y C-4 (δ 5.71, dd, $J = 9.8, 9.8$ Hz) de la unidad de ramnosa interna como en las tricolorinas A y B. La señal doble de dobles en forma de un triplete centrada en 5.83 confirmó la posición para el establecimiento del macrociclo lactónico en C-3 de la glucosa. La comparación de los desplazamientos químicos (δ) en ^{13}C (Fig. 6.18) y las constantes de acoplamiento ($^3J_{\text{H-H}}$) con los valores registrados para la tricolorina B (Cuadro 6.8) determinó que este compuesto corresponde al isómero de este tetrasacárido con la inversión en la posición de los residuos esterificantes, es decir, el isobutirato que en la tricolorina B se localiza en C-4, sustituye la posición C-2 de la ramnosa interna en este isómero (Cuadro 6.9).¹⁴

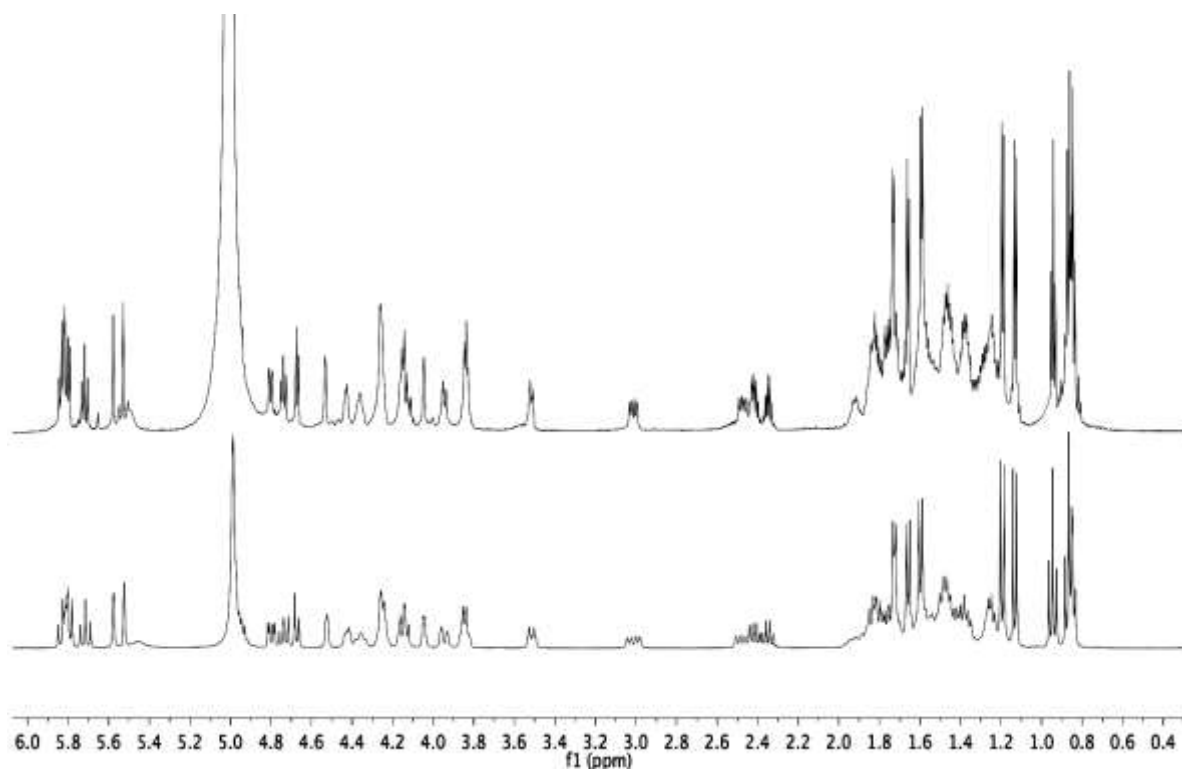


Figura 6.17. Espectro de RMN ^1H para P7.1 (Trazo superior: 500 MHz, piridina- d_5) y la tricolorina A (Trazo inferior: 400 MHz, piridina- d_5).

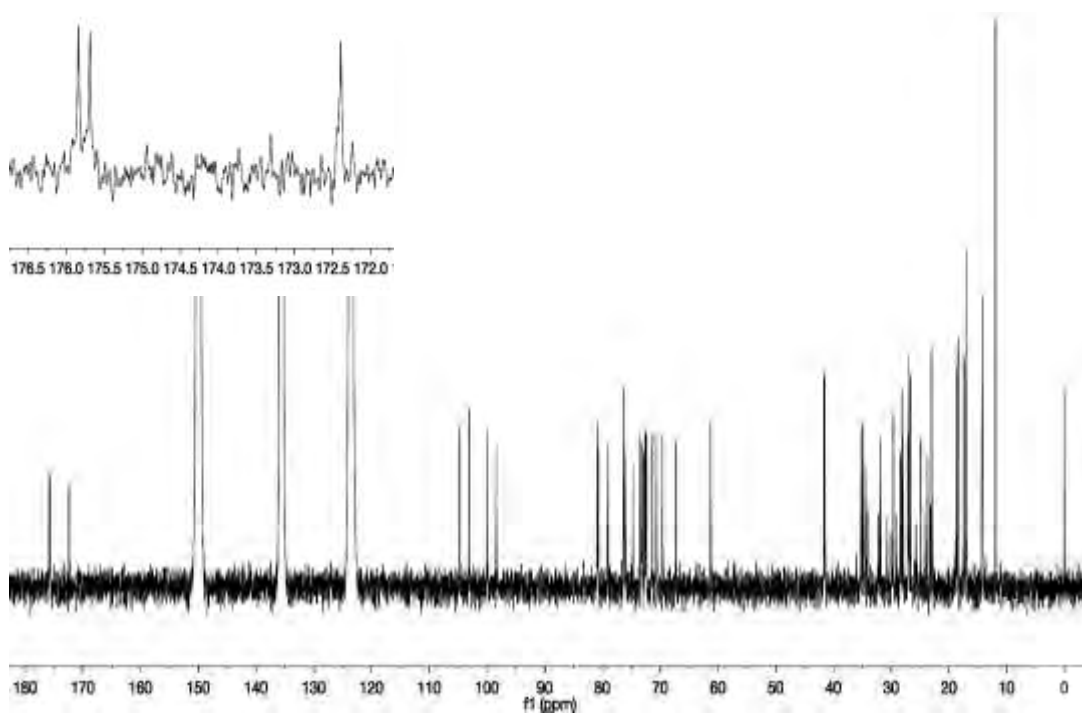


Figura 6.18. Espectro de ^{13}C para P7.1 (125 MHz, piridina- d_5).

Cuadro 6.8. Desplazamientos químicos y multiplicidades para el núcleo oligosacárido de la tricolorina B y P7.1.

| Unidad | Datos descritos por Bah (1996) ¹⁷ | | | | Resultados obtenidos | | | |
|---------------|--|---------------|---------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------|---------------|
| | ¹ H (ppm) | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) | ¹³ C (ppm) | ¹³ C (ppm) | ¹ H (ppm) | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) |
| Fuc-1 | 4.65 | d | 8 | 103 | 103.1 | 4.66 | d | 7.8 |
| 2 | 4.7 | dd | 8.0, 9.2 | 74.9 | 74.7 | 4.73 | dd | 8.7, 7.8 |
| 3 | 4.18-4.28 | m* | - | 76.2 | 76.4 | 4.27-4.22 | m* | - |
| 4 | 4 | d | 3 | 73.2 | 73.2 | 4.04 | s | - |
| 5 | 3.82 | c | 6.5 | 71.3 | 71.4 | 3.83 | c | 6.3 |
| 6 | 1.56 | d | 6.5 | 17.3 | 17.4 | 1.59 | d | 6.3 |
| Glu-1 | 5.77 | d | 7.5 | 99.9 | 99.9 | 5.79 | d | 7.5 |
| 2 | 4.13 | dd | 7.5, 9.0 | 80.8 | 80.1 | 4.14 | dd | 9.0, 7.5 |
| 3 | 5.8 | dd | 9.0, 9.0 | 79.1 | 79 | 5.83 | dd | 9.0, 9.0 |
| 4 | 4.34 | dd | 9.0, 10.0 | 69.7 | 70.6 | 4.35 | dd | 9.0, 8.5 |
| 5 | 3.52 | dt | 10.0, 3.2 | 76.3 | 76.3 | 3.51 | dt | 8.5, 3.1 |
| 6 | 4.13 | dd | 12.0, 3.2 | 61.5 | 61.3 | 4.15 | m* | - |
| | 3.93 | dd | 12 | | | 3.94 | dd | 11.8, 2.4 |
| Ram-1 | 5.55 | d | 1.5 | 98.4 | 98.4 | 5.57 | s | - |
| 2 | 5.79 | dd | 1.5, 3.2 | 72.8 | 72.8 | 5.81 | m* | - |
| 3 | 4.75 | dd | 3.2, 9.7 | 76 | 76 | 4.79 | m* | - |
| 4 | 5.68 | dd | 9.7, 10.0 | 73.5 | 73.4 | 5.71 | dd | 9.8, 9.8 |
| 5 | 4.91 | dq | 6.0, 10.0 | 67.3 | 67.3 | 4.95 | dd | 6.3, 10.0 |
| 6 | 1.62 | d | 6 | 18.4 | 18.4 | 1.65 | d | 6.3 |
| Ram'-1 | 5.49 | d | 1.5 | 104.6 | 104.7 | 5.52 | s | - |
| 2 | 4.48 | dd | 1.5, 3.5 | 72.4 | 72.4 | 4.52 | s | - |
| 3 | 4.39 | dd | 3.5, 9.0 | 72.6 | 72.6 | 4.42 | dd | 3.0, 8.0 |
| 4 | 4.18-4.28 | m* | - | 73.5 | 73.5 | 4.27-4.22 | m* | - |
| 5 | 4.18-4.28 | m* | - | 70.5 | 69.6 | 4.27-4.22 | m* | - |
| 6 | 1.7 | d | 6 | 18.4 | 18.6 | 1.73 | d | 6 |

Cuadro 6.9. Desplazamientos químicos y multiplicidades para las agliconas de la tricolorina B y P7.1

| Unidad | Datos descritos por Bah (1996) ¹⁷ | | | | Resultados obtenidos | | | |
|--------------|--|---------------|----------------|-----------------------|-----------------------|----------------------|---------------|----------------|
| | ¹ H (ppm) | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) | ¹³ C (ppm) | ¹³ C (ppm) | ¹ H (ppm) | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) |
| Jal-1 | - | - | - | 172.4 | 172.4 | - | - | - |
| 2a | 2.97 | ddd | 2.0, 8.5, 16.4 | 34.5 | 34.5 | 3 | ddd | 2.0, 8.5, 16.4 |
| 2b | 2.46 | ddd | 1.5, 7.5, 16.4 | | | 2.47 | ddd | 1.5, 7.5, 16.4 |
| 11 | 3.82 | m | | 81 | 80.9 | 3.83 | m | - |
| 16 | 0.84 | t | 7 | 14.2 | 14.3 | 0.85 | t | 7 |
| mba-1 | - | - | - | 175.7 | 175.6 | - | - | - |
| 2 | 2.41 | tc | 7.0, 7.0 | 41.5 | 41.7 | 2.34 | tc | 7.0, 7.0 |
| 2-Me | 1.18 | d | 7 | 16.9 | 17.3 | 1.18 | d | 7 |
| 3-Me | 0.93 | t | 7 | 11.8 | 11.9 | 0.94 | t | 7 |
| iba-1 | - | - | - | 176.1 | 175.8 | - | - | - |
| 2 | 2.51 | sept | 7 | 34.4 | 41.5 | 2.41 | sept | 7 |
| 3 | 1.11 | d | 7 | 18.1 | 18.6 | 1.12 | d | 7 |
| 3' | 1.1 | d | 7 | 19.1 | 19.4 | 0.9 | d | 7 |

Estas asignaciones se confirmaron al analizar el espectro bidimensional HMBC (Fig. 6.19) para la resina, ya que la señal de C-1 para el carbonilo (δ 175.6) correspondiente al metilbutirato únicamente presenta interacciones ($^3J_{CH}$) con la señal asignable al protón en la posición C-4 (δ 5.71) de la ramnosa interna y, por lo tanto, excluye la posibilidad de que la posición C-2 (δ 5.81) de dicha azúcar estuviese sustituida por este residuo. Asimismo, la señal C-1 del carbonilo asignable al isobutirato (δ 175.8) presentó evidentes interacciones a tres enlaces con los protones de la posición H-2 la ramnosa interna. La correlación entre C-1 de la aglicona (δ 172.4) y la señal para el triplete de la posición C-3 de la glucosa se identificó con facilidad. Con lo anterior, es posible afirmar que el presente compuesto es un isómero de la tricolorina B, dicho esto, se nombró como tricolorina K (Fig. 6.22).

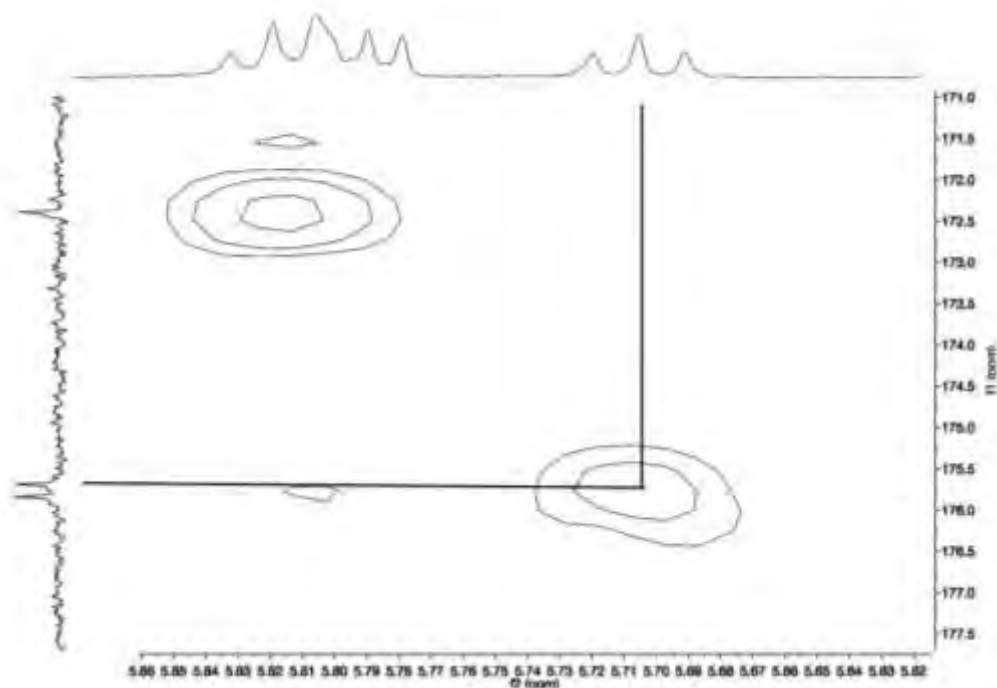


Figura. 6.19. Espectro HMBC para P7.1 en la región de los carbonilos (172-177 ppm). Se destaca con líneas perpendiculares la correlación a tres enlaces (${}^3J_{CH}$) en H-4 (δ 5.71) de la ramnosa interna y C-1 (δ 175.6) del residuo de metilbutirato.

Para el pico P7.2, se detectó en el espectro de masas ESI-MS de alta resolución el ión que corresponde a la molécula cationizada $[M+Na]^+$ de m/z 1017.5320 (Ver anexos), asignando un peso molecular de 994 uma, el cual corresponde a 28 unidades de masa abajo del peso registrado para la tricolorina A, esto indica que los residuos esterificantes corresponden a dos unidades de isobutirato. Al igual que la tricolorina K, este compuesto tiene un patrón de sustitución para las posiciones de esterificación y macrolactonización del ácido tricolorico A equivalente a los de las tricolorinas Ay B. Las figuras 6.20 y 6.21 ilustran los espectros de RMN para 1H y ${}^{13}C$, mientras que la tabla 6.10 muestra los desplazamientos químicos (δ) y constantes de acoplamiento (J) para la tricolorina B y el pico 7.2. Este compuesto novedoso de la serie homóloga de las tricolorinas se designó con la letra L (Fig. 6.22).

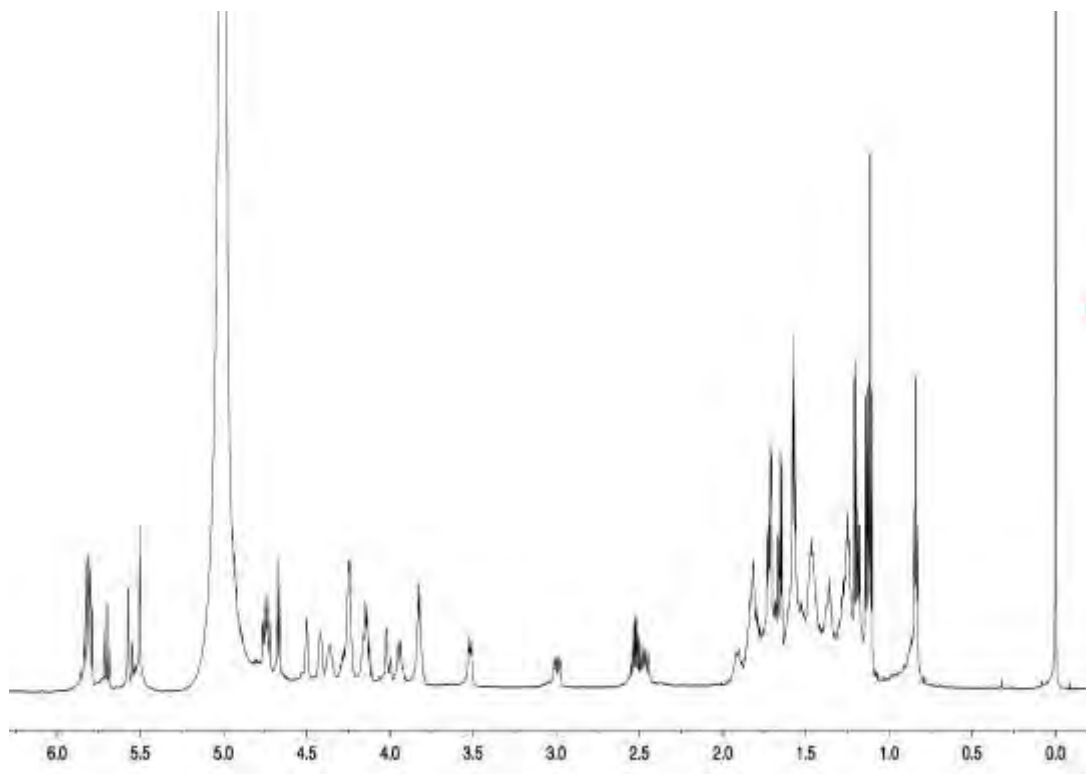


Figura 6.20. Espectro de ^1H para P7.2 (700 MHz, piridina- d_5).

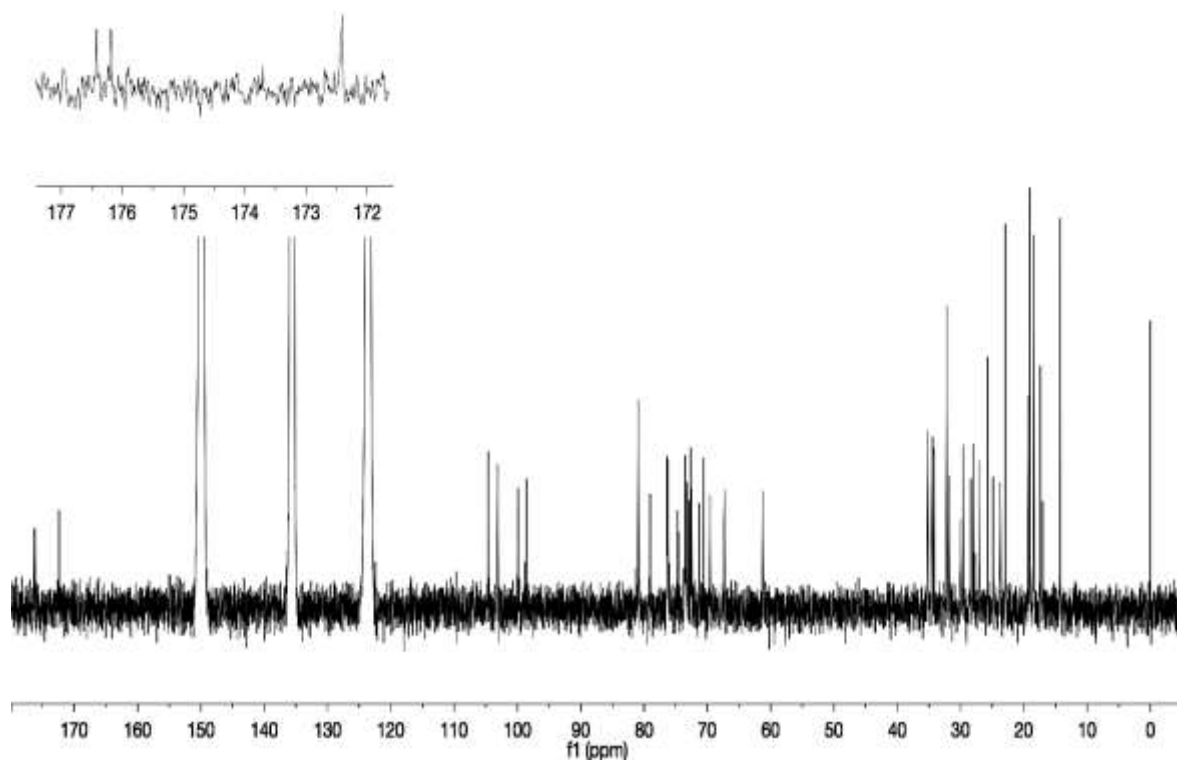


Figura 6.21. Espectro de ^{13}C para P7.2 (175 MHz, piridina- d_5).

Cuadro 6.10. Desplazamientos químicos y multiplicidades para la tricolorina B y P7.2.

| Datos descritos por Bah (1996) ¹⁷ | | | | | Resultados obtenidos | | | |
|--|--------------------|---------------|----------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|---------------|----------------|
| Unidad | ¹ H ppm | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) | ¹³ C (ppm) | ¹³ C (ppm) | ¹ H ppm | Tipo de señal | <i>J</i> (Hz) |
| Fuc-1 | 4.65 | d | 8 | 103.0 | 103.1 | 4.67 | d | 7.8 |
| 2 | 4.70 | dd | 8.0, 9.2 | 74.9 | 74.6 | 4.73 | dd | 9.4, 7.8 |
| 3 | 4.18-4.28 | m* | - | 76.2 | 76.3 | 4.27-4.22 | m* | - |
| 4 | 4.00 | d | 3.0 | 73.2 | 73.2 | 4.02 | d | 3.1 |
| 5 | 3.82 | c | 6.5 | 71.3 | 71.3 | 3.82 | c | 6.2 |
| 6 | 1.56 | d | 6.5 | 17.3 | 17.4 | 1.57 | d | 6.2 |
| Glu-1 | 5.77 | d | 7.5 | 99.9 | 99.9 | 5.79 | d | 7.8 |
| 2 | 4.13 | dd | 7.5, 9.0 | 80.8 | 80.9 | 4.12 | dd | 9.0, 7.8 |
| 3 | 5.80 | dd | 9.0, 9.0 | 79.1 | 79.1 | 5.82 | dd | 9.0, 9.0 |
| 4 | 4.34 | dd | 10.0, 9.0 | 69.7 | 70.6 | 4.35 | dd | 9.0, 9.0 |
| 5 | 3.52 | dt | 10.0, 3.2 | 76.3 | 76.4 | 3.52 | dt | 9.0, 3.2 |
| 6 | 4.13 | dd | 12.0, 3.2 | 61.5 | 61.3 | 4.15 | m* | - |
| | 3.93 | dd | 12.0, 3.2 | | | 3.94 | dd | 11.8, 2.4 |
| Ram-1 | 5.55 | d | 1.5 | 98.4 | 98.6 | 5.57 | s | - |
| 2 | 5.79 | dd | 3.2, 1.5 | 72.8 | 72.8 | 5.80 | dd | 1.5, 3.5 |
| 3 | 4.75 | dd | 9.7, 3.2 | 76.0 | 76.2 | 4.76 | dd | 3.5, 9.6 |
| 4 | 5.68 | dd | 9.7, 10.0 | 73.5 | 73.5 | 5.70 | dd | 9.6, 9.6 |
| 5 | 4.91 | dq | 10.0, 6.0 | 67.3 | 67.4 | 4.92 | m* | - |
| 6 | 1.62 | d | 6.0 | 18.4 | 18.4 | 1.64 | d | 6.0 |
| Ram'-1 | 5.49 | d | 1.5 | 104.6 | 104.6 | 5.50 | s | - |
| 2 | 4.48 | dd | 3.5, 1.5 | 72.4 | 72.4 | 4.49 | s | - |
| 3 | 4.39 | dd | 9.0, 3.5 | 72.6 | 72.6 | 4.41 | s | - |
| 4 | 4.18-4.28 | m* | - | 73.5 | 73.4 | 4.27-4.22 | m* | - |
| 5 | 4.18-4.28 | m* | - | 70.5 | 69.6 | 4.27-4.22 | m* | - |
| 6 | 1.70 | d | 7.0 | 18.4 | 19.0 | 1.71 | d | 7.0 |
| Jal-1 | | | | 172.4 | 172.4 | | | |
| 2a | 2.97 | ddd | 2.0, 8.5, 16.4 | 34.5 | 34.4 | 2.99 | ddd | 2.0, 8.5, 16.4 |
| 2b | 2.46 | ddd | 1.5, 7.5, 16.4 | | | 2.47 | m* | - |
| 11 | 3.82 | m | - | 81.0 | 80.9 | 3.82 | m* | - |
| 16 | 0.84 | t | 7.0 | 14.2 | 14.3 | 0.84 | t | 7.0 |

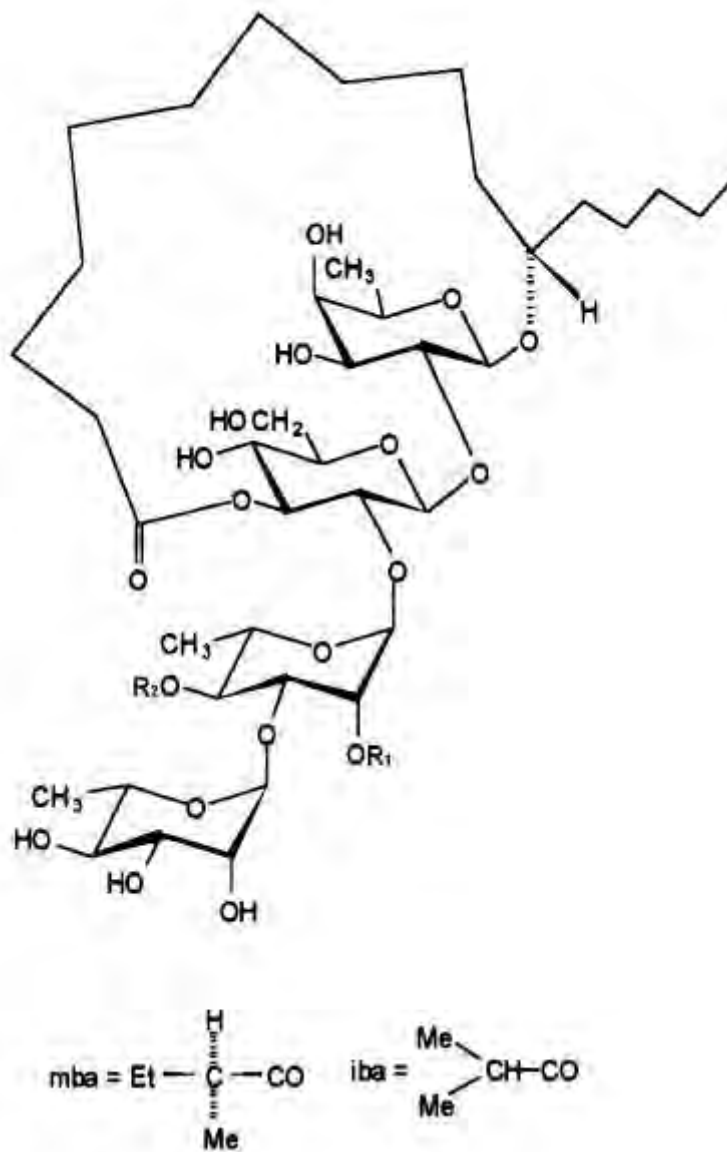


Figura. 6.22. Estructura de los compuestos mayoritarios, las tricolorinas A (t_R 31.03 min; $R_1 = R_2 = mba$) y B (t_R 24.69 min; $R_1 = mba$, $R_2 = iba$), y de los nuevos miembros minoritarios de la serie homóloga, las tricolorinas K (t_R 21.98 min; $R_1 = iba$, $R_2 = mba$) y L (t_R 20.25 min; $R_1 = R_2 = iba$).

6.7. Citotoxicidad y ensayos de modulación.

De acuerdo con los resultados incluidos en el Cuadro 6.11, todas las líneas celulares mostraron sensibilidad a vinblastina, lo que indica una alta respuesta a productos xenobióticos. En este trabajo, la línea más sensible fue CaOV3 con un CI_{50} de 0.0013 $\mu\text{g/mL}$. Para las resinas glicosídicas puras, se determinó que no exhiben actividad citotóxica ya que los valores de CI_{50} son mayores a 4 $\mu\text{g/mL}$, valor considerado como referencia para considerar una actividad significativa de inhibición de crecimiento celular (citotoxicidad);^{20, 21} esta ausencia de citotoxicidad es un requerimiento importante para realizar los ensayos de modulación y poder diferenciar con claridad cualquier efecto de potenciación resultado de un posible sinergismo (interacción de medicamentos que produce efectos combinados aditivos que resultan ser mayores en comparación a la administración de los medicamentos por separado) entre las resinas y la vinblastina.^{3,4}

Cuadro 6.11. Evaluación de la citotoxicidad de los glicolípidos. CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$).

| Compuesto | MCF-7 | CaOV3 | HeLa | HCT15 |
|--------------------|-------|--------|-------|-------|
| P3 | >25 | >25 | >25 | 23.6 |
| P4 | >25 | 18.4 | >25 | 24.6 |
| P5.1 | 15.4 | >25 | >25 | 24.2 |
| P5.2 | >25 | 17.5 | 11.93 | 13.48 |
| P5.3 | >25 | 20.4 | 19.44 | 12.59 |
| P6 | >25 | >25 | >25 | >25 |
| TA | 22.65 | 14.1 | >25 | 23.7 |
| Vinblastina | 0.011 | 0.0013 | 0.009 | 0.015 |

MCF-7 = carcinoma de mama; CaOV3 = adenocarcinoma de ovario;

HeLa = carcinoma de cérvix, HCT-15 = carcinoma de colon.

P3-P6 = picos recolectados; TA = tricolorina A.

En cuanto a los ensayos de modulación mostrados en el Cuadro 6.12, las células MCF-7, MCF-7/Vin⁻ y MCF-7/Vin⁺ presentaron sensibilidad al ser expuestas a diferentes concentraciones de vinblastina. Se observó que las MCF-7 presentaron el valor de CI_{50} más bajo, seguidas de las células MCF-7/Vin⁻ con un valor intermedio y, por último, el valor mayor corresponde a la línea MCF-7/Vin⁺, esto en concordancia con la naturaleza resistente de las células hacia la vinblastina. Al comparar los valores de CI_{50} de los glicolípidos evaluados *versus*

el obtenido para vinblastina en la línea celular MCF-7, se observa que existe un efecto positivo en la inhibición del crecimiento tanto en las cepas sensibles como en las resistentes, lo cual se refleja en el valor del factor de reversión superior en todos los casos al desarrollado por la reserpina utilizada como un control positivo. De acuerdo al valor del factor de reversión, la tricolorina A presenta la mayor potencia como agente de reversión, mientras que los picos P5.3 y P4 desarrollaron la menor potencia. Se encuentran en evaluación el resto de los picos purificados.

| Cuadro 6.12. Ensayos de modulación de la actividad de la vinblastina sobre las células sensibles (MCF-7) y resistentes (MCF-7/Vin). | | | | | | |
|--|--------------------------------|------------------------|---------------|--|-------------------------------------|---------------------|
| Compuesto^a | CI₅₀ (µg/mL) | | | Factor de reversión^c | | |
| | MCF-7/Vin ⁻ | MCF-7/Vin ⁺ | MCF-7 | FR _{MCF-7/Vin⁻} | FR _{MCF-7/Vin⁺} | FR _{MCF-7} |
| Vinblastina | 1.279 ± 0.110 | 1.385 ± 0.035 | 0.038 ± 0.014 | | | |
| P3 | <0.016 | <0.016 | NE | 80 | 87 | - |
| P4 | 0.0647 ± 0.026 | <0.016 | <0.00064 | 20 | 87 | 59 |
| P5.1 | 0.0013 ± 0.0005 | NE | <0.00064 | 984 | - | 59 |
| P5.2 | 0.0034 ± 0.0007 | NE | <0.00064 | 376 | - | 59 |
| P5.3 | <0.0032 | NE | <0.0016 | 400 | - | 23 |
| Tricolorina C | 0.048 ± 0.006 | 0.059 ± 0.016 | <0.00064 | 27 | 24 | 59 |
| Tricolorina A | <0.00064 | <0.00064 | <0.00064 | 1998 | 2164 | 59 |
| Reserpina^b | 0.013 ± 0.007 | 0.06 ± 0.01 | 0.003 ± 0.001 | 98 | 23 | 13 |

^aDiluciones seriadas desde 0.00064 a 10 µg/mL de vinblastina en presencia o ausencia de glicolípido (25 µg/mL).

^bReserpina = 5 µg/mL como control positivo. ^cFR = CI₅₀ Vinblastina/CI₅₀ Vinblastina en presencia de glicolípido. Cada valor representa la media ± DE de tres experimentos independientes. NE = No experimentado.

7. CONCLUSIONES.

1. Se optimizó un procedimiento analítico en HPLC empleando una columna de fase reversa C-18 para la separación y la purificación a nivel preparativo de las resinas glicosídicas solubles en cloroformo de las semillas comerciales del quiebraplato (*Ipomoea tricolor*).
2. Se realizó la identificación de los constituyentes presentes en cada uno de los eluatos obtenidos a nivel preparativo mediante UPLC-ESI-MS. Esta metodología de análisis permitió la detección de dos compuestos inéditos en la literatura fitoquímica.
3. Los dos glicolípidos novedosos forman parte de la serie homóloga de tetrasacáridos derivados del ácido tricolorico A y sus estructuras se caracterizaron como: la tricolorina K, (11*S*) ácido hidroxihexadecanoico 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-[2-*O*-(isobutiril)-4-*O*-(2*S*-metilbutiril)]-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido-(1,3"-lactona); y la tricolorina L: (11*S*) ácido hidroxihexadecanoico 11-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*- α -L-[2-*O*-(isobutiril)-4-*O*-(isobutiril)]-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido-(1,3"-lactona).
4. La tricolorina A resultó ser el agente no citotóxico que desarrolló la mayor actividad moduladora, potenciando la citotoxicidad con un factor de reversión de 1998 al combinarse con la vinblastina ($FR_{MCF-7/Vin} = CI_{50} \text{ vinblastina} / CI_{50} \text{ vinblastina en presencia de glicolípido}$).

8. BIBLIOGRAFÍA.

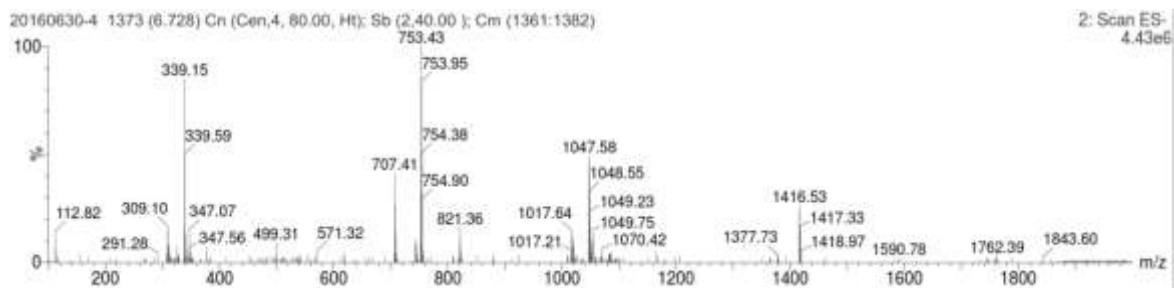
1. Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Wickramaratne, D. M., Pezzuto, J. M., Kinghorn, A. D. (1993) Tricolorin A, major phyto-growth inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products* 56, 571-582.
2. Lotina-Hennsen, B., King-Díaz, B., Pereda-Miranda, R. (2013) Tricolorin A as a natural herbicide. *Molecules* 18, 778-788.
3. Pereda-Miranda, R., Kaatz, G.W., Gibbons, S.J. (2006) Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products* 69, 406-409.
4. 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, 128-131.
5. Sidana, J., Joshi, L.K. (2013) Recycle HPLC: a powerful tool for the purification of natural products. *Chromatogra. Res. Int.* 2013.
6. Díaz-Pontones, D.M. (2009). *Ipomoea*: un género con tradición. *Contactos* 73, 36-44.
7. Carranza, E. (2007). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 151. Familia Convolvulaceae 1. *Pátzcuaro, Michoacán: Instituto de Ecología*, 129.
8. Bruneton, J. (1995) *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. Lavoisier publishing, Paris, 156-157.
9. Chérigo, L., Pereda-Miranda, R. (2006). Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Products* 69, 595-599.
10. CONABIO: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/convolvulaceae/ipomoea-tricolor/fichas/ficha.htm>
11. Nelson, D.L., Cox, M.M. (2009). *Principios de Bioquímica*. Barcelona, España: Ediciones Omega, 238-268.

12. Pereda-Miranda, R., Rosa-Ramírez, D., Castañeda-Gómez, J. (2010). Resin glycosides from the morning glory family. En: Kinghorn, A., Falk, H., Kobayashi, J. (Ed.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Vol 92 Chapter 2. Springer Verlag, New York, pp. 77–153.
13. Escobedo-Martínez, C., Cruz-Morales, S., Fragoso-Serrano, M., Mukhlesur Rahman, M. M., Gibbons, S., Pereda-Miranda, R. (2010). Characterization of a xylose containing oligosaccharide, an inhibitor multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry* 71, 1796-1801.
14. Bah, M., Pereda-Miranda, R. (1996). Detailed FAB-Mass Spectrometry and High Resolution NMR Investigations of Tricolorins A-E, Individual Oligosaccharides from the Resins of *Ipomoea tricolor* (*Convolvulaceae*). *Tetrahedron* 52, 13063-13080.
15. Kubo, I., Nakatsu, T. (1990). Recent examples of preparative-scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. *LC GC* 8, 933-939.
16. Pereda-Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC Isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron*, 58, 3145-3154.
17. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2015). *Fundamentos de química analítica* (9^a ed.), Cengage Learning, pp. 709-734.
18. Figueroa-González, G., Jacobo-Herrera, N., Zentella-Dehesa, A., Pereda-Miranda, R. (2011). Reversal of multidrug resistance by morning glory resin glycosides in human breast cancer cells. *Journal of Natural Products*, 75, 93-97.
19. Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst*, 82, 1107-1112.
20. Cordell, G. A., Beecher, C. W., Pezzuto, J. M. (1991) Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *J. Ethnopharmacol.* 32, 117-133.

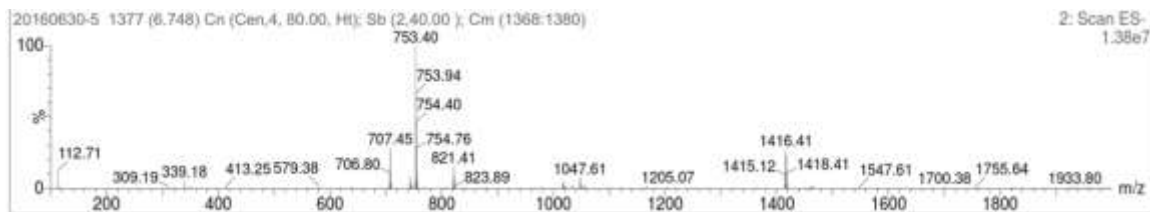
9. ANEXOS.

9.1. Análisis UPLC-ESI-MS de los cortes realizados en el extracto 1.

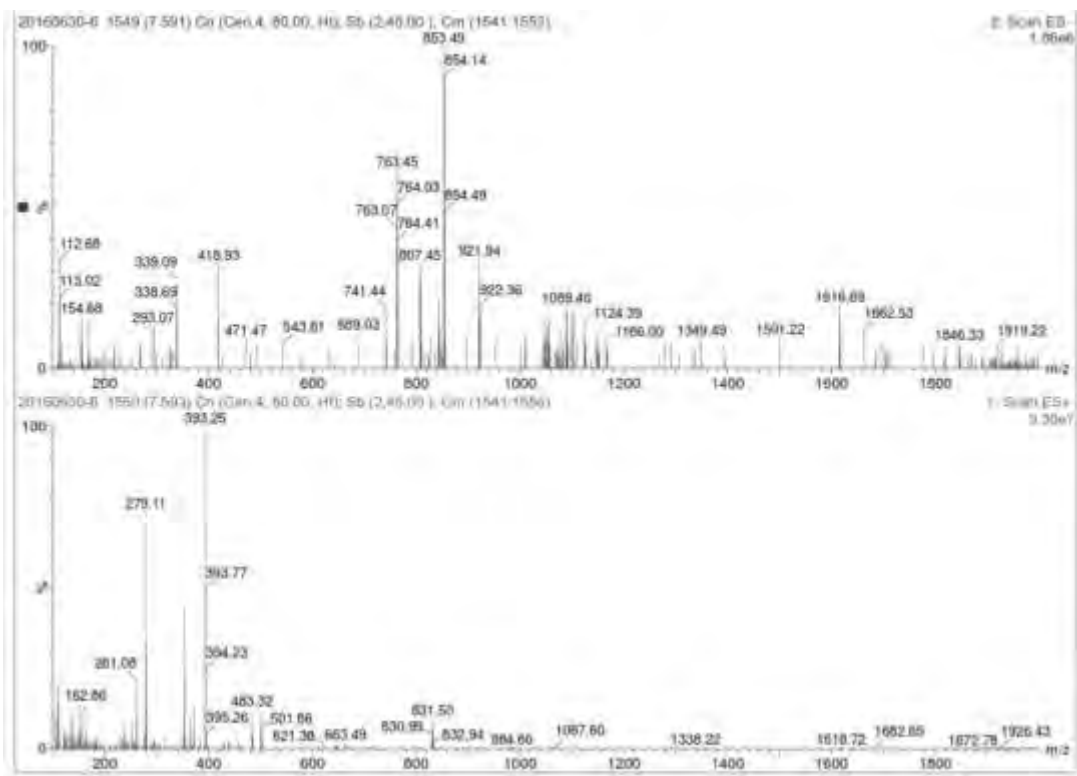
CORTE F1



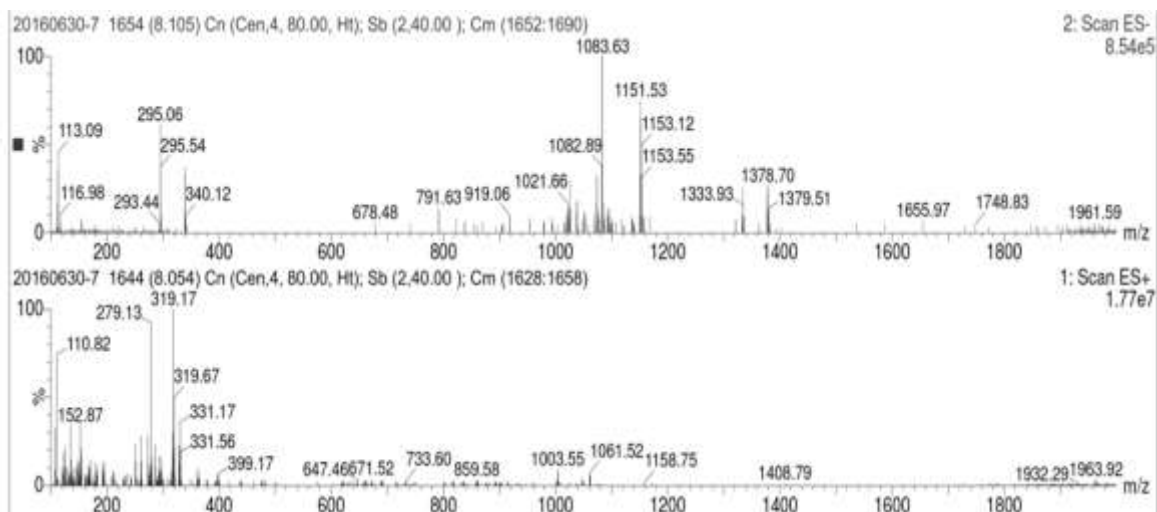
CORTE F2.



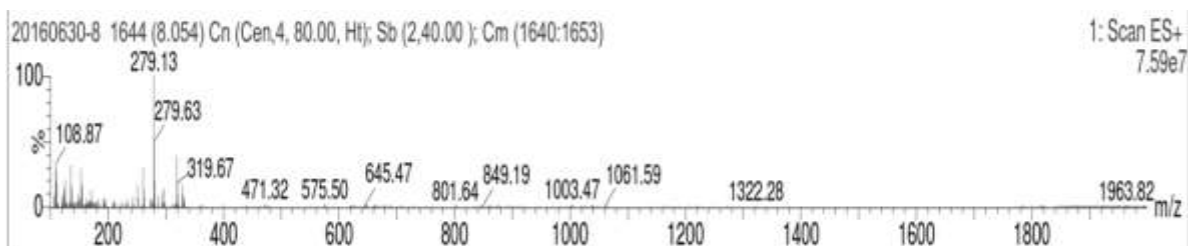
CORTE F3



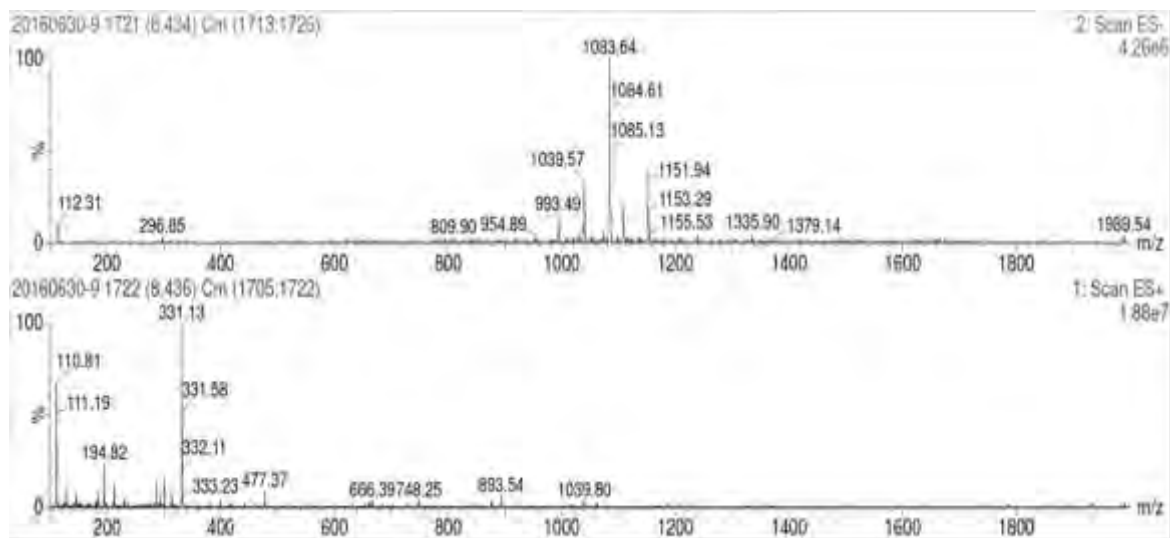
CORTE F4



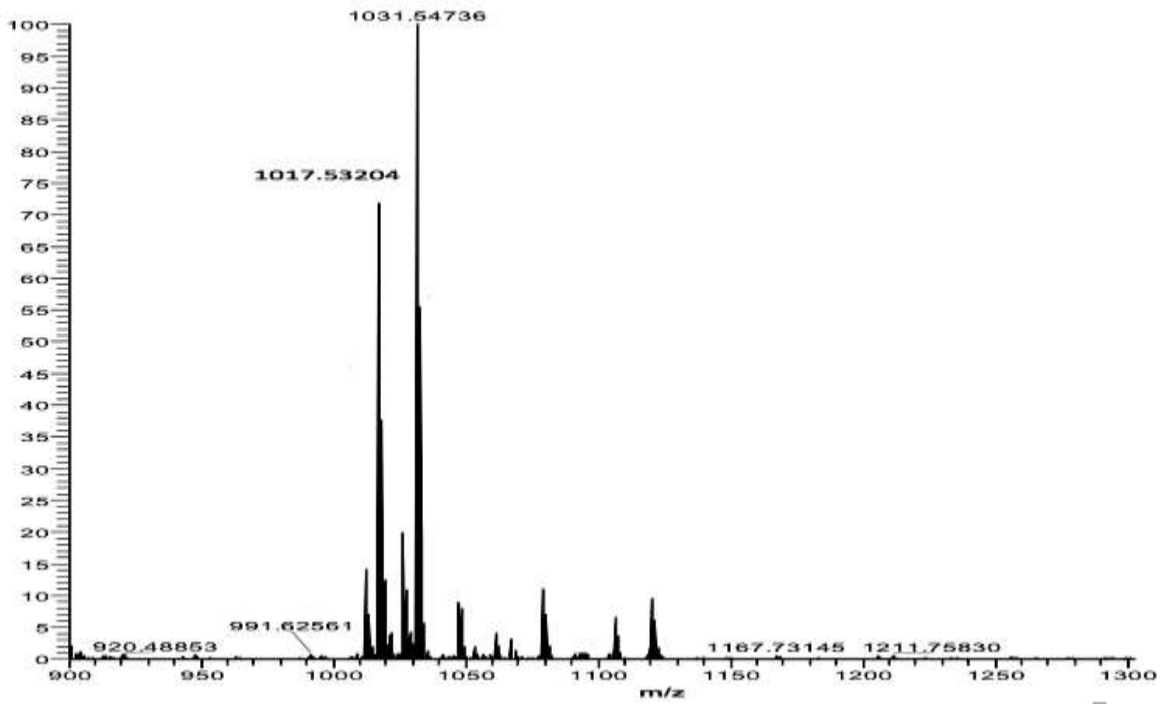
CORTE F5



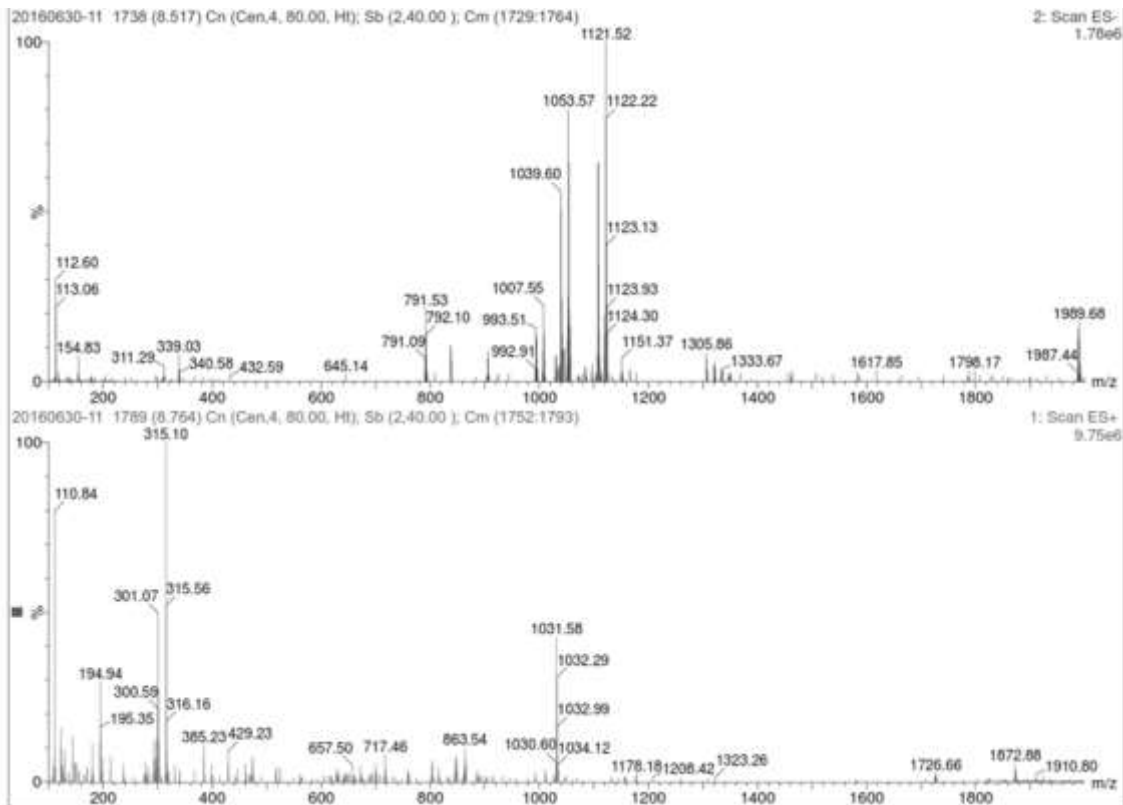
CORTE F6



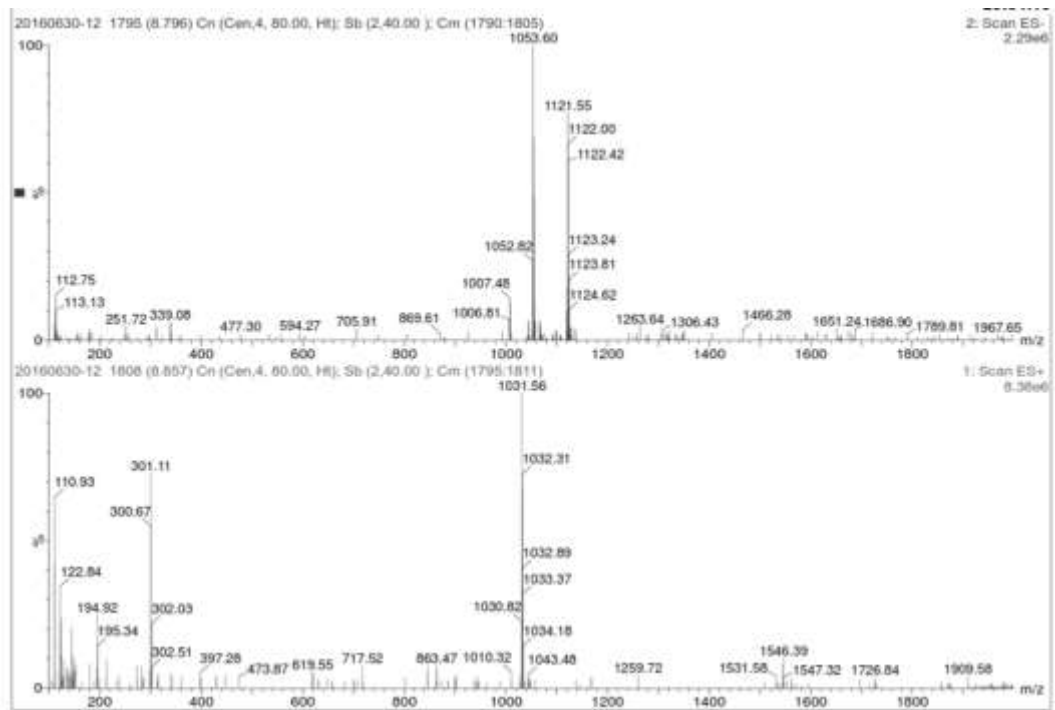
CORTE F7



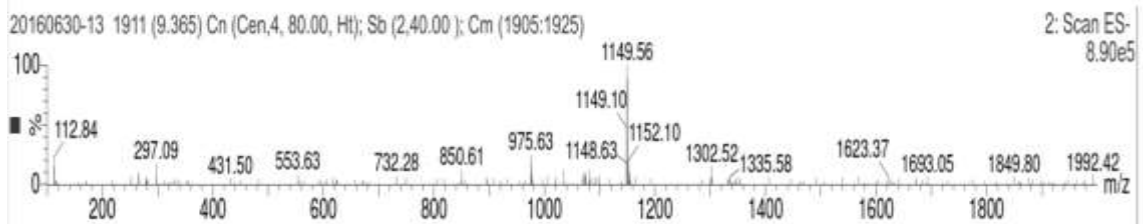
CORTE F8



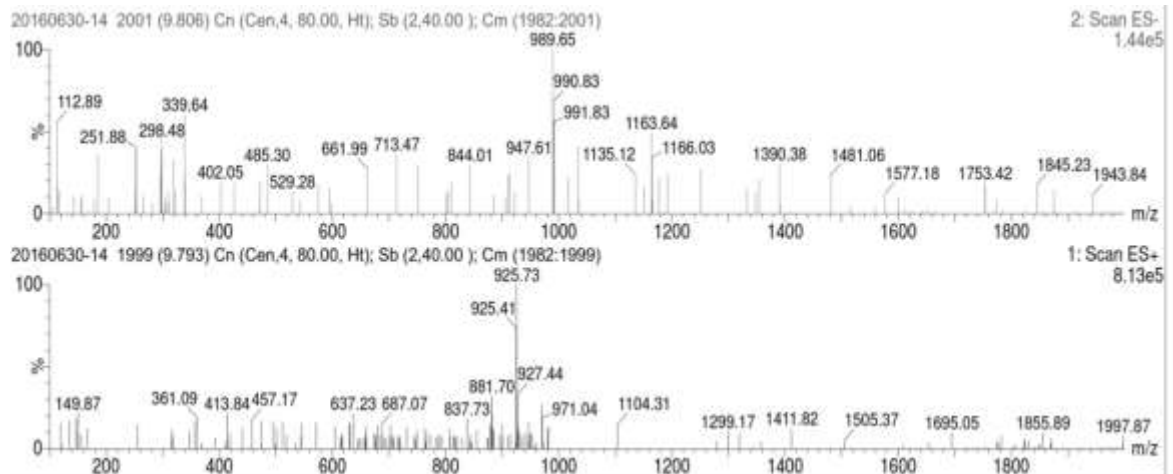
CORTE F9



CORTE F11

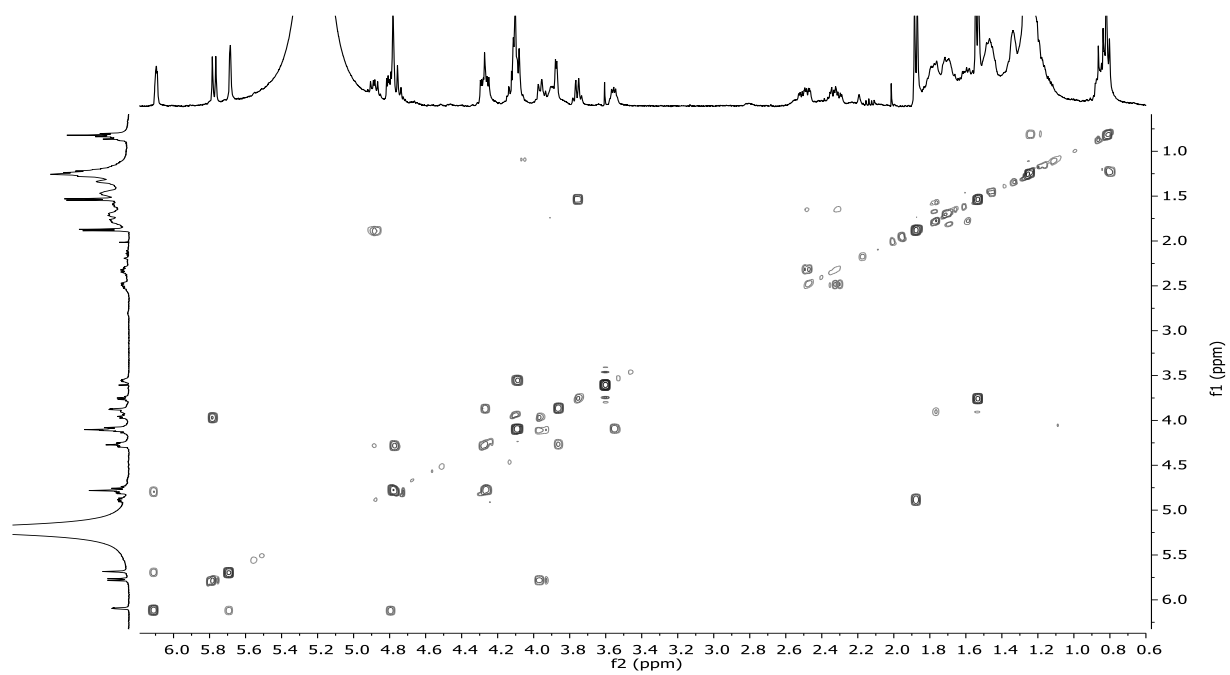


CORTE F12

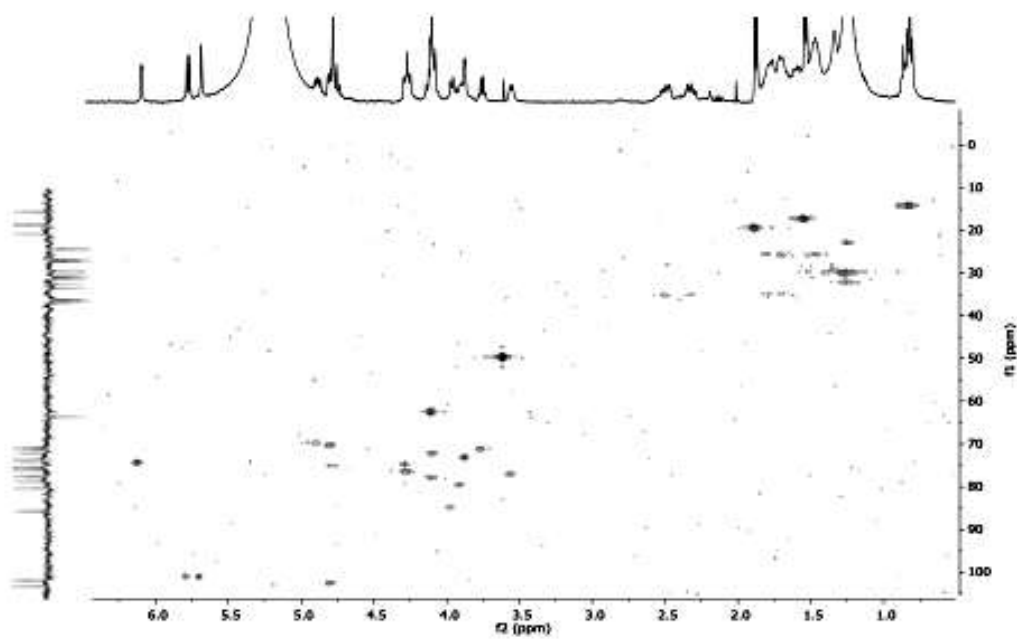


9.2. Espectros 2D para el pico P1 (Disolvente: Piridina-d₅).

COSY

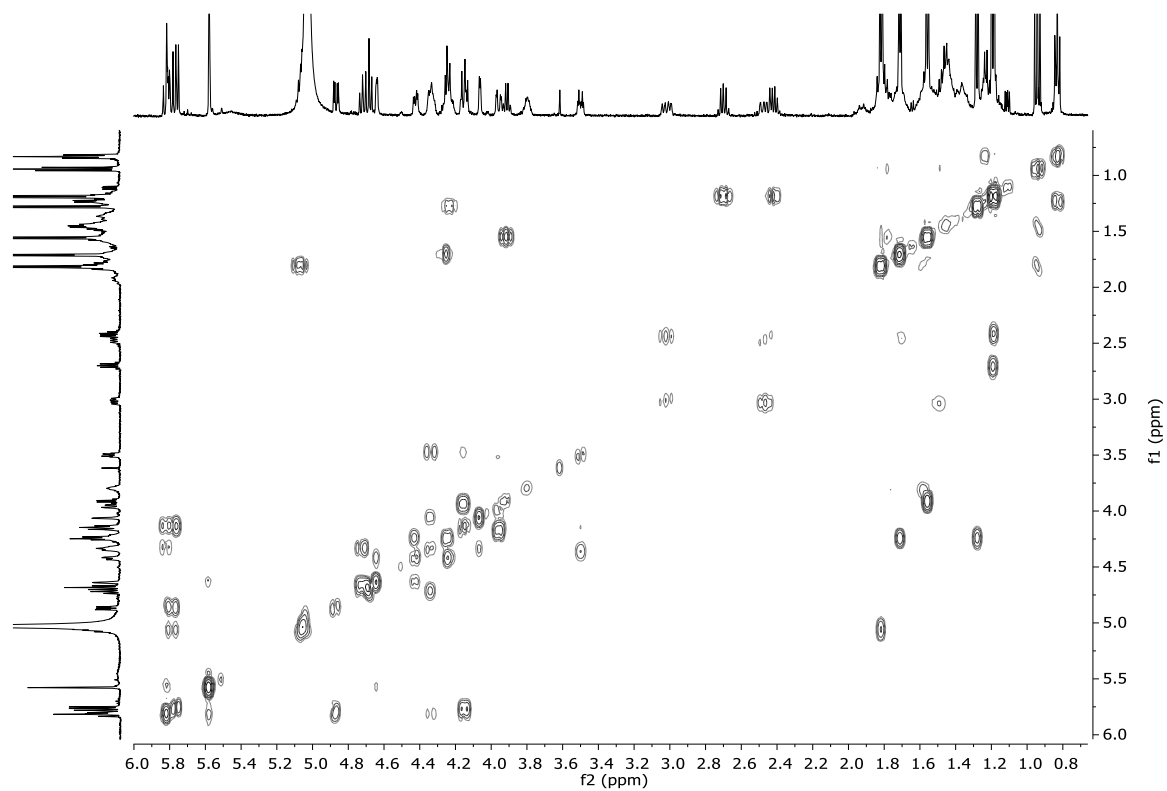


HSQC

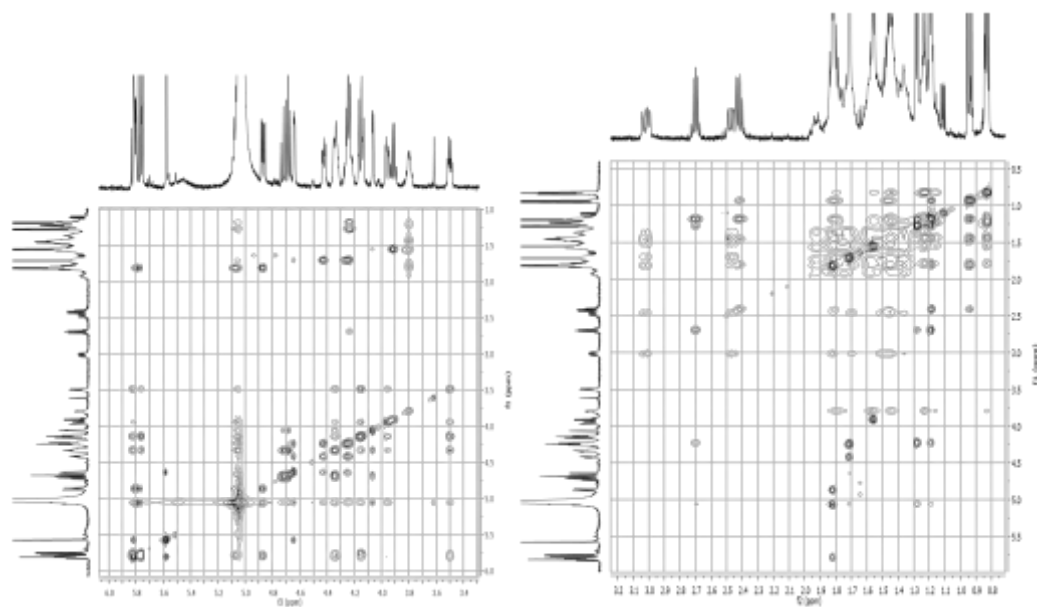


9.3. Espectros 2D para el pico P6 (Disolvente: Piridina-d₅).

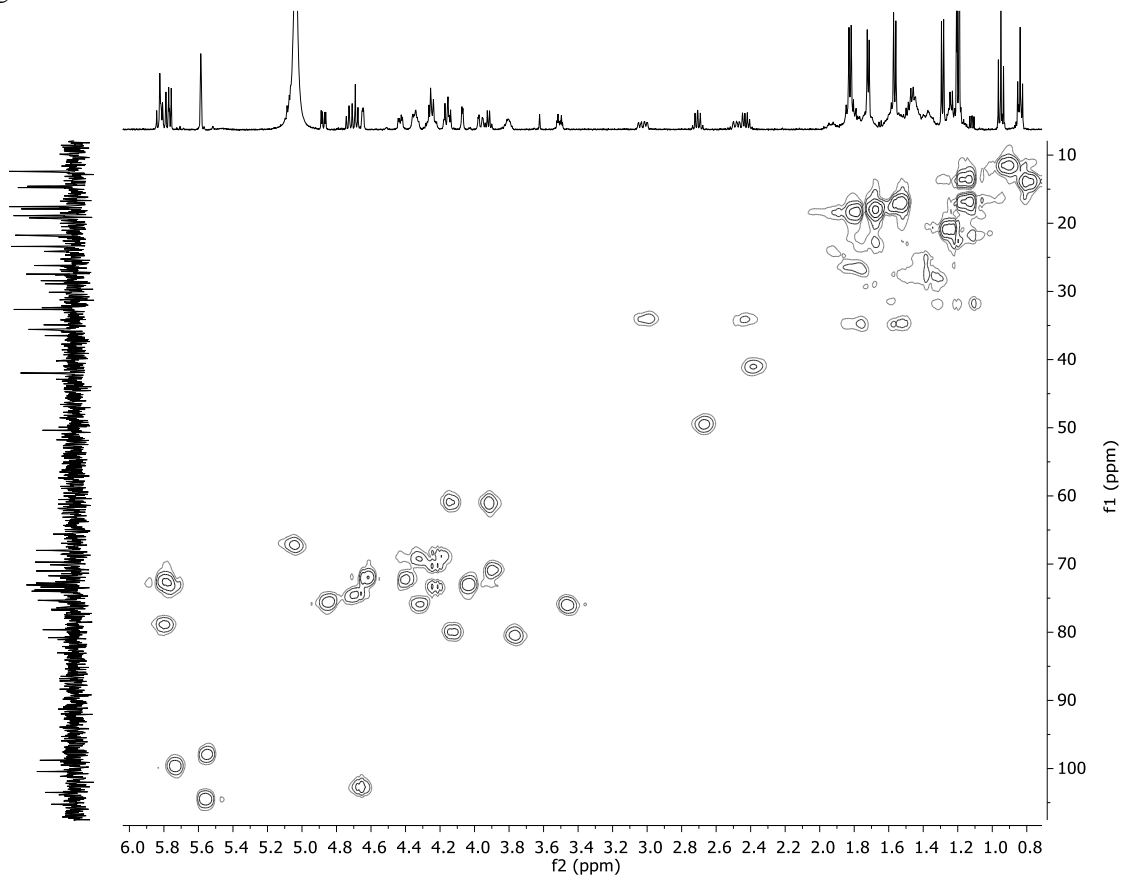
COSY



TOCSY

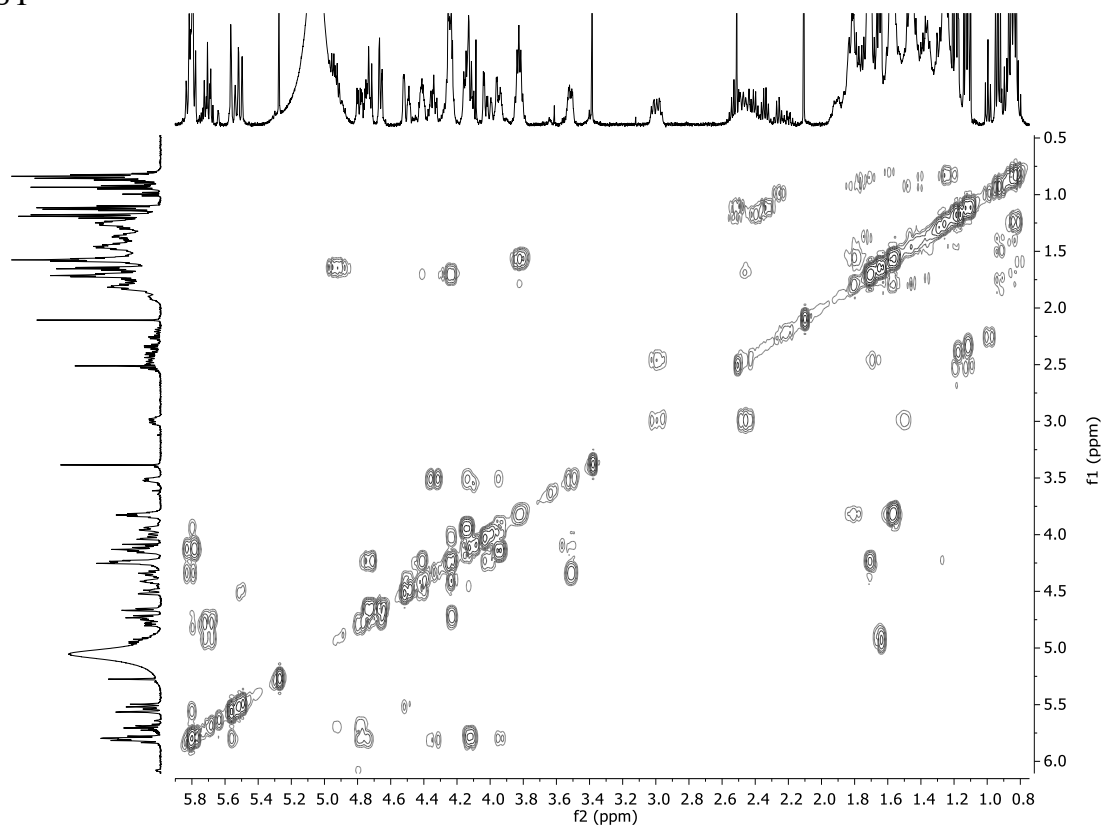


HSQC

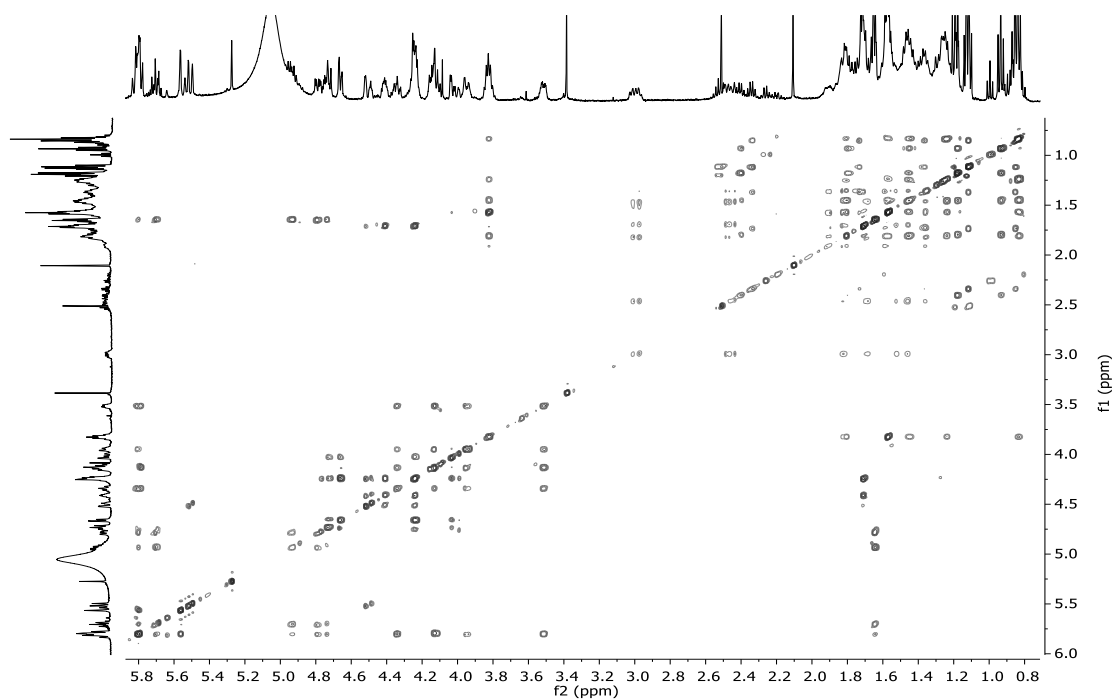


9.4. Espectros 2D para el pico P7.1 (Disolvente: Piridina- d_5).

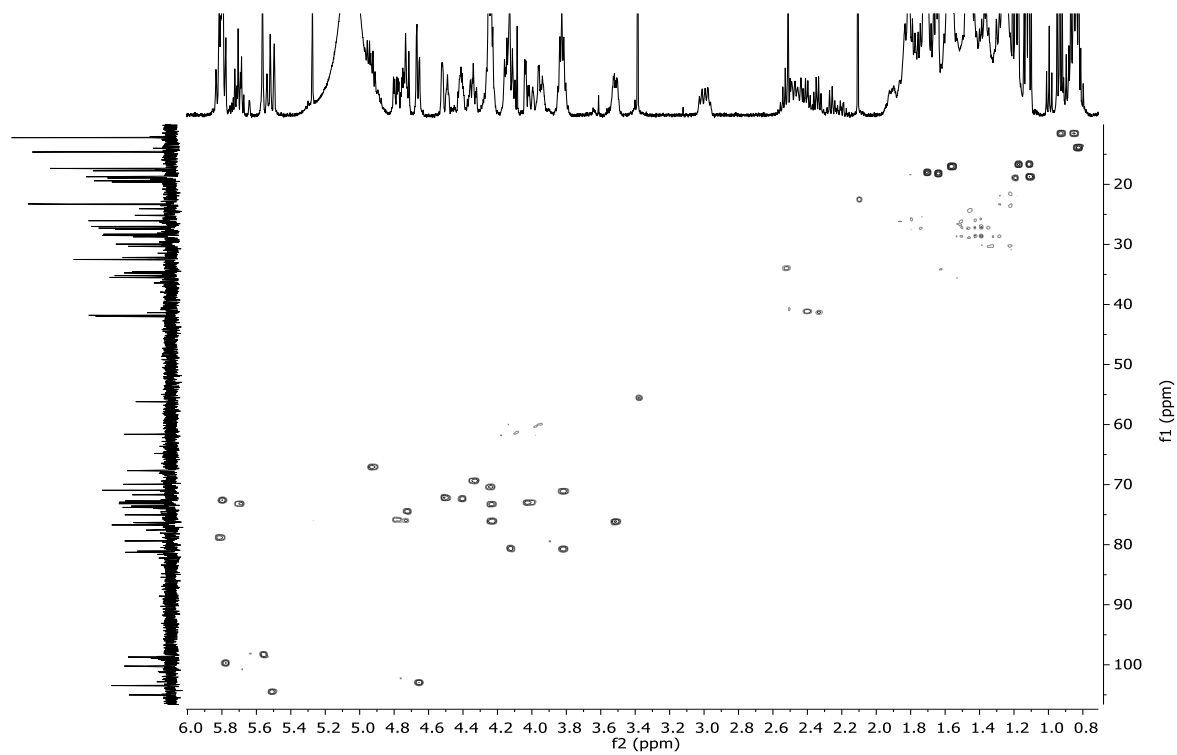
COSY



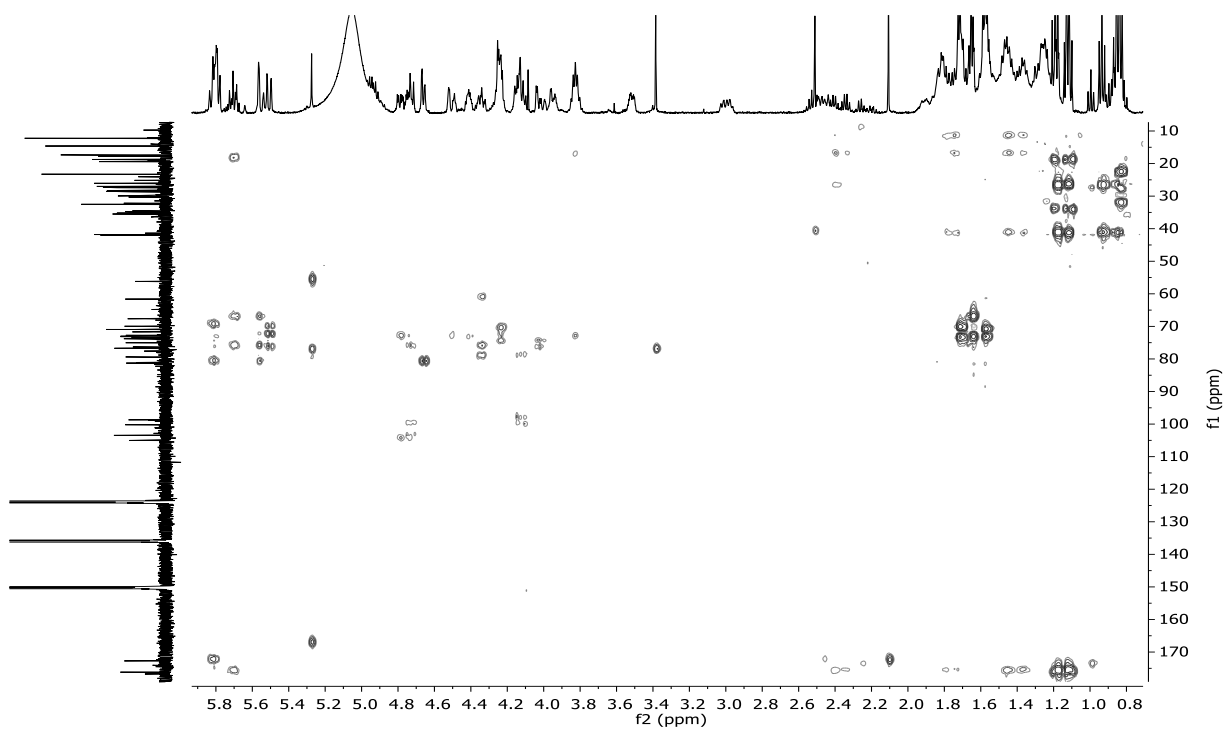
TOCSY



HSQC

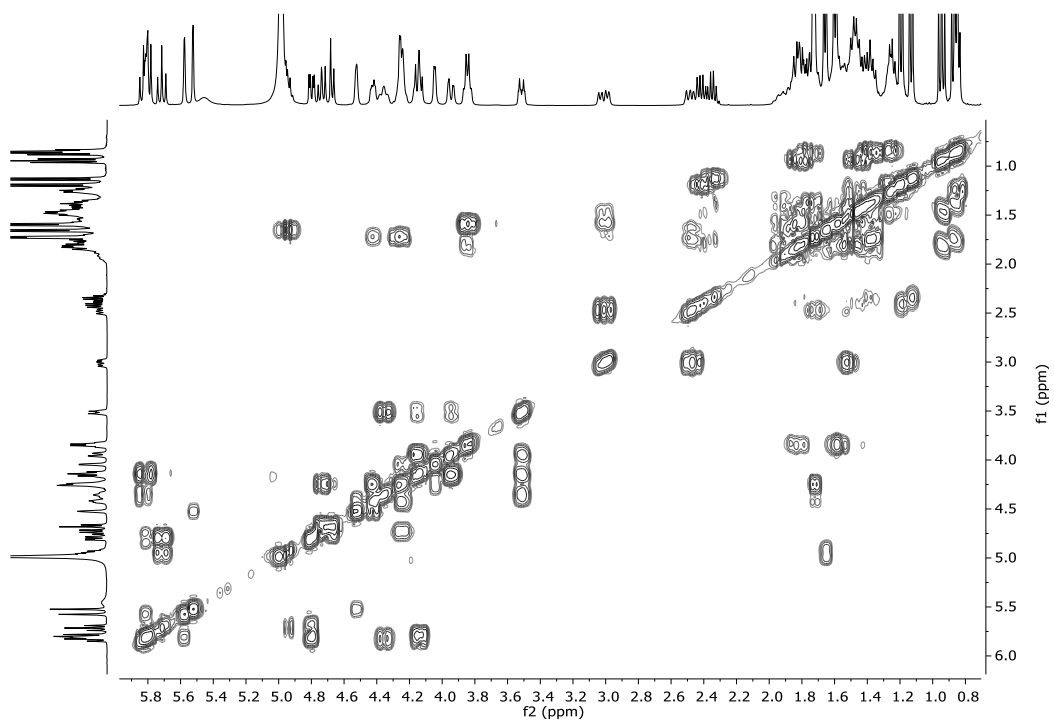


HMBC

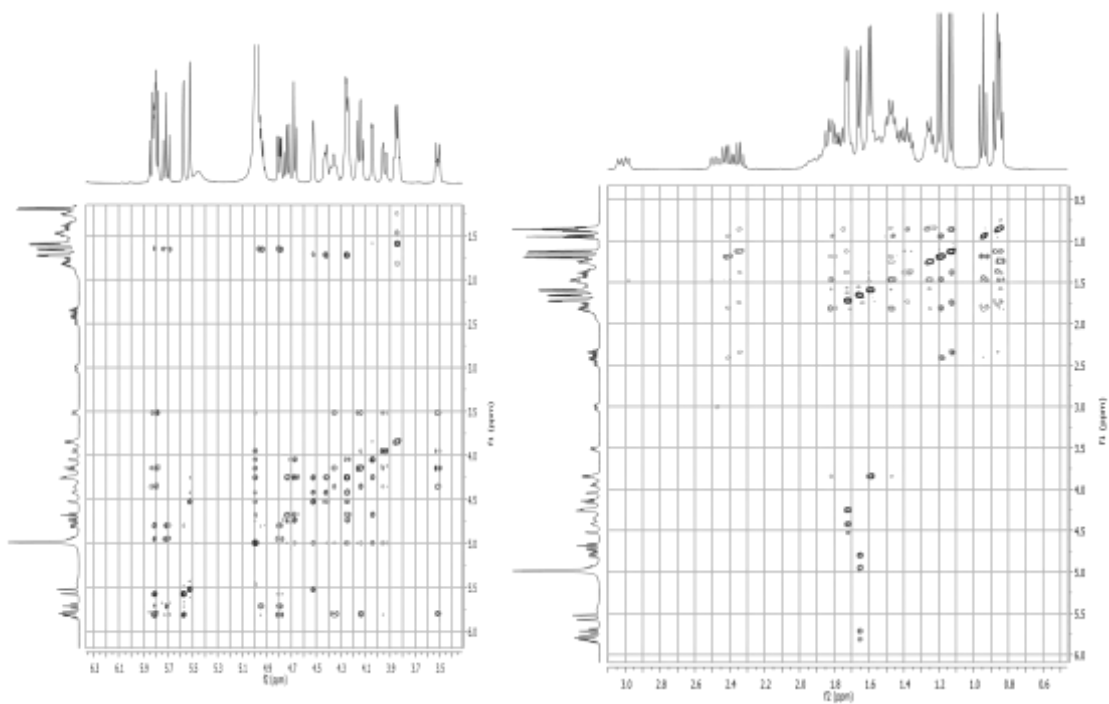


9.5. Espectros 2D para el pico P10 (Disolvente: Piridina-d₅).

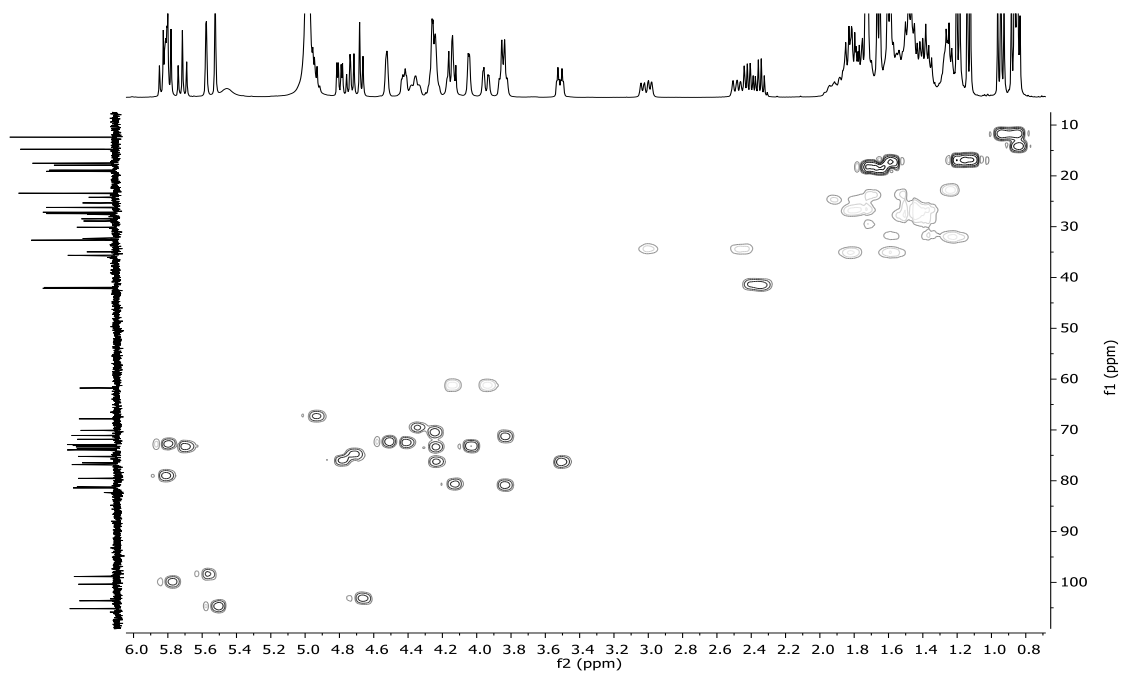
COSY



TOCSY



HSQC



HMBC

