



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

NÚCLEOS OLIGOSACÁRIDOS CONSTITUTIVOS DE LAS RESINAS GLICOSÍDICAS DE  
*Ipomoea hederifolia*: AISLAMIENTO Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRA EN CIENCIAS

PRESENTA  
Q. LEYDE KATERINE GUALTEROS MONTAÑO

TUTOR  
DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA  
FACULTAD DE QUÍMICA

CIUDAD DE MÉXICO, SEPTIEMBRE DE 2019



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
<b>Vocal</b>	Dr. José Federico del Río Portilla
<b>Vocal</b>	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
<b>Vocal</b>	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
<b>Secretario</b>	Dr. José Fausto Rivero Cruz

### **Sitio dónde se desarrolló el tema de investigación:**

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123, Conjunto E, Facultad de Química,  
Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio 123 del conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la asesoría del Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda.

Los resultados parciales de este trabajo se presentaron en el evento académico:

- “Recycling HPLC as an Analytical Methodology for the Purification of Hederifolic Acids from *Ipomoea hederifolia*”, *57th Annual Meeting of the Phytochemical Society of North America (PSNA-2018)* del 4 al 8 de agosto de 2018 en la Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, México (Mejor cartel para un trabajo a nivel maestría).

## AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento al Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (UNAM), por permitirme trabajar en su excelente grupo de investigación, por su apoyo en el desarrollo de un proyecto de investigación que llenó mis expectativas en su totalidad, por su comprensión y su asesoría en mi formación académica.

De igual manera quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones y personas:

- A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por las facilidades otorgadas para mi formación académica.
- Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de esta investigación y la beca otorgada (Número de becario CVU: 868396) durante el período de marzo del 2018-agosto del 2019.
- A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN208019, IN215016) por el financiamiento parcial de esta investigación.
- Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAII-Facultad de Química) por la obtención de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN).
- Al Dr. Carlos Martín Cerda García-Rojas del Departamento de Química del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por la asistencia brindada en la determinación de las rotaciones ópticas.

- A la Dra. Suzana Guimarães Leitão de la Facultad de Farmacia de la Universidad Federal de Rio de Janeiro (Brasil) por el registro de los espectros de masas en alta y baja resolución.
- A los miembros del Jurado: Dr. Ricardo Reyes Chilpa, Dr. José Federico del Río Portilla, Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa, Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava y Dr. José Fausto Rivero Cruz por las correcciones sugeridas en el manuscrito de tesis.
- Al Dr. Jhon Fredy Castañeda Gómez, Universidad Surcolombiana (Colombia), por proporcionar el material vegetal de estudio y la asesoría brindada durante la realización del presente trabajo de investigación.
- A la Dra. Mabel Clara Fragosó Serrano, Departamento de Farmacia de la Facultad de Química (UNAM), por su asesoría en el desarrollo del presente trabajo de investigación, por la cálidez humana con la que me recibió en el laboratorio y por sus valiosos consejos para mi formación integral.
- A mis amigos y compañeros por todo el apoyo brindado durante este valioso tiempo en la UNAM.
- A mi familia por ser la principal motivación para continuar mis estudios de posgrado.

*“A mis padres: Herneley Gualteros Hernández y Angelmira Montaña por ser el mayor ejemplo de tenacidad y amor que hay en mi vida; a mi hermano: Carlos Alberto Gualteros Montaña por ser la luz de mis ojos”*

## RESUMEN

*Ipomoea hederifolia* (Convolvulaceae) crece principalmente como enredadera, tiene una floración estacional y presenta una morfología acampanada. Se encuentra adaptada a diversos tipos de hábitats, sin embargo, los climas tropicales y cálidos favorecen su crecimiento. Entre los usos más destacados de esta especie vegetal se pueden enumerar sus propiedades nutricionales, alucionogénas, farmacobiológicas y ornamentales.

En la presente disertación, se presenta el estudio químico del extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de la especie *I. hederifolia*. Así, se aislaron y purificaron por primera vez las resinas glicosídicas de esta especie, las cuales se sometieron a saponificación y peracetilación para la obtención de cuatro ácidos glicosídicos peracetilados mayoritarios y su posterior purificación mediante el empleo de la cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) a nivel preparativo, haciendo uso de las técnicas de “corte y rasurado de núcleo” y de reciclaje de pico. Se realizó la elucidación estructural de dos de estos oligosacáridos que se identificaron como estructuras novedosas en la literatura fitoquímica y fueron denominaron como los ácidos hederifólicos I y III, constituidos por dos unidades de D-glucosa, dos de D-quinovosa, dos de L-ramnosa y una de D-fucosa.

La elucidación estructural se llevó a cabo a través del empleo de técnicas espectrométricas, (espectrometría de masas mediante ESI y FAB) y espectroscópicas, como la resonancia magnética nuclear ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en 1D y 2D). Los pesos moleculares se determinaron mediante espectrometría de masas, las unidades sacáridas se establecieron por medio de los experimentos de HSQC, TOCSY y COSY y la secuencia de glicosilación se estableció con el empleo de los experimentos HMBC y ROESY. Los ácidos hederifólicos I y III difieren entre sí por una unidad de oxígeno (16 Da) en su peso molecular, indicando una posición de hidroxilación en C-3 de la cadena hidrocarbonada de la aglicona constituida por el ácido 3-12-dihidroxiheptadecanoico en el ácido hederifólico I y el 12-hidroxiheptadecanoico en III. La identificación estructural de estas moléculas permite demostrar la diversidad química y la complejidad de estos compuestos con una distribución restringida entre las especies de la familia de las convolvuláceas.

## ABSTRACT

*Ipomoea hederifolia* (Convolvulaceae) grows mainly as a vine and has a seasonal flowering with funnel shaped flowers. This plant is adapted to different types of habitats, but tropical and warm climates being favored for its development. Among the most common uses of this species are the nutritional, hallucinogen, and ornamental. Many pharmacobiological properties have been described for this morning-glory.

In the present dissertation, the chemical study of the methanol-soluble resin glycosides obtained from the aerial parts of *I. hederifolia* is described. The total MeOH-soluble extract was derivatized by a saponification followed by acetylation to isolate four major peracetylated glycoside acids, named as hederifolic acids I-IV. The isolation of this novel derivatives was performed by preparative High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). "Core-cutting and shaving" and peak recycling techniques were used to achieve their purification. The linear oligosaccharide was assembled by two D-glucoses, two D-quinovoses, two L-rhamnoses, and one D-fucose.

Extensive work was performed exploring 1D and 2D NMR spectra for assessing the  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts in order to complete the structure elucidation of the isolated hederifolic acids I and III: the molecular weights were determined through mass spectrometry (ESI/FAB-MS); the saccharide units were elucidated by the HSQC, TOCSY and COSY experiments; and finally, the glycosylation sequence was established through the HMBC and ROESY experiments. The difference between hederifolic acids I and III was one atom of oxygen (16 Da), which indicated the presence of a hydroxylation in position C-3 of the aglycone in hederifolic acid I. Thus, 3-12-dihydroxyheptadecanoic acid was the aglycone in hederifolic acid I, while 12-hydroxyheptadecanoic in III. The structural identification of these molecules allows us to demonstrate the chemical diversity of the resin glycosides from their morning-glory family and their chemical complexity.

# CONTENIDO

		<b>Pág</b>
<b>I</b>	Lista de Figuras.....	VI
<b>II</b>	Lista de Cuadros.....	VIII
<b>III</b>	Lista de abreviaturas.....	IX
<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	1
<b>2.</b>	<b>ANTECEDENTES.....</b>	3
2.1	Generalidades.....	3
2.1.1	Familia Convolvulaceae.....	3
2.1.2	Género <i>Ipomoea</i> .....	3
2.1.3	Interés farmacobiológico.....	4
2.2	<i>Ipomoea hederifolia</i> : Identificación taxonómica.....	4
2.2.1	Morfología vegetal de la <i>Ipomoea hederifolia</i> .....	5
2.2.2	Actividades biológicas de la especie en estudio.....	5
2.2.2.1	Actividad antiinflamatoria.....	5
2.2.2.2	Actividad antioxidante.....	5
2.2.2.3	Actividad anticonvulsiva.....	6
2.2.2.4	Actividad antimicrobiana.....	6
2.2.2.5	Actividad citotóxica.....	6
2.2.3	Usos medicinales de <i>Ipomea</i> .....	7
2.3	Resinas glicosídicas.....	7
2.4	Técnicas cromatográficas.....	8
2.5	Elucidación estructural.....	10
2.5.1	Métodos degradativos.....	10

2.5.2	Métodos no degradativos.....	11
2.6	Diversidad estructural en la fracción metanólica o convolvulina...	11
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>4.</b>	<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>19</b>
<b>5.</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>20</b>
5.1	Objetivo general.....	20
5.2	Objetivos específicos.....	20
<b>6.</b>	<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>21</b>
6.1	Métodos cromatográficos.....	21
6.2	Recolección del material vegetal.....	22
6.3	Identificación taxonómica del material vegetal.....	22
6.4	Secado y molienda de las partes aéreas de <i>Ipomoea hederifolia</i> ....	22
6.5	Obtención de extractos.....	23
6.6	Fraccionamiento primario del extracto metanólico.....	23
6.7	Cromatografía en capa fina.....	24
6.8	Preparación de derivados de la fracción XVIII.....	24
6.8.1	Hidrólisis alcalina.....	24
6.8.2	Preparación del diazometano.....	25
6.8.3	Preparación del derivado peracetilado.....	25
6.9	Técnicas instrumentales.....	25
6.9.1	Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE).....	25
6.9.1.1	Purificación del derivado acetilado-metilado.....	25
6.9.2.1	Condiciones de operación a nivel analítico.....	26
6.9.2.2	Condiciones de operación a nivel preparativo.....	27

6.10	Determinación de las constantes físicas.....	28
6.11	Resonancia magnética nuclear.....	28
6.12	Espectrometría de masas.....	28
6.13	Identificación de las agliconas y azúcares.....	29
<b>7.</b>	<b>ANÁLISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>30</b>
7.1	Identificación taxonómica.....	30
7.2	Fraccionamiento del extracto metanólico.....	30
7.3	Aislamiento de las resinas glicosídicas.....	31
7.3.1	Condiciones cromatográficas CLAE a nivel analítico.....	31
7.3.2	Condiciones cromatográficas CLAE a nivel preparativo.....	32
7.4	Purificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios.....	33
7.5	Rotación óptica y puntos de fusión de los ácidos hederifólicos I-IV.....	33
7.6	Determinación de las masas exactas para los ácidos hederifólicos I-IV.....	34
7.7	Elucidación estructural de los ácidos glicosídicos.....	35
7.7.1	Ácido hederifólico I.....	35
7.7.2	Ácido hederifólico III.....	45
<b>8.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>52</b>
<b>9.</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>53</b>
<b>10.</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>61</b>

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Estructuras químicas de los carbohidratos más comunes en los núcleos de las resinas glicosídicas.	8
<b>Figura 2.</b> Estructura general de una resina glicosídica de tipo macrocíclico y anfipática. Porción hidrofílica (núcleo oligosacárido) porción hidrofóbica (ácido orgánico y ácido graso).	9
<b>Figura 3.</b> Ácidos arvésicos aislados del extracto metanólico de <i>Convolvulus arvensis</i> .	12
<b>Figura 4.</b> Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de las semillas de <i>Quamoclit × multífida</i> : <b>1</b> = multifidina III; <b>2</b> = multifidina IV; <b>3</b> = multifidina V; <b>4</b> = multifidina VI; <b>5</b> = multifidina VII; <b>6</b> = multifinida VIII; <b>7</b> = multifidina IX; <b>8</b> = metil éster del ácido quamoclínico; <b>9</b> = ácido operculínico XIII; <b>10</b> = ácido quamoclínico I; <b>11</b> = QM-10 y <b>12</b> = QM-12.	13
<b>Figura 5.</b> Ácidos arvésicos E-J aislados de <i>Convolvulus arvensis</i> .	14
<b>Figura 6.</b> Resinas glicosídicas reportadas de <i>Phabitis nil</i> .	15
<b>Figura 7.</b> Estructura química del jalapinósido I.	16
<b>Figura 8.</b> Estructura química del jalapinósido II.	17
<b>Figura 9.</b> Estructura química del jalapinósido B.	18
<b>Figura 10.</b> Partes aéreas de <i>Ipomoea hederifolia</i> , Reserva Natural La Montaña del Ocaso, Quindío, Colombia, marzo de 2013.	22
<b>Figura 11.</b> A) Columna abierta, fraccionamiento primario. B) Eluatos obtenidos.	23
<b>Figura 12.</b> A) Cromatógrafo líquido de alta eficiencia; con detector de índice de refracción; B) Válvula de reciclaje.	26
<b>Figura 13.</b> Perfil cromatográfico de la fracción XVIII, obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia a nivel preparativo.	28
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico a nivel analítico de la fracción XVIII del extracto metanólico.	32
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico a escala preparativa de la fracción XVIII del extracto metanólico de las partes aéreas de <i>I. hederifolia</i> , donde se muestran los picos aislados por la técnica de “corte de núcleo”.	33

<b>Figura 16.</b> Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) del ácido hederifólico I peracetilado	36
<b>Figura 17.</b> Región de señales anoméricas del espectro de HSQC, ácido hederifólico I.	37
<b>Figura 18.</b> Porción del espectro bidimensional COSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico I. Correlaciones $^3J_{\text{H-H}}$ : Q 1-2; Qui H1-H2, Q 2-3; Qui H2-H3, Q 3-4; Qui H3-H4, Q 4-5; Qui H4-H5.	38
<b>Figura 19. Figura 19.</b> Porción del espectro bidimensional TOCSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico I. Abreviaturas: Glu =G = glucosa, Ram = R= ramnosa, Qui = Q= quinovosa, Fuc = F= fucosa.	39
<b>Figura 20.</b> Porción del espectro ROESY del ácido hederifólico I. Interacción nOe: Ram' H-3 ( $\delta_{\text{H}}$ 4.66)/Glu' H-1 ( $\delta_{\text{H}}$ 5.43).	40
<b>Figura 21.</b> Espectro de masas por impacto electrónico de la aglicona metilada-sililada y su patrón de fragmentación (70 eV).	41
<b>Figura 22.</b> Estructura química propuesta para el ácido hederifólico I.	44
<b>Figura 23.</b> Comparación de los espectros de $^1\text{H}$ - RMN (400 MHz) obtenidos para los ácidos hederifólicos I ( <b>trazo superior</b> ) y III ( <b>trazo inferior</b> ).	46
<b>Figura 24.</b> Región de señales anoméricas del espectro de HSQC, ácido hederifólico III.	47
<b>Figura 25.</b> Porción del espectro bidimensional COSY ( $^1\text{H}-^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico III. Correlaciones $^3J_{\text{H-H}}$ : G 1-2; Glu H1-H2, G 3-2; Glu H3-H2, G 3-4; Glu H3-H4, G 4-5; Glu H4-H5, G 6a-6b; Glu H6a-H6b, G 5-6a; Glu' H5-H6a.	47
<b>Figura 26.</b> Porción del espectro bidimensional TOCSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico III. Abreviaturas: Glu=G =Glu'=G'= glucosa, Ram = R= Ram'= R' ramnosa, Qui = Q= Qui'= Q'= quinovosa, Fuc = F= Fuc'= F= fucosa.	48
<b>Figura 27.</b> Estructura química propuesta para el ácido hederifólico III.	51

## LISTA DE CUADROS

	Pág.
<b>Cuadro 1.</b> Fraccionamiento primario del extracto metanólico de <i>Ipomoea hederifolia</i>	24
<b>Cuadro 2.</b> Identificación taxonómica del material vegetal.	30
<b>Cuadro 3.</b> Fracciones reunidas del extracto metanólico	31
<b>Cuadro 4.</b> Puntos de fusión y rotaciones ópticas para los ácidos hederifólicos I-IV.	34
<b>Cuadro 5.</b> Masas de los ácidos hederifólicos I-IV	34
<b>Cuadro 6.</b> Constantes espectroscópicas de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) y $^{13}\text{C}$ (100 MHz) para el ácido hederifólico I en piridina- $d_5$ .	42
<b>Cuadro 7.</b> Constantes espectroscópicas de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz) y $^{13}\text{C}$ (100 MHz) para el ácido hederifólico III en piridina- $d_5$ .	49

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
CCF	Cromatografía en capa fina
CLAE	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
COSY	<i>Correlation spectroscopy</i>
d	Doblete
dd	Doble de dobles
ddd	Doble de dobles de dobles
d.i.	Diámetro interno
ESI	<i>Electrospray ionization</i>
FAB	<i>Fast Atom Bombardemet</i>
Fuc	Fucosa
Glu	Glucosa
HMBC	<i>Heteronuclear multiple-bond coherence spectroscopy</i>
HPLC	<i>High Performance Liquid Chromatograpy</i>
HR-MS	High Resolution Mass Spectrometry
HSQC	<i>Heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy</i>
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MS	<i>Mass Spectrometry</i>
Piridina <i>d</i> <sub>5</sub>	Piridina deuterada
P.f.	Punto de fusión
Qui	Quinovosa
Ram	Ramnosa

RMN	Resonancia magnética nuclear
t	Triplete
TOCSY	<i>Total correlation spectroscopy</i>
1D	Monodimensional
2D	Bidimensional

# 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas han desarrollado un rol importante desde la antigüedad en la vida de los humanos, cubriendo necesidades básicas como alimentación, materia prima para la construcción de viviendas y ropa, para ambientar espacios y en la preparación de remedios herbolarios [1]. Las especies vegetales se encuentran distribuidas a lo largo del planeta y se han adaptado a condiciones climáticas variadas, lo que ha facilitado su propagación y crecimiento por diferentes territorios. En las especies vegetales se encuentran principios bioactivos, de ahí que se empleen en la elaboración de fitofármacos enfocados en el tratamiento de padecimientos específicos. Los conocimientos ancestrales sobre los preparados medicinales han sido un aliciente, en la búsqueda actual de metabolitos con interés farmacobiológico, debido al actual interés del hombre por utilizar productos que provengan de origen natural [2].

La familia Convolvulacea ha sido utilizada en la preparación de remedios herbolarios desde la antigüedad. Uno de los géneros más importantes dentro de esta familia es el *Ipomea*, que cuenta con aproximadamente 500 especies reportadas; éstas crecen de forma silvestre como enredaderas, arbustos o pequeños árboles, presentan floración anual y sus flores poseen forma de campanas. Las especies de *Ipomea* presentan una amplia actividad biológica debido a los metabolitos secundarios que la conforman (alcaloides de tipo *ergot* y glicolípidos principalmente) [3]; tal es el caso de *I. batatas* que presenta actividades antimutagénica [4], antioxidante [5] y se emplea como una fuente alimenticia [6, 7]. En las especies *I. aquatica* e *I. carnea* la actividad antihipoglucemiante y su contenido de alcaloides [8, 9]; las especies *I. pes-capre* e *I. cairicia* han mostrado propiedades antinociceptivas [10,11] e *I. nil* presenta efectos purgantes [12]. Estudios recientes describieron que *I. alba* desarrolla un efecto modulador a la resistencia cruzada a fármacos en células tumorales resistentes a vinblastina, entre otros [13].

Los efectos purgantes de las ipomoeas se atribuyen a compuestos llamados resinas glicosídicas; estas moléculas están compuestas por una parte hidrofílica conformada por un núcleo oligosacárido y una parte hidrofóbica constituida por una aglicona, representada por un ácido graso mono o dihidroxilado de 14 ó 16 átomos de carbono, generalmente en forma

de macrolactona. También, el núcleo oligosacárido puede encontrarse esterificado con ácidos grasos saturados de diferente longitud de cadena [14]. Los estudios químicos basados en las especies de *Ipomoea* han permitido el aislamiento de sus metabolitos secundarios principales tales como los glicolípidos y conocer acerca de la diversidad estructural de estas moléculas, como es el caso de los pescaprosido A y las pescapreinas I-V de *I. pes-capre* [15], las murocoidinas I-V de *I. murucoides* [16] y las escamoninas I-II y orizabinas V-VIII de *I. orizabensis* –la falsa jalapa– [17], a los cuales se les han atribuido un potencial citotóxico.

El presente estudio se basó en la contribución al conocimiento de la diversidad química de las resinas glicosídicas. Para ello, se estudiaron los glicolípidos presentes en el extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *I. hederifolia*. Esta especie se distribuye ampliamente en las zonas tropicales de América y, en la actualidad, no existen descripciones en la literatura sobre su composición química. Las partes aéreas de la *I. hederifolia* se recolectaron en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso, en el municipio de Quimbaya, Departamento del Quindío, Colombia. Posteriormente, este material se dejó secar a 40 °C durante siete días; seguidamente, fue pulverizado y se realizó una extracción por maceración exhaustiva con metanol. Una vez obtenido el extracto, éste se fraccionó por cromatografía en columna abierta y, por medio de cromatografía en capa fina, se seleccionaron las fracciones en las que se encontraban las resinas glicosídicas. Se emplearon métodos degradativos para facilitar su análisis cromatográfico. Los compuestos fueron aislados y purificados a través de cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE), empleando las modalidades de “rasurado y corte de núcleo” y “reciclaje de pico” a través de un número determinado de ciclos. Las masas de los compuestos se establecieron por medio de espectrometría de masas de alta y baja resolución y la elucidación estructural por medio de resonancia magnética nuclear, RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) empleando experimentos mono y bidimensionales.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades

#### 2.1.1 Familia Convolvulaceae

La familia Convolvulaceae contiene 57 géneros y 1880 especies descritas hasta hoy [18]; se encuentra distribuida en diferentes hábitats debido a que se propaga rápidamente y se adapta a diferentes tipos de climas, favoreciendo su crecimiento y distribución los climas templados [19]. Las especies pertenecientes a esta familia pueden presentar crecimientos de tipo arbustivo, pero en la mayoría de los casos crecen como enredaderas o lianas. Dentro de esta familia, los alcaloides alucinógenos de tipo *ergot* – son biosintetizados por hongos endófitos [20] que viven en asociación en los tejidos internos de estas plantas– y las resinas glicosídicas, se encuentran como los metabolitos secundarios principales, estas últimas de interés farmacobiológico principalmente por su acción purgante, entre otras [21, 22].

#### 2.1.2 Género *Ipomoea*

Las especies del género *Ipomoea* son las más abundantes dentro de la familia Convolvulaceae. Este género está conformado por 650 especies y su crecimiento se ve favorecido en los climas cálidos y tropicales. Estas plantas son enredaderas, arbustos y árboles pequeños que florecen en ciertas épocas del año en la forma de una campana [23, 24].

En la medicina tradicional [21], las especies de este género han sido empleadas en la elaboración de remedios herbolarios para el tratamiento de múltiples padecimientos; se usan principalmente por sus efectos purgante (*I. purga*), antimicrobiano (*I. murucoides*), anticancerígeno (*I. orizabensis*) y antiinflamatorio (*I. pes-caprae*), entre otros; también, se utilizan como una fuente nutricional (*I. batata*) y con fines ornamentales (*I. purpurea*) [25-27].

### 2.1.3 Interés farmacobiológico

El género *Ipomoea*, al igual que todos los miembros de las convolvuláceas, tiene como principal característica la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas; éstas son moléculas de carácter anfipático, constituidas por una parte hidrofóbica (aglicona) y una parte hidrofílica (núcleo de sacáridos). Estas especies se han empleado desde la época precolombina, principalmente, por su acción purgante que despertó el interés científico por el estudio químico de estas especies vegetales [28]. También, numerosas especies de convolvuláceas se utilizan ampliamente en la jardinería, gracias al colorido de sus flores para ornamentar diferentes espacios. Además, sus semillas se usan como agentes enteógenos en rituales de adivinación o religiosos, asimismo con fines recreativos, lúdicos o médicos, debido a las alucinaciones que se pueden presentar tras su consumo por la presencia de alcaloides alucinógenos de tipo *ergot* [20].

Uno de sus principales usos es el nutricional, tal es el caso de *I. batatas*, esta especie es originaria de la región mesoamericana, comúnmente conocida como “camote”; esta enredadera es de fácil cultivo y resistente a condiciones climáticas variables, presenta un crecimiento como planta rastrera, posee raíces comestibles las cuales han sido empleadas para la alimentación desde los tiempos prehispánicos en México, debido a que cuenta con un alto contenido de carbohidratos, vitaminas, fibras y minerales [29].

### 2.2 *Ipomoea hederifolia*: Identificación taxonómica

La *I. hederifolia* se identifica taxonómicamente como se muestra a continuación [30].

Reino	Plantae
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Convolvulaceae
Género	<i>Ipomoea</i>
Epíteto específico	<i>I. hederifolia</i>
Autor botánico	Linnaeus
Nombre común	“Scarlet morning glory”, batatilla roja

### **2.2.1 Morfología vegetal de la *Ipomoea hederifolia***

La *I. hederifolia* es una enredadera de florecimiento anual de tipo heterofila (hojas desiguales), tiene estomas paracíticos y tricomas multicelulares que se encuentran en las hojas y el tallo. Al ser heterofila, las morfologías de sus hojas son ovaladas, suborbiculares y lobuladas de 2-15 cm de largo. Las flores poseen pedicelos de 5-7 mm de largo, un ápice obtuso, exteriores de dos sépalos con una cerda subterminal de 1.6-6 mm de largo, corola de color rojo a amarillo rojizo 2.5-4.5 cm de largo. Las semillas son de color marrón oscuro o en algunos casos negras, de superficie piriforme y dorsal [31,32].

### **2.2.2 Actividades biológicas de la especie en estudio**

#### **2.2.2.1 Actividad antiinflamatoria**

Se determinó la actividad antiinflamatoria del extracto metanólico de *I. hederifolia*; para ello, OjoAtawodi y colaboradores emplearon dosis de 100, 200 y 300 mg/kg de extracto en ratas a las que se les había inducido la formación de edemas en las patas, por medio de una inyección de carragenina. Encontraron que la inflamación se redujo en comparación con el grupo control de animales. El mayor porcentaje de inhibición (54.63%) lo presentó el extracto metanólico a una concentración de 300 mg/kg, también realizaron pruebas con el fármaco de referencia la indometacina el cual inhibió en un 57.55%. En el modelo inflamatorio crónico, las fracciones metanólicas (200 y 300 mg/kg) inhibieron el peso del granuloma en 18.15% y 22.24%, respectivamente, mientras que la indometacina lo inhibió en 29.63%. Los resultados indican que el extracto metanólico de *I. hederifolia* presenta actividad antiinflamatoria en la inflamación aguda y crónica [33].

#### **2.2.2.2 Actividad antioxidante**

Los autores [30] determinaron la actividad antioxidante a través del ensayo de blanqueamiento del DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) [34]. Trazaron la curva de

inhibición y obtuvieron los valores de IC<sub>50</sub> 50, 42 y 65  $\mu$ L, encontrando que el extracto de *I. hederifolia* posee actividad antioxidante por el método del DPPH.

### **2.2.2.3 Actividad anticonvulsiva**

Botham y colaboradores evaluaron la toxicidad aguda, teniendo como base, la guía de la toxicidad OCDE-423. Los ensayos de toxicidad se llevaron a cabo sobre un grupo de ratones y encontraron que la *I. hederifolia* en bajas concentraciones es un estimulante del sistema nervioso central [35].

### **2.2.2.4 Actividad antimicrobiana**

La actividad antibacteriana del extracto de *I. hederifolia* [30,36] se probó contra bacterias Gram negativas como *Pseudomonas aeruginosa* y *Escherichia coli*. Las cepas bacterianas se cultivaron en el medio Luria Bertani (LB) esterilizado (pH 5.7) durante 16-18 h a 37 °C en un agitador rotatorio. Se prepararon los medios de LB con agar como agente gelificante y se esterilizaron a 121 °C durante 15-20 minutos en una autoclave. Los discos esterilizados se colocaron a la misma distancia. Los cuatro compuestos (5 mg cada uno) se pesaron y se disolvieron en 5 mL de dimetilsulfóxido (DMSO). Las muestras de análisis (3  $\mu$ L) se colocaron en los discos y las placas se envolvieron herméticamente con parafilm y se incubaron a 37 °C durante 24 h. Se encontró que el extracto de *I. hederifolia* presentaba actividad antibacteriana.

### **2.2.2.5 Actividad citotóxica**

Se evaluó el efecto de la convolvulina extraída de la raíz de la *I. hederifolia* sobre las líneas celulares aislados de aorta e íleon de rata y contra líneas celulares de Caco-2 y KB. Este extracto metanólico demostró actividad citotóxica contra la línea celular KB derivada del carcinoma nasofaríngeo [30].

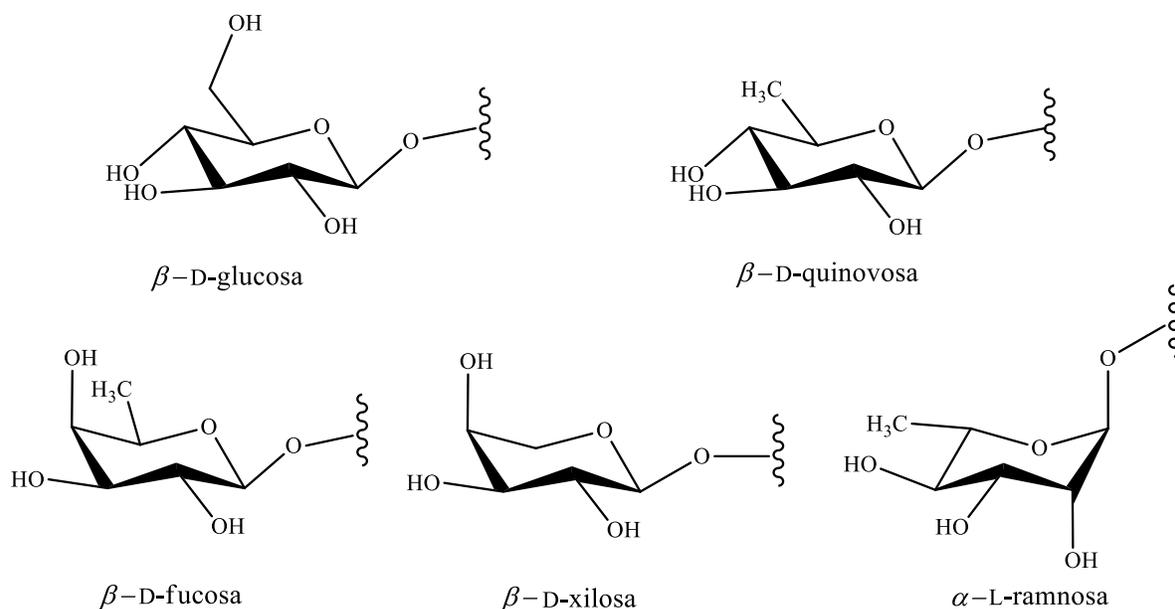
### 2.2.3 Usos medicinales de *Ipomoea*

Las raíces de algunas especies de *Ipomoea* se han empleado para tratar dolores de estómago, como purgantes y antiparasitarios. La papa gigante, *I. mauritiana*, es uno de los ingredientes del *chyawanprash*, un preparado herbolario de la medicina Ayurvédica conocido por sus propiedades medicinales y nutritivas como “el elixir de la vida” [37]. Las semillas de *I. tricolor* e *I. violacea* fueron empleadas por los aztecas y zapotecas, en rituales chamánicos y religiosos, también, las usaron en la preparación de venenos basándose en sus propiedades enteogénicas debido a su alto contenido de alcaloides de tipo ergolina, muchas especies contienen alucinógenos derivados del *ergot* producidos por hongos endófitos del género *Periglandula* [20].

### 2.3 Resinas glicosídicas

Las resinas glicosídicas son derivados glicosilados de ácidos grasos mono y dihidroxilados generalmente de 14 ó 16 átomos de carbono. Su estructura química le otorga un carácter anfipático al poseer un ácido graso (hidrófobo) y un núcleo de azúcares (hidrófilo); estos constituyentes están unidos a través de un enlace tipo éster intramolecular (enlace anomérico) formando una estructura macrocíclica a través de una lactonización intramolecular o también se pueden encontrar en la forma abierta y el núcleo oligosacárido se puede encontrar esterificado por ácidos grasos de cadena corta o larga. Cabe mencionar que estas moléculas forman parte de los principales metabolitos secundarios constitutivos de la familia Convolvulaceae [21].

Los oligosacáridos son metabolitos de alto peso molecular, el núcleo compuesto por azúcares se une a través de enlaces *O*-glicosídicos, los cuales se conectan por medio de enlaces covalentes. Los monosacáridos que con mayor frecuencia se encuentran en estos compuestos son la D-glucosa, la D-quinovosa, la L-ramnosa, la D-fucosa y, con menor frecuencia, la D-xilosa (**Figura 1**) [38].



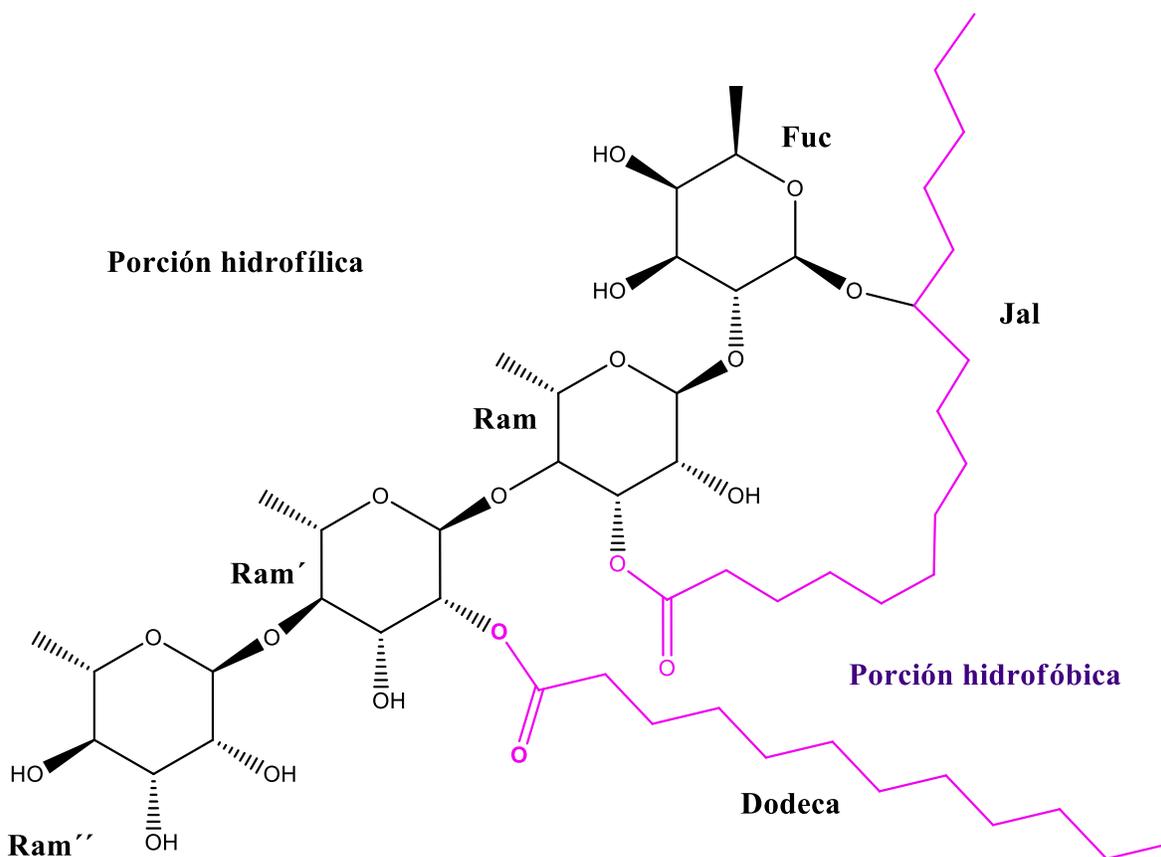
**Figura 1.** Estructuras químicas de los carbohidratos más comunes en los núcleos de las resinas glicosídicas.

Los oligosacáridos presentan una gran diversidad estructural debido al número y tipo de unidades que constituyen el núcleo, la posición y el tipo de lactonización, las posiciones y la cantidad de hidroxilaciones de la aglicona, la secuencia de glicosilación la cual puede ser lineal o ramificada, el tipo de ésteres que están unidos a los carbohidratos. Se han descrito desde núcleos disacáridos hasta heptasacáridos, al igual que dímeros, entre otros. La aglicona de estas moléculas está compuesta principalmente por los ácidos jalapinólico (11*S*-hidroxihexadenacoico) o convolvulínico (11*S*-hidroxitetradecanoico). Estas especies se pueden aislar a través de CLAE y se pueden caracterizar a través de RMN 1D y 2D y HR-MS [27, 28, 30]. En la **Figura 2** se presenta la estructura general de una resina glicosídica característica de las convolvuláceas.

## 2.4 Técnicas cromatográficas

La estructura química de las resinas glicosídicas dificulta su separación mediante el empleo de métodos convencionales como la cromatografía en capa fina o en columna; esto se debe principalmente a la naturaleza anfipática de estas moléculas que cuentan con una porción polar y otra apolar; además, muchas de estas moléculas presentan el mismo núcleo

oligosacárido y cuentan únicamente con una diferencia estructural en sus agliconas. Por lo tanto, su coeficiente de partición es sumamente semejante. Para ello surgió la necesidad de emplear técnicas de mayor resolución, como la cromatografía de líquidos, que permite la separación de moléculas de alta complejidad como los oligosacáridos. Ante la necesidad de analizar moléculas con alto peso molecular, no volátiles y termolábiles, surgió la CLAE la cual permite el análisis de biomoléculas como los oligosacáridos y polisacáridos de origen vegetal. Las características químicas de las resinas glicosídicas, hacen que sea idóneo el uso de la cromatografía líquida en fase reversa (FR-CLAE) para su análisis [39].



**Figura 2.** Estructura general de una resina glicosídica anfipática de tipo macrocíclica. Porción hidrofílica (núcleo oligosacárido) porción hidrofóbica (ácido orgánico y ácido graso).

Es importante tener en cuenta la naturaleza de la fase estacionaria para lograr una adecuada separación y obtener la mejor resolución de las mezclas de resinas glicosídicas, para ello se emplean las columnas de sílice derivatizadas con grupos hidrofóbicos de cadenas alifáticas C<sub>18</sub> (octadecilsilano), amino (aminopropilsilano), ciano (cianopropilsilano) y fenilo

(fenilsilano); el uso de cada columna dependerá de la evaluación de diferentes parámetros operacionales, buscando obtener la mejor separación de los picos cromatográficos [40].

La separación de los componentes utiliza el principio de la cromatografía, sin embargo, la purificación de los compuestos de interés se debe principalmente al uso de las técnicas de “corte y rasurado de núcleo” y “reciclaje de pico” [41]. Estas técnicas implican la presencia de una válvula de reciclaje en el equipo cromatográfico, haciendo que el pico de interés recircule por la columna y sea detectado por el detector de índice de refracción un número determinado de ciclos, esto permite la purificación del compuesto de interés por tanto a través del reciclaje se eliminan las sustancias consideradas como impurezas [8]. El uso de la válvula de reciclaje ha permitido la separación de un gran número de oligosacáridos tales como las orizabina I-XXI (*I. orizabensis*) [41], las purginas I-III (*I. purga*) [37], las murucoidinas I-V (*I. murucoides*) y los batatinósidos I-VI (*I. batatas*) [42].

## **2.5 Elucidación estructural**

Para lograr una separación estructural adecuada, se suelen emplear métodos degradativos como las hidrólisis alcalina y ácida, así como las técnicas espectroscópicas de RMN (1D y 2D) y técnicas espectrométricas de alta y baja resolución [21].

### **2.5.1 Métodos degradativos**

Los métodos degradativos son reacciones químicas que se usan para reducir la complejidad de las moléculas que se desean analizar. En este caso se utilizan hidrólisis que permiten dividir la molécula en fragmentos más pequeños. Para ello, se emplean técnicas de saponificación a través de las cuales se pueden obtener los ácidos orgánicos que esterifican al núcleo oligosacárido y la apertura de la macrolactona. Estos productos de saponificación son derivatizados, para formar ésteres metílicos solubles en disolventes orgánicos apróticos como el  $\text{CHCl}_3$ , que facilitan su análisis por cromatografía de gases. En tanto que el ácido glicosídico resultante es soluble en agua y se recupera a través de particiones con *n*-butanol, la hidrólisis y derivatización de estos oligosacáridos generan cambios en su polaridad que

permiten realizar corridas cromatográficas con mejor resolución y separación en un menor tiempo [40].

### 2.5.2 Métodos no degradativos

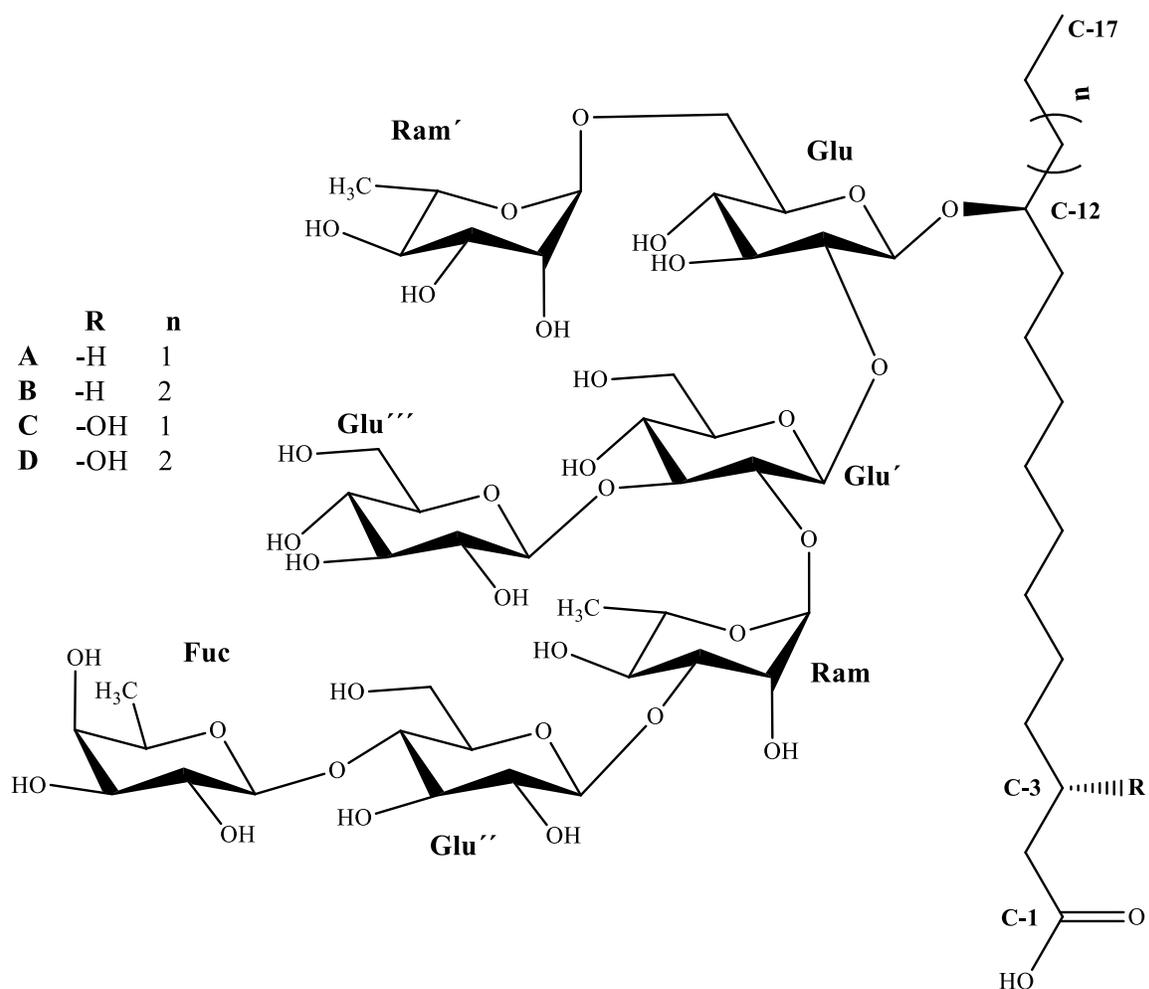
Para la elucidación estructural es necesario emplear herramientas espectroscópicas y espectrométricas tales como la RMN y la HR-MS. Estas técnicas permiten determinar la estructura química de la molécula sin necesidad de degradar el producto de origen. Por medio de la RMN, utilizando los experimentos en 1D ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y 2D (COSY, TOCSY, HMBC, HSQC y ROESY) se obtienen espectros que proporcionan información acerca de los tipos de enlaces, carbonos anoméricos (número de unidades sacáridas presentes en la molécula); también, se pueden establecer la secuencia de glicosilación, la posición de lactonización, de esterificación del núcleo sacárido y de hidroxilación en la aglicona [43].

### 2.6 Diversidad estructural en la fracción metanólica o convolvulina

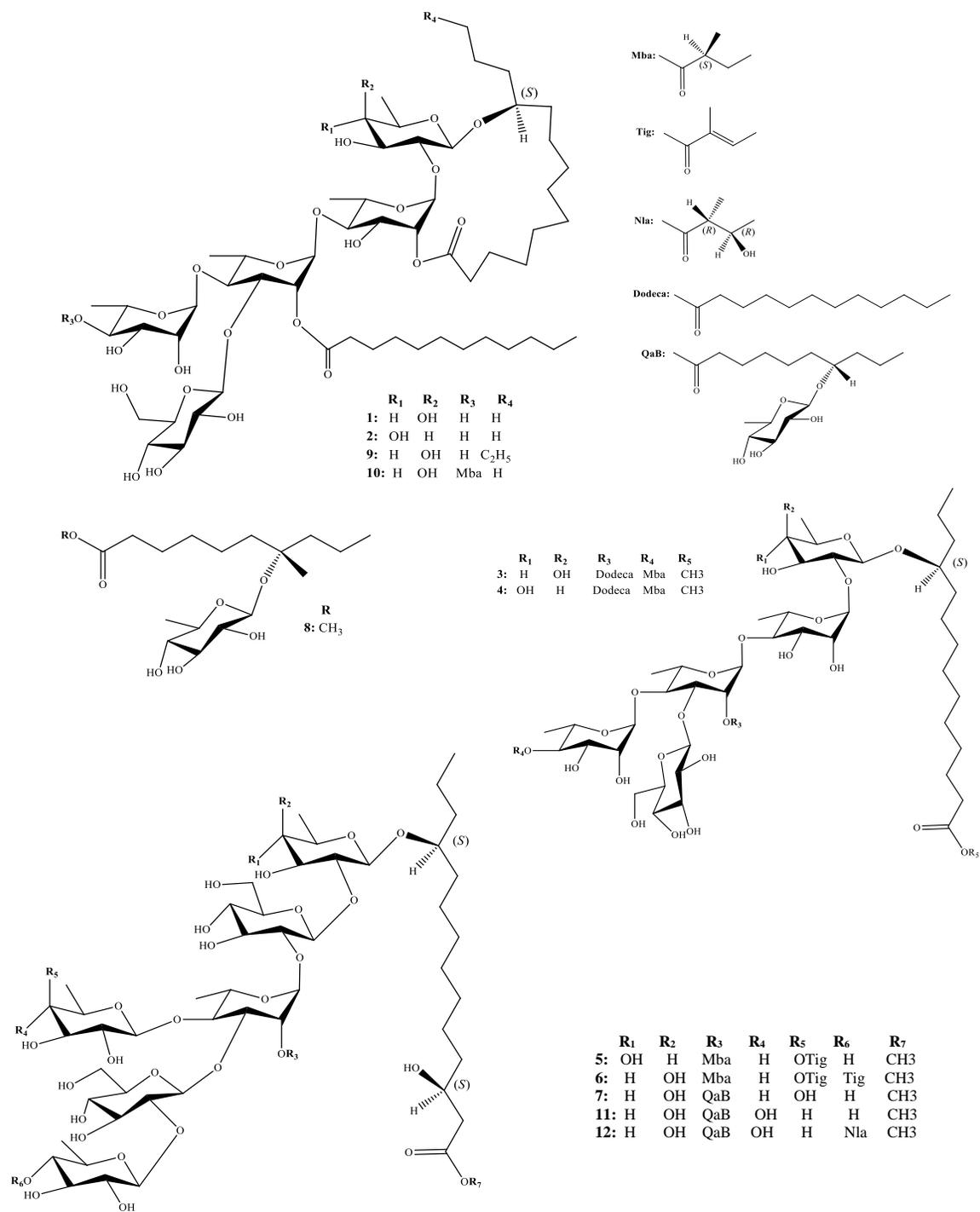
Los ácidos arvénicos A-D fueron aislados del extracto metanólico de la especie *Convolvulus arvensis* [44]. Los cuatro compuestos presentaron el mismo núcleo heptasacárido, constituido por una unidad de D-fucosa, dos unidades de L-ramnosa y cuatro unidades de D-glucosa. Los ácidos arvénicos A-D sólo difieren entre sí en la hidroxilación en la posición C-3 de la aglicona y en su longitud (véase **Figura 3**), siendo para el ácido arvénico A, el ácido (12*S*)-hidroxipentadecanoico; para el ácido arvénicos B, el ácido (12*S*)-hidroxihexadecanoico; para el ácido arvénicos C, el ácido (3*S*,12*S*)-hidroxipentadecanoico; y, por último, para el ácido arvénicos D, el ácido (3*S*,12*S*)-hidroxihexadecanoico.

Ono y colaboradores lograron aislar siete resinas glicosídicas a partir del extracto metanólico de las semillas de *Quamoclit × multifida* [45], el material vegetal se compró en Japón en 1990, la identificación se llevó a cabo por el profesor Kazumoto Miyahara y el ejemplar de herbario fue depositado en el Laboratorio de Química de Productos Naturales, Escuela de Agricultura de la Universidad de Tokai. Los autores nombraron a los oligosacáridos aislados como las multifidinas III-IX y, también, aislaron cinco glicósidos ya

conocidos como el éster metílico del ácido quamoclínico, los ácidos operculínico XIII, quamoclínico I, QM-10 y QM-12 (véase **Figura 4**). La estructura química de los compuestos purificados se determinó a través del análisis de los espectros obtenidos por RMN mono ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y bidimensionales (COSY, TOCSY, HMBC y HMQC) a una frecuencia de 500 y 600 MHz. Las masas de los compuestos se determinaron utilizando las técnicas espectrométricas de baja y alta resolución. Por último, se evaluó el potencial citotóxico de las multifidinas III, IV y VII, el ácido operculínico XIII, y de los compuestos QM-10 y QM-12.



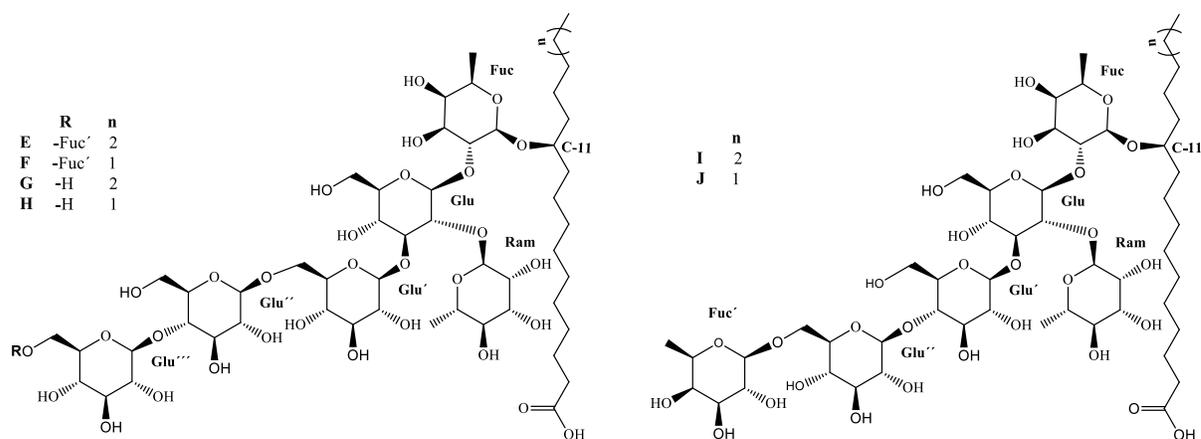
**Figura 3.** Ácidos arvénicos aislados del extracto metanólico de *Convolvulus arvensis*.



**Figura 4.** Estructuras de los compuestos aislados del extracto metanólico de las semillas de *Quamoclit x multífida*: **1** = multifidina III; **2** = multifidina IV; **3** = multifidina V; **4** = multifidina VI; **5** = multifidina VII; **6** = multifidina VIII; **7** = multifidina IX; **8** = metil éster del ácido quamoclínico; **9** = ácido operculínico XIII; **10** = ácido quamoclínico I; **11** = QM-10 y **12** = QM-12.

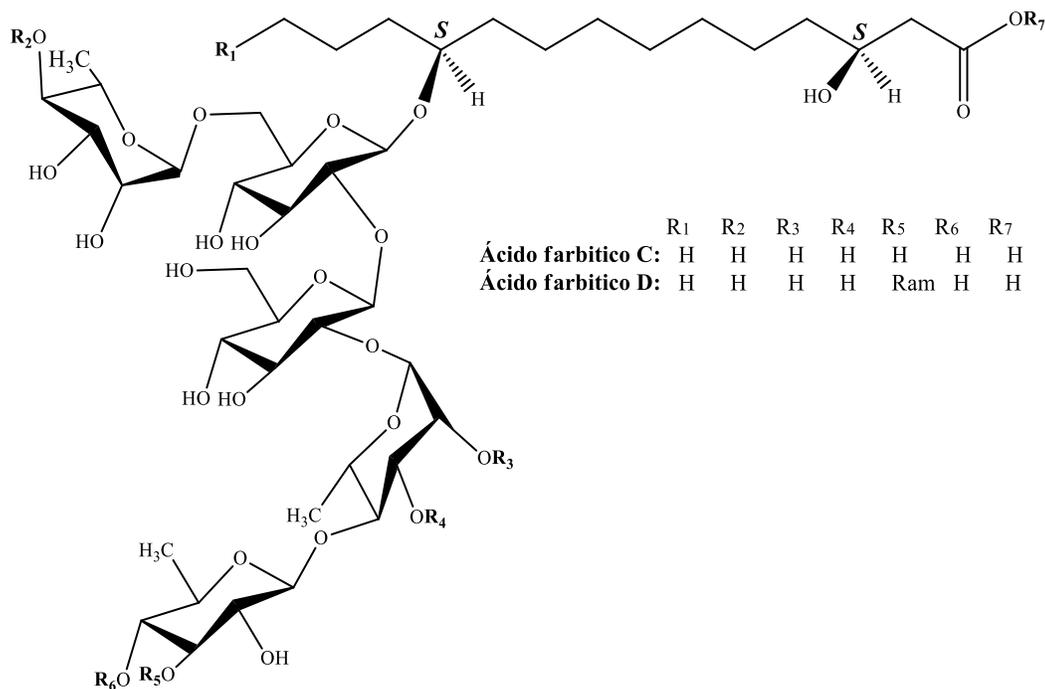
A partir del extracto metanólico de *Convolvulus arvensis* y técnicas de hidrólisis, Fan y colaboradores lograron purificar seis nuevos ácidos glicosídicos identificados como los ácidos arvénicos E-J (**Figura 5**) [46]. La estructura química se estableció a través de técnicas espectroscópicas como RMN, empleando los experimentos mono ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y bidimensionales (HSQC, HMBC, TOCSY y COSY) obtenidos en un equipo de 500 MHz. Para la determinación de la masa molecular emplearon la CLAE acoplada de espectrometría de masas (CLAE-ESI-MS).

Los ácidos arvénicos poseen estructuras de hexa y heptasacáridos, los compuestos A y B tienen un esqueleto de siete unidades sacáridas, conformadas por una unidad de L-ramnosa, dos unidades de D-fucosa, y cuatro unidades de D-glucosa. Para los ácidos C y D encontraron que tienen un núcleo oligosacárido de seis unidades, constituido por una unidad de L-ramnosa, una unidad de D-fucosa y cuatro unidades de D-glucosa. Los metabolitos E y F tienen un esqueleto hexasacárido compuesto por tres unidades de D-glucosa, dos unidades de D-fucosa y una unidad de L-ramnosa. Los autores determinaron que los compuestos A, C y E presentan al ácido 11*S*-hidroxiheptadecanoico como aglicona y los ácidos arvénicos B, D y F poseen al ácido 11*S*-hidroxihexadecanoico.



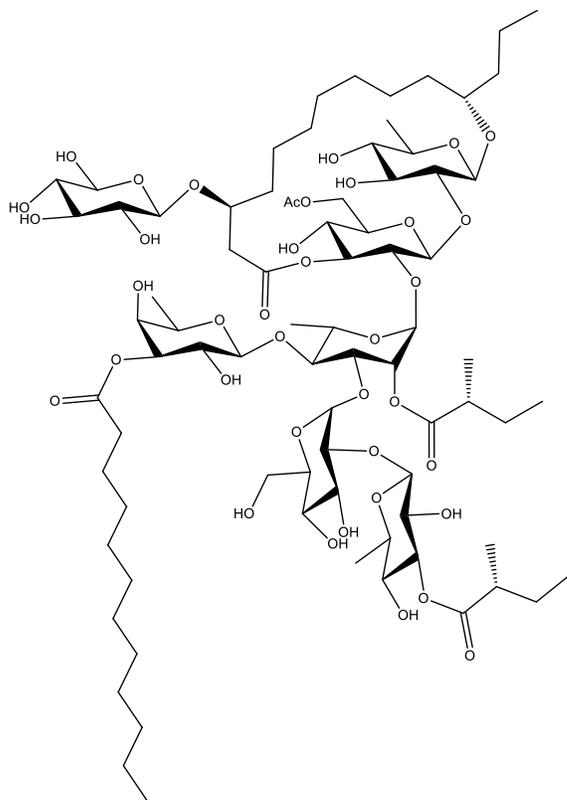
**Figura 5.** Ácidos arvénicos E-J aislados de *Convolvulus arvensis*.

Ono describe una revisión de las resinas glicosídicas presentes en algunas especies de la familia Convolvulacea: *I. operculata*, *Pharbitis nil*, *Quamoclit pennata*, *Calystegia soldanella* e *I. muricata* [47]. Los autores clasifican los glicolípidos teniendo como criterio la solubilidad en éter: jalapinas (solubles) y convolvulinas (insolubles). Para la *I. operculata*, reportaron las estructuras de los ácidos operculínicos I-XVIII, los cuales tienen un esqueleto de cuatro unidades de monosacáridos y el ácido operculínico H un heptasacárido. En la *P. nil*, se han encontrado los ácidos farbitico (ácido ipurólico, una unidad de D-glucosa y una ramnosa), C y D (**Figura 6**). En la especie *Q. pennata*, se encontraron los ácidos quamoclínicos A-H y seis resinas glicosídicas con estructuras de macrolactonas denominadas como las quamoclínicas I-VI, estos compuestos tienen como base un núcleo de cinco unidades sacáridas. En el extracto metanólico de hojas de *C. soldanella*, encontraron los ácidos soldanólicos A-D (hexasacáridos) y de las semillas de *I. muricata*, aislaron una nueva resina glicosídica llamada muricatina IX, la cual presenta una estructura de macrolactona y con un núcleo oligosacárido de cuatro unidades. Las estructuras químicas de los compuestos se determinaron a través de los experimentos mono y bidimensionales obtenidos por resonancia magnética nuclear y las masas de los oligosacáridos se determinaron a través de técnicas espectrométricas.



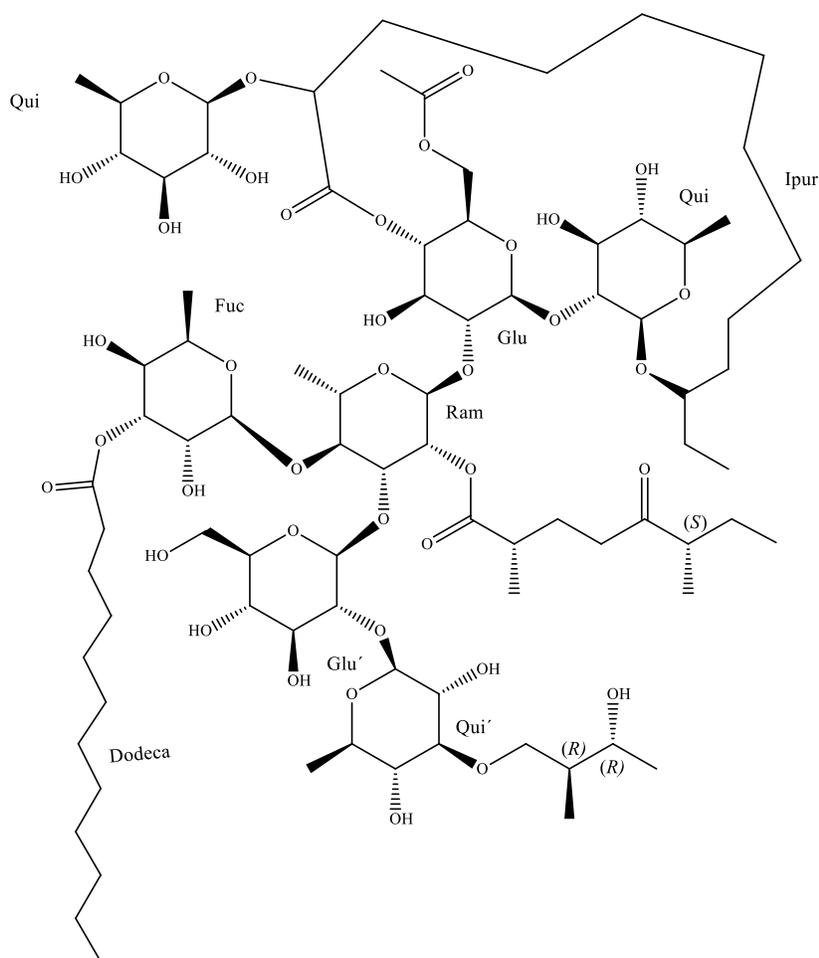
**Figura 6.** Resinas glicosídicas reportadas de *Pharbitis nil*.

Bautista, a partir del extracto metanólico de las raíces de *I. purga* [48], aisló la primera resina glicosídica macrocíclica bisdesmosídica, denominado con el nombre común de jalapínosido I. El material vegetal se recolectó en Coxmatla, Municipio de Xico, Veracruz, México, en noviembre del 2010. El compuesto se purificó a través de CLAE a escala preparativa, mediante la técnica de “reciclaje de pico”. Por medio de las técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear (700 MHz), utilizando los experimentos de una y dos dimensiones y también, mediante la espectrometría de masas de alta y baja resolución, lograron determinar la estructura y la masa molecular del compuesto purificado constituido por tres unidades de D-quinovosa, dos de D-glucosa, una unidad de L-ramnosa y una unidad de D-fucosa, como aglicona tiene el ácido ipurólico compuesto de 11 átomos de carbono (**Figura 7**). Se demostró la falta de citotoxicidad por medio del ensayo de la sulfurodamina (SRB) y, en ensayos de modulación, se demostró que el jalapínosido puede ser una muy buena alternativa en terapias de combinación para disminuir la resistencia múltiple a fármacos en las quimioterapias en células derivadas de tumores humanos.



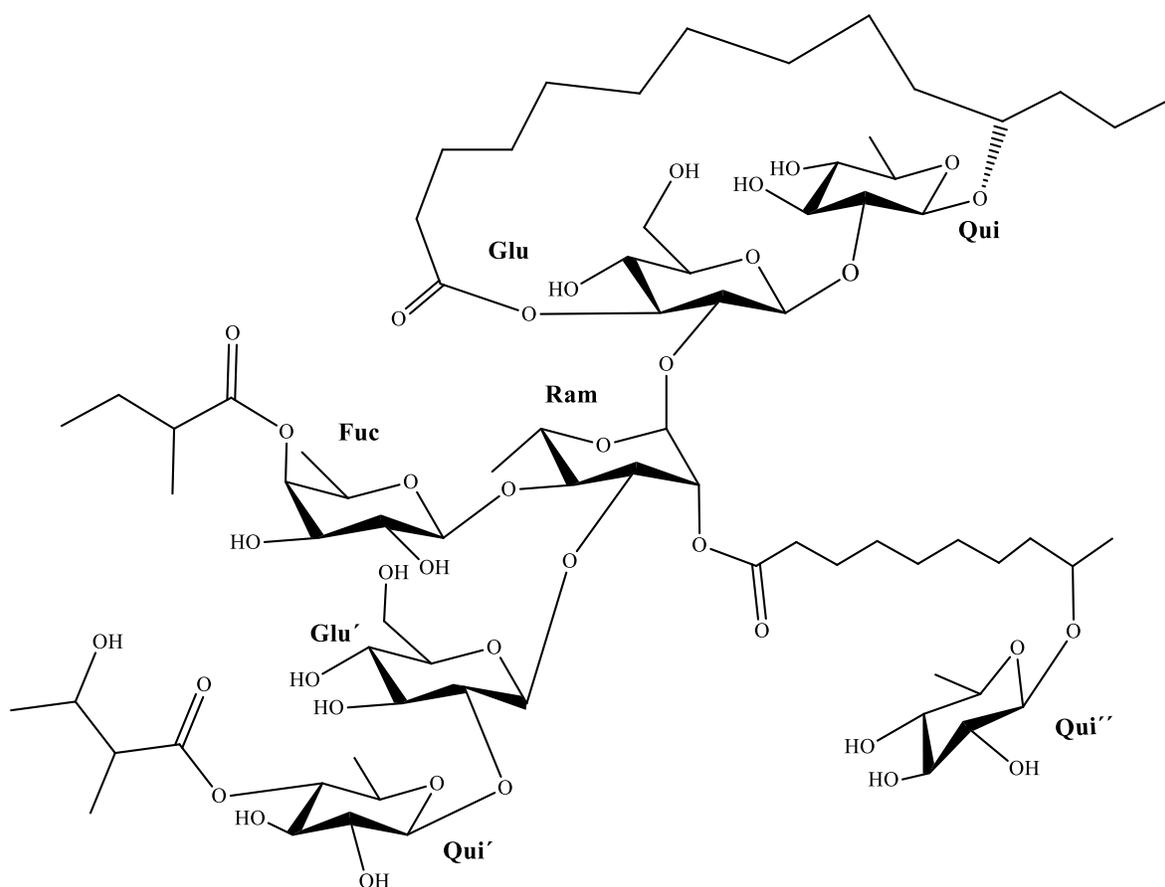
**Figura 7.** Estructura química del jalapínosido I.

También, a partir del extracto metanólico de *I. purga*, Bautista y colaboradores aislaron el jalapínosido II (**Figura 8**), una resina bisdesmosídica macrocíclica que tiene como núcleo oligosacárido al ácido púrgico C [49]. La raíz en polvo se extrajo exhaustivamente con maceración en metanol, los perfiles cromatográficos se obtuvieron por cromatografía líquida de alta eficiencia a nivel preparativo, el compuesto de interés se colectó a través de las técnicas de “rasurado y corte de pico” y purificado mediante 10 ciclos de reciclaje de la muestra en una columna C-18. La caracterización estructural de la resina se realizó a través de técnicas espectrométricas como espectrometría de masas de alta y baja resolución y espectroscópicas como resonancia magnética nuclear de una y dos dimensiones. Por medio del ensayo con sulfurodamina, se demostró la falta de citotoxicidad del jalapínosido II aislado, también se encontró que éste presentaba un poderoso potencial modulador del fenotipo de resistencia a la vinblasina en células derivadas de cáncer mamario.



**Figura 8.** Estructura química del jalapínosido II.

De la fracción convolvulínica de las especies *I. purga*, *I. stans* e *I. murucoides*, León y colaboradores [50], aislaron seis resinas nuevas parcialmente aciladas, la elucidación estructural de los compuestos se realizó a través de las técnicas de RMN (1D y 2D) y espectrometría de masas (HR-FAB-MS y ESI-MS). Estas resinas fueron nombradas como los hexasacáridos jalapínosido B (**Figura 9**) y el ácido púrgico D; la estansina A (heterodímero tipo éster conformado por dos unidades del ácido estansoico A) y dos ácidos glicosídicos, el ácido murucínico II (pentasacárido) y el ácido estancínico I (tetrasacárido). Se evaluaron la actividad citotóxica de los compuestos aislados en líneas celulares de cáncer OVCAR y UISO-SQC-1, encontrándose efectos citotóxicos para todas las muestras ensayadas. Además, el jalapínosido B mostró una actividad antiproliferativa en células de glioma C6 y células tumorales RG2.



**Figura 9.** Estructura química del jalapínosido B.

### 3. JUSTIFICACIÓN

En latinoamerica, se encuentran numerosas especies vegetales que pueden presentar propiedades farmacobiológicas y cuyo empleo en la medicina tradicional garantizan la presencia de metabolitos secundarios bioactivos. Sin embargo, los estudios enfocados al conocimiento de los principios bioactivos de las plantas aún son insuficientes. Una de estas especies es la *I. hederifolia*, una enredadera invasora de los cultivos de café, de la que se sospecha contiene metabolitos secundarios que forman parte del arsenal químico involucrado en la ecología química de esta planta y, por lo tanto, de interés medicinal como son las resinas glicosídicas de las especies de la familia de las convolvuláceas. De esta manera, se buscará contribuir con el estudio de los glicolípidos en el género *Ipomoea*, asimismo establecer procedimientos analíticos que permitan el análisis estructural de este tipo de moléculas.

### 4. HIPÓTESIS

El extracto metanólico obtenido de las partes aéreas de *I. hederifolia* presenta un alto contenido de principios bioactivos anfipáticos, los cuales se pueden aislar y purificar por medio de cromatografía de líquidos de alta eficiencia. De esta forma, se contribuirá ampliando los conocimientos sobre la diversidad estructural de los glicolípidos en el género *Ipomoea*.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Determinar la composición química de las resinas glicosídicas de la especie *I. hederifolia* por medio de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia para su aislamiento y purificación. En tanto que la elucidación estructural de los constituyentes purificados se realizará mediante el empleo de técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM).

### 5.2 Objetivos específicos

**5.2.1** Llevar a cabo la extracción metanólica de las partes aéreas de la *I. hederifolia*, con el fin de aislar las resinas glicosídicas de carácter polar.

**5.2.2** Realizar el fraccionamiento del extracto metanólico de *I. hederifolia* por medio de una cromatografía en columna abierta para obtener fracciones ricas en los glicolípidos.

**5.2.3** Llevar a cabo el estudio químico de las resinas glicosídicas presentes en los extractos metanólicos de *I. hederifolia*.

**5.2.4** Determinar las condiciones de operación en cromatografía líquida de alta eficiencia, tanto a nivel analítico como preparativo para lograr la separación de los glicolípidos presentes en la especie vegetal en estudio y a su vez lograr la purificación de cada uno de los compuestos mayoritarios, utilizando las técnicas de “corte y rasurado de núcleo” y “reciclaje de pico”.

**5.2.5** Establecer la estructura química de los principios activos presentes en la *I. hederifolia*, por medio de técnicas espectroscópicas, como la resonancia magnética nuclear, y la espectrometría de masas de alta y baja resolución.

## 6. METODOLOGÍA

### 6.1 Métodos cromatográficos

Los métodos cromatográficos se emplearon con el fin de separar y purificar los analitos de interés presentes en el extracto de las partes aéreas de *I. hederifolia*. Para ello, se realizó el fraccionamiento primario mediante cromatografía en columna abierta del extracto metanólico de *I. hederifolia*; en la cual se empleó una columna de vidrio convencional con dimensiones de 60 cm de largo  $\times$  15 cm de diámetro y se empacó con gel de sílice 60 (Merck); como fase móvil, se emplearon los disolventes  $\text{CHCl}_3$ , acetona, metanol y mezclas de éstos en polaridad creciente, partiendo de cloroformo hasta un 100% de metanol. Una vez obtenidos cada uno de los eluatos, se monitorearon por medio de cromatografía en capa fina, utilizando cromatoplasmas de gel de sílice 60 F254 sobre aluminio, las cuales se revelaron a una temperatura de 80 °C con la adición mediante aspersion de un agente cromógeno ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ -sulfato cérico). Una vez agrupados cada uno de los eluatos con base en su homogeneidad cromatográfica ( $R_f$ ), en la fracción XVIII, se evidenció la presencia de resinas glicosídicas al compararse con una muestra auténtica de tricolorina A. La CLAE se trabajó en modo isocrático y en fase reversa. Una vez obtenidas las condiciones de operación en modo analítico, se extrapolaron a modo preparativo, utilizando una relación matemática para el cálculo del flujo del disolvente. La muestra se purificó a través de las modalidades de “corte y rasurado de núcleo” y “reciclado de pico”, por medio de una válvula de reciclaje presente en el cromatógrafo líquido de alta eficiencia. La elucidación estructural se llevó a cabo a través de RMN en 1D y 2D; las masas de los compuestos se establecieron por medio de espectrometría de masas de alta y baja resolución.

## 6.2 Recolección del material vegetal

Las partes aéreas de la *I. hederifolia* (**Figura 10**) se recolectaron en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso, en el municipio de Quimbaya, Departamento del Quindío, Colombia, en marzo de 2013.



**Figura 10.** Partes aéreas de *Ipomoea hederifolia*, Reserva Natural La Montaña del Ocaso, Quindío, Colombia, marzo de 2013.

## 6.3 Identificación taxonómica del material vegetal

Un ejemplar de herbario de la especie de estudio *I. hederifolia* se depositó en el Herbario Nacional Colombiano, Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia en Bogotá-Colombia, y se guardó un ejemplar seco en el herbario de la Universidad del Quindío (P. Charry y J. Castañeda, HUQ 35012).

## 6.4 Secado y molienda de las partes aéreas de *Ipomoea hederifolia*

Las partes aéreas de *I. hederifolia* se secaron a 40 °C durante siete días. Seguidamente, el material vegetal seco, se pulverizó en un molino convencional, para disminuir el tamaño de partícula y para dar homogeneidad a la muestra; el material vegetal molido se tamizó y, finalmente, se almacenó en un recipiente de vidrio de color ámbar para evitar la degradación de compuestos fotosensibles.

## 6.5 Obtención de extractos

Los extractos de las partes aéreas de *I. hederifolia* se obtuvieron por maceración exhaustiva con disolventes de diferente polaridad: hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol [1]. Los extractos obtenidos se concentraron a presión reducida, utilizando un rotaevaporador (modelo: R-114; con bomba de vacío: V710, Suiza) y se almacenaron a temperatura ambiente.

## 6.6 Fraccionamiento primario del extracto metanólico

El fraccionamiento del extracto metanólico (**Figura 11A**) se llevó a cabo a través del uso de cromatografía en columna abierta [1]. En la columna se depositó gel de sílice (220 g) y la muestra correspondiente al extracto metanólico (30 g), el proceso de elución se efectuó mediante el uso de disolventes y mezclas de los mismos. El sistema de elución inició con el disolvente de menor polaridad, el cloroformo, seguidamente, se aumentó la polaridad utilizando mezclas de  $\text{CHCl}_3$  con acetona variando las proporciones de cada uno (véase **Cuadro 1**) y, por último, se usó metanol. Se obtuvieron 81 eluatos de 50 mL c/u (**Figura 11B**).



**Figura 11.** A) Columna abierta, fraccionamiento primario. B) Eluatos obtenidos.

**Cuadro 1.** Fraccionamiento primario del extracto metanólico de *Ipomoea hederifolia*

<b>Eluato</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Relación %</b>
1-11	CHCl <sub>3</sub>	100
12-13	CHCl <sub>3</sub> -Acetona	7:3
14-16	CHCl <sub>3</sub> -Acetona	6:4
17-34	CHCl <sub>3</sub> -Acetona	1:1
35-38	CHCl <sub>3</sub> -Acetona	25:75
39-43	CHCl <sub>3</sub> -Acetona	1:9
44-47	Acetona	100
48-67	Acetona-Metanol	85:15
68-81	Metanol	100

### **6.7 Cromatografía en capa fina**

Por medio de cromatografía en capa fina (CCF), se realizó un análisis cualitativo de las resinas glicosídicas a cada uno de los 81 eluatos obtenidos, esto permitió agrupar las fracciones según su naturaleza y contenido de glicolípidos, teniendo en cuenta como parámetro el R<sub>f</sub> de los compuestos visualizados.

### **6.8 Preparación de derivados de la fracción XVIII**

#### **6.8.1 Hidrólisis alcalina**

Siguiendo la metodología planteada por Pereda-Miranda y colaboradores [51], la fracción XVIII (300 mg) se trató con NaOH, (5%, 8 mL); posteriormente, la mezcla de reacción se sometió a un reflujo a 90 °C durante 4 h. Una vez transcurrido este tiempo, la muestra se aciduló con HCl, 4 N hasta obtener un pH de 5. La extracción de los ácidos glicosídicos se llevó a cabo a través de un proceso de particiones. El producto de saponificación se extrajo con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 20 mL); seguidamente, se le realizó una extracción con alcohol isobutílico (3 × 20 mL) a la fase acuosa; la fase orgánica se lavó con agua (1 × 20 mL) y se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidrido, el producto obtenido se concentró a presión reducida.

## 6.8.2 Preparación del diazometano

Para la síntesis del diazometano se utilizó una metodología previamente descrita en la literatura [52]. Se preparó una solución de *N*-metil-*N*-nitroso-*p*-toluensulfonamida (5 g, diazald) y éter (45 mL), esta mezcla se adicionó lentamente sobre una solución de KOH (5 g), agua desionizada (8 mL) y etanol (10 mL, 95%, QP). La reacción permaneció a una temperatura de 60 °C y en agitación constante hasta que se agotó la solución de diazald.

## 6.8.3 Preparación del derivado peracetilado

Se realizó una peracetilación al producto hidrólizado de la fracción XVIII. Para ello, la muestra (60 mg) se trató con anhídrido acético (1.75 mL) y piridina (0.97 mL), la mezcla de reacción permaneció a temperatura ambiente por 48 h. La reacción se terminó agregando agua fría (10 °C, 10 mL) y manteniéndola en agitación durante 5 min, seguidamente, para la extracción se realizó una partición con acetato de etilo (3 × 10 mL). La fase orgánica se trató con una solución de ácido clorhídrico (0.1 N, 2 × 20 mL), posteriormente, se realizó una extracción alcalina con una solución saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO<sub>3</sub>, 1 × 20 mL). Finalmente, la fase orgánica se lavó con agua desionizada (2 × 20 mL), se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a presión reducida. El producto peracetilado se trató con diazometano para la obtención del derivado peracetilado-metilado.

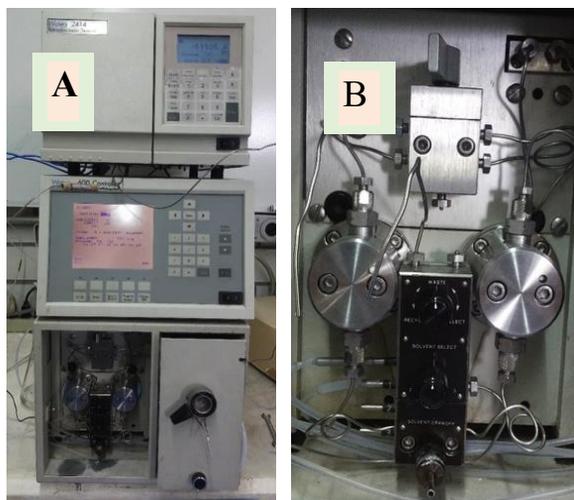
## 6.9 Técnicas instrumentales

### 6.9.1 Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE)

#### 6.9.1.1 Purificación del derivado acetilado-metilado

La fracción XVIII peracetilada-metilada, se analizó en un cromatógrafo líquido de alta eficiencia (**Figura 12A**): marca Waters constituido por un detector de índice de refracción modelo Waters 2414 y acoplado a una bomba cuaternaria tipo waters 600 controller. Se usaron columnas de fase reversa symmetry marca Waters de gel de sílice modificadas con octadecilo (C<sub>18</sub>) de 250 mm × 4.6 d.i., y 5 μm de tamaño de partícula (nivel analítico) y 300

mm × 19 mm d.i., 7 μm de tamaño de partícula (nivel preparativo); fase móvil: acetonitrilo (90 %) y agua (10 %), operado en modo isocrático. El flujo a nivel analítico: 0.5 mL/min, volumen de inyección (20 μL); nivel preparativo: flujo: 8 mL/min, volumen de inyección (500 μL). Los cromatogramas fueron procesados por medio del software Empower 2 de Waters. Para lograr la purificación de la muestra a través de técnicas de reciclado y de corte de núcleo, con la ayuda de una válvula de reciclaje (**Figura 12.B**).



**Figura 12.** A) Cromatógrafo líquido de alta eficiencia, con detector de índice de refracción; B) Válvula de reciclaje.

### 6.9.2.1 Condiciones de operación a nivel analítico

Parámetro	Especificaciones
Equipo	HPLC, <i>Waters 600 controller</i>
Detector	Índice de refracción (IR), 2114 Waters
Columna	symmetry sílice-C <sub>18</sub> (Waters) de 250 mm × 4.6 d.i., y 5 μm de tamaño de partícula
Fase móvil	Mezcla acetonitrilo-agua (9:1)
Tipo de elución	Isocrático
Vehículo de muestra	Metanol
Flujo	0.500 mL/min
Vol. de inyección	20 μL
Tiempo de análisis	60 minutos
Temperatura interna del equipo	40 °C

Para establecer el flujo a nivel preparativo se utilizó la siguiente relación matemática:

$$F_p = F_a \times \left(\frac{F_p}{F_a}\right) \times \left(\frac{d_p}{d_a}\right)^2$$

Donde:

**F<sub>p</sub>**: Flujo a nivel preparativo

**F<sub>a</sub>**: Flujo a nivel analítico

**L<sub>p</sub>**: Longitud de la columna preparativa

**L<sub>a</sub>**: Longitud la columna analítica

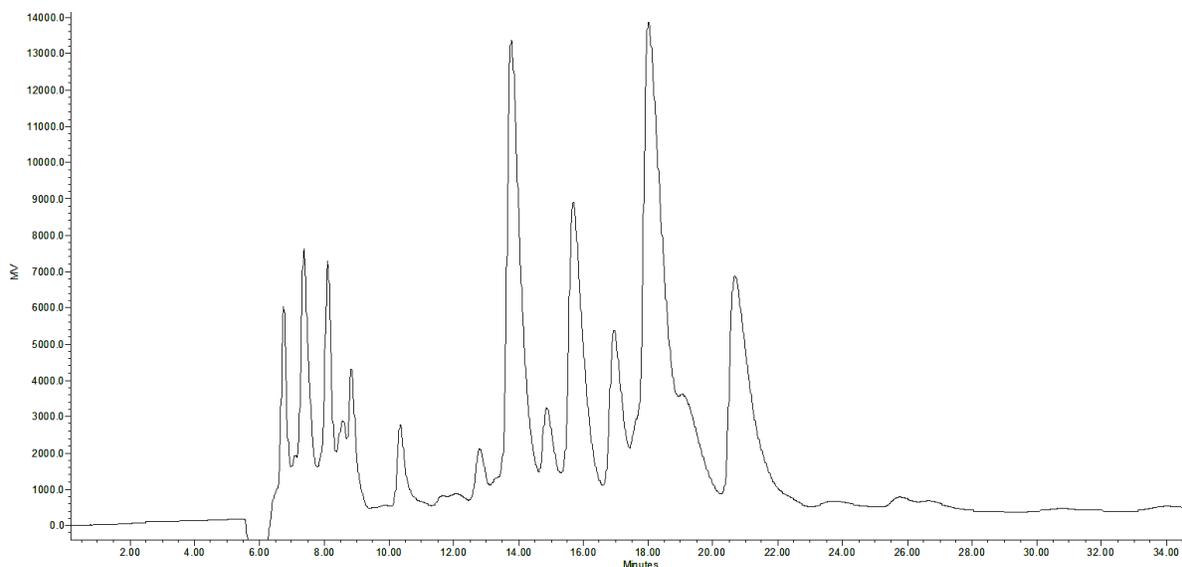
**d<sub>p</sub>**: Diametro interno de la columna analítica

**d<sub>a</sub>**: Diametro interno de la columna preparativa

#### 6.9.2.2 Condiciones de operación a nivel preparativo

Parámetro	Especificaciones
Equipo	HPLC, <i>Waters 600 controller</i>
Detector	Índice de refracción (IR), 2114 <i>Waters</i>
Columna	Symmetry sílice-C <sub>18</sub> , 300 mm×19 mm d.i., 7 μm de tamaño de partícula.
Fase móvil	Mezcla acetonitrilo-agua (9:1)
Tipo de elución	Isocrático
Vehículo de muestra	Metanol
Flujo	8 mL/min
Vol. de inyección	500 μL
Tiempo de análisis	60 minutos
Temperatura interna del equipo	40 °C

La **Figura 13** ilustra el perfil cromatográfico de la fracción **XVIII** obtenido en modo preparativo.



**Figura 13.** Perfil cromatográfico de la fracción XVIII, obtenido por cromatografía líquida de alta eficiencia a nivel preparativo. Columna: symmetry sílice-C<sub>18</sub>, 300 mm×19 mm *d.i.*, 7 μm de tamaño de partícula. Detector de índice de refracción.

### 6.10 Determinación de las constantes físicas

Los puntos de fusión se determinaron en un fusiómetro Fisher-Johns y no están corregidos. Las rotaciones ópticas se obtuvieron en un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizando metanol como disolvente.

### 6.11 Resonancia magnética nuclear

Los espectros de RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C se obtuvieron en espectrómetros Agilent-Varian (400 MHz) y Bruker AV (600 MHz) y se utilizó pirdirina deuterada (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) como disolvente. La señal del tetrametilsilano (TMS) se usó como referencia para la determinación de los desplazamientos químicos, los cuales se expresan en partes por millón (ppm).

### 6.12 Espectrometría de masas

Cada compuesto se analizó por U-HPLC-MS mediante introducción directa empleando la técnica de ionización por electrospray en un equipo modelo Waters Acquity U-HPLC class system acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo simple SQD2 ajustado para

colectar valores de  $m/z$  entre 300-3500 en baja resolución. El voltaje para ambos modos de ionización positivo y negativo fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador a 25 bar. Las muestras se disolvieron en MeOH para obtener una concentración final de 1 mg/mL. Se determinó el peso molecular mediante los valores de  $m/z$  para las especies  $[M+Na]^+$  y  $[M-H]^-$  en los espectros generados. Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en un equipo LQT XL Orbitrap (Thermo Fisher) con ionización por ESI e introducción directa de la muestra preparada en MeOH:H<sub>2</sub>O (9.5:0.5) y suplementada con ácido fórmico (0.1%) para facilitar la ionización y detección del catión aducto  $[M+Na]^+$ .

### 6.13 Identificación de las agliconas y azúcares

Los peracetatos de los ácidos hederifólicos I y III (20 mg), individualmente, se sometieron a una hidrólisis alcalina para generar los ácidos glicosídicos. Éstos se sometieron a una hidrólisis ácida adicionando 10 mL de HCl 4N, las mezclas se calentaron a reflujo a 90 °C durante 2h. Posteriormente, se diluyeron con 5 mL de agua y se extrajeron con éter etílico (3 × 10 mL). Las fases acuosas se neutralizaron con KOH 1N y se extrajeron con *n*-butanol (3 × 10 mL). Las fases butanólicas se lavaron con agua desionizada (2 × 5 mL) y se concentraron hasta sequedad para obtener 13 mg de una mezcla de monosacáridos.

La sililación de las mezclas de monosacáridos (1.5 mg) se realizó mediante un tratamiento con 0.1 mL del reactivo SIGMA SIL-A, una mezcla de trimetilclorosilano-hexametildisilazano-piridina (1:3:9), a una temperatura de 70 °C durante 5 min. De manera adicional, se prepararon los derivados *O*-sililados (éteres de TMS) de muestras estándares (0.5 mg) de *L*-ramnosa, *D*-fucosa, *D*-quinovosa y *D*-glucosa (Sigma) siguiendo el mismo procedimiento. Los tiempos de retención en la cromatografía de gases para estos derivados sililados correspondieron a 5.25 min para la **ramnosa**, 5.47 min para la **fucosa**, 6.17 min para la **quinovosa** y 7.15 min para la **glucosa** [13].

Las fases orgánicas de cada una de las fracciones hidrolizadas, se derivatizaron con CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> para después tratarse con SIGMA SIL-A (0.5 mL) durante 30 min a una temperatura de 60 °C, posteriormente fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas [59].

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1 Identificación taxonómica

Se realizó la identificación botánica de la especie bajo estudio, la cual fue recolectada en la Reserva Natural La Montaña del Ocaso, en el municipio de Quimbaya, departamento del Quindío en Colombia en marzo de 2013. Los ejemplares de herbario de las flores, hojas y tallos de *I. hederifolia* se depositaron en el Herbario de la Universidad del Quindío en Colombia. En el **Cuadro 2** se resumen la identificación realizada por el Herbario de la Universidad del Quindío.

**Cuadro 2.** Identificación taxonómica del material vegetal.

<b>Familia</b>	Convolvulacea
<b>Especie</b>	<i>I. hederifolia</i> L.
<b>No Voucher HUQ</b>	35012
<b>Lugar de recolecta</b>	Reserva Natural La Montaña del Ocaso, Quindío, Colombia

### 7.2 Fraccionamiento del extracto metanólico

Los extractos son mezclas complejas que contienen metabolitos secundarios y otras moléculas solubles en el disolvente de extracción. Generalmente, los compuestos presentes en estos extractos polares poseen diferentes tipos de actividades biológicas las cuales se pueden evaluar a través de ensayos biológicos y farmacológicos específicos. De las partes aéreas de *I. hederifolia*, se preparó un extracto metanólico, teniendo en cuenta que las moléculas de interés tienen un carácter polar y podían solubilizarse en este disolvente. La maceración es una técnica que permite el aislamiento, a partir de una matriz que puede ser líquida o sólida, y la extracción se lleva a cabo teniendo en cuenta la diferencia de solubilidad presente en los componentes de la mezcla ya que éstos se separan mediante la transferencia selectiva de cada analito hacia el disolvente utilizado para la maceración [53]. En la extracción de las resinas glicosídicas se utiliza ampliamente la maceración, teniendo en cuenta si es una convolvulina (insoluble en éter) o una jalapina (soluble en éter) [21,54].

El extracto metanólico de las partes aéreas de *I. hederifolia* se fraccionó por medio de cromatografía en columna abierta con gel de sílice, utilizando disolventes de elución de baja a alta polaridad. Se obtuvieron 81 fracciones de 50 mL cada uno. Los eluatos obtenidos se reunieron en 20 fracciones y teniendo como criterio la visualización de las resinas glicosídicas en CCF con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sulfato cérico bajo calentamiento. Los eluatos y pesos respectivos se resumen en el **Cuadro 3**. Se seleccionó la fracción XVIII que concentraba las resinas glicosídicas.

**Cuadro 3.** Fracciones reunidas del extracto metanólico

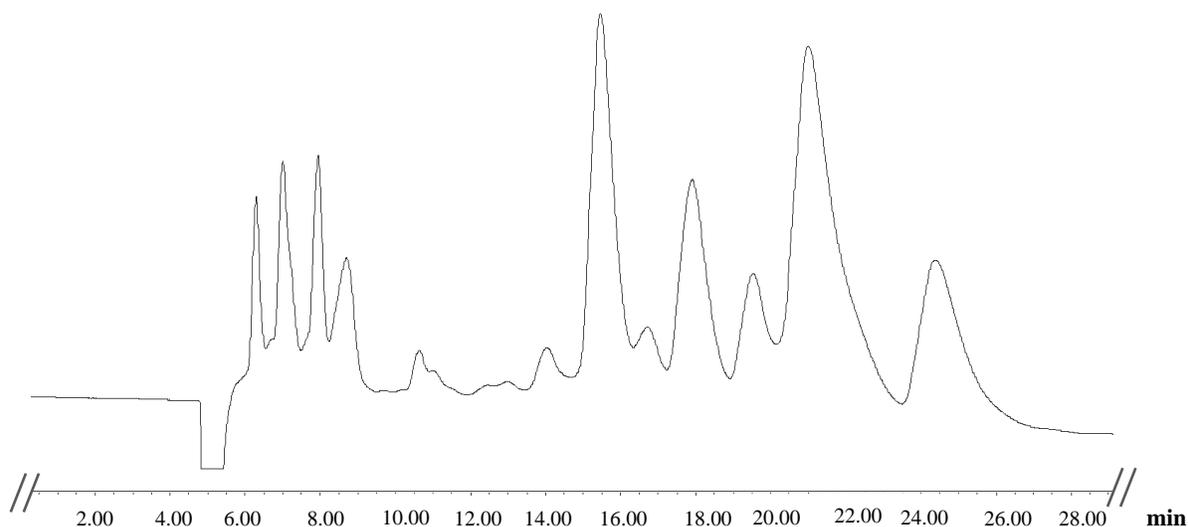
Clave	Eluatos reunidos	Peso (mg)
I	1-7	456.7
II	8	435.6
III	9-16	456.3
IV	17-19	537.4
V	20-21	345.6
VI	22-23	194.5
VII	24-26	284.9
VIII	27-31	273.8
IX	32-36	456.5
X	37-39	342.5
XI	40-45	465.7
XII	46	764.0
XIII	47-52	764.3
XIV	53-56	678.7
XV	57-58	354.6
XVI	59-61	352.6
XVII	62-63	354.6
XVIII	64-66	987.6
XIX	67-71	456.7
XX	72-81	678.9

### 7.3 Aislamiento de las resinas glicosídicas

#### 7.3.1 Condiciones cromatográficas CLAE a nivel analítico

La fracción XVIII, que presuntivamente contenía resinas glicosídicas, se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia para obtener su perfil cromatográfico y, asimismo,

desarrollar las condiciones instrumentales para la posterior resolución de la fracción. Se establecieron las condiciones de operación del equipo bajo las cuales se obtuvo una mejor resolución del cromatograma (**Figura 14**), las condiciones empleadas se describieron en la **sección 6.9.2.1**. Éstas se seleccionaron teniendo por medio de la observación de los perfiles cromatográficos obtenidos por CLAE. para ello se empleó un cromatógrafo líquido modelo HPLC, Waters 600 controller, con un detector de índice de refracción (IR), 2114 Waters, una columna Symmetry de gel de sílice modificada con octadecilo (C<sub>18</sub>, Waters) de 250 mm × 4.6 d.i., y 5 μm de tamaño de partícula, una mezcla acetonitrilo-agua (9:1), con un flujo de 0.5 mL/min, un volumen de inyección de la muestra de 20 μL, durante 60 minutos a una temperatura de 40 °C.



**Figura 14.** Perfil cromatográfico de la fracción XVIII del extracto metanólico.

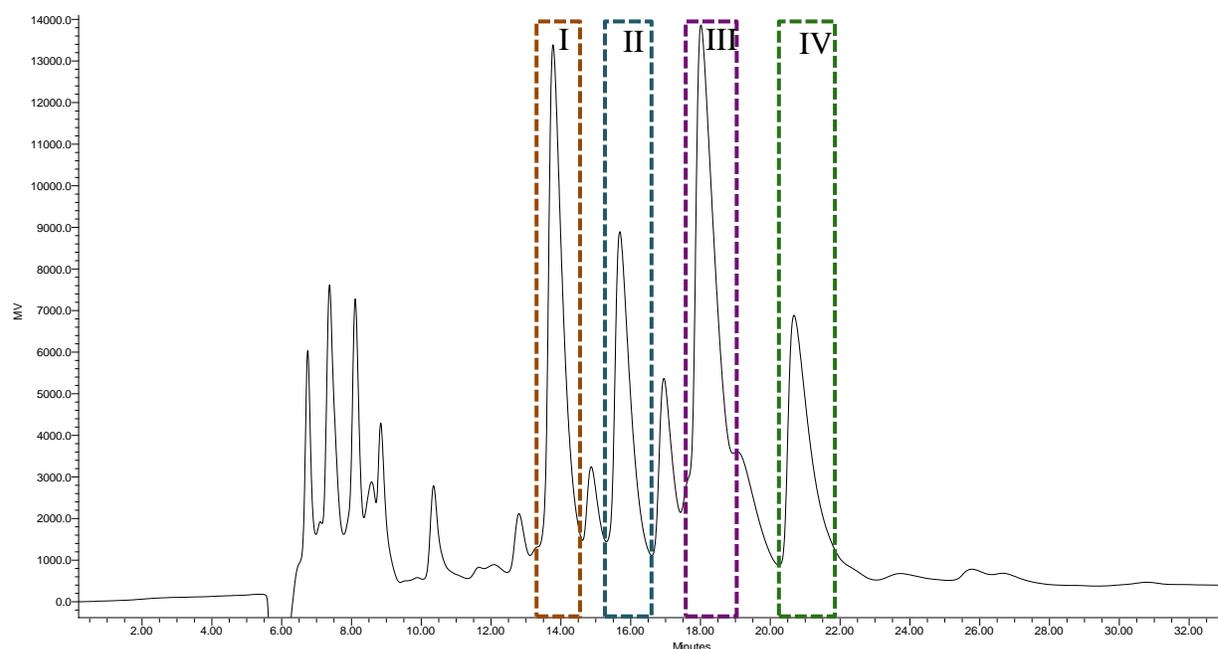
### 7.3.2 Condiciones cromatográficas CLAE a nivel preparativo

Una vez obtenidas las condiciones instrumentales de operación para el sistema cromatográfico a nivel analítico, éstas se extrapolaron a nivel preparativo teniendo en cuenta la relación matemática descrita en la **sección 6.9.2.2**. Los perfiles cromatográficos (**Figura 15**) se obtuvieron en un cromatógrafo líquido modelo HPLC, Waters 600 controller, con detector de índice de refracción (IR), 2114 Waters, empleando una columna symmetry de gel de sílice modificada con octadecilo (C<sub>18</sub>): 300 mm × 19 mm d.i., 7 μm de tamaño de partícula,

como fase móvil se empleó una mezcla acetonitrilo-agua (9:1), en modo isocrático, a un flujo de 8 mL/min, con un volumen de inyección de 500  $\mu$ L, un tiempo de análisis de 60 minutos, a una temperatura de 40 °C.

#### 7.4 Purificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios

Se realizaron un total de 25 inyecciones y se procedieron a cortar los picos mayoritarios, tal como se observa en la **Figura 15**; se efectuaron los cortes de las señales principales identificados como los picos I, II, III y IV. Cada uno de los eluatos colectados se reinyectó y recicló por medio de una válvula de reciclaje (**Figura 12B**), la cual ayudó en el proceso de purificación de los compuestos.



**Figura 15.** Perfil cromatográfico a escala preparativa de la fracción XVIII del extracto metanólico de las partes aéreas de *I. hederifolia*, donde se muestran los picos aislados por la técnica de “corte de núcleo”.

#### 7.5 Rotación óptica y puntos de fusión de los ácidos hederifólicos I-IV

Se determinaron los puntos de fusión (P.f.) de los ácidos hederifólicos I-IV en un fusiómetro Fisher-Johns sin corrección y las rotaciones ópticas en un polarímetro Pelkir-

Elmer 341 empleando metanol como disolvente, los resultados obtenidos se incluyen en el **Cuadro 4**. Los valores para las rotaciones ópticas dextrógiras son congruentes con las descritas en la literatura para todas las resinas glicosídicas [55-59].

**Cuadro 4.** Puntos de fusión y rotaciones ópticas para los ácidos hederifólicos I-IV.

Ácido hederifólico	P.f. °C	Rotación óptica
I	106–110	$[\alpha]_{589} -7.5$ , $[\alpha]_{578} -10.0$ , $[\alpha]_{546} -10.0$ , $[\alpha]_{436} -15.0$ , $[\alpha]_{365} -10.0$
II	110–114	$[\alpha]_{589} -6.7$ , $[\alpha]_{578} -8.3$ , $[\alpha]_{546} -9.2$ , $[\alpha]_{436} -13.3$ , $[\alpha]_{365} -18.3$
III	103–106	$[\alpha]_{589} -7.5$ , $[\alpha]_{578} -7.5$ , $[\alpha]_{546} -10.0$ , $[\alpha]_{436} -15.0$ , $[\alpha]_{365} -15.0$
IV	115–117	$[\alpha]_{589} -20.0$ , $[\alpha]_{578} -25.0$ , $[\alpha]_{546} -25.0$ , $[\alpha]_{436} -20.0$ , $[\alpha]_{365} -25.0$

#### 7.6 Determinación de las masas exactas para los ácidos hederifólicos I-IV.

Por medio del análisis de los espectros de masas registrados mediante ESI en modo negativo y positivo [60], se determinaron las masas de los ácidos hederifólicos I-IV a través de la detección de los iones  $[M-H]^-$  y  $[M+Na]^+$ , respectivamente (**Cuadro 5**). Los espectros de masas adquiridos se ilustran en la sección de los **ANEXOS**.

**Cuadro 5.** Masas de los ácidos hederifólicos I–IV.

Ácido hederifólico	Peso Molecular	$[M-H]^-$ <i>m/z</i>	$[M+Na]^+$ <i>m/z</i>	Fórmula molecular
I	2114	2113 (anexo I)	2137 (anexo II)	C <sub>95</sub> H <sub>140</sub> O <sub>52</sub>
II	1882	1881 (anexo III)	1905 (anexo IV)	C <sub>85</sub> H <sub>126</sub> O <sub>46</sub>
III	2056	2055 (anexo V)	2079 (anexo VI)	C <sub>93</sub> H <sub>138</sub> O <sub>50</sub>
IV	1824	1823 (anexo VII)	1847 (anexo VIII)	C <sub>83</sub> H <sub>124</sub> O <sub>44</sub>

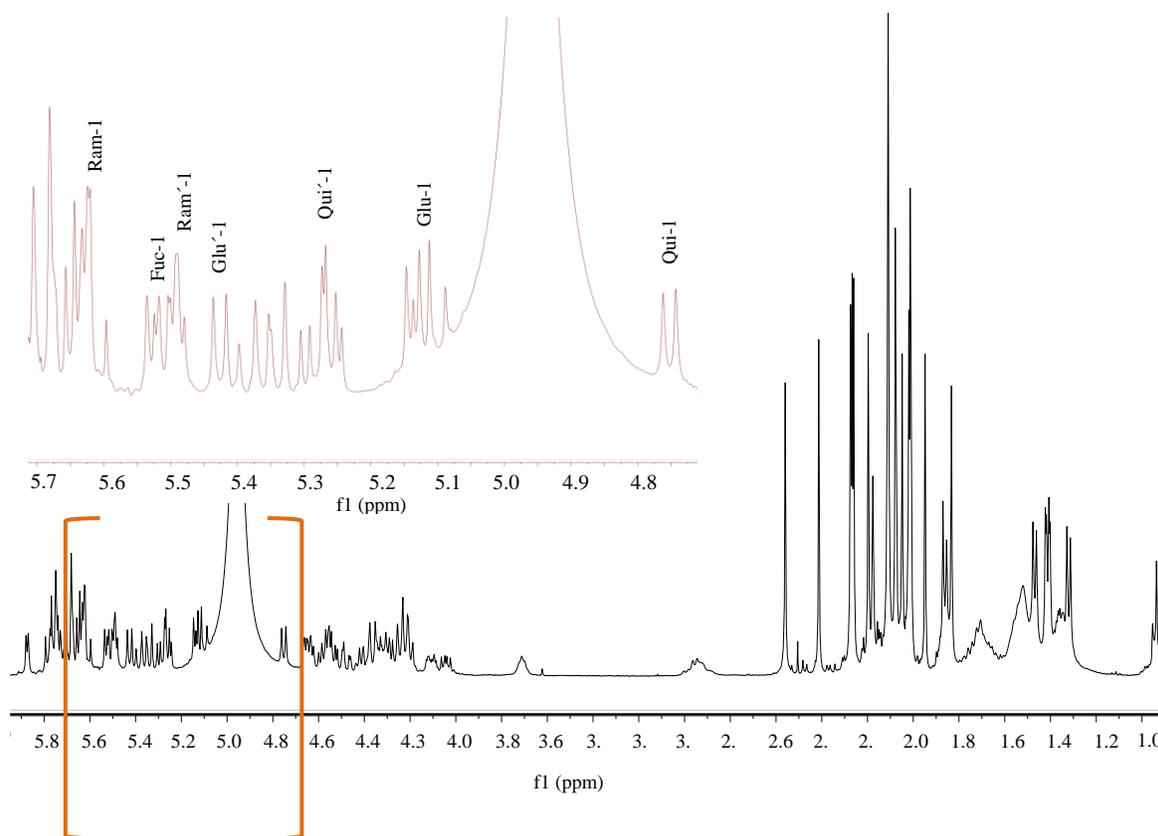
A continuación, se discutirá la elucidación estructural de los compuestos I y III cuyas estructuras se caracterizaron en su totalidad mediante el análisis espectroscópico (RMN) y espectrométrico (EM-ESI) y el empleo de derivatizaciones.

## 7.7 Elucidación estructural de los ácidos glicosídicos

### 7.7.1 Ácido hederifólico I

Por medio de resonancia magnética nuclear, se obtuvieron espectros monodimensionales de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para el ácido hederifólico I. El análisis de estos espectros permitió obtener información acerca de la estructura química del compuesto de interés. En estos espectros, se identificaron señales características correspondientes a los glicolípidos: se encontraron un total de siete señales anoméricas que corresponde a “señales reporteras” para la identificación rápida del número de unidades sacáridas [21] ya que corresponden a señales dobletes en la RMN  $^1\text{H}$  con desplazamientos químicos entre 4.75 y 5.63 ppm (**Figura 16**); en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , estas señales se encuentran correlacionadas con los carbonos que aparecen entre los desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  97.2 y 102.2 (**Cuadro 6**).

A través, de los patrones de acoplamiento ( $^3J_{1,2}$ ) observados para cada una de las unidades de los monosacáridos, se logró establecer su naturaleza con ayuda de los espectros COSY y TOCSY. Así, las señales con un desplazamiento químico de  $\delta_{\text{H}}$  4.75 y 5.28 poseen una multiplicidad de un doblete cada una ( $^3J_{1,2} = 7.6$  Hz), característicos para dos unidades de quinovosa [55]. Las señales con desplazamientos químicos centrados en  $\delta_{\text{H}}$  5.14 y 5.43 poseen un patrón de acoplamiento de doblete ( $^3J_{1,2} = 7.8$  y  $7.7$  Hz, respectivamente) característico para las señales anoméricas de las unidades de glucosa [56]. Las señales con desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{H}}$  5.63 y 5.49 se presentaron como singuletes anchos y son generados por los protones anoméricos de dos unidades de ramnosa que presenta una constante de coplamamiento vecinal pequeña ( $^3J_{1,2} < 1\text{Hz}$ ) [57].



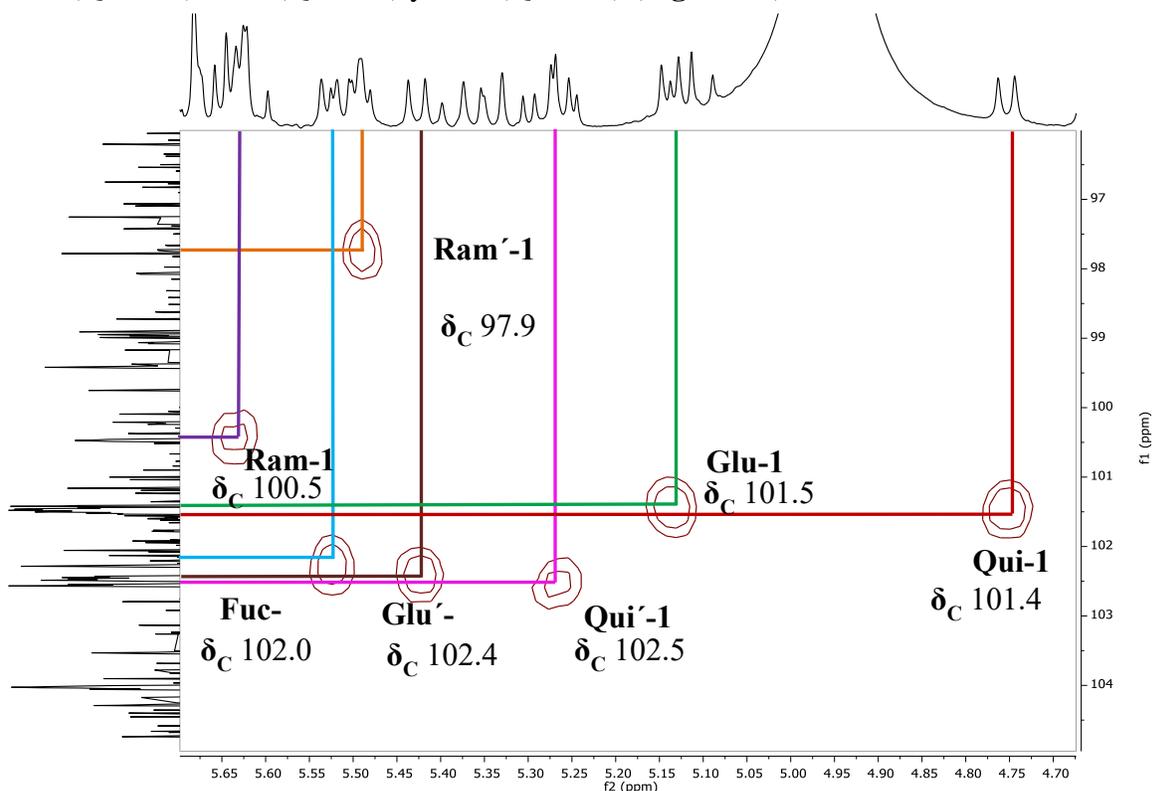
**Figura 16.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) del ácido hederifólico I peracetilado ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

La señal con el desplazamiento químico de  $\delta_{\text{H}}$  5.52, se presentó con un acoplamiento de doblete ( $^3J_{1,2} = 7.2$  Hz), señal característica de una unidad de fucosa. También, se determinaron el número de metil pentosas presentes en la estructura, esto se logró establecer debido a las cinco señales tipo dobletes ( $^3J_{1,2} = 7.6$  Hz) observadas entre  $\delta_{\text{H}}$  1.48 y 1.86 en el espectro de  $^1\text{H}$  (**Figura 15**), estas señales son características de los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas.

Por medio del análisis del espectro de dos dimensiones ( $^1J_{\text{CH}}$ ) HSQC (**Figura 17**), se identificaron las interacciones de protón con su respectivo carbono y se lograron establecer las correlaciones para las señales anoméricas, las cuales están comprendidas en la región de los desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  97 y 102. Se identificaron las correlaciones para las unidades de monosacáridos en: Qui-1( $\delta_{\text{H}}$  4.75,  $\delta_{\text{C}}$  101.4), Glu-1( $\delta_{\text{H}}$  5.14,  $\delta_{\text{C}}$  101.5), Ram-1( $\delta_{\text{H}}$  5.63,  $\delta_{\text{C}}$  100.5), Fuc-1( $\delta_{\text{H}}$  5.52,  $\delta_{\text{C}}$  102.0), Ram'-1( $\delta_{\text{H}}$  5.49,  $\delta_{\text{C}}$  97.9), Glu'-1( $\delta_{\text{H}}$  5.43,  $\delta_{\text{C}}$  102.4) y Qui'-1( $\delta_{\text{H}}$  5.28,  $\delta_{\text{C}}$  102.5). También, se identificaron las correspondientes a los

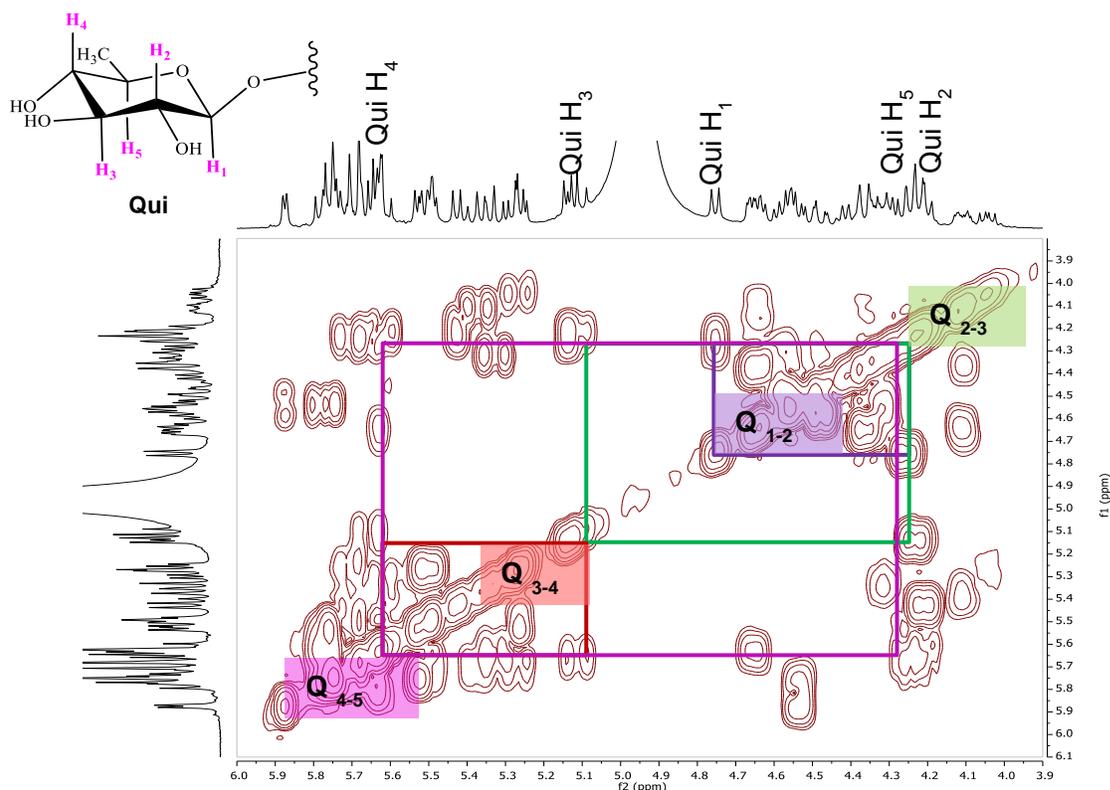
carbonos de las metilpentosas entre  $\delta_C$  10-20 y las señales oxigenadas entre  $\delta_C$  60-80 (**Cuadro 6**). Con ayuda de los experimentos bidimensionales COSY y TOCSY, se lograron identificar las unidades de carbohidratos que conforman el núcleo oligosacárido, teniendo como criterio el valor de las constantes de acoplamiento vecinales ( $^3J_{H-H}$ ) de acuerdo con los ángulos de torsión diédricos entre los protones de las piranosas [58]. En la región comprendida entre  $\delta_H$  4.0-6.00 se lograron asignar los monosacáridos correspondientes a las unidades de D-glucosa, L-ramnosa, D-quinovosa y D-fucosa.

Tanto en el experimento COSY (**Figura 18**) como en el TOCSY (**Figura 19**), se deben establecer cuadros de conectividad, para ello se identificaron las señales anoméricas y se inició la correlación con el protón H<sub>2</sub>. En el caso del experimento TOCSY, que permite identificar las correlaciones de los protones a más enlaces de distancia, éste confirmó las interacciones vecinales mostradas en los experimentos COSY (**Figura 18**) y a su vez permitió establecer las interacciones entre los protones restantes: H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub> y H<sub>5</sub>-H<sub>6</sub>; por ejemplo, Qui H-1 ( $\delta$  4.75) correlacionó con las señales centradas en  $\delta$  5.65 (Qui H-4), 5.11 (Qui H-3), 4.23 (Qui H-5), 4.21 (Qui H-2) y 1.32 (Qui H-6) (**Figura 19**).



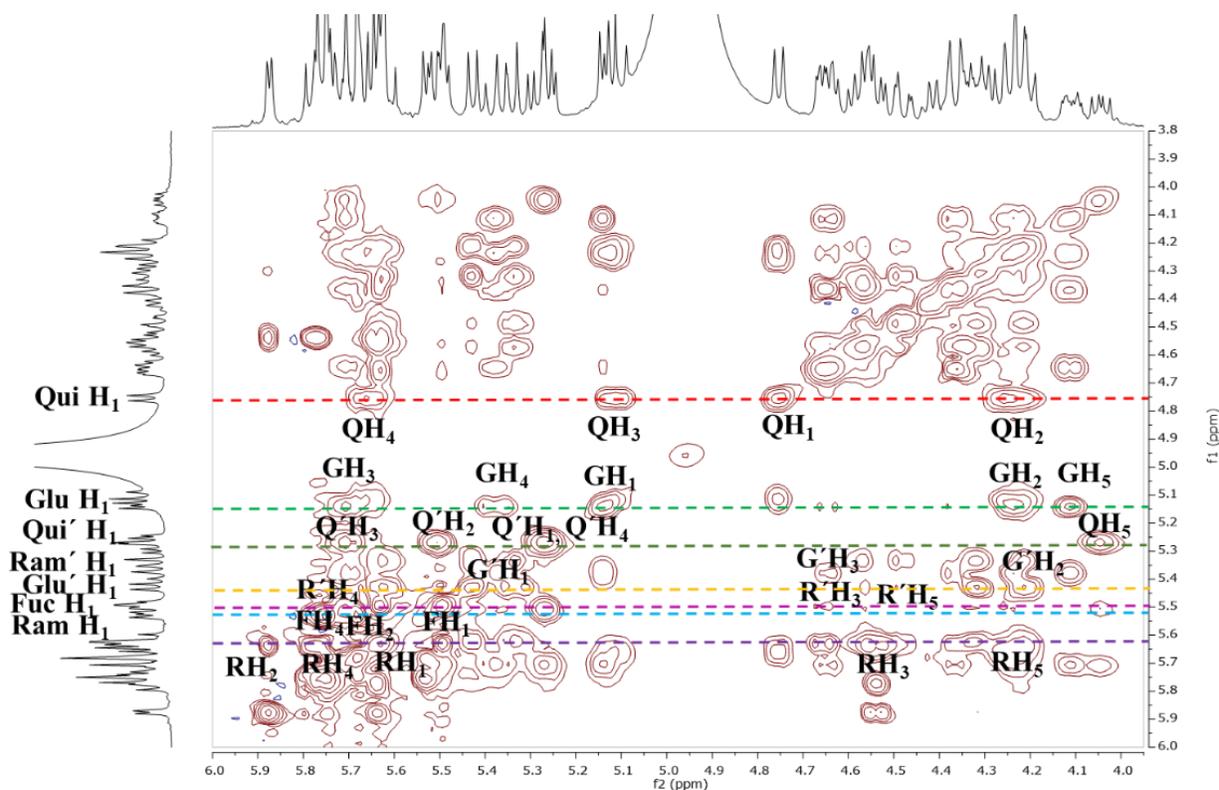
**Figura 17.** Región de señales anoméricas del espectro de HSQC, ácido hederifólico I.

Es importante saber que en estos experimentos es de gran importancia el ángulo diedro que se forma entre cada una de las interacciones de los protones, de ello depende que las constantes de acoplamiento sean pequeñas ( ${}^3J_{\text{Jecuatorial-ecuatorial}} \leq 1.5$  Hz), medianas ( ${}^3J_{\text{Jecuatorial-axial}} \leq 4.0$  Hz) o grandes ( ${}^3J_{\text{Jaxial-axial}} \geq 9.0$  Hz); también, se manifiesta en la resolución de las señales, para este caso (400 MHz), las mejor resueltas, correspondieron a los protones H<sub>2</sub> y H<sub>5</sub> para las metil pentosas, y H<sub>2</sub>, H<sub>5</sub>, H<sub>6a</sub>, y H<sub>6b</sub> para las hexosas. La secuencia de glicosilación se confirmó mediante el análisis de los espectros bidimensionales ROESY y HMBC. Las principales interacciones  ${}^3J_{\text{CH}}$  observadas fueron: Qui H-1 ( $\delta_{\text{H}} 4.75$ )/C-11 aglicona ( $\delta_{\text{C}} 81.5$ ), Qui H-2( $\delta_{\text{H}} 4.21$ )/Glu C-1( $\delta_{\text{C}} 101.5$ ), Glc H-2( $\delta_{\text{H}} 4.25$ )/Ram C-1 ( $\delta_{\text{C}} 100.5$ ), Fuc H-1( $\delta_{\text{H}} 5.52$ )/Ram C-3( $\delta_{\text{C}} 78.7$ ), Ram' H-1( $\delta_{\text{C}} 5.49$ )/Fuc C-3( $\delta_{\text{C}} 78.3$ ), Ram' H-3 ( $\delta_{\text{H}} 4.66$ )/Glc' C-1( $\delta_{\text{C}} 102.4$ ), Glc' H-2 ( $\delta_{\text{H}} 4.22$ )/Qui' C-1( $\delta_{\text{C}} 102.5$ ). Destacan las interacciones entre Ram' H-3 ( $\delta_{\text{H}} 4.66$ )/Glu' H-1( $\delta_{\text{H}} 5.43$ ) y Glu' H-2 ( $\delta_{\text{H}} 5.43$ )/Qui' H-1( $\delta_{\text{H}} 5.28$ ) para confirmar la secuencia para las dos últimas unidades sacáridas (**Figura 20**).

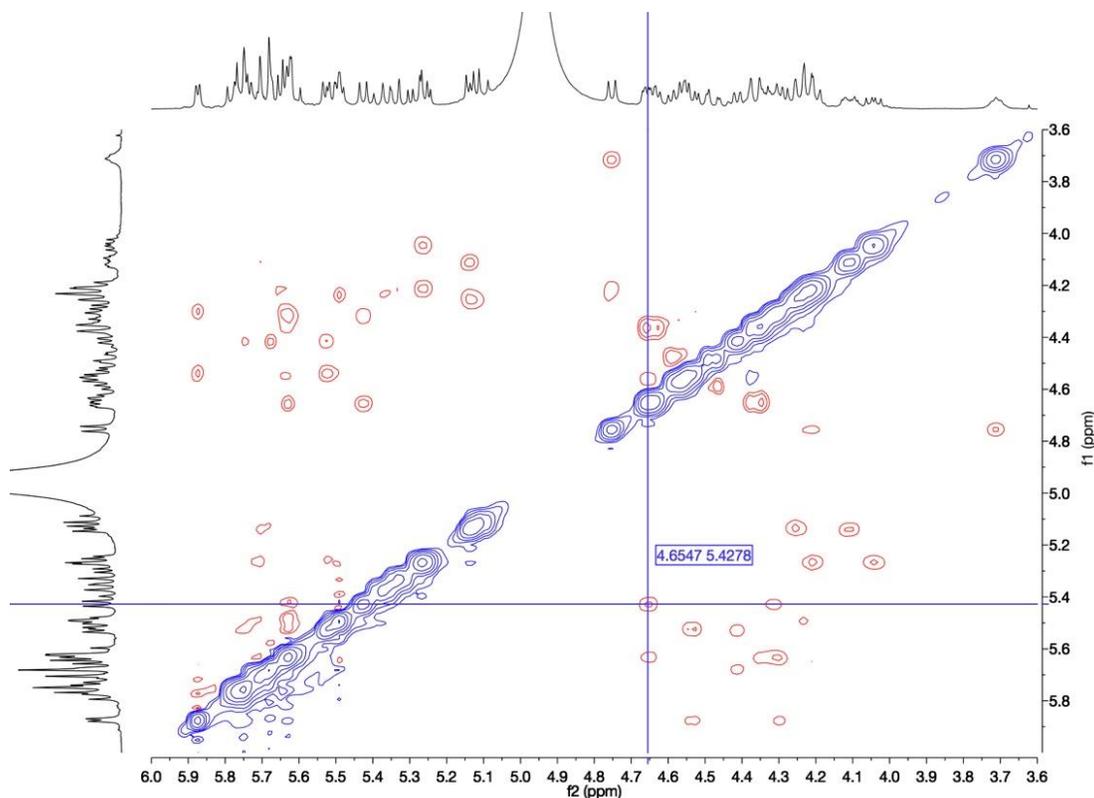


**Figura 18.** Porción del espectro bidimensional COSY ( ${}^1\text{H} - {}^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico I. Correlaciones  ${}^3J_{\text{H-H}}$ : Q 1-2; Qui H<sub>1</sub>-H<sub>2</sub>, Q 2-3; Qui H<sub>2</sub>-H<sub>3</sub>, Q 3-4; Qui H<sub>3</sub>-H<sub>4</sub>, Q 4-5; Qui H<sub>4</sub>-H<sub>5</sub>.

Con ayuda de los experimentos COSY y TOCSY se identificaron siete unidades de monosacáridos, constituyendo un núcleo heptasacárido lineal, el cual está conformado por dos unidades de D-glucosa, dos unidades de D-quinovosa, dos unidades de L-ramnosa y una unidad de D-fucosa. En el **Cuadro 6** se presentan los desplazamientos químicos para los núcleos de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , junto con las constantes de acoplamiento ( $^3J_{\text{HH}}$ ) registradas para el heptasacárido constitutivo del ácido hederifólico I. Estos desplazamientos fueron obtenidos en un equipo de resonancia magnética nuclear de 400 MHz utilizando como disolvente  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ . Se utilizó el TMS como sustancia de referencia y los desplazamientos químicos se encuentran en ppm. Por último, la diferencia en peso del oligosacárido y el peso molecular calculado permitió asignar una aglicona dihidroxilada con una longitud de diecisiete átomos de carbono [46]: el ácido 3,12-dihidroxiheptadecanoico.



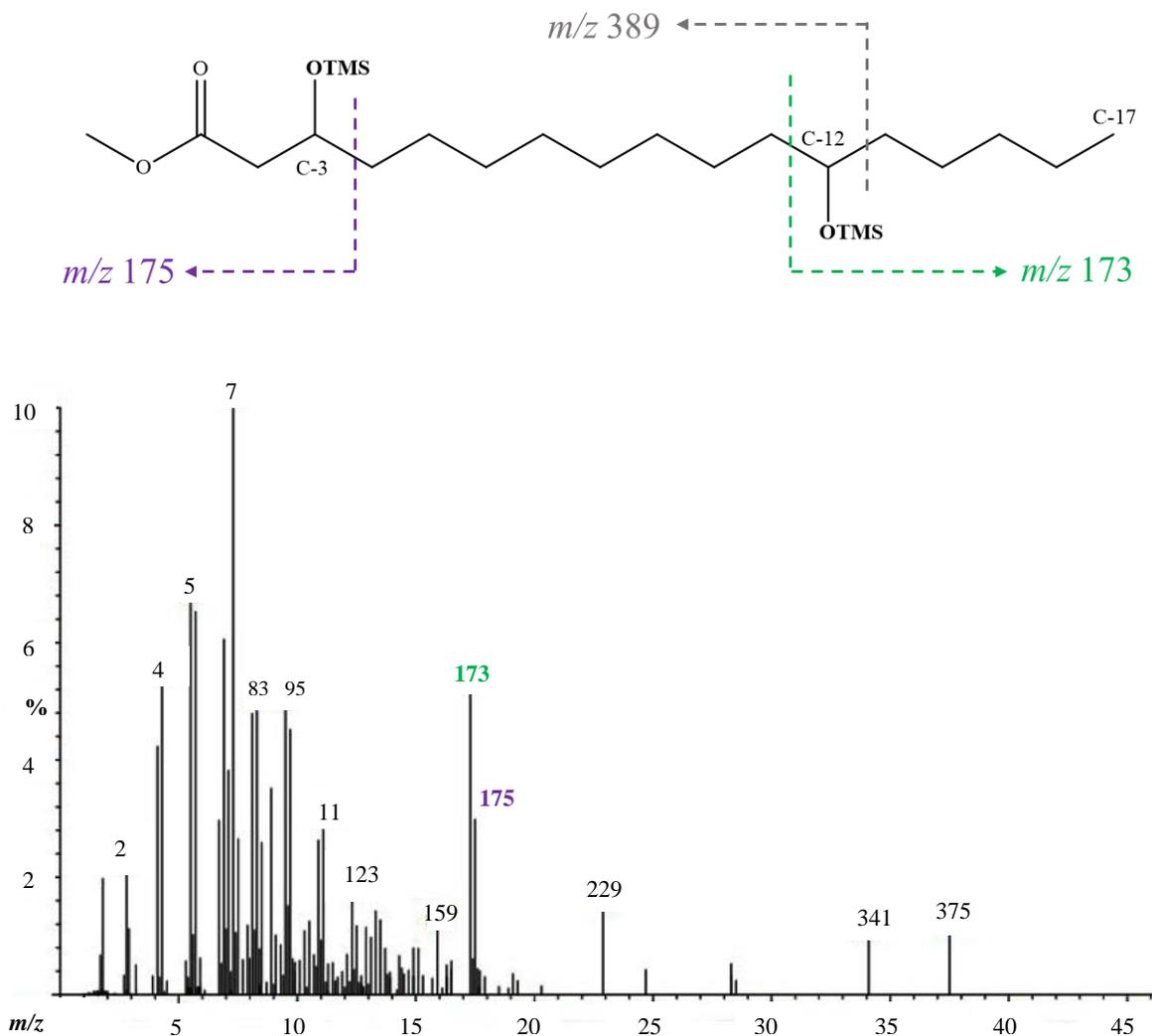
**Figura 19.** Porción del espectro bidimensional TOCSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico I. Abreviaturas: Glu =G = glucosa, Ram = R= ramnosa, Qui = Q= quinovosa, Fuc = F= fucosa.



**Figura 20.** Porción del espectro ROESY del ácido hederifólico I. Interacción nOe: Ram' H-3 ( $\delta_H$  4.66)/Glu' H-1 ( $\delta_H$  5.43).

La posición de hidroxilación en C-3 de la aglicona se determinó mediante la presencia de las dos señales doble de dobles de un sistema ABX centradas en 2.97 y 2.89 ppm que corresponden al metileno ( $\delta_C$  41.2) vecinal al ácido carboxílico [59]. Por lo tanto, el análisis de los datos espectroscópicos en RMN permitió establecer la estructura química para el ácido hederifólico I como un heptasacárido del ácido 3,12-dihidroxiheptadecanoico. Para la caracterización inequívoca de esta aglicona, se utilizó la cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas por impacto electrónico del derivado metilado-sililado de la aglicona recuperada mediante la hidrólisis ácida del ácido glicosídico libre (ácido hederifólico I). Las rupturas alfa a las dos posiciones de hidroxilación se identifican irrefutablemente a través de los cationes oxonio de  $m/z$  173 y 175 (**Figura 21**). Este patrón de dihidroxilación en las posiciones C-3 y C-12 del ácido heptadecanoico se describió previamente para las agliconas de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa brasileña, en donde el ácido hexadecanoico es la porción hidrofóbica constitutiva del glicolípido [59].

Por lo tanto, el análisis de los datos espectroscópicos en la RMN y espectrométricos permitieron establecer la estructura molecular para el ácido hederifólico I como un heptasacárido del ácido 3,12-dihidroxiheptadecanoico (**Figura 22**).



**Figura 21.** Espectro de masas por impacto electrónico de la aglicona metilada-sililada y su patrón de fragmentación (70 eV).

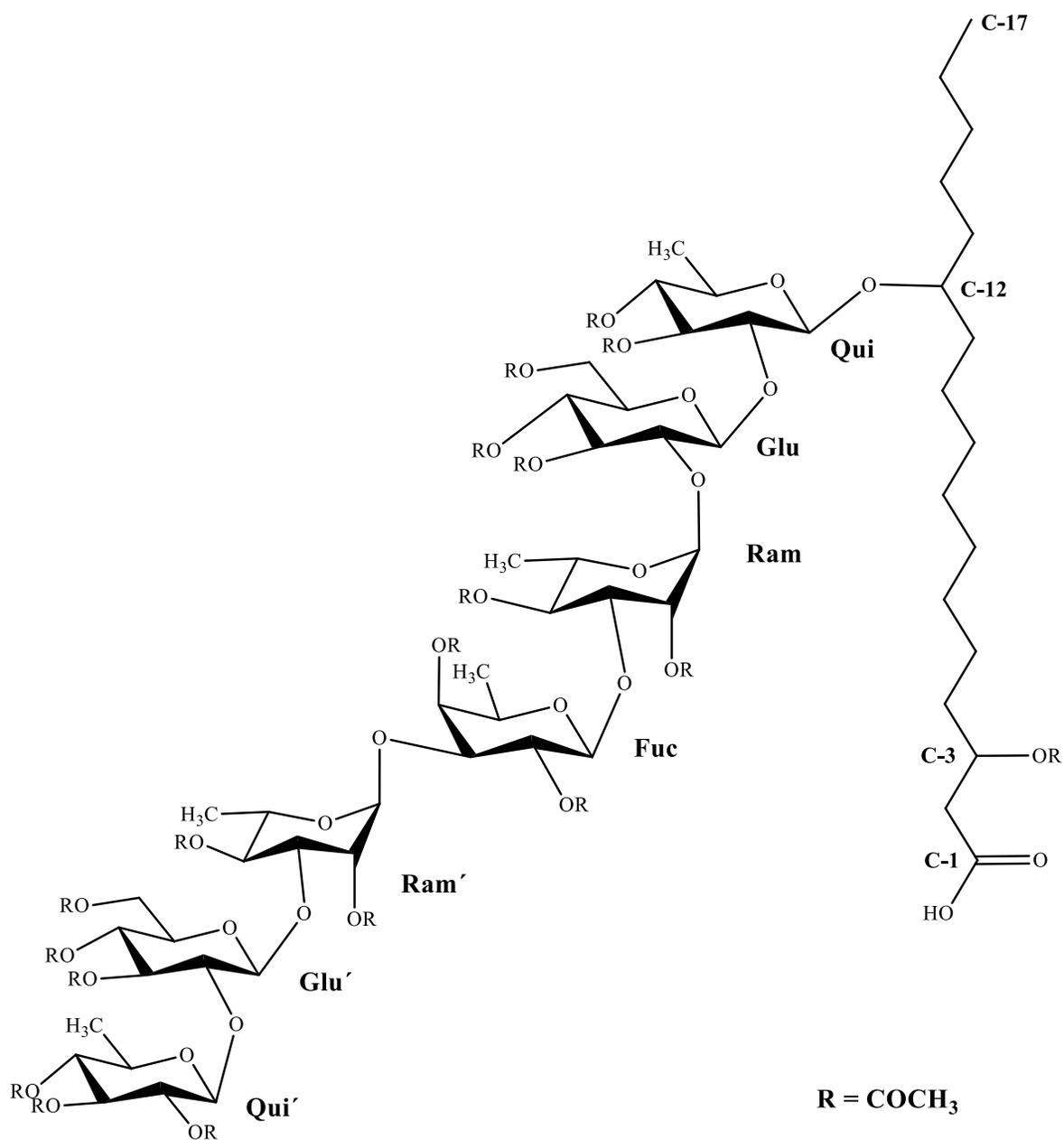
**Cuadro 6.** Constantes espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para el ácido hederifólico I en piridina-*d*<sub>5</sub>.

<b>Posición</b>	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
<b>Qui-1</b>	4.75 d (7.6)	101.4
2	4.21 dd (7.6, 9.5)	69.4
3	5.11 dd (9.5, 9.5)	74.7
4	5.65 dd (9.5, 9.5)	76.0
5	4.23 m	73.1
6	1.32 d (6.2)	18.0
<b>Glc-1</b>	5.14 d (7.8)	101.5
2	4.25 dd (7.8, 9.3)	77.3
3	5.70 m	74.3
4	5.38 dd (9.5, 9.5)	70.3
5	4.11 ddd (9.5, 5.0, 2.5)	72.7
6a	4.65 dd (11.0, 5.0)	63.0
6b	4.37 dd (11.0, 2.5)	
<b>Ram-1</b>	5.63 brs	100.5
2	5.88 brd (3.9)	73.2
3	4.54 dd	78.7
4	5.77 dd	72.30
5	4.29 dq (9.4, 6.1)	70.3
6	1.42 d (6.3)	16.5
<b>Fuc-1</b>	5.52 d (7.2)	102.0
2	4.64 m	78.3
3	5.68 m	71.5
4	5.75 m	72.5
5	4.41 dq (6.5, 1.0)	69.9
6	1.42 d (6.5)	16.2

**Cuadro 6.** Continuación...

<b>Posición</b>	<b><math>\delta_H</math></b>	<b><math>\delta_C</math></b>
<b>Ram'-1</b>	5.49 brs	97.9
2	4.36 m	76.1
3	4.66 m	78.2
4	5.76 m	69.9
5	4.57 dq	68.2
6	1.86 d (6.3)	19.4
<b>Glu'-1</b>	5.43 d (7.7)	102.4
2	4.22 dd (7.7, 9.6)	69.4
3	5.64 (9.6, 9.3)	74.4
4	5.33 dd (9.3, 9.3)	70.3
5	4.32 m	71.8
6a	4.48 dd (2.5, 11.5)	63.2
6b	4.57 dd (11.5, 5.0)	
<b>Qui'-1</b>	5.28 d (7.6)	102.5
2	5.51 dd (7.6, 10.0)	72.8
3	5.71 dd (10.0, 10.0)	76.5
4	5.27 dd (10.0, 10.0)	74.2
5	4.04 dq (10.0, 6.2)	71.4
6	1.47 d (6.2)	18.4
<b>Ag-2a</b>	2.97 dd (15.0, 2.7)	41.2
<b>Ag-2b</b>	2.89 dd (15.0, 7.2)	
<b>3</b>	5.74	72.4
<b>12</b>	3.71	81.5
<b>17</b>	0.93	14.7

Abreviaciones: d= doblete, dd= doblete de doblete, t=tripleto, brs= señal ancha, m= multiplete, señales sobrepuestas.



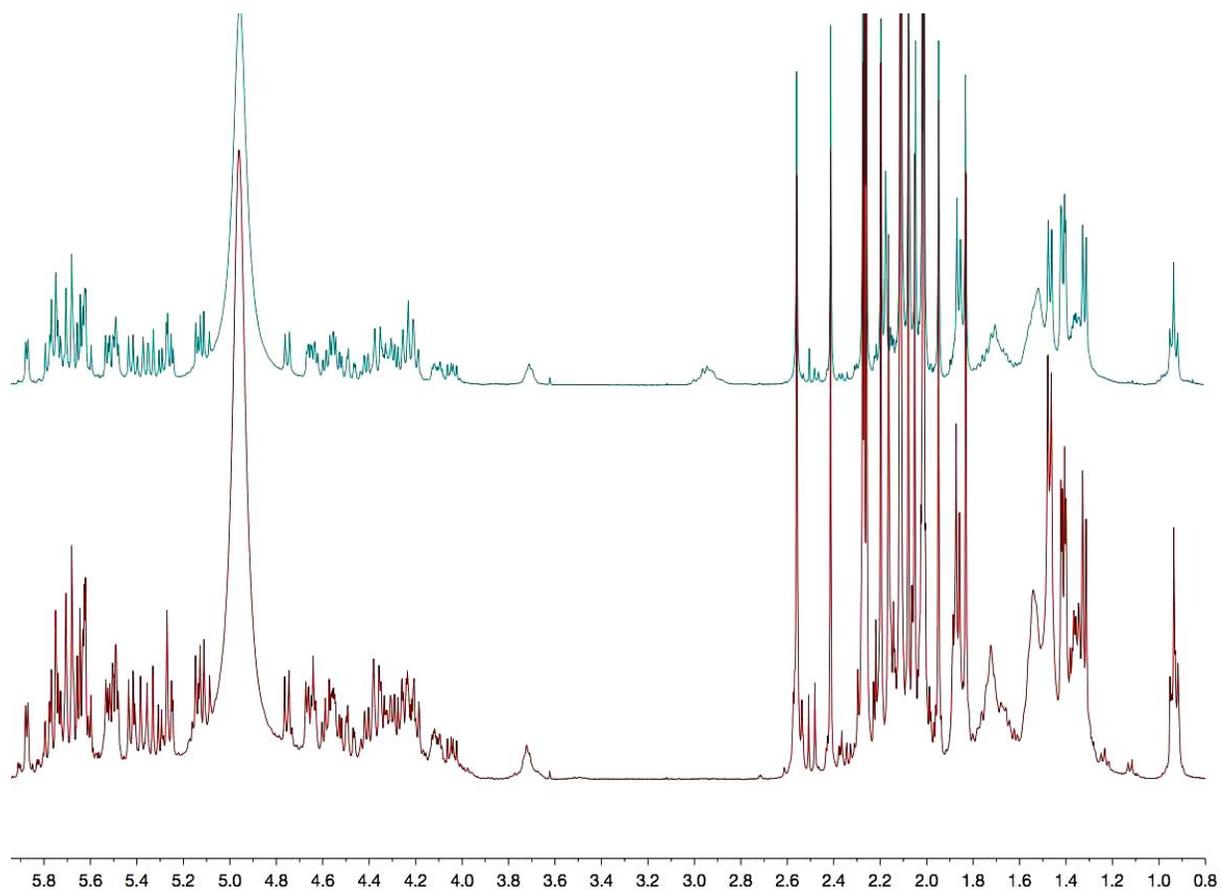
**Figura 22.** Estructura química propuesta para el ácido hederifólico I.

### 7.7.2 Ácido hederifólico III

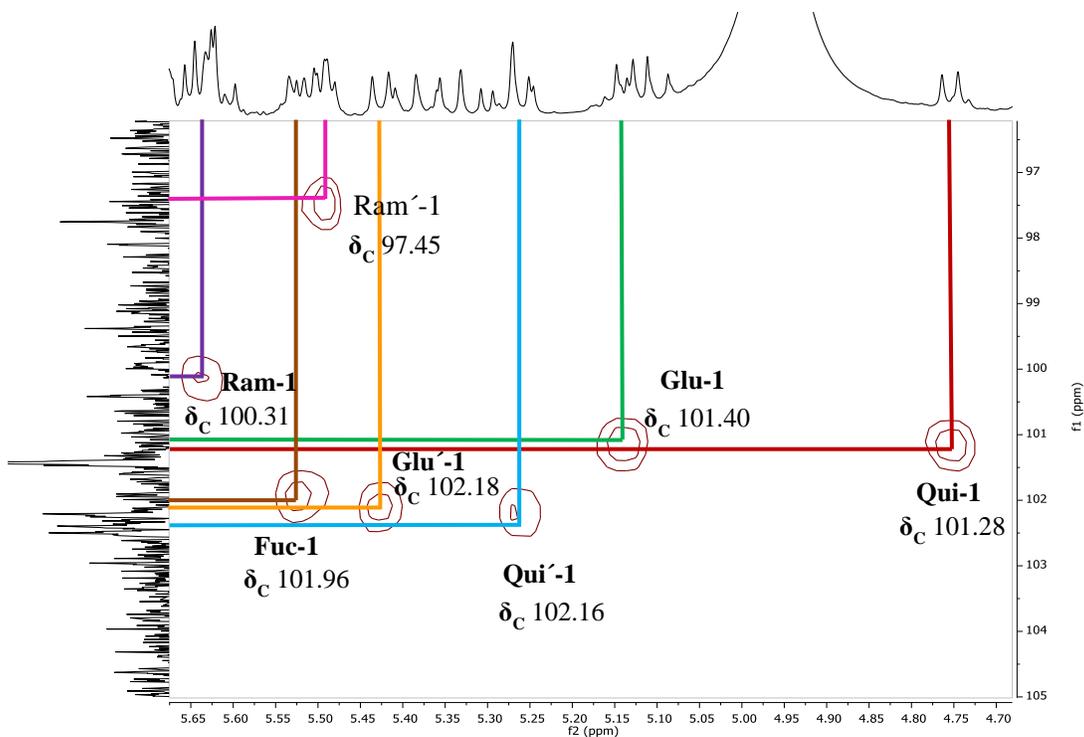
El análisis de los espectros monodimensionales ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ), obtenidos por resonancia magnética nuclear para el ácido hederifólico III, permitieron definir los desplazamientos químicos, las constantes de acoplamiento y a su vez adquirir información acerca de la estructura molecular de este compuesto oligosacárido. Teniendo en cuenta los desplazamientos químicos se identificaron señales características correspondientes a las resinas glicosídicas: un total de siete señales anoméricas entre los desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{H}}$  4.75 y 5.64; en el espectro de  $^{13}\text{C}$ , estas señales se encuentran correlacionadas con los carbonos que aparecen entre los desplazamientos químicos de  $\delta_{\text{C}}$  100.28 y 100.3 (**Cuadro 7**). Se observó una similitud entre los espectros de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  obtenidos para los ácidos hederifólicos I y III como ilustra el comparativo entre los espectros de RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 23**). La región correspondiente al oligosacárido ( $\delta_{\text{H}}$  3.5-6.0) indicaba que ambos compuestos presentan la misma porción sacárida, ya que todas las señales se superponen en esta porción del espectro. La única diferencia espectroscópica en el espectro del ácido hederifólico III, en donde el sistema ABX formado entre el metileno C-2 de la aglicona ( $\delta_{\text{H}}$  2.97, 2.89;  $\delta_{\text{C}}$  41.2) y el metino C-3 ( $\delta_{\text{H}}$  5.74,  $\delta_{\text{C}}$  72.4) que indicaban una hidroxilación en la posición C-3 de la aglicona en el compuesto I, no se observó. Para el ácido hederifólico III, se registró un triplete para la señal del metileno C-2 ( $\delta_{\text{H}}$  2.57,  $\delta_{\text{C}}$  35.5) que indicó la ausencia de oxidación en la posición C-3 y, por lo tanto, la aglicona debería corresponder al ácido 12-hidroxiheptadecanoico [46]. Por tanto, las estructuras químicas de los ácidos hederifólicos I y III poseen la misma secuencia de unidades monosacáridas y sólo difieren en la posición de hidroxilación en la posición C-3 de la aglicona [59]. Esto se corroboró a través de los patrones de acoplamiento ( $^3J_{\text{H,H}}$ ) mostrados para cada una de las unidades de monosacáridos, con ayuda de los espectros bidimensionales COSY y TOCSY, en los cuales se evidenciaron las semejanzas entre los compuestos mencionados.

La correspondencia entre cada una de las señales protónicas y su respectivo átomo de carbono geminal, se llevó a cabo por medio del experimento bidimensional HSQC (**Figura 24**), el cual también evidenció que el núcleo oligosacárido del ácido hederifólico III está conformado por siete unidades de monosacáridos, al igual que el ácido hederifólico I. En el caso de los experimentos bidimensionales COSY (**Figura 25**) y TOCSY (**Figura 26**), que

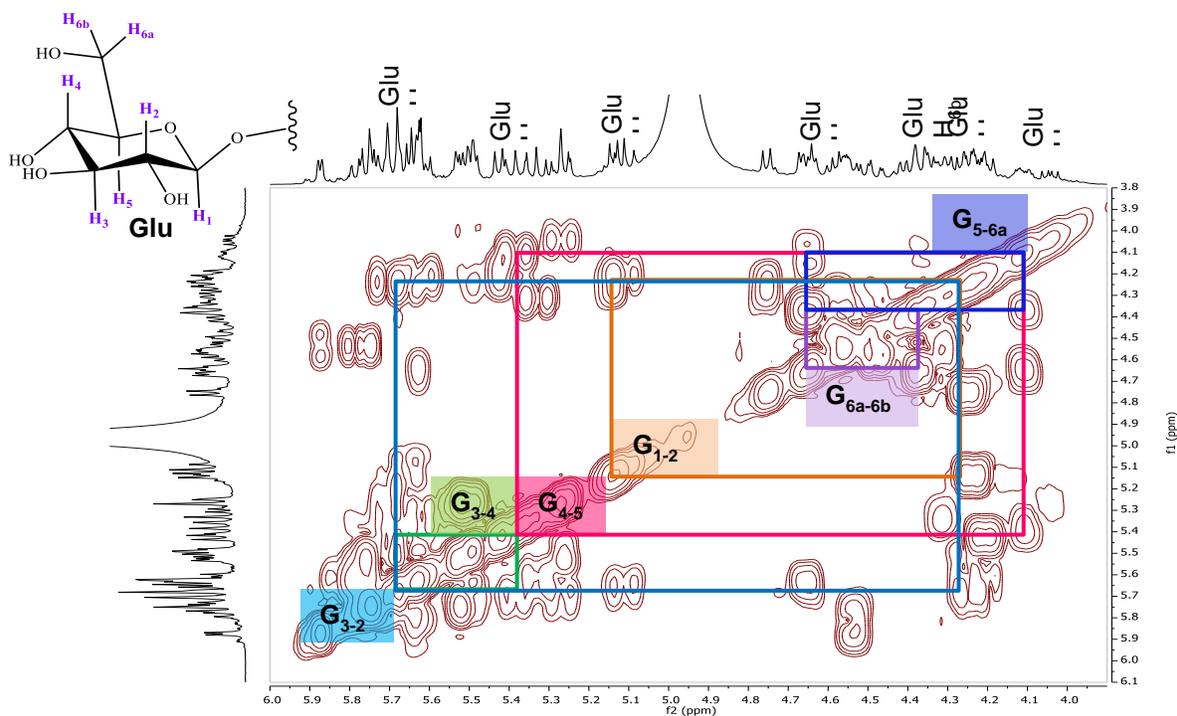
representan correlaciones homonucleares  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ , se encontró que el ácido hederifólico III presenta las mismas correlaciones protón-protón que el ácido hederifólico I; por tal motivo, después de comparar las señales obtenidas por los experimentos de RMN (mono y bidimensionales), se estableció que las dos estructuras químicas están constituidas por el mismo núcleo oligosacárido, es decir, dos unidades de D-glucosa, dos unidades de D-quinovosa, dos unidades de L-ramnosa y una unidad de D-fucosa.



**Figura 23.** Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ - RMN (400 MHz) obtenidos para los ácidos hederifólicos I (**trazo superior**) y III (**trazo inferior**).

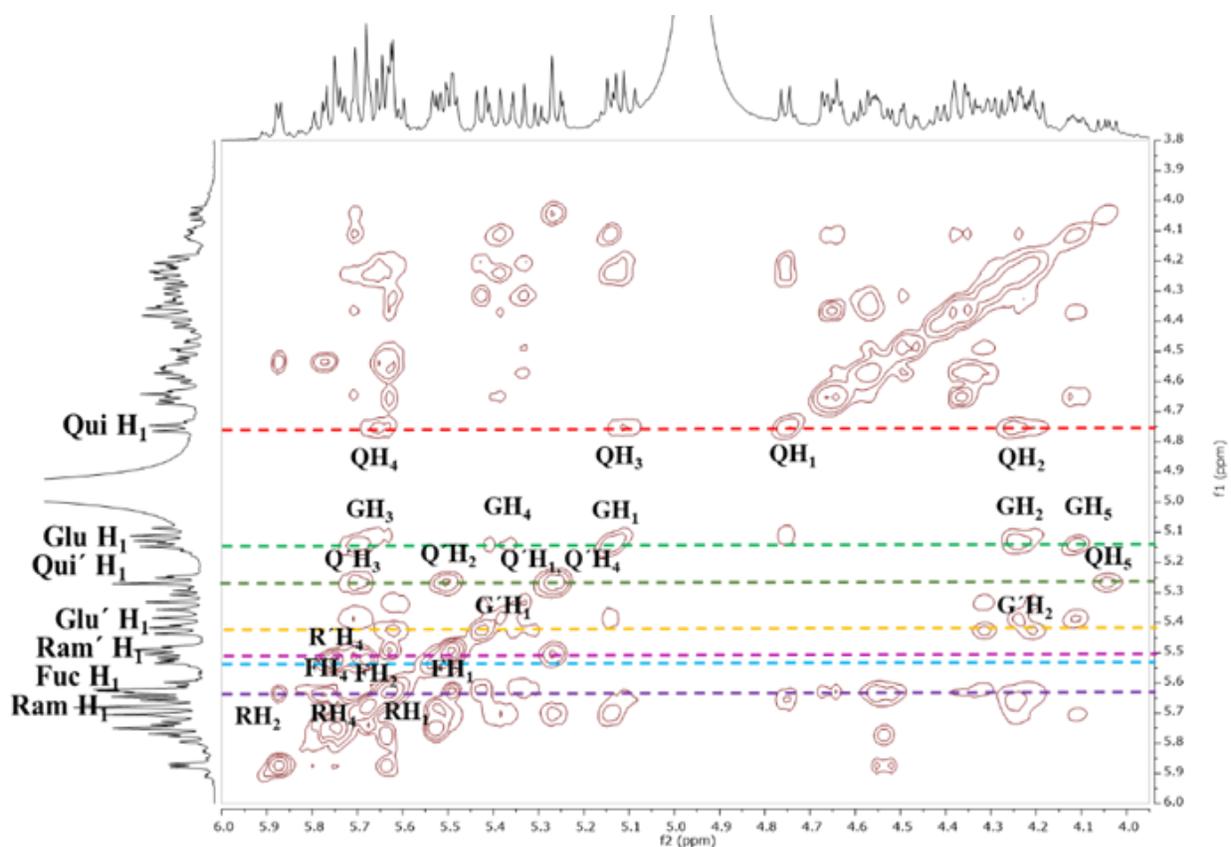


**Figura 24.** Región de señales anoméricas del espectro de HSQC, ácido hederifólico III.



**Figura 25.** Porción del espectro bidimensional COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico III. Correlaciones  $^3J_{\text{H-H}}$ : G 1-2; Glu H1-H2, G 3-2; Glu H3-H2, G 3-4; Glu H3-H4, G 4-5; Glu H4-H5, G 6a-6b; Glu H6a-H6b, G 5-6a; Glu' H5-H6a.

En el **Cuadro 7**, se enlistan los desplazamientos químicos y las constantes acoplamiento ( $^3J_{HH}$ ) registradas para el heptasacárido constitutivo del ácido hederifólico III. Estos desplazamientos fueron obtenidos en un equipo de resonancia magnética nuclear (400 MHz) con piridina deuterada ( $C_5D_5N$ ) como disolvente. Se utilizó el TMS como sustancia de referencia y los desplazamientos químicos se encuentran en ppm. En la **Figura 27** se presenta la estructura química propuesta para el ácido hederifólico III, ésta se obtuvo a través del análisis espectroscópico de los espectros obtenidos por RMN, monodimensionales ( $^1H$  y  $^{13}C$ ) y bidimensionales (COSY, TOCSY, HSQC y HMBC). Su estructura química difiere del ácido hederifólico I, en la ausencia de hidroxilación en la posición C-3 de la aglicona y, por lo tanto, corresponde a un heptasacárido del ácido 12-hidroxiheptadecanoico (**Figura 21**).



**Figura 26.** Porción del espectro bidimensional TOCSY ( $^1H - ^1H$ ) del ácido hederifólico III. Abreviaturas: Glu=G=Glu'=G'= glucosa, Ram = R= Ram'= R' ramnosa, Qui = Q= Qui'= Q'= quinovosa, Fuc = F= Fuc'= F= fucosa.

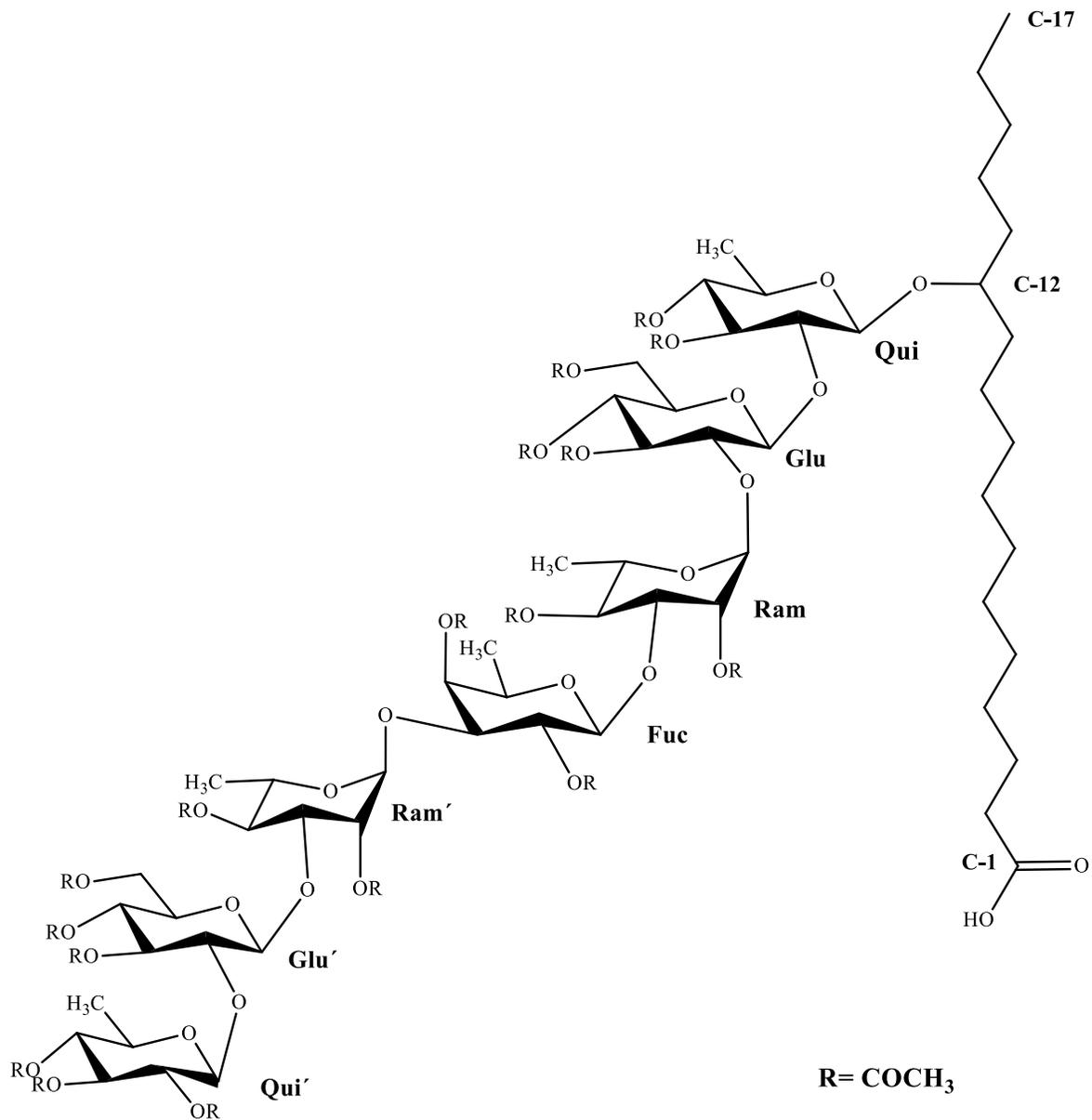
**Cuadro 7.** Constantes espectroscópicas de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (100 MHz) para el ácido hederifólico III en piridina- $d_5$ .

Posición	$\delta_{\text{H}}^*$	$\delta_{\text{C}}$
<b>Qui-1</b>	4.75 d (7.4)	101.28
2	4.26 dd (7.4, 9.5)	77.19
3	5.12 dd (9.5, 9.5)	74.38
4	5.64 (9.5, 9.5)	75.95
5	4.22 m	69.10
6	1.32 d (6.2)	17.7
<b>Glc-1</b>	5.14 d (7.7)	101.40
2	4.21 (7.7, 9.0)	79.55
3	5.63 dd (9.5, 9.5)	74.19
4	5.38 dd (9.5, 9.5)	78.02
5	4.11 ddd (2.5, 4.5, 9.5)	72.50
6a	4.65 dd (4.5, 11.5)	62.44
6b	4.37 (11.5, 2.5)	
<b>Ram-1</b>	5.64 brs	100.31
2	5.88 brd (3.8)	72.92
3	4.54 m	78.46
4	5.75 m	72.72
5	4.30 dq (9.5, 6.0)	69.86
6	1.41 d (6.4)	16.56
<b>Fuc-1</b>	5.52 (3.6)	101.96
2	5.68 dd (9.4)	71.24
3	4.23 m	79.77
4	5.36 m	70.03
5	4.42 m	69.58
6	1.42 d (6.4)	16.51

**Cuadro 7.** Continuación...

<b>Posición</b>	<b><math>\delta_H</math></b>	<b><math>\delta_C</math></b>
<b>Ram'-1</b>	5.49 brs	97.45
2	4.36 m	75.68
3	4.66 m	78.01
4	5.76	69.76
5	4.57 dq	67.73
6	1.86 d (6.3)	19.0
<b>Glu'-1</b>	5.43 d (7.7)	102.18
2	4.24 dd (7.7, 9.5)	72.60
3	5.69 m	74.09
4	5.33 dd (9.5, 9.4)	70.18
5	4.32 ddd (9.4, 4.7, 2.4)	71.80
6a	4.48 dd (9.4, 2.5)	62.89
6b	4.57 dd (9.4, 4.7)	
<b>Qui'-1</b>	5.28 d (7.6)	102.16
2	5.50 dd (7.5, 10.0)	72.46
3	5.68 dd (10.0, 10.0)	76.26
4	5.27 dd (10.0, 10.0)	74.04
5	4.05 dq (10.0, 6.5)	70.96
6	1.47 d (6.1)	18.4
<b>Ag-2a</b>	-	-
<b>Ag-2b</b>	-	-
<b>3</b>	5.76	72.27
<b>12</b>	3.71	81.25
<b>17</b>	0.93	14.7

Los patrones de acoplamiento se describen como d = doblete, dd = doblete de doblete, t = triplete, brs = señal ancha, m = multiplete, señales sobrepuestas.



**Figura 27.** Estructura química propuesta para el ácido hederifólico III.

## 8. CONCLUSIONES

**8.1** Se desarrolló un procedimiento analítico mediante CLAE en fase reversa preparativa y, mediante el empleo de las técnicas de corte, rasurado de núcleo y reciclaje de pico, se separaron y purificaron los ácidos hederifólicos I-IV presentes en el extracto metanólico de las partes aéreas de *Ipomoea hederifolia*.

**8.2** Por medio de espectrometría de masas mediante ionización por electroespray en modo positivo y negativo, se lograron establecer las masas para los ácidos glicosídicos aislados.

**8.3** Los experimentos de RMN en dos dimensiones, como TOCSY, COSY y HSQC, permitieron establecer cada una de las unidades unidades sacáridas para cada ácido glicosídico, en tanto que los experimentos HMBC y ROESY permitieron establecer las conectividades de los monosacáridos para establecer la secuencia de glicosilación de los ácidos hederifólicos I y III.

**8.4** Se caracterizó la estructura molecular del ácido hederifólico I como: el ácido 3,12-dihidroxiheptadecanico  $\beta$ -D-quinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-fucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D- quinopiranósido.

**8.5** Se caracterizó la estructura molecular del ácido hederifólico III como: el ácido 2-hidroxiheptadecanico  $\beta$ -D-quinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- $\beta$ -D-fucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-O- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-O- $\beta$ -D- quinopiranósido.

**8.6** Los ácidos hederifólicos I y III aislados y caracterizados son totalmente novedosos y no existen reportes actuales en la literatura.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- [1] J. Sarris. Herbal medicines in the treatment of psychiatric disorders: 10-year updated review. *Phytotherapy research*, 2018, **32**, 1147–1162.
- [2] J. Davidow. *Infusions of Healing. A treasury of Mexican–American Herbal Remedies*, Fireside: New York, Simon & Schuster, 1999, 134–135.
- [3] M. Meira; E. Pereira da Silva; J.M. David; J.P. David. Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 2012, **22**, 682–713.
- [4] M. Yoshimoto; S. Okuno; M. Yoshinaga; O. Yamakawa; M. Yamaguchi; J. Yamada. Antimutagenicity of Sweetpotato (*Ipomoea batatas*) Roots. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1999, **63**, 537–541.
- [5] M.S. Islam; M. Yoshimoto; S. Yahara; S. Okuno; K. Ishiguro; O. Yamakawa. Identification and Characterization of Foliar Polyphenolic Composition in Sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.) Genotypes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2002, **50**, 3718–3722.
- [6] R.G. Rumbaoa; D.F. Cornago; I.M. Geronimo. Phenolic content and antioxidant capacity of Philippine sweet potato (*Ipomoea batatas*) varieties. *Food Chemistry*, 2009, **113**, 1133–1138.
- [7] I. Oduro; W.O. Ellis; D. Owusu. Nutritional potential of two leafy vegetables: *Moringa oleifera* and *Ipomoea batatas* leaves. *Scientific Research and Essay*, 2008, **3**, 57–60.
- [8] T.S. Malalavidhane; S.M. Wickramasinghe; E.R. Jansz. Oral hypoglycaemic activity of *Ipomoea aquatica*. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, **72**, 293–298.

- [9] M. Haraguchi; S.L. Gorniak; K. Ikeda; Y. Minami; A. Kato, A.A. Watson; R.J Nash; R.J. Molyneux; N. Asano. Alkaloidal Components in the Poisonous Plant, *Ipomoea carnea* (Convolvulaceae). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, **51**, 4995–5000.
- [10] M.M. de Souza; A. Madeira; C. Berti; R. Krogh; R.A. Yunes; V. Cechinel-Filho. Antinociceptive properties of the methanolic extract obtained from *Ipomoea pes-caprae* (L.) R. Br. *Journal of Ethnopharmacology*, 2000, **69**, 85–90.
- [11] A.A. Ferreira; F.A. Amaral; I.D.G. Duarte; P.M. Oliveira; R.B. Alves; D. Silveira; A.O. Azevedo; D.S. Raslan; M.S.A. Castro. Antinociceptive effect from *Ipomoea cairica* extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 2006, **105**, 148–153.
- [12] D. Mammen. 2006, *Medicinal Plants: Chemistry and Properties*. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 1–230.
- [13] S. Cruz-Morales; J. Castañeda-Gómez; G. Figueroa-González; A.D. Mendoza-García; A. Lorence; R. Pereda-Miranda. Mammalian Multidrug Resistance Lipopenta saccharide Inhibitors from *Ipomoea alba* Seeds. *Journal of Natural Products*, 2012, **75**, 1603–1611.
- [14] R. Pereda-Miranda; M. Bah. Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 2003, **3**, 11–12.
- [15] R. Pereda-Miranda; E. Escalante-Sánchez; C. Escobedo-Martínez. Characterization of Lipophilic Pentasaccharides from Beach Morning Glory (*Ipomoea pes-caprae*). *Journal of Natural Products*, 2005, **68**, 226–230.
- [16] L. Chérigo; R. Pereda-Miranda. Resin Glycosides from the Flowers of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Products*, 2006, **69**, 595–599.

- [17] B. Hernández-Carlos; R. Bye; R. Pereda-Miranda. Orizabins V–VIII, Tetrasaccharide Glycolipids from the Mexican Scammony Root (*Ipomoea orizabensis*). *Journal of Natural Products*, 1999, **62**, 1096–1100.
- [18] G. Srivastava; R.C. Mehrotra; D.L. Dilcher. Paleocene *Ipomoea* (Convolvulaceae) from India with implications for an East Gondwana origin of Convolvulaceae. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2018, **115**, 1–6.
- [19] T.C. Mitchell; B.R.M. Williams; J.R.I. Wood; D.J. Harris; R.W. Scotland; M.A. Carine. How the temperate world was colonised by bindweeds: biogeography of the Convolvuleae (Convolvulaceae). *BMC Evolutionary Biology*, 2016, **16**, 1–112.
- [20] U. Steiner; E. Leistner. Ergot alkaloids and their hallucinogenic potential in morning glories. *Planta Medica*, 2018, **84**, 751–758.
- [21] R. Pereda-Miranda; D. Rosas-Ramírez; J. Castañeda-Gómez. Resin glycosides from the morning glory family. En: Kinghorn, A.D. et al. (eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 92. Springer–Verlag/Wien. New York, 2010, 79–147.
- [22] J. Nowak; M. Woźniakiewicz; P. Klepacki; A. Sowa; P. Kościelniak. Identification and determination of ergot alkaloids in Morning Glory cultivars. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2016, **408**, 3093–3102.
- [23] A. Yazlik; I. Üremiş; A. Uludağ; K. Uzun; S. Şenol. *Ipomoea triloba*: an alien plant threatening many habitats in Turkey. *European and Mediterranean Plant Protection Organization Bulletin*, 2018, **48**, 589–594.
- [24] N. Netsai; M. Moses; M. Tuarira. Effect of cutting position and vine pruning level on yield of Sweet Potato (*Ipomoea Batatas* L.). *Journal of Aridland Agriculture*, 2019, **5**, 1–5.

- [25] M. Ono; K. Akiyama; M. Kishida; M. Okawa; J. Kinjo; H. Yoshimitsu; K. Miyahara. Two new glycosidic acids, multifidinic acids F and G, of the ether-insoluble resin glycoside (convolvulin) from the seeds of *Quamoclit* × *multifida*. *Journal of Natural Medicines*, 2013, **67**, 822–826.
- [26] W.M.D. Thisera; R.M.P.S. Thilakarathne; A.G.K. Neranja; K.D.K.P. KumariS. Evaluation of the Antimicrobial Activity of Different Solvent Extracts of *Ipomoea littoralis* (Blume): A Naturally Growing Medicinal Plant in Sri Lanka. *outh Asian Research Journal of Natural Products*, 2019, **2**, 1–9.
- [27] R. Pereda-Miranda. Bioactive natural products from traditionally used mexican plants. En: Arnason, J.T., et al. (eds.) *Phytochemistry of Medicinal Plants*, Springer, Boston, MA., 1995, 83–112.
- [28] E. Bautista; M. Fragoso-Serrano; R. Pereda-Miranda. Jalapinoside II, a bisdesmoside resin glycoside, and related glycosidic acids from the officinal jalap root (*Ipomoea purga*). *Phytochemistry Letters*, 2016, **17**, 85–93.
- [29] H. Taihua; L. Xi; M. Zhang; J. Chen. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves as nutritional and functional foods. *Food Chemistry*, 2014, **6**, 380–389.
- [30] A. Pandurangan; K. Rana. Mini review on chemistry and biology of *Ipomoea hederifolia* linn. (convolvulaceae). *Global Journal of Pharmaceutical Education and Research*, 2016, **4**, 23–25.
- [31] K. Jenett-Siems; S.C. Ott; T. Schimming; K. Siems; F. Müller; M. Hilker; L. Witte; T. Hartmann; D.F. Austin; E. Eich. Ipangulines and minalobines, chemotaxonomic markers of the infrageneric *Ipomoea* taxon subgenus *Quamoclit*, section *Mina*. *Phytochemistry*, 2005, **66**, 223–231.

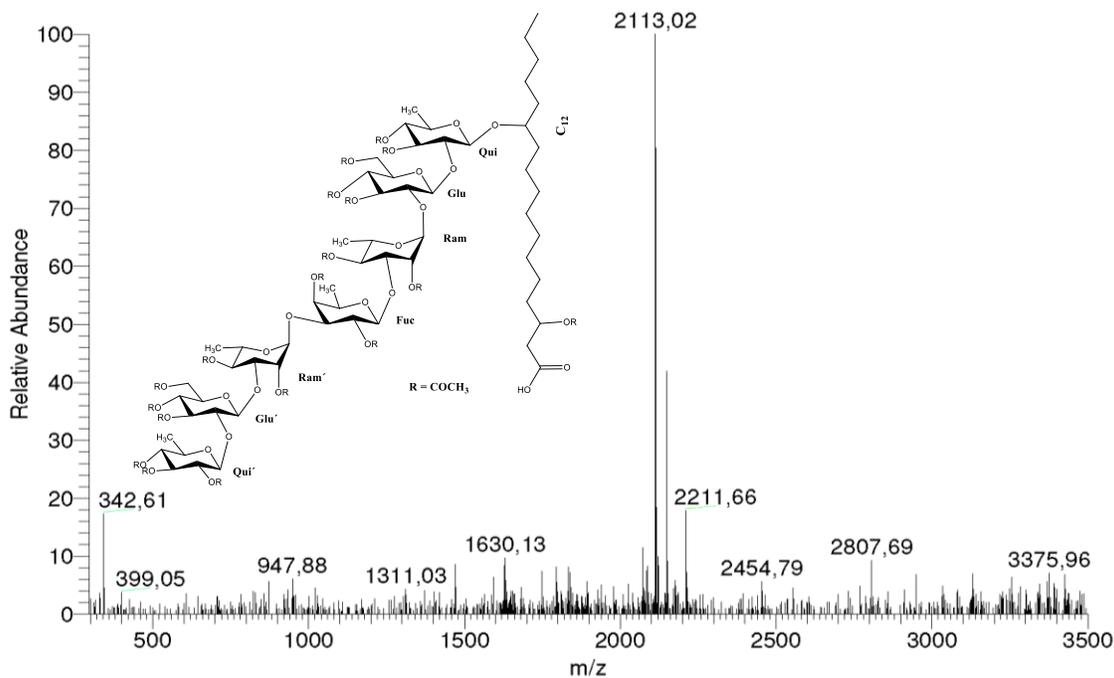
- [32] T. Schimming; K. Jenett-Siems; P. Mann; B. Tofern-Reblin; J. Milson; R.W. Johnson; T. Deroin; D.F. Austin; E. Eich. Calystegines as chemotaxonomic markers in the Convolvulaceae. *Phytochemistry*, 2005, **66**, 469–480.
- [33] S. Ene-OjoAtawodi; G.S. Onaolapo. Comparative *in vitro* antioxidant potential of different parts of *Ipomoea asarifolia*, Roemer & Schultes, *Guiera senegalensis*, J. F. Gmel and *Anisopus mannii* N. E. Brown *Revista Brasileira de Ciências Farmacéuticas*, 2010, **46**, 245–250.
- [34] H. Mohamad; F. Abas; D. Permana; N.H. Lajis; A.M. Ali; M. Aspollah; T.Y.Y Hin; H. Kikuzakid; N. Nakatani. DPPH Free Radical Scavenger Components from the Fruits of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae) of *Alpinia rafflesiana* Wall. ex. Bak. (Zingiberaceae). *Zeitschrift für Naturforschung C*, 2004, **59**, 811–815.
- [35] P.A. Botham. Acute systemic toxicity—prospects for tiered testing strategies. *Toxicology in Vitro*, 2004, 18, 227–230.
- [36] S. Islam. Antimicrobial activities of *Ipomoea batatas* (L.) leaf. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 2008, **6**, 14–17.
- [37] R. Sharma; N. Martins; K. Kuca; A. Chaudhary; A. Kabra; M. Rao; P.K. Prajapati. *Chyawanprash*: A Traditional Indian Bioactive Health Supplement. *Biomolecules*, 2019, **9**, 1–24.
- [38] M. Ono; M. Imao; K. Miyahara. Two New Glycosidic Acids, Quamoclinic Acids G and H, of the Resin Glycosides (Convolvulin) from the Seeds of *Quamoclit pennata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, **58**, 1232–1235.
- [39] A. Mari; A. Napolitano; M. Masullo; C. Pizza; S. Piacente. Identification and quantitative determination of the polar constituents in *Helichrysum italicum* flowers and derived food supplements. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2014, **96**, 249–255

- [40] M. Ono; Y. Takagi-Taki; F. Honda-Yamada; N. Noda; K. Miyahara. Components of Ether-Insoluble Resin Glycoside (Convolvulin) from Seeds of *Quamoclit pennata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 2010, **58**, 666–672.
- [41] R. Pereda-Miranda; B. Hernández-Carlos. HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from *Mexican scammony* root. *Tetrahedron*, 2002, **58**, 3145–3154
- [42] E. Escalante-Sánchez; D. Rosas-Ramírez; E. Linares; R. Bye; R. Pereda-Miranda. Batatinosides II–VI, Acylated Lipooligosaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, **56**, 9423–9428.
- [43] J. Castañeda-Gómez; G. Figueroa-González; N. Jacobo; R. Pereda-Miranda. Purgin II, a Resin Glycoside Ester-Type Dimer and Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps from *Ipomoea purga*. *Journal of Natural Products*, 2013, **76**, 64–71.
- [44] B.Y. Fan; Y. Lu; H. Yin; Y. He; J.L. Li, G. Chen. Arvensic acids A–D, novel heptasaccharide glycosidic acids as the alkaline hydrolysis products of crude resin glycosides from *Convolvulus arvensis*. *Fitoterapia*, 2018, **131**, 209–214.
- [45] M. Ono; M. Azuchi; M. Ichio; Y. Jiyoubi; S. Tsutsumi; S. Yasuda; R. Tsuchihashi; M. Okawa; J. Kinjo; H. Yoshimitsu; T. Nohara. Seven new resin glycosides from the seeds of *Quamoclit × multifida*. *Journal of Natural Medicines*, 2019, **73**, 11–22.
- [46] B.Y. Fan; Y. He; Y. Lu; M. Yang; Q. Zhu; G.T. Tong; J.L. Li. Glycosidic Acids with Unusual Aglycone from *Convolvulus arvensis*. *Journal of Natural Products*, 2019, **82**, 1593–1598.
- [47] M. Ono. Resin glycosides from Convolvulaceae plants. *Journal of Natural Medicines*, 2017, **71**, 591–604.

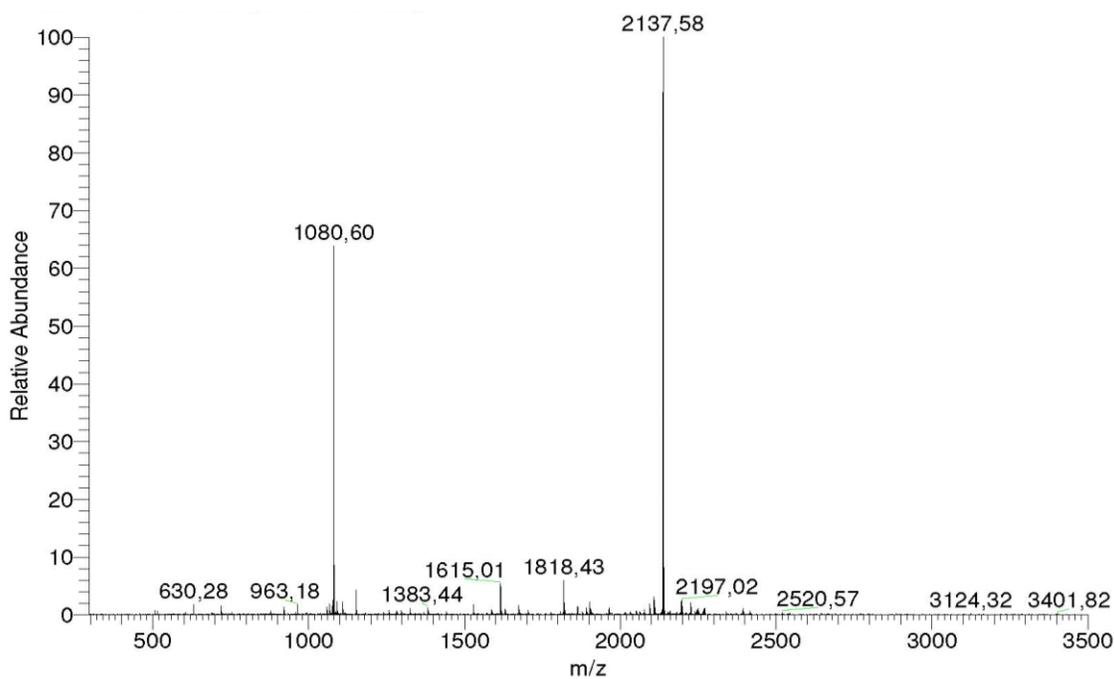
- [48] E. Bautista; M. Fragoso-Serrano; R. Pereda-Miranda. Jalapinoside, a Macrocyclic Bidesmoside from the Resin Glycosides of *Ipomea purga*, as a Modulator of Multidrug Resistance in Human Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 2015, **78**, 168–172.
- [49] E. Bautista; M. Fragoso-Serrano; R. Pereda-Miranda. Jalapinoside II, a bidesmoside resin glycoside, and related glycosidic acids from the officinal jalap root (*Ipomoea purga*). *Phytochemistry letters*, 2016, **17**, 85–93.
- [50] I. León-Rivera; F. del Río-Portilla; R.G. Enríquez; E. Rangel-López; J. Villeda; M.Y. Ríos; G. Navarrete-Vázquez; I. Hurtado-Días; U. Guzmán-Valdivieso; V. Núñez-Urquiza; C. Escobedo-Martínez. Hepta-, hexa-, penta-, tetra-, and trisaccharide resin glycosides from three species of *Ipomoea* and their antiproliferative activity on two glioma cell lines. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2016, **55**, 214–223.
- [51] R. Pereda-Miranda; M. Fragoso-Serrano; E. Escalante-Sánchez; B. Hernández-Carlos; E. Linares; R. Bye. Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity *Journal of Natural Natural Products*, 2006, **69**, 1460–1466.
- [52] L.S. Barkawi; J. Cohen. A method for concurrent diazomethane synthesis and substrate methylation in a 96-sample format. *Nature Protocols*, 2010, **5**, 1619–1626.
- [53] A. Bucić-Kojić; M. Planinić; S. Tomas; M. Bilić, D. Velić. Study of solid–liquid extraction kinetics of total polyphenols from grape seeds. *Journal of Food Engineering*, 2007, **81**, 236–242.
- [54] C.C. Barnes; M.K. Smalley; K.P. Manfredi; K. Kindscher; H. Loring; D.M. Sheeley. Characterization of an Anti-tuberculosis Resin Glycoside from the Prairie Medicinal Plant *Ipomoea leptophylla*. *Journal of Natural Natural Products*, 2003, **66**, 1457–1462.

- [55] S. Cruz-Morales; J. Castañeda-Gómez; D. Rosas-Ramírez; M. Fragoso-Serrano; G. Figueroa-González; A. Lorence; R. Pereda-Miranda. Resin Glycosides from *Ipomoea alba* Seeds as Potential Chemosensitizers in Breast Carcinoma Cells. *Journal of Natural Natural Products*, 2016, **79**, 3093–3104.
- [56] L. Chérigo; R. Pereda-Miranda; M. Fragoso-Serrano; N. Jacobo-Herrera; G. Kaatz; S. Gibbons. Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Natural Products*, 2008, **71**, 1037–1045.
- [57] J. Castañeda-Gómez; R. Pereda-Miranda. Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (*Ipomoea purga*). *Journal of Natural Natural Products*, 2011, **74**, 1148–1153.
- [58] E. Escalante-Sánchez; R. Pereda-Miranda. Batatins I and II, ester-type dimers of acylated pentasaccharides from the resin glycosides of sweet potato. *Journal of natural products*, 2007, **70**, 1029–1034.
- [59] J. Lira-Ricárdez; R. Pereda-Miranda; J. Castañeda-Gómez; M. Fragoso-Serrano; R. Costa Simas; S. Guimarães Leitão. Resin Glycosides from the roots of *Operculina macrocarpa* (Brazilian Jalap) with Purgative Activity. *Journal of Natural Products*, 2019, **82**, 1664–1677.
- [60] J. Castañeda-Gómez; P. Laviás-Hernández; M. Fragoso-Serrano; A. Lorence; R. Pereda-Miranda. Acylsugar diversity in the resin glycosides from *Ipomoea tricolor* seeds as chemosensitizers in breast cancer cells. *Phytochemistry Letters*, 2019, **32**, 77–82.

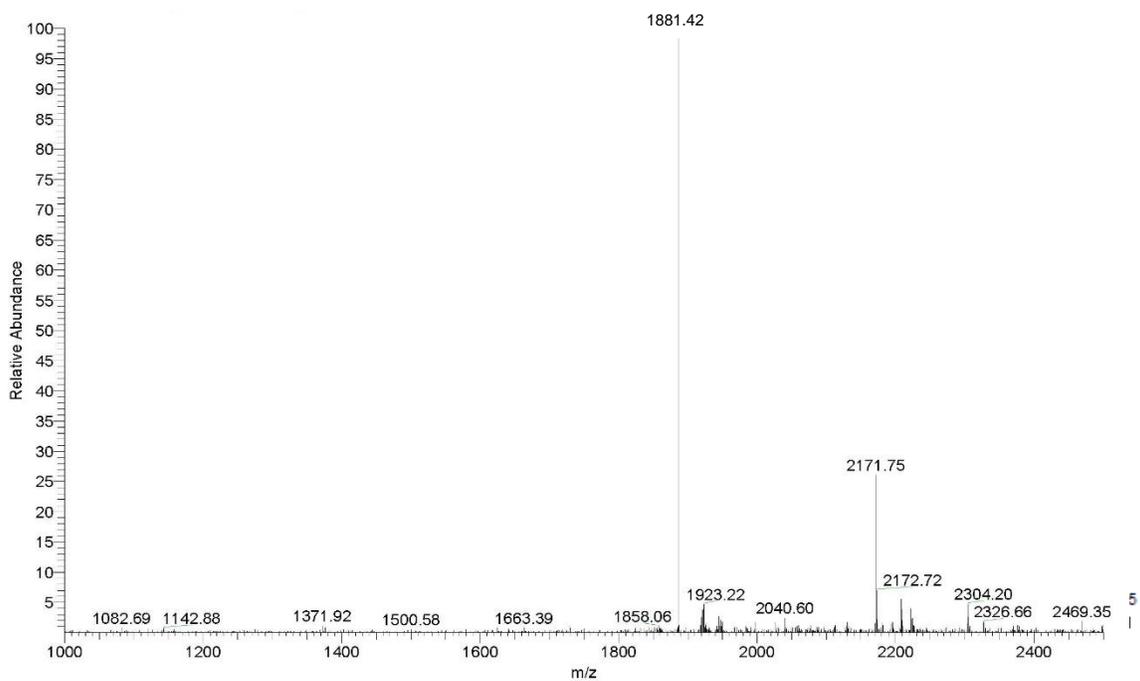
## 10. ANEXOS



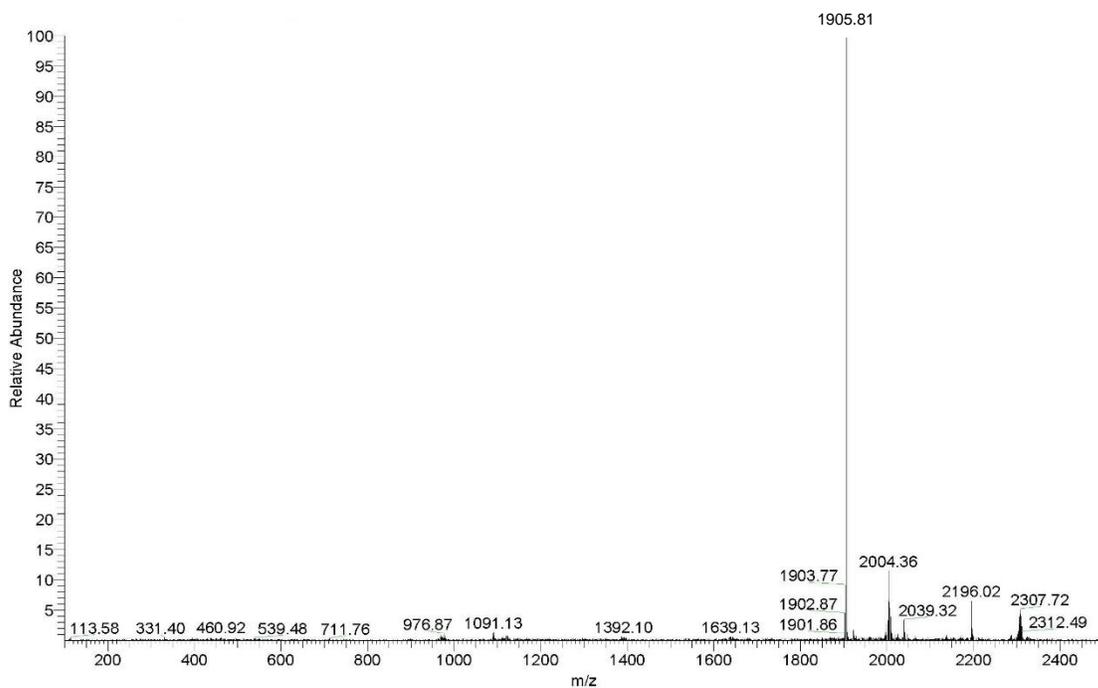
ANEXO 1. Espectro de masas MS/ESI modo negativo del ácido hederifólico I.



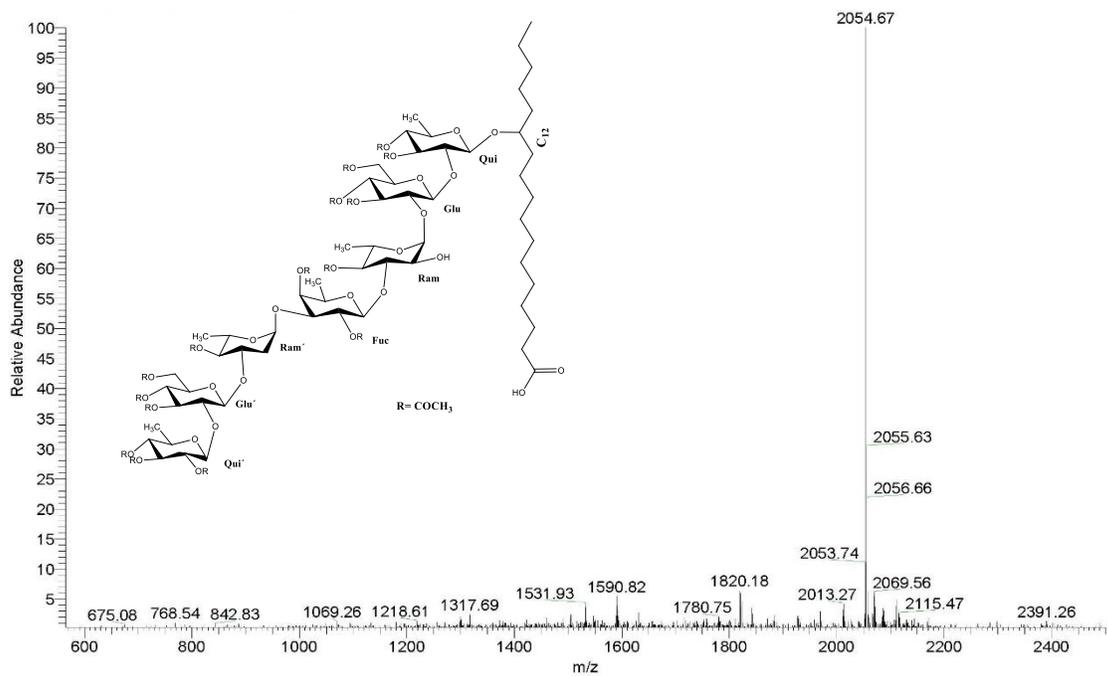
ANEXO 2. Espectro de masas MS/ESI modo positivo del ácido hederifólico I.



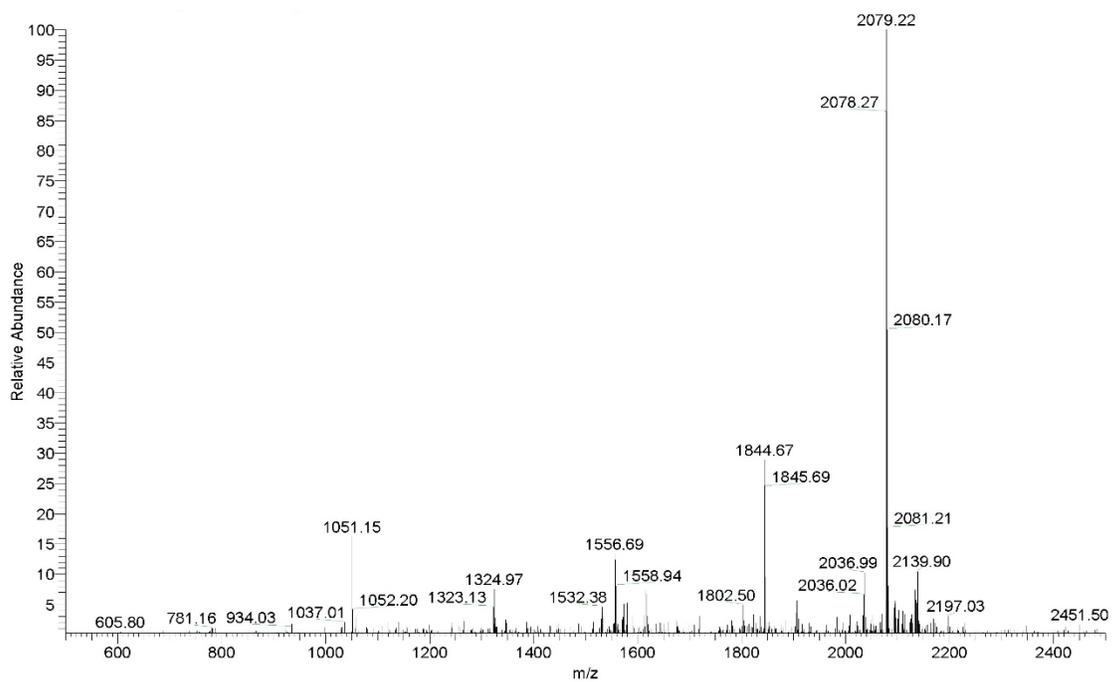
**ANEXO 3.** Espectro de masas MS/ESI modo negativo del ácido hederifólico II.



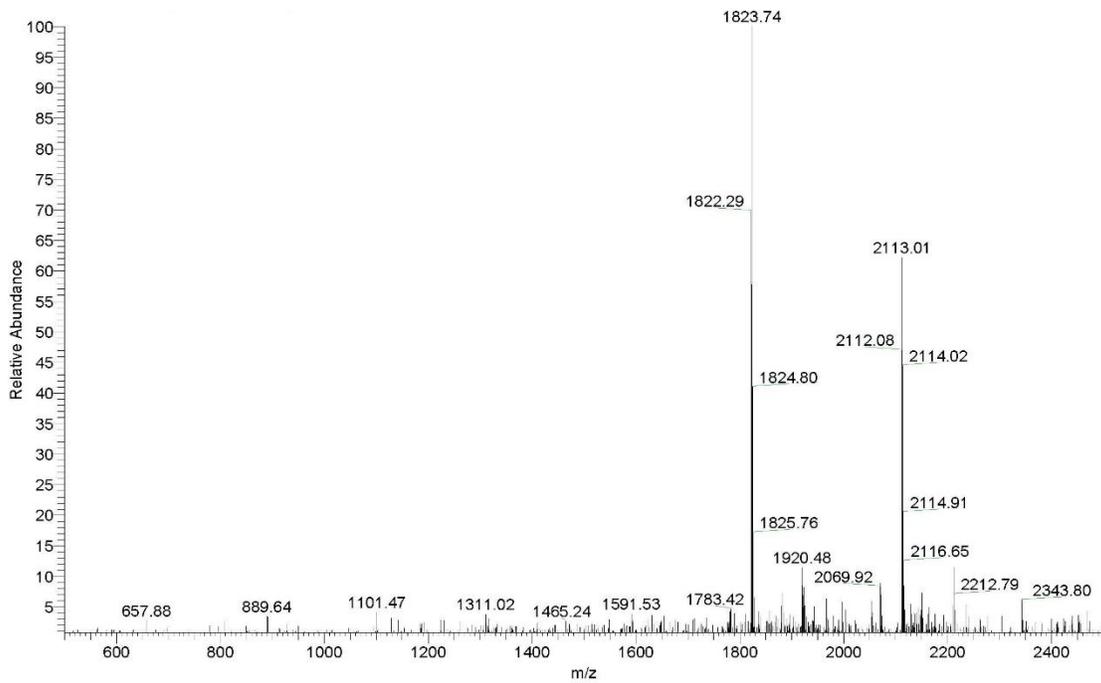
**ANEXO 4.** Espectro de masas MS/ESI modo positivo del ácido hederifólico II.



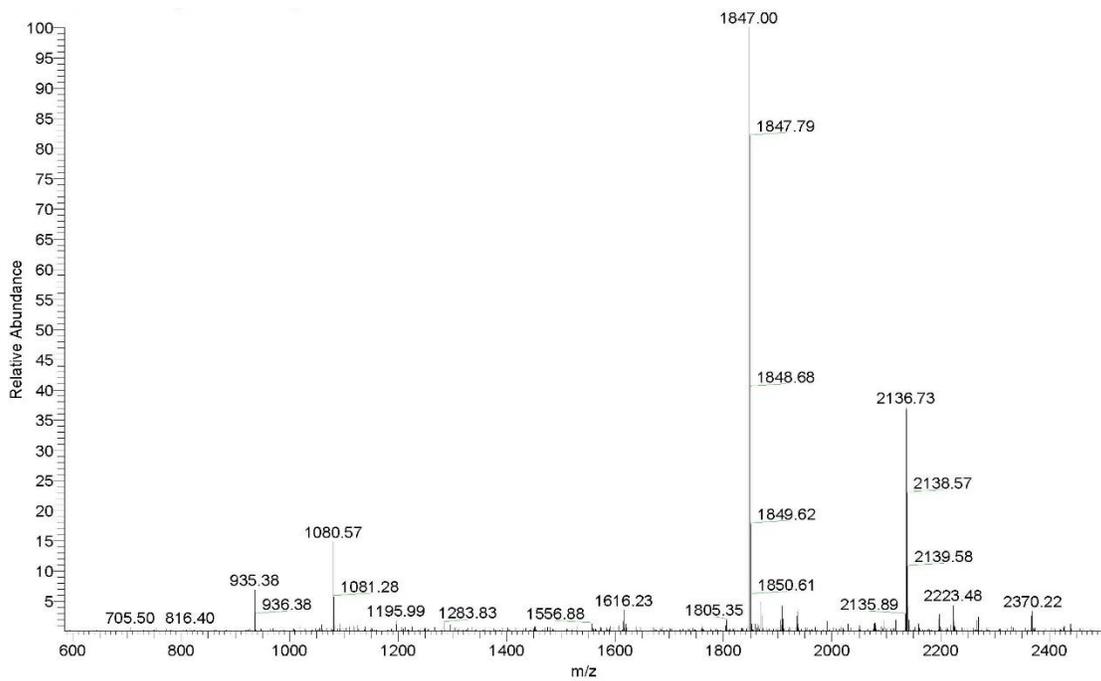
**ANEXO 5.** Espectro de masas MS/ESI modo negativo del ácido hederifólico III.



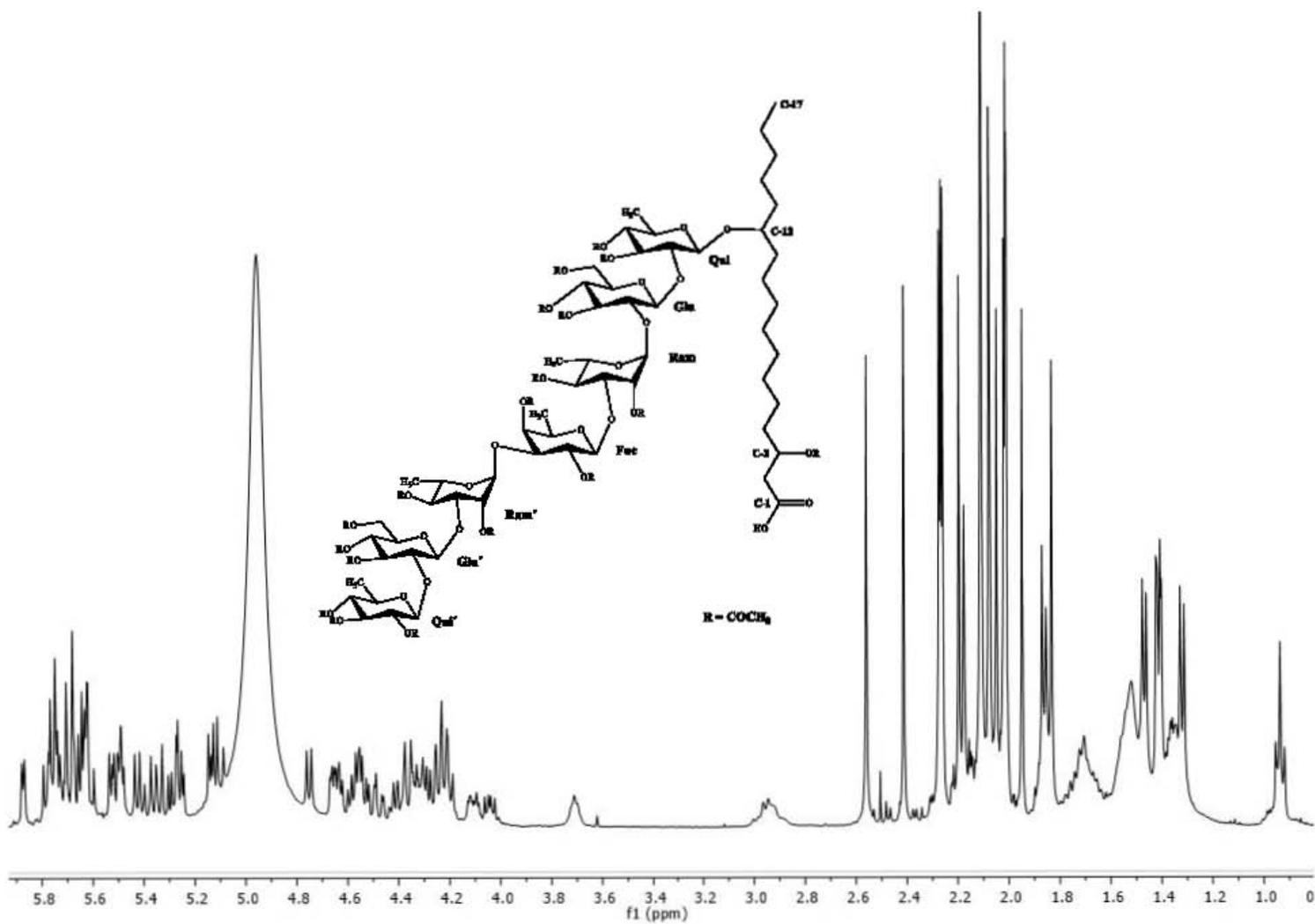
**ANEXO 6.** Espectro de masas MS/ESI modo positivo del ácido hederifólico III.



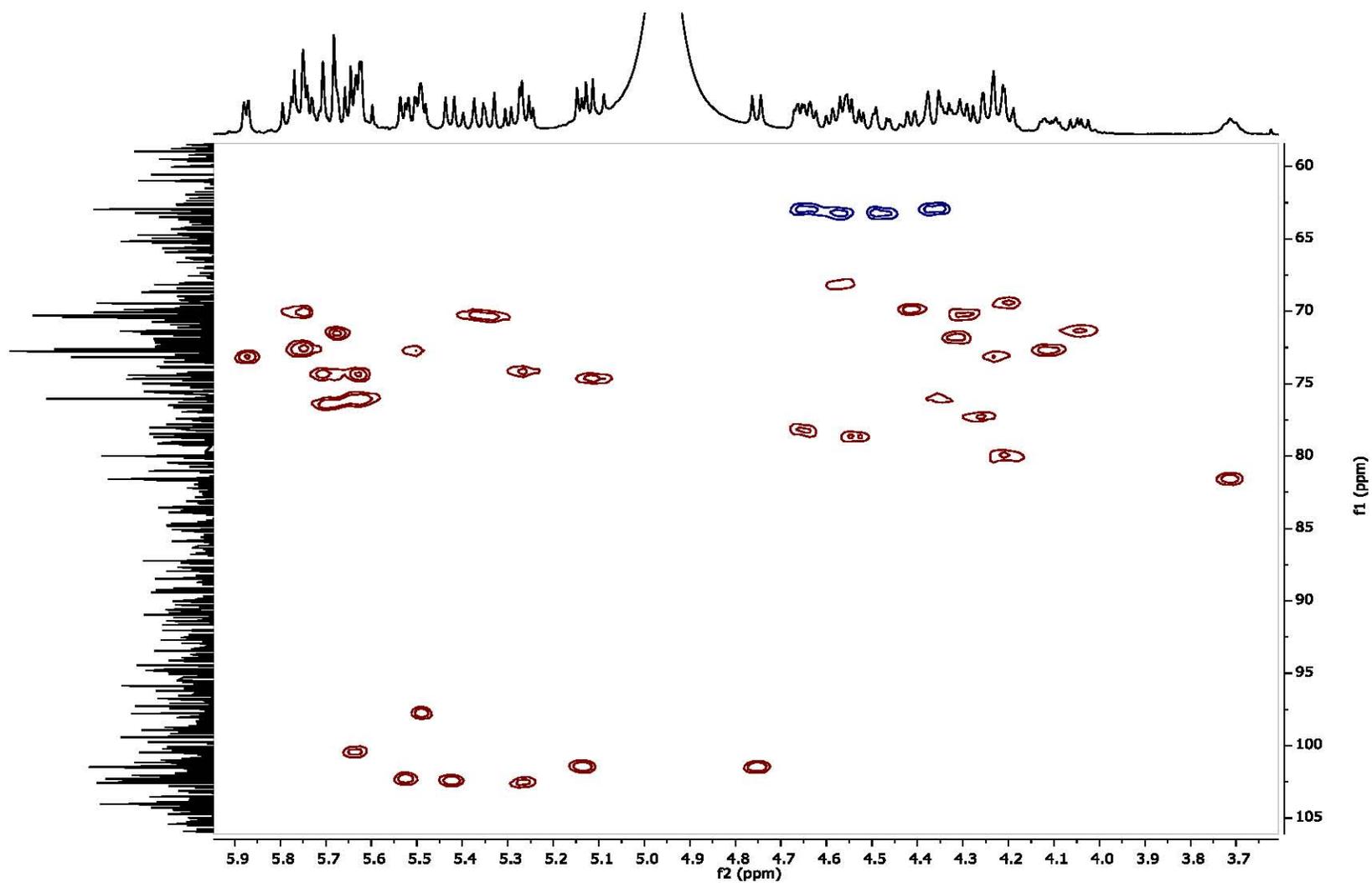
**ANEXO 7.** Espectro de MS/ESI modo negativo del ácido hederifólico IV.



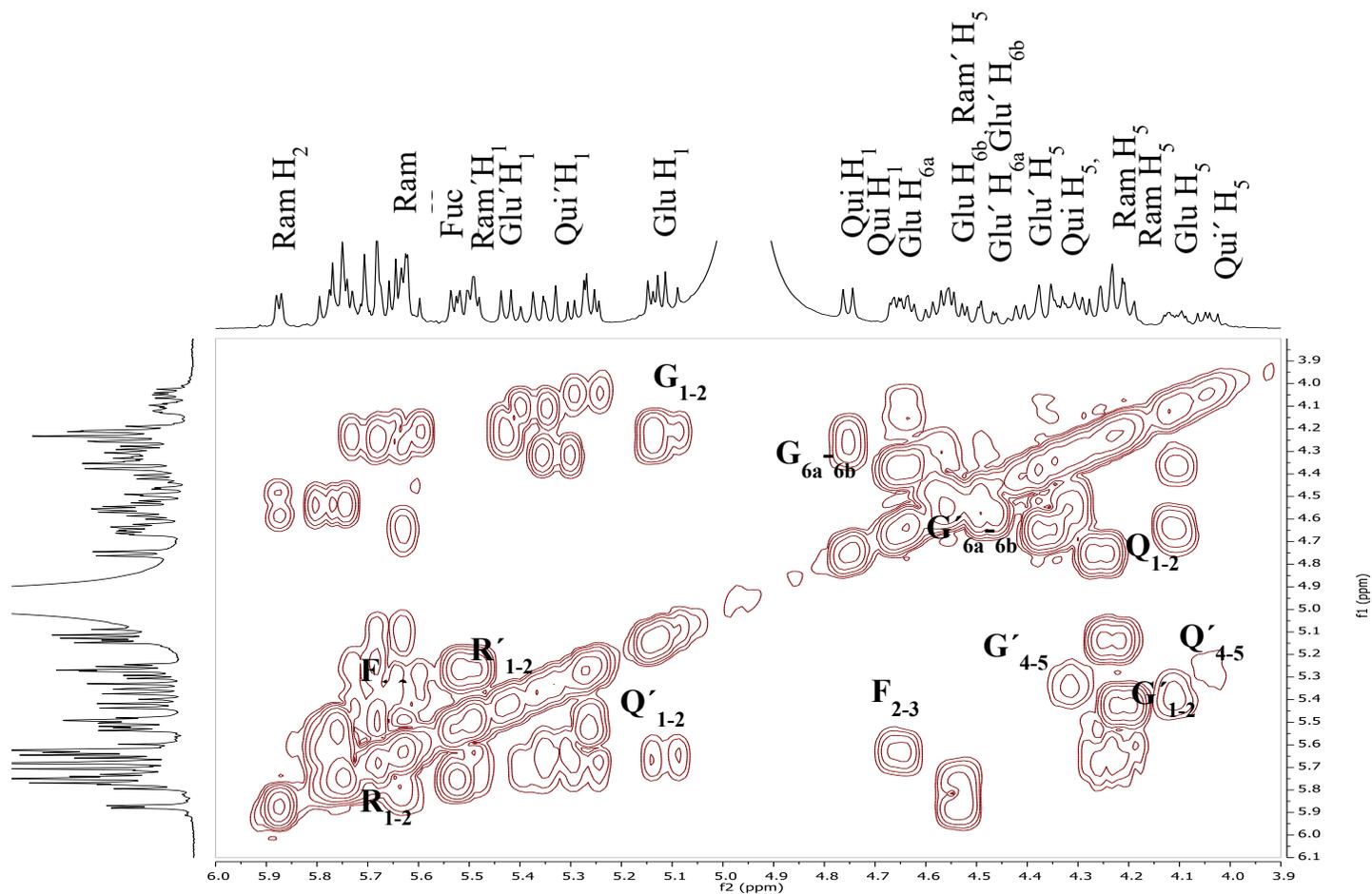
**ANEXO 8.** Espectro de masas MS/ESI modo positivo del ácido hederifólico IV.



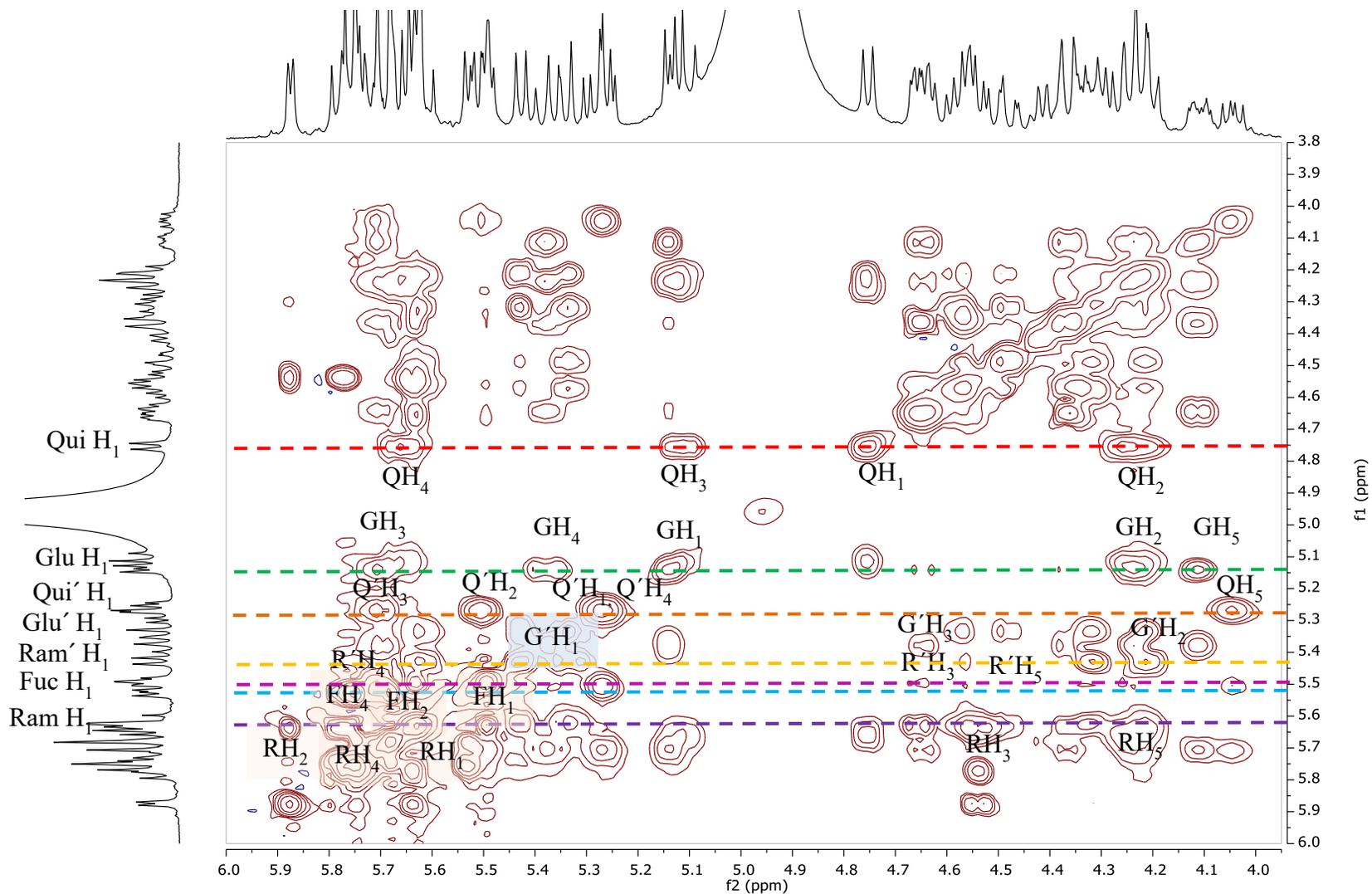
ANEXO 9. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz) del ácido hederifólico I peracetilado ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).



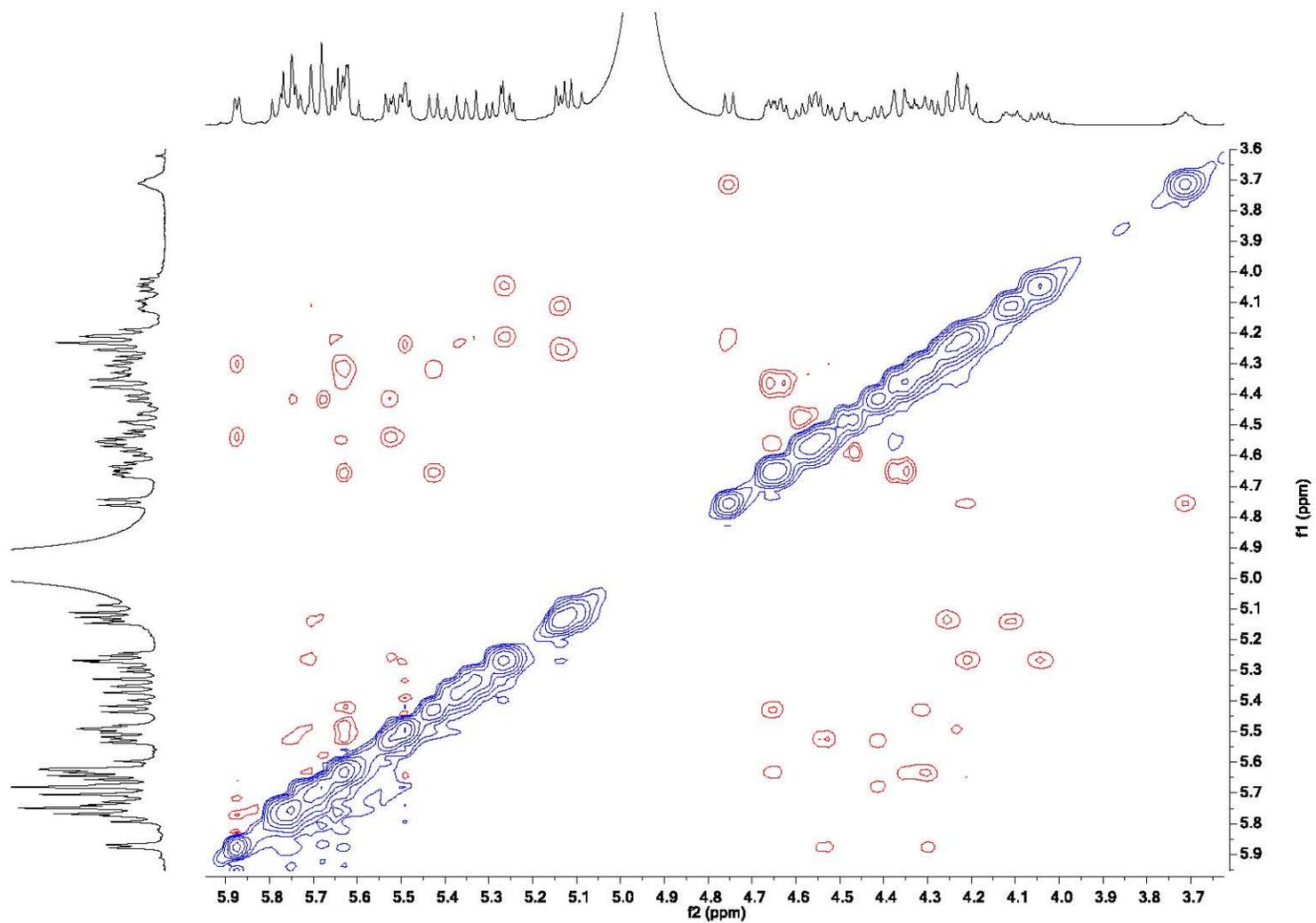
ANEXO 10. Espectro de HSQC obtenido por RMN (400 MHz) del ácido hederifólico I peracetilado en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.



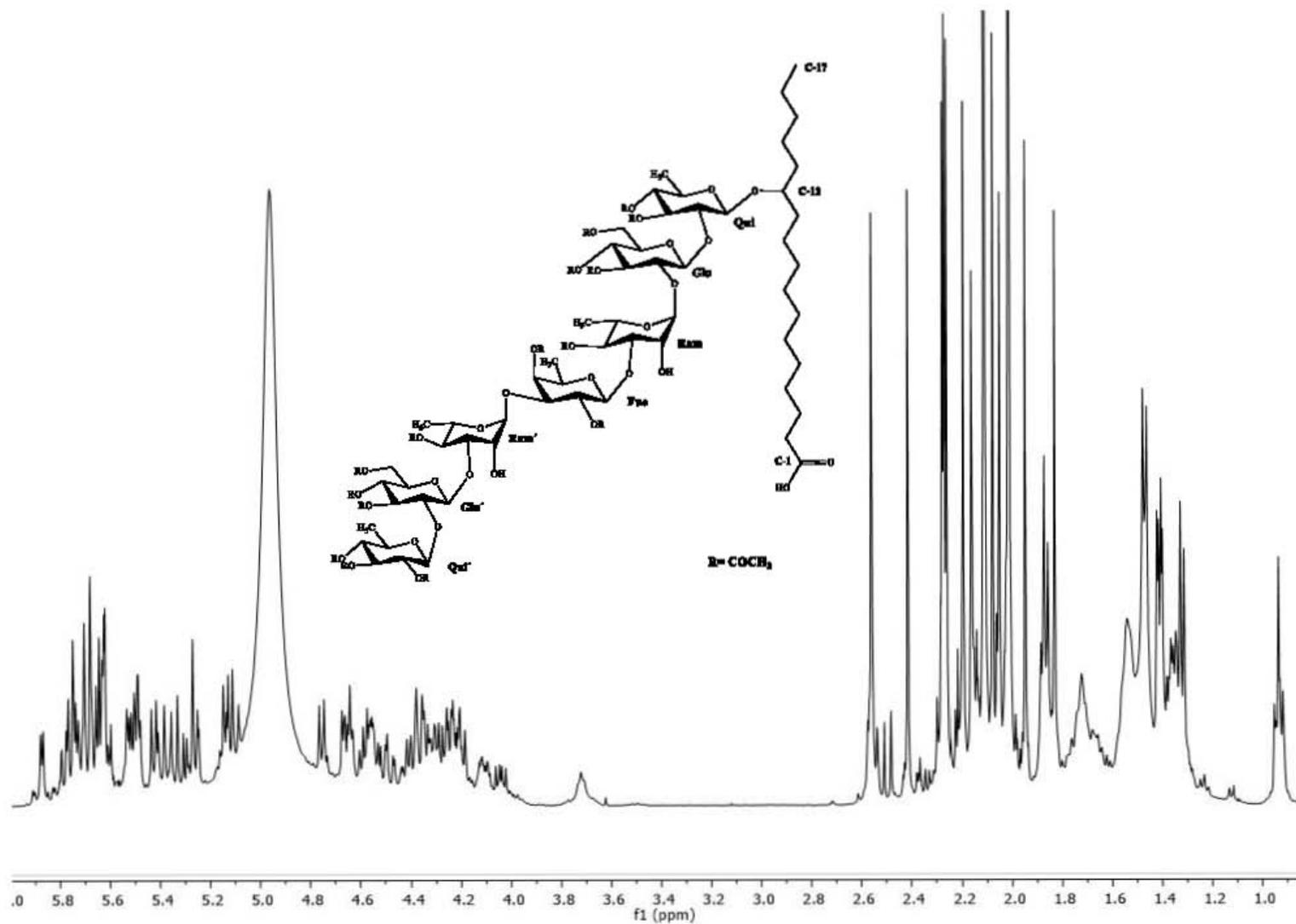
**ANEXO 11.** Porción del espectro bidimensional COSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico I. Correlaciones  $^3J_{\text{H-H}}$ : F1-2; Fuc H1-H2, R1-2; Ram H1-H2, R1-2; Ram' H1-H2, Q'1-2; Qui' H1-H2, G1-2; Glu H1-H2, G6a-G6b; Glu H6a-H6b, G'6a-6b; Glu' H6a-H6b, G4-5; Glu H4-H5, Q1-2; Qui H1-H2, G'1-2; Glu' H1-H2, Q'4-5; Qui' H4-H5.



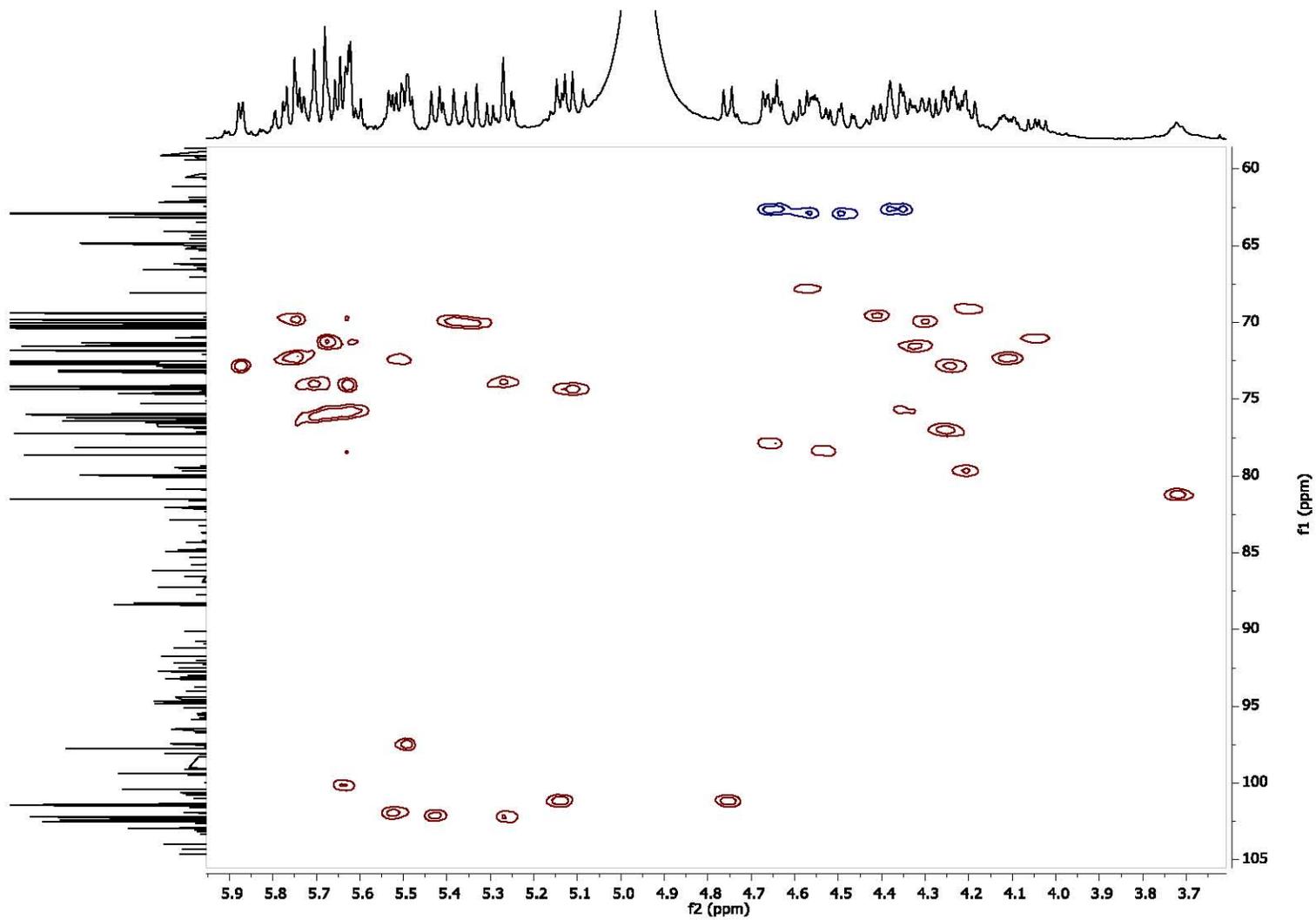
**ANEXO 12.** Porción del espectro bidimensional TOCSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico I. Abreviaturas: Glu = G = glucosa, Ram = R = ramnosa, Qui = Q = quinovosa, Fuc = F = fucosa.



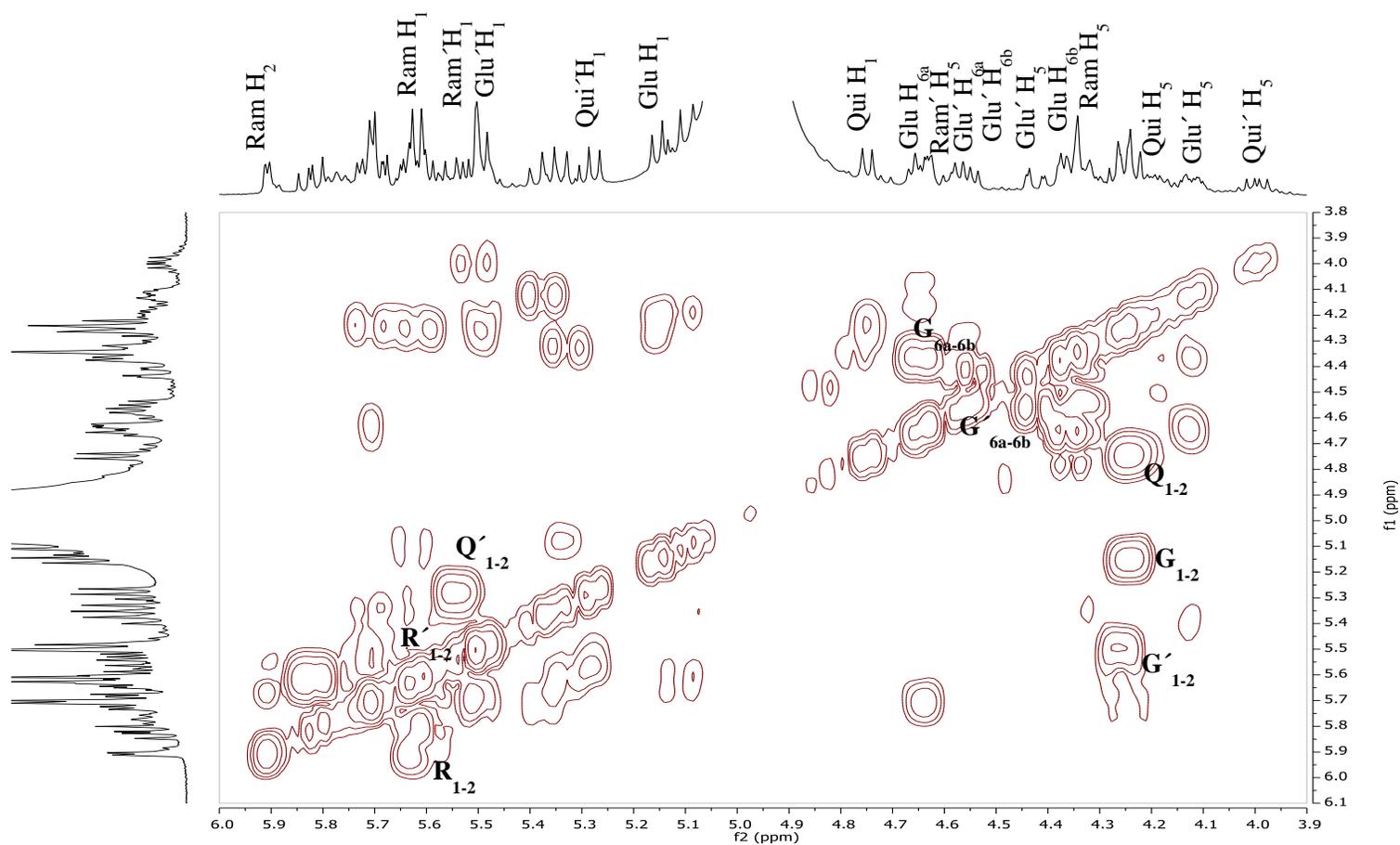
ANEXO 13. Espectro ROESY obtenido por RMN (400 MHz) del ácido hederifólico I peracetilado en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .



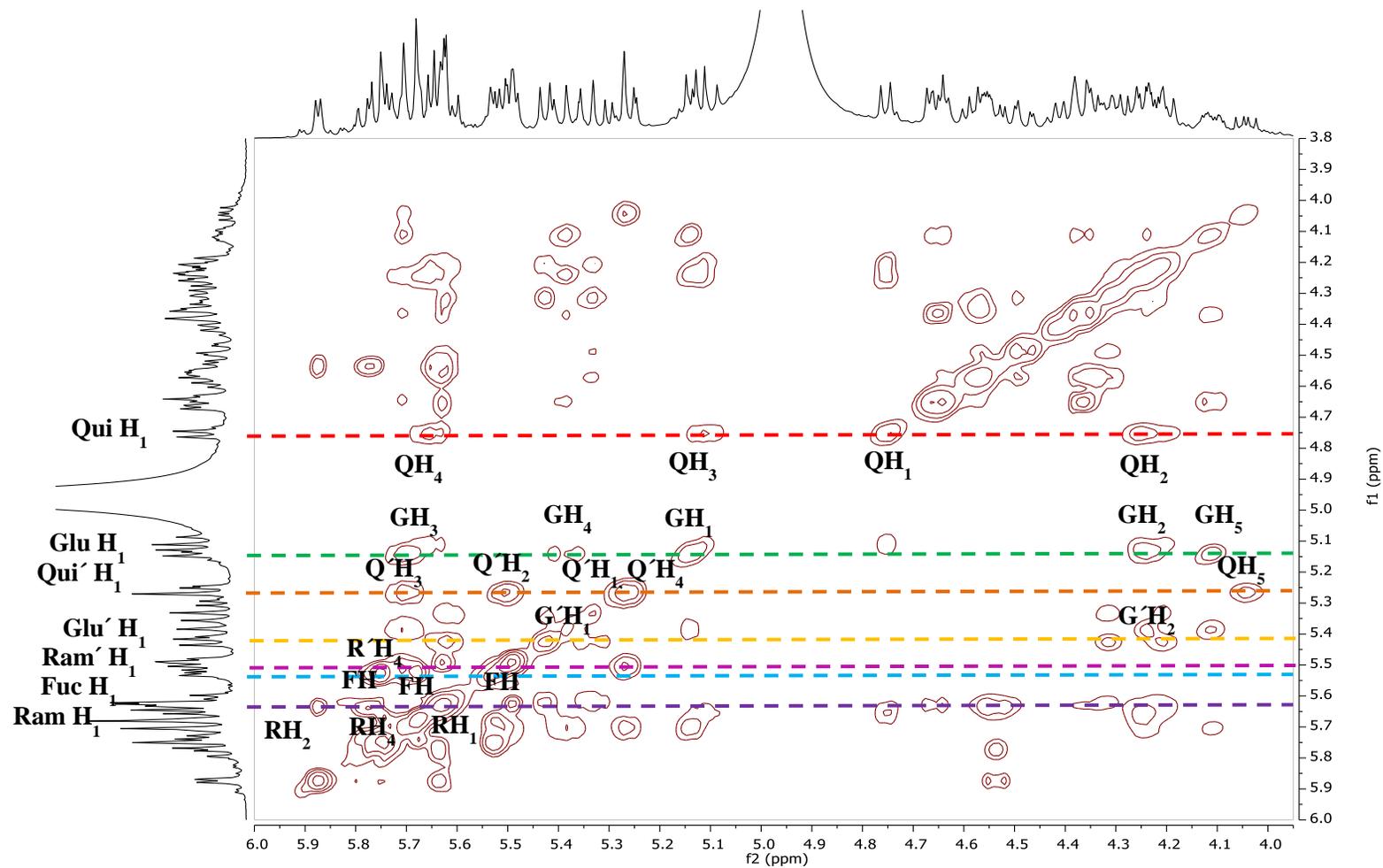
ANEXO 14. Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz) del ácido hederifólico III peracetilado (C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N).



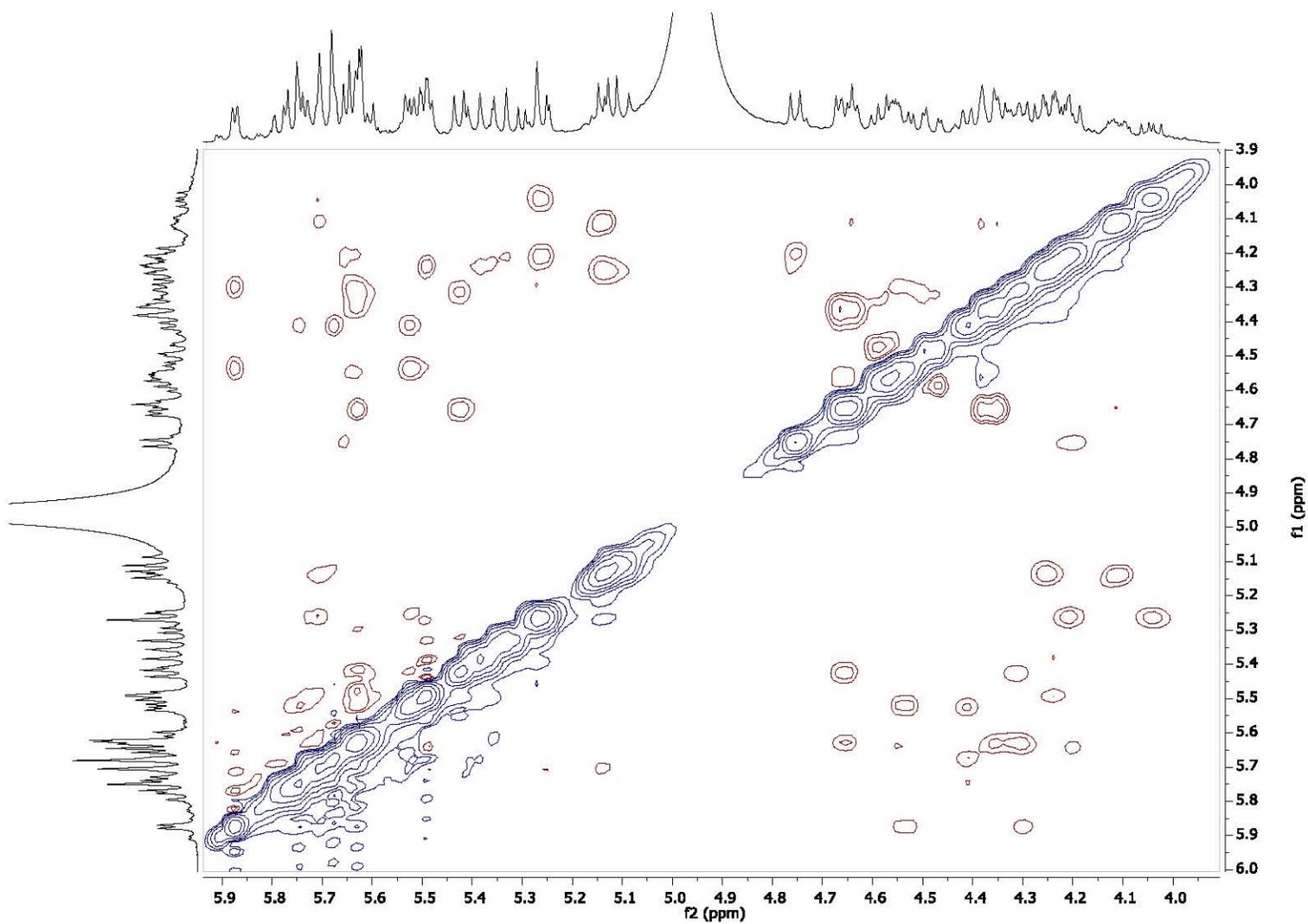
ANEXO 15. Espectro de HSQC obtenido por RMN (400 MHz) del ácido hederifólico III peracetilado en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.



**ANEXO 16.** Porción del espectro bidimensional COSY ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico III. Correlaciones  $^3J_{\text{H-H}}$ : F1-2; Fuc H1-H2, R1-2; Ram H1-H2, R'1-2; Ram' H1-H2, Q'1-2; Qui' H1-H2, G1-2; Glu H1-H2, G6a-6b; Glu H6a-H6b, G'6a-6b; Glu' H6a-H6b, G'4-5; Glu' H4-H5, Q1-2; Qui H1 - H2, G'1-2; Glu' H1-H2, Q'4-5; Qui' H4-H5.



ANEXO 17. Porción del espectro bidimensional TOCSY ( $^1\text{H} - ^1\text{H}$ ) del ácido hederifólico III. Abreviaturas: Glu=G =Glu'=G'= glucosa, Ram = R= Ram'= R' ramnosa, Qui = Q= Qui'= Q'= quinovosa, Fuc = F= Fuc'= F= fucosa.



**ANEXO 18.** Espectro ROESY obtenido por RMN (400 MHz) del ácido hederifólico III peracetilado en  $C_5D_5N$ .