



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE RESINAS
GLICOSÍDICAS DE LA ESPECIE *IPOMOEA WOLCOTTIANA*”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO.

PRESENTA:

MANUEL ALEJANDRO APARICIO CUEVAS

MEXICO D.F. 2012



JURADO ASIGNADO

Presidente: Adolfo García Osuna

Vocal: José Fausto Rivero Cruz

Secretario: Mabel Clara Fragoso Serrano

Primer suplente: Silvia Citlalli Gama González

Segundo suplente: Isabel Del Carmen Rivero Cruz

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Supervisor técnico:

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Sustentante:

Manuel Alejandro Aparicio Cuevas

Agradecimientos:

Agradezco el apoyo brindado a las siguientes personas e instituciones:

Sistema Nacional de Investigadores por la beca otorgada durante el periodo de Marzo de 2011 a Febrero de 2012 a través del nombramiento como ayudante de Investigador Nacional.

Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN 217310) y Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 101380) por el financiamiento parcial de esta investigación.

M. en C. Rosa Isela Del Villar Morales y Dra. Nuria Esturau Escofet por el registro de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear. M. en C. Georgina Duarte y M. en C. Margarita Guzmán por el registro de los espectros de masas de alta resolución. Todos ellos miembros de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación, Facultad de Química, UNAM.

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

Dr. Jhon Fredy Castañeda Gómez, que sin tener que hacerlo se tomó el tiempo de ayudarme en la realización de este trabajo.

Dr. Rogelio Pereda Miranda por haberme otorgado sin pedirlo la beca que tanto aproveché.

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

Dedicatorias:

A mis padres:

Por haber sido mis maestros, cada quien en su forma muy particular, me han hecho el hombre que soy ahora, y si en éste momento me gradúo ha sido porque ellos nunca se han dado por vencidos. Son mi ejemplo a seguir.

A mis hermanos:

Por haber estado ahí siempre. Gracias.

A mis amigos:

Porque hemos vivido muchísimas cosas juntos, todos conocemos del otro las miserias y así hemos aprendido a querernos.

A Ceci:

Todo lo que tengo que agradecerte te lo he dicho en su momento, pero si algo hay que quiero que quede impreso, es que en éste momento eres mi compañera inseparable, mi amiga a toda prueba y sin duda alguna mi amor. GRACIAS

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Significado
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
CHCl ₃	Cloroformo
CLAR	Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución
COSY	Correlación espectroscópica homonuclear (¹ H- ¹ H) (Correlation Spectroscopy)
FAB	Bombardeo Rápido de Átomos (Fast Atom Bombardment)
g	Gramo
HMBC	Correlación Heteronuclear a Enlaces Múltiples (¹³ C- ¹ H) (Heteronuclear Multiple Bond Correlation)
HSQC	Correlación Heteronuclear a un Solo Enlace (¹³ C- ¹ H) (Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy)
Hz	Hertz
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
m	Metro
<i>m/z</i>	Relación masa carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
ppm	Partes por millón
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
TMS	Tetrametilsilano
<i>t_R</i>	Tiempo de Retención
TOCSY	Correlación Espectroscópica Total (¹ H- ¹ H) (Total Correlated Spectroscopy)
δ	Desplazamiento químico

Agradecimientos:	II
Dedicatorias:	III
Lista de abreviaturas	IV
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
2.1 La familia Convolvulaceae.	3
2.2. El género <i>Ipomoea</i>	4
2.2.1. Usos tradicionales.	4
2.2.2 Química y actividad biológica del género <i>Ipomoea</i>	6
2.2.3 Resinas glicosídicas.....	7
2.2.4. Resinas glicosídicas del género <i>Ipomoea</i>	11
2.3 Antecedentes etnobotánicos de <i>Ipomoea wolcottiana</i>	12
2.4 Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae.....	14
3. Justificación	15
4. Objetivos	16
4.1. Objetivo general.	16
4.2. Objetivos particulares.	16
5. Parte experimental	17
5.1. Determinación de los espectros de RMN y EM.....	17
5.2 Métodos cromatográficos	17
5.3 Material vegetal.	18
5.4 Obtención de las resinas glicosídicas.	18
5.4.1 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.....	18
5.4.2 Fraccionamiento secundario de las subfracción V y VI.....	20
5.4.3 Identificación de la subfracción de trabajo mediante CLAR.	21
5.4.4 Escalamiento a nivel preparativo.	24
5.4.5. Fraccionamiento por CLAR de la fracción Iw29.....	25
5.4.6. Purificación de los componentes mayoritarios de la subfracción Iw29.1 mediante CLAR.....	26

6. Resultados y Discusión.....	30
6.1 Purificación del componente mayoritario lw29.1.4 mediante CLAR.....	30
6.1.2. Elección de fracciones de trabajo mediante espectrometría de masas.	31
6.2. Elucidación estructural del componente de la subfracción lw29.1.4.	35
6.2.1 Identificación de fragmentos por espectrometría de masas	35
6.2.2. Asignación de señales de RMN ¹ H y ¹³ C.	36
6.2.3. Caracterización de la secuencia de glicosidación y las posiciones de esterificación del componente lw 29.1.4.....	40
6.2.4. Comparación con la literatura.....	42
6.3. Componentes lw29.1.2 e lw29.6.....	43
7. Conclusiones.....	44
8. Referencias	45

Lista de figuras.

Figura 1. Fragmento del mural de Teotihuacan (500 a.C.), representando el Tlaltocan (Paraiso de la Lluvia del Dios Tlaloc), mostrando a la Diosa Madre, con sus sacerdotes asistentes. Las ramas entrelazadas están inspiradas en el crecimiento retorcido de la enredadera conocida en náhuatl como coaxihuitl (<i>Ipomoea spp</i>), la planta serpiente, una estilizada representación del alucinógeno ololiuhqui (<i>Ipomoea violácea</i>).	5
Figura 2. Diversos miembros del género <i>Ipomoea</i> benéficas o perjudiciales.	6
Figura 3. Estructura de la tricolorina A.	12
Figura 4. Árbol de <i>Ipomoea wolcottiana</i>	13
Figura 5. Distribución de <i>Ipomoea wolcottiana</i> en Veracruz.....	13
Figura 6. Flores del árbol de <i>Ipomoea wolcottiana</i>	14
Figura 7. Placa cromatográfica en capa fina de las fracciones ricas en oligosacáridos	19
Figura 8. Placa cromatográfica de referencia de <i>I. murucoides</i> vs fracciones de <i>I. wolcottiana</i>	20
Figura 9. Cromatograma de fracciones con resinas glicosídicas.....	21
Figura 10. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw28.....	22
Figura 11. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción de trabajo lw29.	22
Figura 12. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw30.	23
Figura 13. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw31.....	23
Figura 14. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw32.....	24
Figura 15. Cromatograma de la muestra lw29 a nivel preparativo.	25
Figura 16. Cromatograma de fracción lw29.1.....	27
Figura 17. Purificación de la subfracción lw29.1.4.	28
Figura 18. Purificación de la subfracción lw29.1.2.	29
Figura 19. Purificación del componente mayoritario lw 29.6.....	29
Figura 20 Fragmentación característica de una resina glicosídica.....	31
Figura 21 Espectro de masas muestra lw29.1.	32
Figura 22 Espectro de masas muestra lw 29.2.....	32
Figura 23 Espectro de masas muestra lw29.3.	33
Figura 24 Espectro de masas muestra lw29.4.	33
Figura 25 Espectro de masas muestra lw29.5.	34
Figura 26 Espectro de masas muestra lw29.6	34
Figura 27 Espectros de masas componente lw29.1.4.....	36
Figura 28. Espectro de RMN ¹ H para el componente lw29.1.4.	37
Figura 29. Espectro de RMN ¹³ C para el componente lw29.1.4.	37
Figura 30. Ampliación del espectro HSQC, para el compuesto lw29.1.4.....	38

Figura 31. Ampliación del espectro COSY del componente lw29.1.4.....	39
Figura 32. Ampliación del espectro TOCSY del componente lw29.1.4.....	39
Figura 33. Ampliación del espectro HMBC para el componente lw29.1.4.....	41
Figura 34. Molécula correspondiente al componente lw29.1.4 (Intrapilosina VII).....	43

Lista de Cuadros

Cuadro 1. Especies de <i>Ipomoea</i> con actividad biológica.	2
Cuadro 2 Algunos metabolitos activos del género <i>Ipomoea</i> (Meira, <i>et al.</i> , 2012).	8
Cuadro 3 Algunos metabolitos activos del género <i>Ipomoea</i> (continuación cuadro 2).....	9
Cuadro 4 Algunos metabolitos activos del género <i>Ipomoea</i> (continuación cuadro 2).....	10
Cuadro 5 Fórmulas para el cálculo de los parámetros preparativos.	24
Cuadro 6. Esquema de cortes de la fracción lw29.	26
Cuadro 7. Esquema de corte de la fracción de trabajo lw29.1.....	27
Cuadro 8. Datos espectroscópicos para RMN ¹ H y ¹³ C para el componente lw29.1.4 ¹	40

1. Introducción

Desde épocas ancestrales, las plantas han servido como medio para sanar diversos padecimientos, no sólo en territorio nacional sino en otras partes del mundo.

El territorio mexicano cuenta con una gran variedad de poblaciones indígenas, muchas de ellas aún conservan intacto su conocimiento herbolario, a pesar de que no siempre se tiene un registro escrito. México es un país con una riqueza vegetal inmensa. Se sabe que solamente un pequeño porcentaje de la totalidad de especies vegetales existentes en el país ha sido estudiada, por lo que el presente trabajo busca, esencialmente, aportar el correspondiente granito de arena a la montaña del conocimiento que poco a poco se ha ido formando.

Los géneros *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Operculina* y *Cuscuta* pertenecientes a la familia *Convolvulaceae* tienen una amplia distribución en el mundo y se distinguen por sus actividades medicinales, alucinógenas (rituales religiosos) y citotóxicas. En este contexto, sabemos que la actividad biológica de algunas especies del género *Ipomoea* se debe a la presencia de resinas glicosídicas (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

Una resina glicosídica, químicamente hablando, es una molécula de naturaleza anfipática de alto peso molecular, que debe su característica hidrofílica a los grupos hidroxilo presentes en la molécula y su hidrofobicidad a la cadena alifática que usualmente se encuentra en forma de éster intramolecular (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

Se ha encontrado que las resinas glicosídicas de algunas especies del género *Ipomoea* poseen actividades anticancerígenas (Alonso-Castro, 2011), así como también se observa una reversión en la resistencia a fármacos (Corona-Castañeda, *et al.*, 2012; Figueroa-González, *et al.*, 2012), fitotoxicidad, actividades espasmolítica y espasmogénica (Pereda-Miranda & Bah, 2003). El cuadro 1 ilustra algunas especies del género *Ipomoea* y sus actividades.

	<i>I. stans</i>	<i>I. wolcottiana</i>	<i>I. pausiflora</i>	<i>I. orizabensis</i>	<i>I. pes-caprae</i>	<i>I. tricolor</i>	<i>I. intrapilosa</i>	<i>I. murucoides</i>	<i>I. batatas</i>	<i>I. purga</i>	<i>I. alba</i>	<i>I. stimulans</i>	<i>I. squamosa</i>	<i>I. purpurea</i>	<i>I. acquatica</i>	<i>I. campanulata</i>	<i>I. cairica</i>	<i>I. digitata</i>	<i>I. indica</i>	<i>I. nil</i>	<i>I. asarifolia</i>	<i>I. carnea</i>	<i>I. leptophylla</i>	<i>I. muricata</i>	<i>I. stolinifera</i>
Afrodisíaco									•									•							
Alucinógeno					•	•*					•			•											
Analgésico.					•																				•
Antcancerígeno	*	*		•	*	•			•				•							•					
Antidiabético									•							•			•						
Antídoto								8							8	9									
Antifúngico															•										
Anti-hipertensivo					•			7							•							•			
Anti-inflamatorio					•			•	•	•		•	•				•	•			•				•
Antipirético				•											•										
Citotóxicas.	•	•	•	•	•	•			•			•													
Coagulante														•	•										
Colagógo																		•							
Diurético														•	•										•
Fitotóxica	•					•																			
Fitotóxica																									
Galactogogo									•									•							
Infecciones en la piel					•										•									•	
Modulador de resistencia a fármacos.				•	•	•	•	•		•															
Otros usos	1			4	5									6					1			10	2	3	
Purgante	•			•					•	•		•	•	•					•						

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

1. Sanar huesos rotos. 2. Su humo se usa contra los nervios, y la raíz contra el malestar estomacal y como tónico. 3. Preparaciones en glicerol de la droga cruda se usan contra la faringitis, y las preparaciones óticas contra la otitis externa. 4. Antihelmíntico, epilepsia, hidrocefalia, meningitis. 5. Reumatismo. 6. Sífilis. 7. Sólo una variante que se usa en Japón. 8. Antídoto contra veneno de escorpión. 9. Antídoto contra veneno de serpiente. 10. SIDA. 11. Crisis epilépticas, sedante, antiespasmódico (Meira, *et al.*, 2011; Grover, *et al.*, 2002; Chérigo *et al.*, 2009)

2. Antecedentes.

2.1 La familia Convolvulaceae.

Es una familia que consta de alrededor de 55 géneros y 1650 especies, de las cuáles la mayoría son plantas perenes o anuales, a veces con tallos volubles, algunos arbustos y también algunos árboles. Los géneros incluyen *Convolvulus* (250spp), *Ipomoea* (500 spp), *Pharbitis-Ipomoea*, *Argyreia* (90 spp) y *Cuscuta* (170 spp) (Trease & Evans, 2008).

El nombre de esta familia deriva del latín “*convolvere*” que significa entrelazado, y se refiere al crecimiento de muchos miembros de esta familia, en forma de enredaderas. Una de las más notables características anatómicas de esta familia es la existencia de células, que secretan resinas glicosídicas, en los tejidos foliar y radicular, mismos componentes que constituyen un importante marcador quimiotaxonómico de la familia, así como también son los causantes de la actividad purgante que tienen sus miembros (Meira & *et al*, 2012).

Los remedios purgantes conocidos por los Aztecas, denominados “*tlanquiloni*”, consistían en los extractos de diversos tubérculos, conocidos de forma colectiva como “*cacamotli*”, o “*camote*”, que significa raíz comestible (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

De la totalidad de los géneros reportados para esta familia, 15 se encuentran en México, mismos que representan un total de las llamadas “glorias de la mañana” por su traducción del idioma inglés.

La familia *Convolvulaceae* se distribuye en zonas tropicales y subtropicales, aunque algunos grupos se han extendido hasta zonas templadas, como los géneros *Convolvulus*, *Calystegia* e *Ipomoea*. Se reconocen 4 zonas de diversidad principales para la familia: México, Sudamérica, África tropical y el sudeste de Asia. Dado que la mayoría de las glorias de la mañana son enredaderas heliófitas, prosperan mejor en espacios abiertos, bosques tropicales caducos, donde la flora vecina de baja estatura provee un soporte adecuado para el crecimiento así como también permite la entrada de luz casi a ras de suelo. La sombra de los bosques perenes generalmente impide el crecimiento de la mayoría de las *Convolvulaceas*, exceptuando algunas grandes lianas (Ej. *Ipomoea phillomega*, *Ipomoea reticulata* e *Ipomoea santillanii*) así como algunas especies de

maleza que aprovechan los hábitats ribereños y perturbados de este tipo de bosque (*Ipomoea alba*, *Ipomoea batatas* y *Odonellia hirtiflora*) (Mc Donald, 1991).

2.2. El género *Ipomoea*.

Este género pertenece a la familia *Convolvulaceae*, y de la totalidad de sus miembros, poco menos de un tercio del total pertenecen al género *Ipomoea* (Meira & Pereira, 2011), algunas de las especies de este género son conocidas como “manto de la virgen”, “glorias de la mañana” o “campanitas” y dentro de sí hay especies con efectos benefactores o perjudiciales para el hombre (Díaz, 2009). Las especies de este género se encuentran localizadas principalmente en zonas tropicales y subtropicales, aunque, como se dijo antes, algunas especies se han extendido a zonas templadas (Meira & Pereira, 2012).

2.2.1. Usos tradicionales.

Las especies de este género han estado relacionadas con nuestro país desde épocas inmemoriales; se usaban -y usan- como medio para curar diversos padecimientos relacionados con el frío, lluvia y otros malestares (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

Se tiene registro de la existencia y utilización de plantas del género *Ipomoea* en la iconografía, al menos desde el periodo clásico, así como en periodos subsecuentes, por ejemplo, en el mural de Tepantitla (Figura 1) en el Tlaltocan (jardín morada de Tláloc o Paraiso de Lluvia del Dios Tláloc) está representada una planta arbórea, después identificada como un miembro de las especies denominadas colectivamente como *cazahuates*, o *casahuates*, la variante Mexicana actual para *cuauhzahuatl* (*zahuatl*= periquillo o casoso, y *cuauh*= árbol) es decir, las especies *I. murucoides*, *I. arborescens*, *I. intrapilosa*, etc.

Son dos las características que relacionan a este complejo con el mural: la primera, es que estos árboles, son, aún ahora, considerados como mágicos en el altiplano Mexicano, ya que su exuberante flor es capaz de florecer precisamente en la temporada seca y las leyendas dicen que anuncian la llegada de las lluvias; la segunda es el uso de estas plantas

como medio para curar malestares ocasionados por “el agua y el frío” en forma de cataplasmas.



Figura 1. Fragmento del mural de Teotihuacan (500 a.C.), representando el Tlaltocan (Paraiso de la Lluvia del Dios Tlaloc), mostrando a la Diosa Madre, con sus sacerdotes asistentes. Las ramas entrelazadas están inspiradas en el crecimiento retorcido de la enredadera conocida en náhuatl como coaxihuitl (*Ipomoea spp*), la planta serpiente, una estilizada representación del alucinógeno ololiuhqui (*Ipomoea violácea*).

En la actualidad, pueblos de la Sierra Gorda de Querétaro, utilizan las plantas como ofrendas dentro de sus festividades, como es el caso de las hojas de *Ipomoea tricolor* e *Ipomoea purpurea*, para teñir la tortilla en algunas fiestas indígenas; algunas otras especies, como *Ipomoea batatas* (camote), se utiliza como alimento por sus propiedades- propiedades incluso consideradas actualmente por la NASA para producir alimento espacial. Algunas otras, incluso, fueron prohibidas por la Santa Inquisición por su uso en rituales mágico-religioso, debido a la actividad de algunos metabolitos secundarios de las plantas, mismos que en la actualidad han llamado la atención de diversos sectores de la ciencia (Díaz, 2009), los metabolitos encontrados son derivados del ácido lisérgico y producen estados alterados de conciencia (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

Tampoco se puede ignorar la contribución nutricional del género *Ipomoea*, que ha llegado hasta nuestra mesa en forma del conocido “camote” o “papa dulce” y que ha sido degustado a lo largo de todo el territorio mexicano (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

En otros lugares, se usa como medio para proteger cultivos, ya que por los metabolitos secundarios antes mencionados, y la rapidez con la que las enredaderas crecen y se propagan, son capaces de actuar como buenos herbicidas, actividad que se ha estudiado y documentado (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

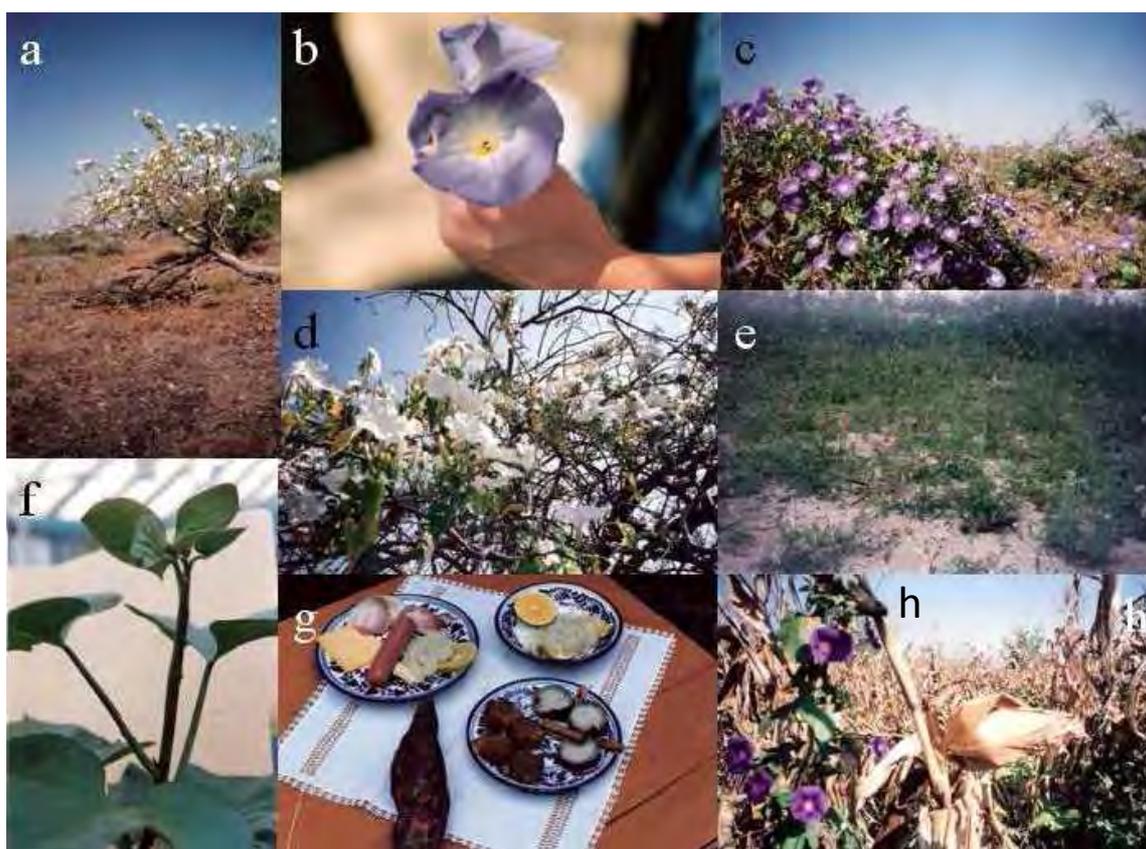


Figura 2. Diversos miembros del género *Ipomoea* benéficas o perjudiciales. **a y d** cazahuate; **b y c** *Ipomoea tricolor*; **e** *Ipomoea pes-caprae*, crecimiento en dunas costeras, protección de infraestructura portuaria; **f y g**, *Ipomoea batatas*, uso alimenticio; **h**, *Ipomoea purpurea* maleza de algunos cultivos como el maíz.

2.2.2 Química y actividad biológica del género *Ipomoea*

Este género se ha estudiado desde los años 50's, algunas especies de *Ipomoea* muestran actividad antimicrobiana, analgésica, espasmolítica, espasmogénica, hipotensora y anticancerígena. Los componentes bio-activos más comúnmente encontrados son alcaloides del ergot, alcaloides derivados del indol, alcaloides nortropánicos, compuestos

fenólicos, cumarinas, norisoprenoides, diterpenoides, isocumarinas, bencenoides, flavonoides, antocianinas, glicolípidos, lignanos y triterpenos.

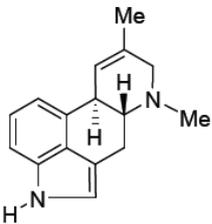
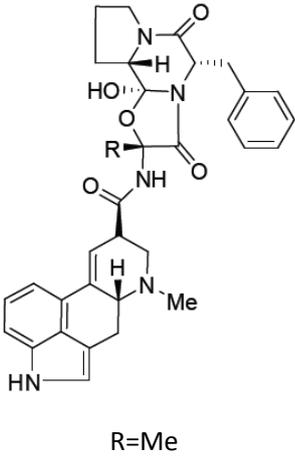
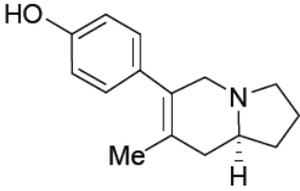
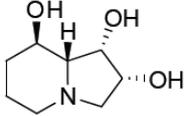
Algunos de los metabolitos antes mencionados se ilustran en los cuadros 2, 3 y 4.

2.2.3 Resinas glicosídicas.

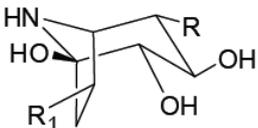
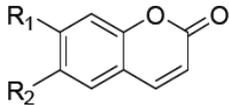
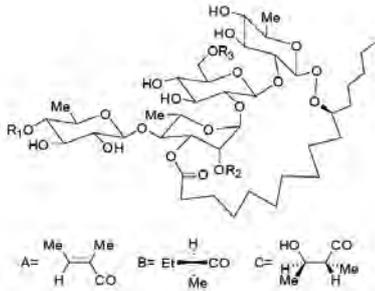
Distintas especies de *Ipomoea* presentan actividades antimicrobiana, analgésica, espasmolítica, espasmogénica etc., y todas estas actividades se asocian a la existencia de ciertos metabolitos secundarios dentro de las plantas. Estos metabolitos llamados resinas glicosídicas, son derivados monohidroxilados y dihidroxilados de ácidos grasos de 14 y 16 átomos de carbono y son parte de una gran familia de sustancias conocidas como glicolípidos o lipopolisacáridos. Estas estructuras tienen un carácter anfipático, ya que contienen porciones hidrofóbicas (agliconas) e hidrofílicas (unidades sacáridas). Las unidades sacáridas encontradas en estas moléculas son epímeros de pentosas (L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa y D-xilosa en formas de piranosa y D-glucosa como **única** hexosa (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010), que se presentan en unidades disacáridas altamente conservadas (L-ramnosa-(1→2)-D-fucosa, L-ramnosa-(1→4)-L-ramnosa, D-glucosa-(1→2)-D-fucosa).

Los sustituyentes que más frecuentemente se encuentran esterificando el núcleo oligosacárido son ácidos grasos de cadena corta como el acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2S) metil butírico (mba), 3-metilbutírico (3-mba), (-)-(2R-3R)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nílico, nla), y tíglico (tga), también se han encontrado ácidos arilalquílicos como el (*E*)-cinámico (ca), así como también ácidos grasos saturados con cadenas de distintas longitudes, como los ácidos *n*-hexanóico (hexa), *n*-octanóico (octa), *n*-decanóico (deca), *n*-dodecanóico (dodeca), *n*-hexadecanóico (hexadeca), *n*-octadecanóico (octadeca) y *n*-eicosanóico (eicosa).

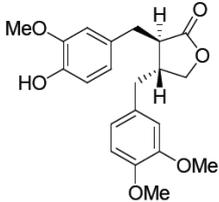
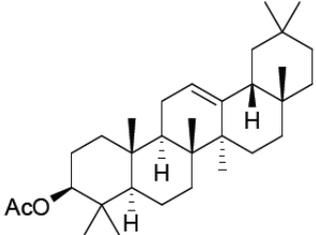
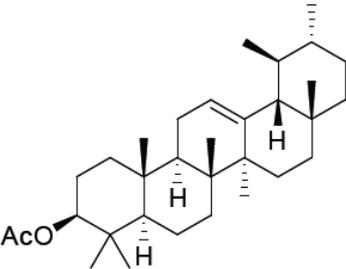
La mayoría de las resinas glicosídicas contienen ácido jalapínico ó (11S)-hidroxihexadecanóico como aglicona, que frecuentemente se encuentra abarcando dos o más unidades del esqueleto oligosacárido (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

Alcaloides del ergot	Especie	Estructura
Agroclavina	<i>I. fistulosa</i> <i>I. mueller</i> <i>I. tricolor</i>	
Ergotamina	<i>I. tricolor</i>	 R=Me
Alcaloides indolizidina	Especie	Estructura
Ipalbidina	<i>I. alba</i> <i>I. muricata</i> <i>I. hardwickii</i>	
Swainsonina	<i>I. carnea</i>	

Cuadro 2 Algunos metabolitos activos del género *Ipomoea* (Meira, et al., 2012).

Alcaloides nortropánicos	Especie	Estructura
A) Calistegina B1 B) Calistegina B2 C) Calistegina B3	<i>I. alba</i> <i>I. acquatica</i> <i>I. batatas</i> <i>I. carnea</i> <i>I. heferifolia</i> <i>I. eremnibrocha</i> <i>I. obscura</i> <i>I. pes-caprae</i> <i>I. setifera</i> <i>I. violacea</i>	 <p>A) R=H; R₁=OH B) R=OH; R₁=H C) R=R₁=OH</p>
Cumarinas	Especie	Estructura
A) Cumarina	<i>I. turpethum</i>	 <p>A) R₁=R₂=H B) R₁=OH; R₂=OMe C) R₁=R₂=OH D) R₁=OH; R₂=H</p>
B) Escopoletina	<i>I. batatas</i> <i>I. cairica</i> <i>I. digitata</i> <i>I. stans</i> <i>I. turpethum</i>	
C) Esculetina	<i>I. batatas</i>	
D) Umbeliferón	<i>I. batatas</i> <i>I. cairica</i> <i>I. digitata</i>	
Glicolípidos	Especie	Estructura
A) Escamonina 1 B) Escamonina 2	<i>I. orizabensis</i>	 <p>A) R₁=A; R₂=B; R₃=H B) R₁=H; R₂=B; R₃=H</p>

Cuadro 3 Algunos metabolitos activos del género *Ipomoea* (continuación cuadro 2) (Meira, et al., 2012).

Lignan	Especie	Estructura
Arctigenina	<i>I. cairica</i>	
Triterpenos	Especie	Estructura
Acetato de β -amirina	<i>I. batatas</i> <i>I. pes-caprae</i>	
Acetato de α amirina	<i>I. pes-caprae</i>	

Cuadro 4 Algunos metabolitos activos del género *Ipomoea* (continuación cuadro 2) (Meira, et al., 2012).

Una primera clasificación de las resinas fue de acuerdo a su solubilidad en éter: la parte soluble se designó como Jalapina y la insoluble como Convolvulina.

Se conocen a la fecha 239 compuestos de este tipo, y se han identificado en ellos 53 ácidos glicosídicos diferentes. Los nombran de acuerdo a la planta de donde provienen y actualmente la clasificación general de las resinas obedece a su tamaño; existen **disacáridos** (como el Resinósido cuscútico A de *Cuscuta chinensis* o la muricata B de *Ipomoea muricata*), **trisacáridos** (como los ácidos cuscúticos A₁-A₃ o el ácido tricolorínico

C, de *Ipomoea tricolor*), **tetrasacáridos** (como los ácidos cuscúticos A-D o el merremósido I de *Merremia mammosa* (Lour), **pentasacáridos** (como el ácido arborecínico, de *I. arborescens*) , **hexasacáridos** (ejem. ácido lonchofílico de *I. lonchopylla* J. Black, o el ácido operculinico, de *I. operculata*), y por último, los **oligómeros tipo éster** (como las batatinas I, II, III y IV de *I. batatas*, o la merremina de *Merremia hungaiensis*) (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

2.2.4. Resinas glicosídicas del género *Ipomoea*.

Una de las primeras *Ipomoeas* estudiadas fue *Ipomoea tricolor*, de la cual se aislaron, purificaron y evaluaron las resinas llamadas “tricolorinas”, siendo responsable de la actividad fitotóxica la llamada tricolorina A (Figura 3). En estudios posteriores, se encontró una relación entre la estructura de las resinas con la bio-actividad que presentan, al parecer actúan como desacopladores de la cadena de electrones a nivel de membrana, y la macrolactona presente parece ser un requerimiento estructural importante, ya que su hidrólisis se asocia directamente con la pérdida de bio-actividad (Pereda-Miranda & Bah, 2003), sin embargo, se ha encontrado que el tamaño de la macrolactona no tiene correlación directa con la actividad antibacterial y otros estudios revelan que, una mayor actividad bactericida, coincide con su carácter lipofílico, no así como sus similares lipofóbicos; en cuanto a su uso como modulador en la resistencia a fármacos, se sabe que su carácter anfipático facilita la entrada en las bacterias así como su interacción con las bombas de extrusión (Corona-Castañeda, *et al.*, 2012).

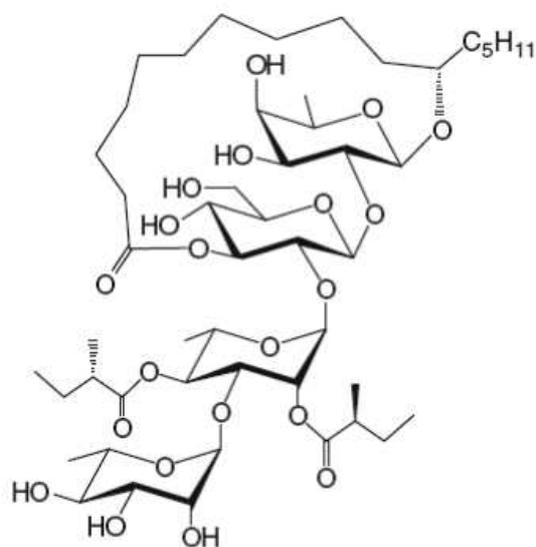


Figura 3. Estructura de la tricolorina A.

2.3 Antecedentes etnobotánicos de *Ipomoea wolcottiana*.

Ipomoea wolcottiana es un árbol pionero (Figura 4) que se distribuye a lo largo de la costa occidental de México, desde Sonora hasta Chiapas, con algunas poblaciones hacia el centro de México, Puebla y Morelos (Figura 5). Los individuos adultos miden entre 3 y 13 metros de altura y presentan diámetros de tronco relativamente grandes ($78.8 \text{ cm} \pm 28.84 \text{ cm}$, media \pm DE $n=70$) (Parra-Tabla, 2002) que pueden ramificar hasta la base en sitios muy soleados. Estos árboles, al ser heliófitos, son muy escasos si no es que inexistente en el interior de selvas tupidas, dada la sombra que existe. La producción de hojas ocurre de junio a noviembre (temporada de lluvias) y la floración (Figura 6) coincide normalmente con la temporada de hojas secas, cuando los árboles pierden su follaje (diciembre-enero) y termina hacia el mes de marzo (Mc Donald, 1991).



Figura 4. Árbol de *Ipomoea wolcottiana*

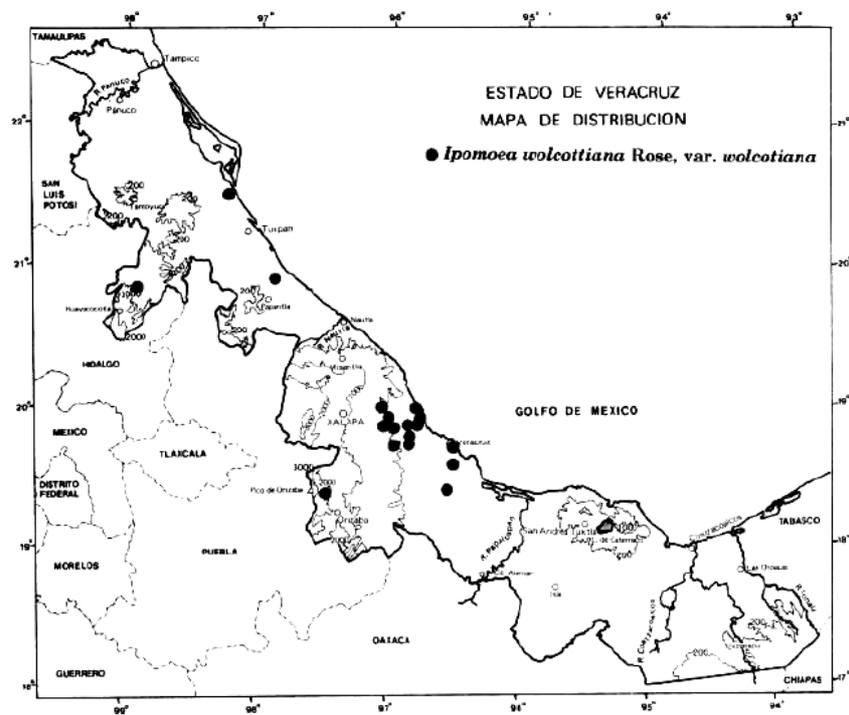


Figura 5. Distribución de *Ipomoea wolcottiana* en Veracruz



Figura 6. Flores del árbol de *Ipomoea wolcottiana*

2.4 Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae.

Desde tiempos prehispánicos se han usado miembros de esta familia –por ejemplo algunas especies de *Ipomoea*, las especies llamadas “cazahuates”- como medio para tratar varios padecimientos, ya que poseen diversas cualidades, por ejemplo, las hojas crudas se pueden frotar directamente en la piel para tratar comezón, ardor o algunas infecciones. En la actualidad, hay gente que aun usa decocciones de estas plantas para tratar enfermedades que se consideran “calientes”, como la fiebre, reumatismo e inflamación (Chérigo & Pereda-Miranda, 2008).

Existen investigaciones que señalan a los alcaloides de tipo indólico así como a las resinas glicosídicas como principales constituyentes bio-activos de la familia (MacLeod & Ward, 1997). De acuerdo a estudios realizados, hay una gran cantidad de metabolitos bio-activos, procedentes de diversas especies de *Ipomoea*, algunas resinas glicosídicas han sido evaluadas en diversos bio-ensayos (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

3. Justificación.

Debido a la carencia de información acerca de la composición metabólica de *Ipomoea wolcottiana* y al antecedente que se tiene acerca de la naturaleza propia de las resinas glicosídicas de este género así como de su potencial actividad biológica, se pretende con este trabajo, aportar conocimiento acerca de la composición química de la planta, con el aislamiento, la purificación y la identificación de moléculas intactas sin derivatización o degradación química.

4. Objetivos

4.1. Objetivo general.

- Se pretende realizar el aislamiento y la purificación de al menos un componente mayoritario de una subfracción proveniente del fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de *Ipomoea wolcottiana*.

4.2. Objetivos particulares.

- Realizar el fraccionamiento secundario de una fracción obtenida del extracto clorofórmico de las flores de *Ipomoea wolcottiana*, con el objetivo de simplificar su composición mediante cromatografía en columna abierta.
- Realizar controles cromatográficos en capa fina para separar las subfracciones que demuestren la presencia de resinas glicosídicas.
- Establecer las condiciones analíticas necesarias para obtener cromatogramas adecuados de las subfracciones y realizar las inyecciones necesarias en el cromatógrafo para determinar la subfracción de trabajo.
- Realizar el escalamiento a nivel preparativo de la fracción elegida.
- Realizar la separación de fracciones menos complejas en la fracción elegida.
- Purificar cada una de las fracciones por la técnica de sobrecarga, rasurado de picos y reciclaje para garantizar la purificación de constituyentes individuales.
- Realizar la elucidación estructural de la molécula aislada y purificada por medio de estudios espectrométricos y espectroscópicos.

5. Parte experimental.

5.1. Determinación de los espectros de RMN y EM

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

Los espectros de masas de baja resolución fueron registrados en un aparato JEOL SX10 mediante el método de ionización por bombardeo con átomos acelerados (EM-FAB) en el modo negativo sobre una matriz de trietanolamina.

5.2 Métodos cromatográficos

Los procedimientos seguidos durante este trabajo consistieron en la aplicación de cromatografía en columna abierta, utilizando una columna de 80 cm de largo y 9.5 cm de diámetro y empacada con gel de sílice 60 Merck F_{54} 0.063-0.200 mm.

Se utilizó una mezcla de disolventes de polaridad creciente comenzando por hexano, pasando por diclorometano y terminando con metanol, con el objetivo de separar distintos componentes de la fracción con base en su polaridad.

La reagrupación en fracciones de composición similar se realizó mediante cromatografía en capa delgada, utilizando placas (4 x 10 cm) recubiertas de gel de sílice F_{254} Merck. Las placas cromatográficas resultantes se revelaron mediante el rociado homogéneo de una mezcla de H_2SO_4 -sulfato sérico, como agente cromógeno y se calentaron sobre una parrilla cuya temperatura aproximada fue de 80°C.

Se utilizó un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Miliford, MA, USA) constituido por una bomba (Waters 600) adaptada con una válvula de reciclaje de muestra y un detector de índice de refracción (Waters 410), integrados a un equipo de cómputo (Pentium 4, Windows XP, marca Dell). El control del equipo, la adquisición, proceso y manejo de información cromatográfica se realizó mediante el software

Empower 2. Para la purificación de los compuestos, se tiene una válvula de reciclaje de muestra adaptado al sistema cromatográfico.

Las condiciones analíticas en el cromatógrafo de líquidos de alta resolución se determinaron en una columna Symmetry de fase reversa C₁₈ (4.6 mm de diámetro interno, 250 mm de longitud, 5µm de tamaño de partícula).

El escalamiento a nivel preparativo, así como la purificación, se desarrollaron en una columna de fase reversa Symmetry C₁₈ (19 mm de diámetro interno, 300 mm de longitud, 7µm de tamaño de partícula).

5.3 Material vegetal.

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

Nota: Con las cantidades expresadas en unidades de masa de cada fracción o muestra pura, debe entenderse que proceden de un proceso de separación y evaporación, para finalmente registrar su peso.

5.4 Obtención de las resinas glicosídicas.

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

5.4.1 Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.

El fraccionamiento primario del extracto clorofórmico se realizó mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice. La elución se inició con cloroformo incrementándose gradualmente la polaridad (5% MeOH en eluatos de 1 L), terminando con metanol. Se obtuvieron 54 fracciones primarias que fueron comparadas mediante CCF

para reunir las semejantes y obtener 9 subfracciones. La figura 7 muestra las fracciones que eran indicativas de la presencia de oligosacáridos.

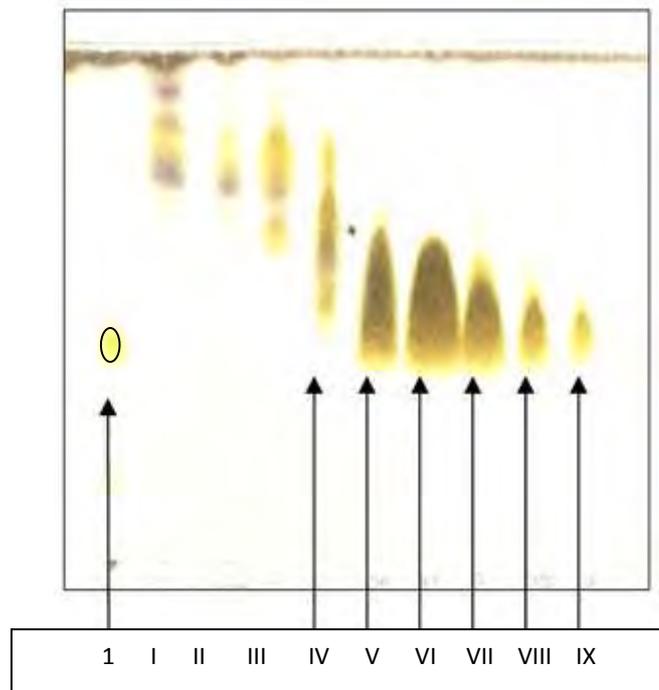


Figura 7. Placa cromatográfica en capa fina de las fracciones ricas en oligosacáridos. 1: Muestra de referencia (oligosacárido de *I. muruoides*), I a IX: Fracciones obtenidas del fraccionamiento primario del extracto clorofórmico de las hojas de *I. wolcottiana*. Se resaltan con flechas las muestras ricas en oligosacáridos.

5.4.2 Fraccionamiento secundario de las subfracción V y VI.

Consta de 2 fracciones (V y VI) procedentes del extracto clorofórmico del fraccionamiento primario de la planta, cuyo peso total fue de 28.35 g.

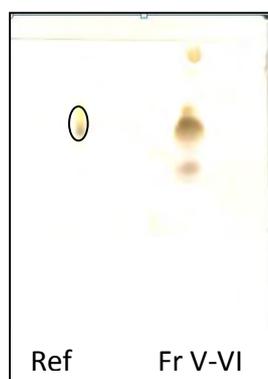


Figura 8. Placa cromatográfica de referencia de *I. muruoides* vs fracciones de *I. wolcottiana* (CHCl₃:MeOH 8:2).

El fraccionamiento secundario se realizó con una columna de 80 cm de largo y 9.5 cm de diámetro y empacada con gel de sílice 60 Merck F₅₄ 0.063-0.200 mm, se realizaron en elosatos de 1 L con incrementos graduales de polaridad de 5%, empezando con 100% cloroformo y terminando con 100% metanol, del cual se obtuvieron 117 subfracciones, de las cuales, mediante otro control cromatográfico en capa fina se determinó que sólo las fracciones de 28-32 contenían resinas glicosídicas.



Figura 9. Cromatograma de fracciones con resinas glicosídicas (CHCl_3 :MeOH 80:20).

5.4.3 Identificación de la subfracción de trabajo mediante CLAR.

Las fracciones elegidas se inyectaron a nivel analítico en el Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución (CLAR). La búsqueda de condiciones comenzó con ACN 100%, siguiendo con 75% de ACN y 25% de H_2O , posteriormente se probó con 75 % de ACN y 25% de MeOH, finalmente MeOH 100%, y se eligió éste último disolvente como fase móvil, utilizando una columna analítica C_{18} Symmetry. Todo lo anterior se realizó siguiendo un esquema isocrático manual.

Se inyectaron las fracciones 28 a 32, con un volumen de inyección de 10 μL y concentración de la muestra de 10 mg/50 μL en CLAR con un flujo de 0.4 mL/min en la columna analítica y se obtuvieron los siguientes cromatogramas (figuras 10 a la 14).

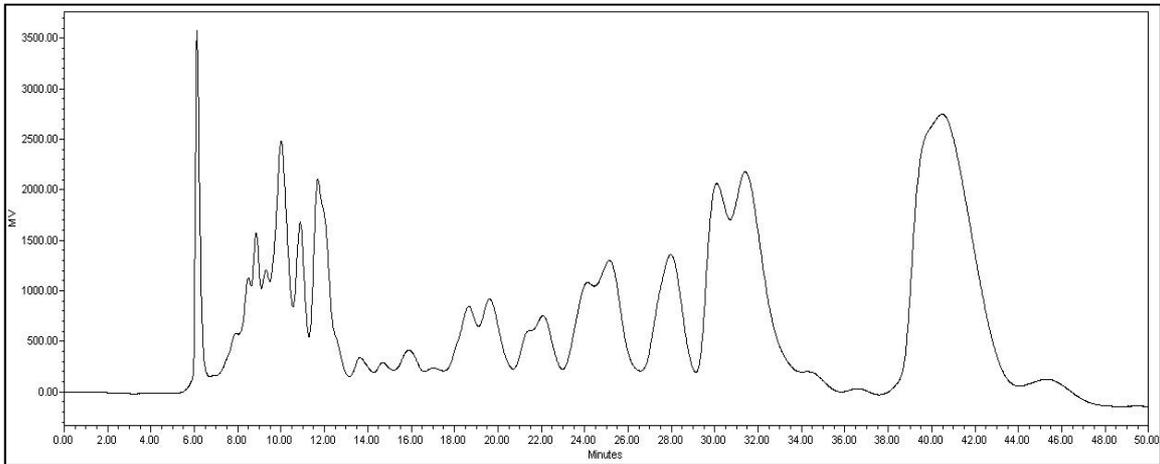


Figura 10. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw28.

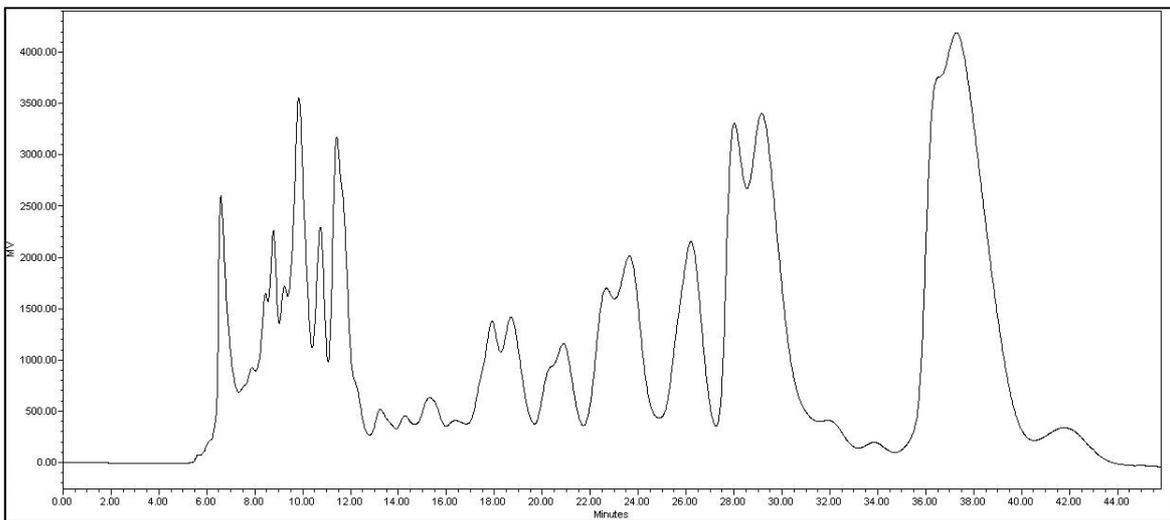


Figura 11. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción de trabajo lw29.

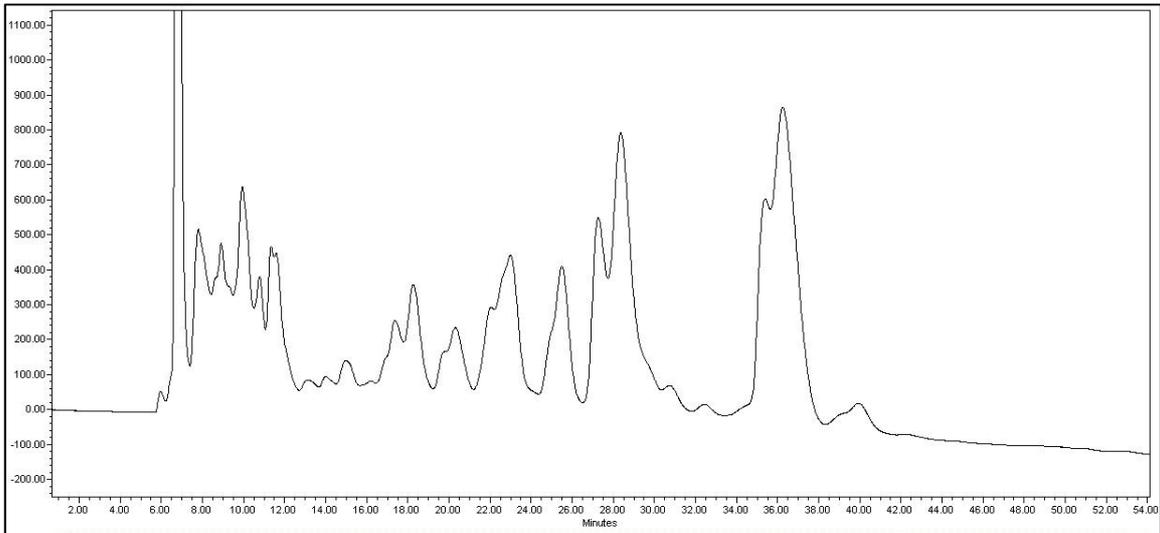


Figura 12. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción Iw30.

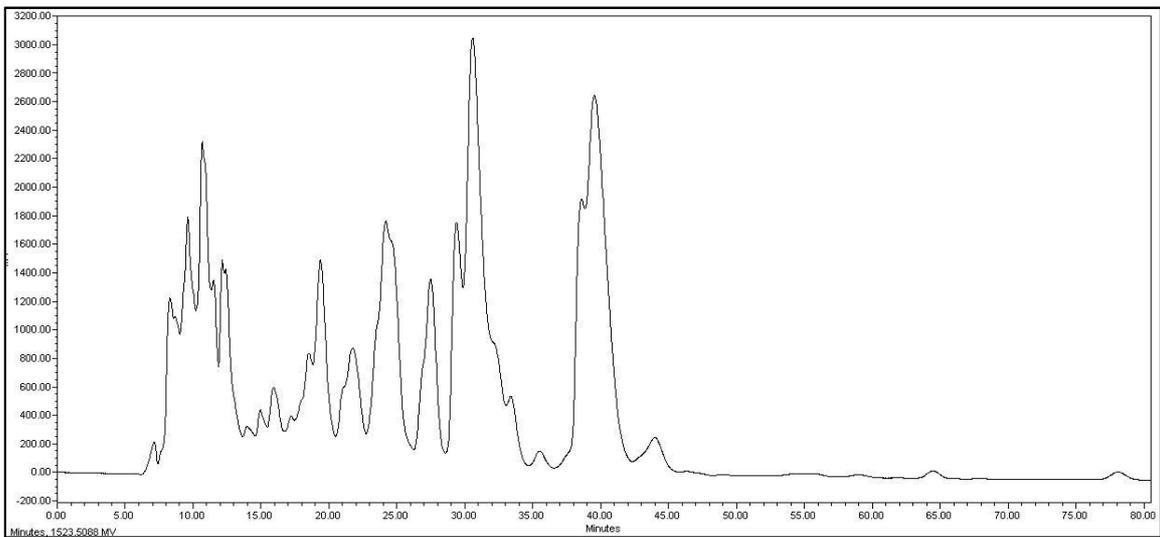


Figura 13. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción Iw31.

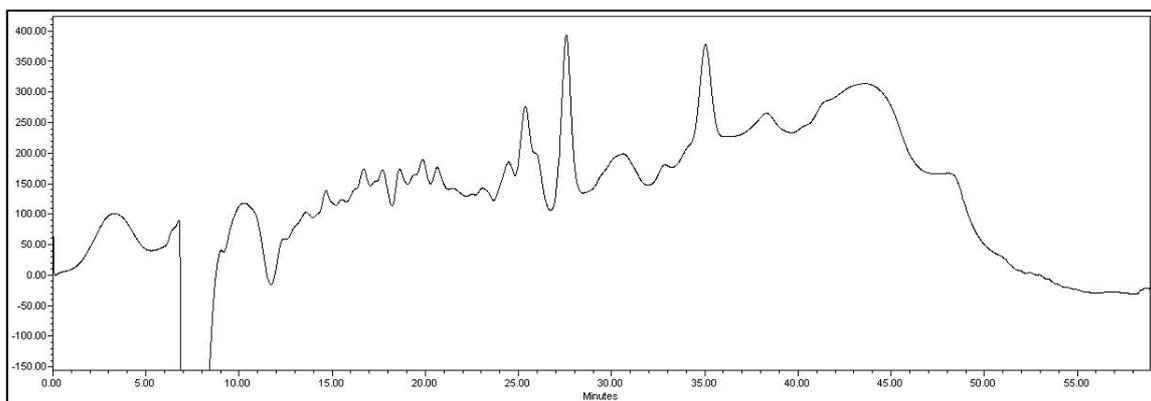


Figura 14. Cromatograma a nivel analítico de la subfracción lw32.

De acuerdo con el perfil cromatográfico observado en las diferentes muestras, se seleccionó la fracción lw29, proveniente del fraccionamiento secundario por columna abierta, como la fracción de trabajo, con un rendimiento de 12.9% (3.66 g).

5.4.4 Escalamiento a nivel preparativo.

Una vez seleccionada la subfracción de trabajo, se procedió a realizar los cálculos correspondientes para el escalamiento a nivel preparativo como se ilustra en el cuadro 5.

Masa a inyectar:	Flujo de la columna preparativa:
$M_p = M_a \times \frac{L_p}{L_a} \times \frac{d_p^2}{d_a^2}$	$F_p = F_a \frac{L_p d_p^2}{L_a d_a^2}$
Donde:	
Mp= Masa a inyectar columna preparativa.	La= Longitud de la columna analítica.
Ma=Masa inyectada previamente a nivel analítico.	Lp=Longitud de la columna preparativa.
Fp= Flujo a nivel preparativo.	dp= diámetro de la columna preparativa.
Fa= Flujo a nivel analítico.	da= diámetro columna analítica.

Cuadro 5 Fórmulas para el cálculo de los parámetros preparativos.

Las condiciones obtenidas mediante el uso de estas ecuaciones fueron un flujo de 8.16 mL/min inyectando cantidades de 90 mg (de lw29), con volumen de inyección de 500 µL, utilizando la columna Symmetry preparativa.

5.4.5. Fraccionamiento por CLAR de la fracción lw29.

El cromatograma a nivel analítico se reprodujo fielmente con las nuevas condiciones preparativas descritas en el párrafo anterior, empleando metanol como fase móvil y el cromatograma es presentado en la figura 15.

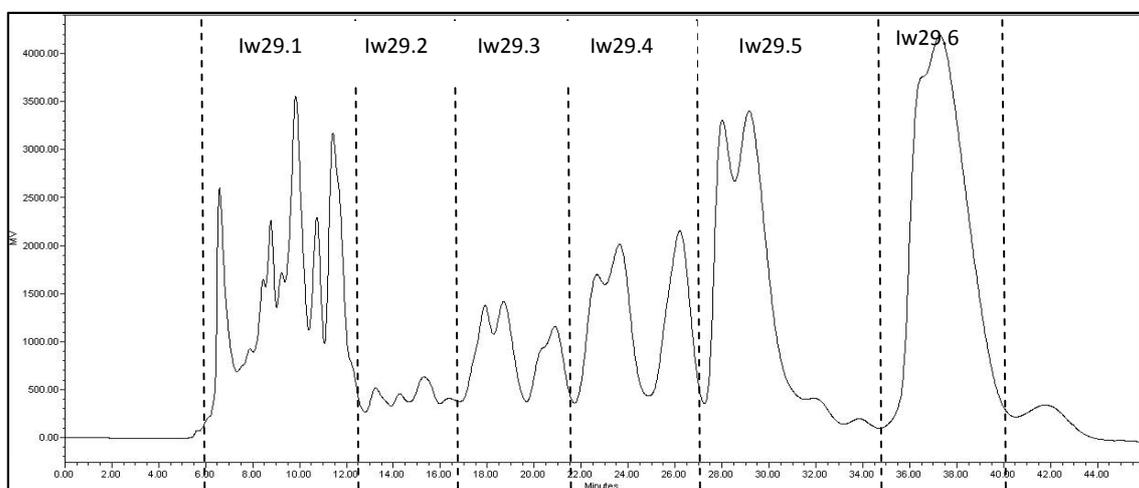


Figura 15. Cromatograma de la muestra lw29 a nivel preparativo.

Las acotaciones que muestra la figura 15 se refieren al esquema de corte seguido, debido a la complejidad de la fracción, siendo los intervalos de tiempo de retención aproximados los que se ilustran en el cuadro 6, para cada una de las subfracciones, estos cortes se realizaron de forma manual, intercalando los matraces en la línea colectora.

Debido al tiempo de retención conveniente y buen rendimiento obtenido, se centró en la purificación de los componentes, de la subfracción lw29.1. De la cual se obtuvo un total de 301 mg, que representa un 8.2% de los 3.66 g de lw29 obtenidos inicialmente.

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

Cuadro 6. Esquema de cortes de la fracción lw29.

5.4.6. Purificación de los componentes mayoritarios de la subfracción lw29.1 mediante CLAR.

Para realizar un segundo fraccionamiento por CLAR de la subfracción lw29.1 se empleó como sistema de elución metanol, flujo de 8.16 mL/min, volumen de inyección de 500 µL en concentraciones de 180 mg/mL; el esquema de corte que se siguió se ilustra en la figura 16 y se presenta en el cuadro 7. Es importante resaltar que el cambio en los tiempos de retención puede deberse a que el MeOH usado era recuperado y a que la presión del equipo al momento de utilizarlo era menor a la registrada en la sección 5.4.5.

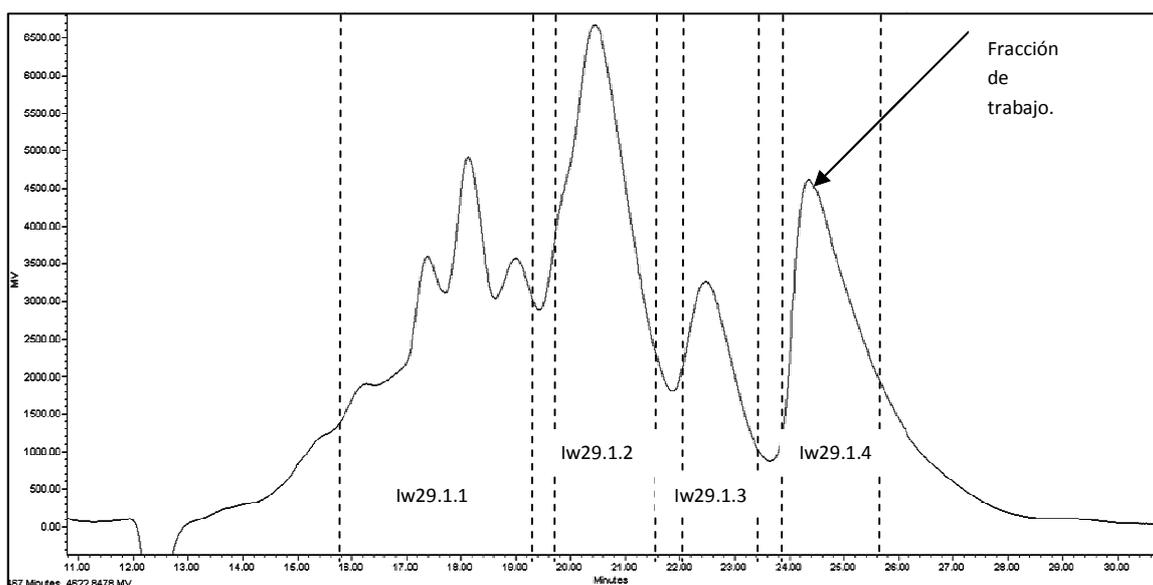


Figura 16. Cromatograma de fracción lw29.1.

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

Cuadro 7. Esquema de corte de la fracción de trabajo lw29.1.

Una vez realizado el segundo fraccionamiento, se realizó la purificación del pico identificado como lw29.1.4, sometiéndolo a 24 ciclos de reciclaje y por la técnica de rasurado de pico, como se muestra en la figura 17, para obtener 18 mg. Este proceso se logró con el empleo de la válvula de reciclaje de muestra, adaptada al sistema cromatográfico y consiste en el giro de la válvula cuando la muestra pasa por la columna a la posición de reciclar, para que la muestra regrese a la columna en lugar de ser colectada, dejándola en esta posición las veces necesarias que permitan ir purificando la muestra de interés y girando a la posición de “colectar” cuando se desea eliminar los picos que están contaminando la muestra.

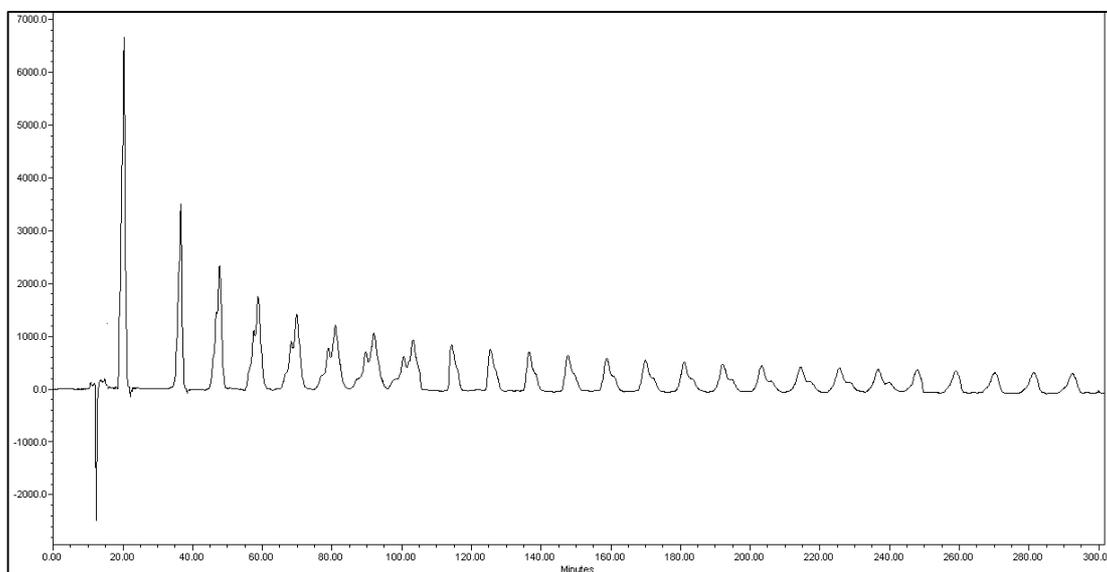


Figura 17. Purificación de la subfracción lw29.1.4 mediante la técnica de reciclaje, empleando el detector de índice de refracción, flujo de 8.16 mL/min, y metanol como fase móvil.

La subfracción lw29.1.2 se sometió a un doble esquema de reciclado, constando cada uno de 13 ciclos de reciclado como muestra la figura 18, de esta subfracción se obtuvo un total de 11 mg.

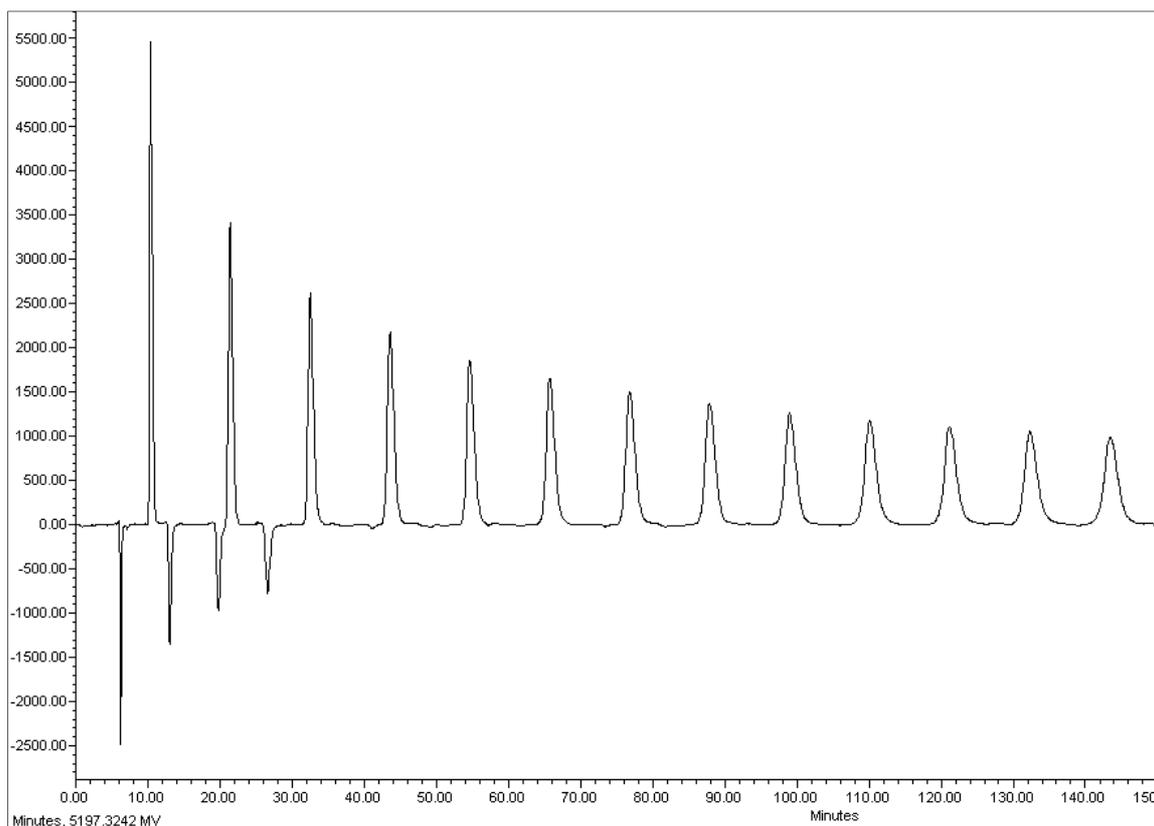


Figura 18. Purificación de la subfracción lw29.1.2

Para la purificación de la subfracción lw29.6 se centró en el componente con t_R 40.5 min y se sometió a 10 ciclos de reciclado para obtener finalmente 7 mg de compuesto puro.

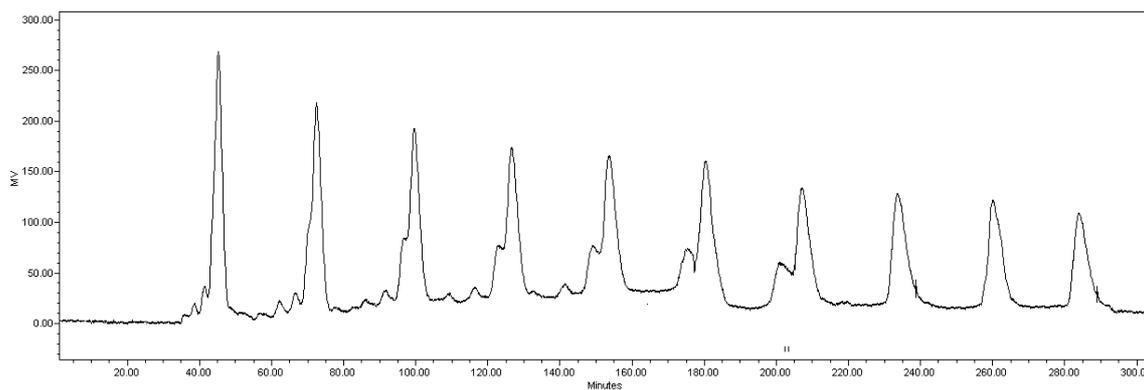


Figura 19. Purificación del componente mayoritario lw 29.6.

6. Resultados y Discusión.

6.1 Purificación del componente mayoritario lw29.1.4 mediante CLAR.

La separación por columna abierta no representa un medio adecuado para la separación de las resinas, debido a la similitud estructural entre los diferentes lipopolisacáridos que forman parte de la mezcla presente en estas subfracciones; se han llevado a cabo también experimentos en Sephadex, columnas de intercambio iónico, así como también filtración en gel, sin que estos tuvieran tampoco resultados satisfactorios (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

Es necesario entonces, un método que permita la aplicación de CLAR como medio de separación y purificación, obteniendo primero unas condiciones instrumentales adecuadas a nivel analítico, y con base en estas, unas condiciones preparativas para separar y purificar los componentes de interés, en la figuras 10 y 11 (sección 5.4.3, parte experimental) respectivamente muestran el perfil cromatográfico a nivel analítico y nivel preparativo, donde se puede apreciar la complejidad de la muestra.

Se empleó una columna Symmetry C₁₈ preparativa (ver página 18, sección 5.2) ya que fue la que ofreció la mejor resolución para la separación y purificación, utilizando un flujo de 8.16 mL/min.

Las subfracciones obtenidas del fraccionamiento secundario por columna abierta se inyectaron en el CLAR a nivel analítico, para elegir entre éstas el perfil que mejor permitiera la separación y purificación de 2 ó 3 componentes mayoritarios.

La fracción de trabajo elegida gracias a su tiempo de retención y mejor resolución fue la fracción nombrada como lw29, de la cual, se purificaron 3 picos mayoritarios (lw29.1.2, lw29.1.4 e lw29.6), logrando hasta el momento la elucidación estructural sólo del componente nombrado como lw29.1.4. Debido a que el tiempo de retención de este componente es adecuado para su purificación (24.5 min) y a que su corte fue más

sencillo, se eligió primero este componente para purificar (se dice que el tiempo de retención es adecuado porque nos evita ciclos de reciclaje demasiado largos, evitando así una posible descomposición de la muestra), posteriormente se purificaron los componentes nombrados como lw29.1.2 así como lw29.6 cuyos cromatogramas se mostraron con anterioridad (figuras 18 y 19 respectivamente).

6.1.2. Elección de fracciones de trabajo mediante espectrometría de masas.

En la figura 20 se presenta el patrón de fragmentación correspondiente al ácido operculínico A (un ácido glicosídico que constituye el núcleo oligosacárido de una resina glicosídica) (Ambrosio, 2007). Con el análisis por espectrometría de masas se verificó la existencia de estas fragmentaciones características en las resinas glicosídicas, como se logra observar en los espectros de masas presentados en las figuras 21 a 26.

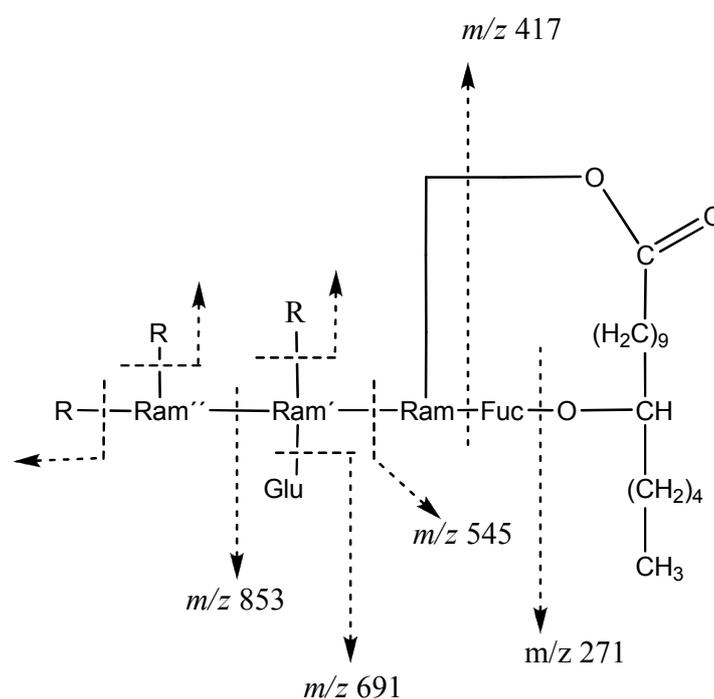


Figura 20 Fragmentación característica de una resina glicosídica. (R= otro azúcar)

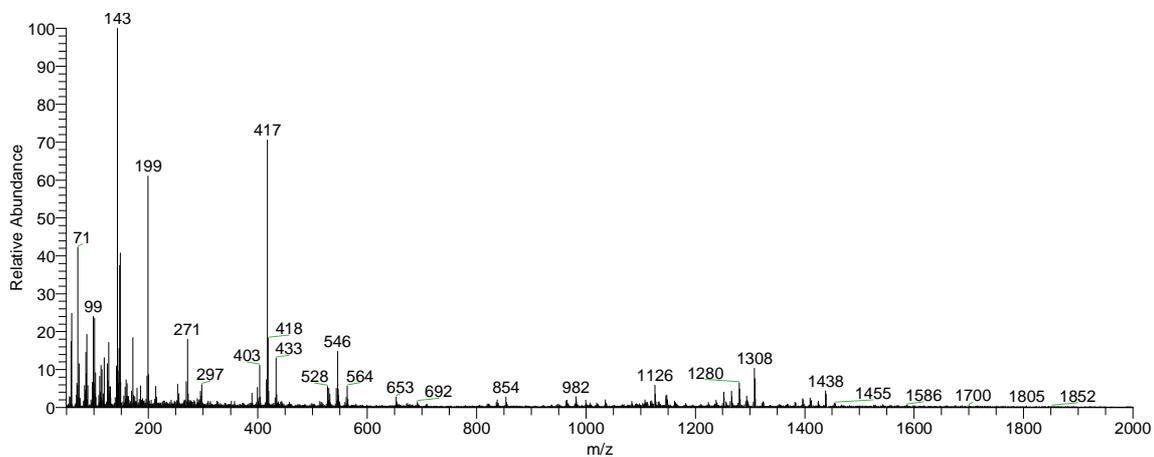


Figura 21 Espectro de masas muestra lw29.1.

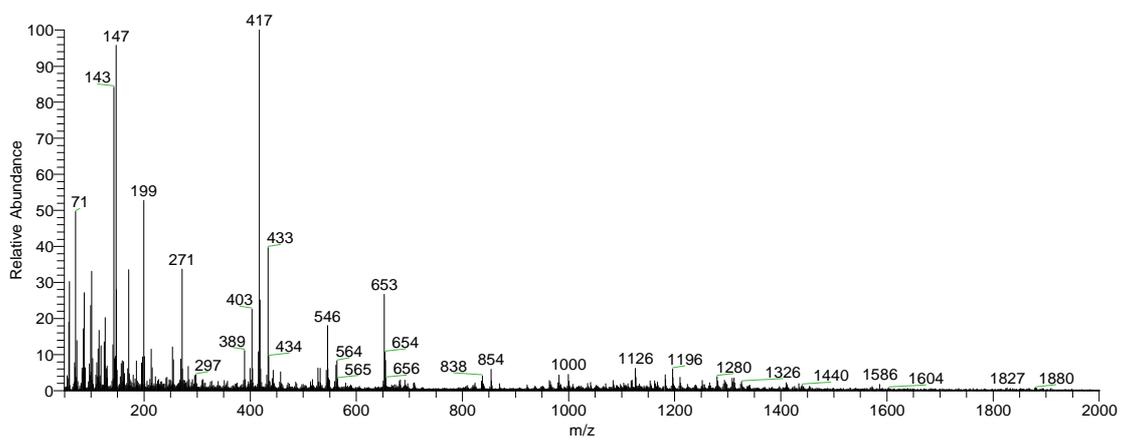


Figura 22 Espectro de masas muestra lw 29.2.

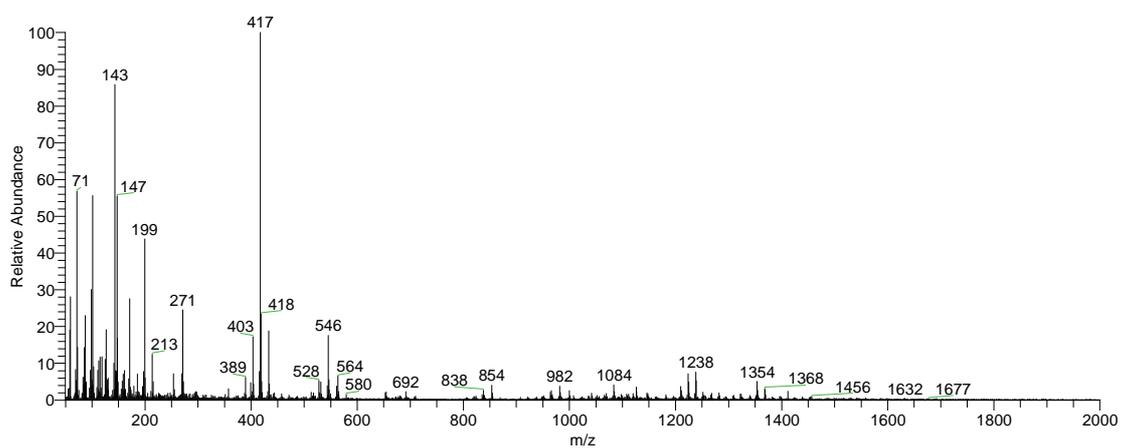


Figura 23 Espectro de masas muestra lw29.3.

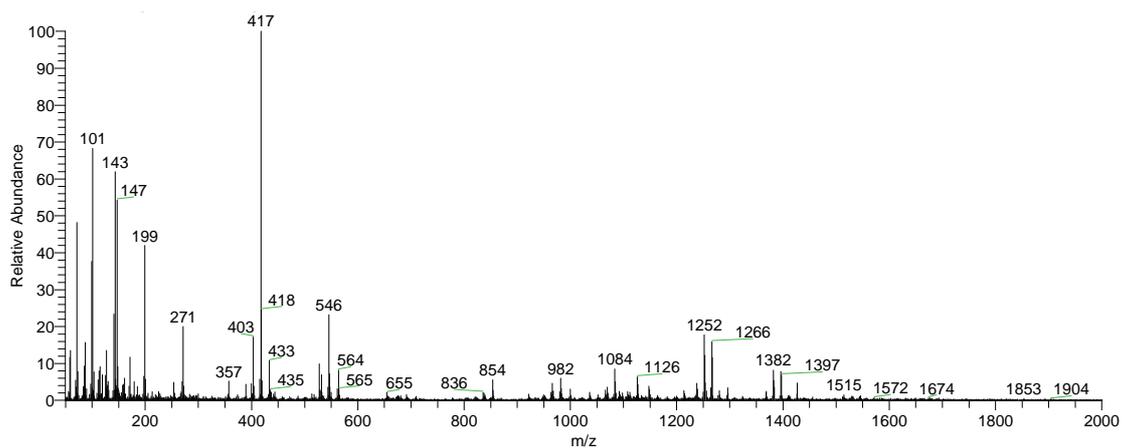


Figura 24 Espectro de masas muestra lw29.4.

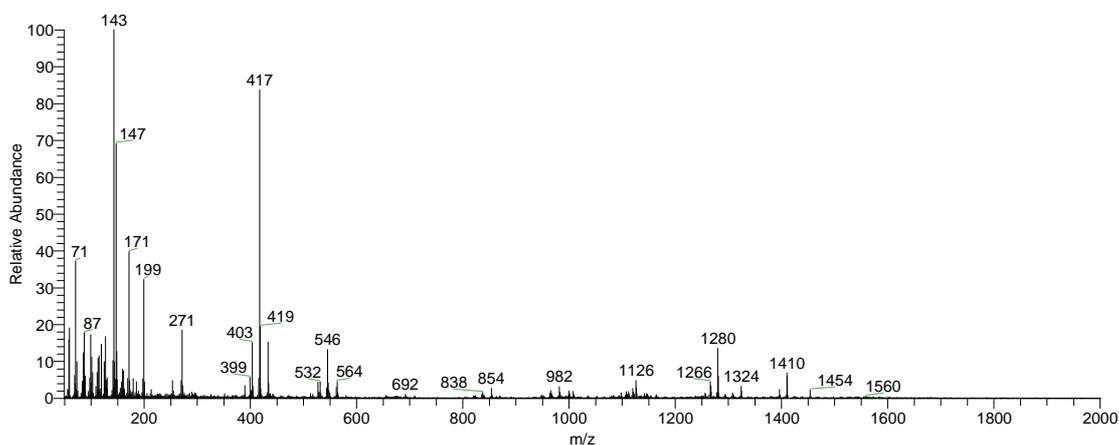


Figura 25 Espectro de masas muestra lw29.5.

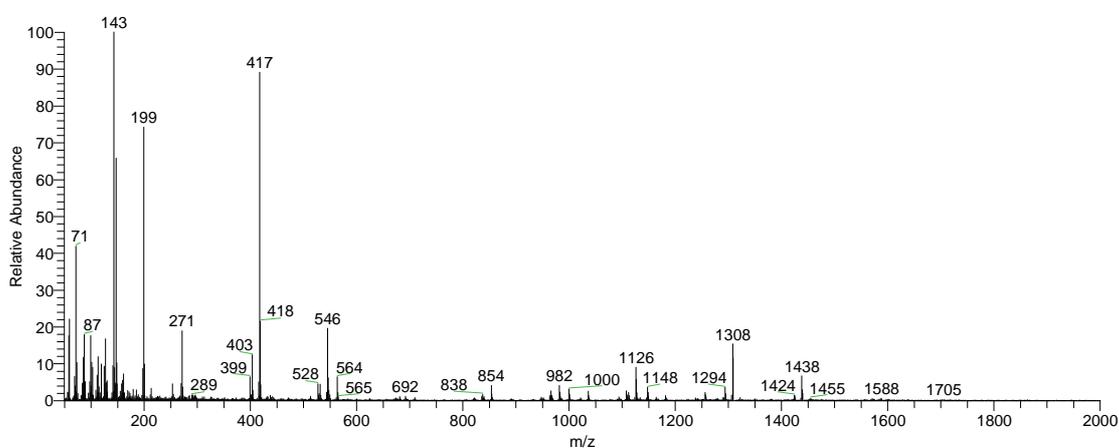


Figura 26 Espectro de masas muestra lw29.6

Es importante señalar, que los espectros anteriores (lw29.1-lw29.6, provenientes de un tercer fraccionamiento en CLAR) solamente comprueban la existencia de resinas glicosídicas, y su registro permitió corroborar la elección de la subfracción de trabajo, de acuerdo con las fragmentaciones características pertenecientes a resinas glicosídicas, dichas fragmentaciones corresponden a los picos con m/z 545 ó 546, 417, 271 y, que están

presentes en todas las fracciones (Corona-Castañeda, 2008) y como ya se mencionó en la figura 20.

Sabiendo que todas las fracciones contenían resinas, se eligieron las fracciones lw29.1 e lw29.6 por que se separó de éstas mayor cantidad.

6.2. Elucidación estructural del componente de la subfracción lw29.1.4.

6.2.1 Identificación de fragmentos por espectrometría de masas

Se utilizó la técnica de EM-FAB en su modalidad negativa, dada la naturaleza lábil de éstos compuestos (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010) y se determinó que el ión molecular corresponde a un valor m/z de 1437 $[M - H]^-$ (figura 27), además se reporta el fragmento con m/z de 1307 que corresponde a la pérdida del residuo trans-cinamoilo ($C_9H_6O^-$) con una diferencia de 130 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 1437; el fragmento de m/z 1181 corresponde a la pérdida del residuo octanoilo ($C_8H_{14}O$) con una diferencia de 126 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 1307; el fragmento de m/z 1035 corresponde a la pérdida de una unidad de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) con una diferencia de 146 unidades de masa con respecto al peso del ión m/z 1181; el fragmento de m/z 999 corresponde a la pérdida del residuo dodecanoilo ($C_{12}H_{22}O$) con una diferencia de 182 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 1181; el fragmento de m/z 853 corresponde a la pérdida de una unidad de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) con una diferencia de 146 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 999; el fragmento de m/z 545 corresponde a las pérdidas consecutivas de una unidad de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) y una unidad de hexosa ($C_6H_{12}O_6$) con una diferencia de 308 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 853; el fragmento de m/z 417 corresponde a la pérdida de una unidad de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4 + H_2O$) con una diferencia de 128 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 545 y el fragmento de m/z 271 corresponde a la pérdida de una unidad de metilpentosa ($C_6H_{10}O_4$) con una diferencia de 146 unidades de masa con respecto al peso del ión de m/z 417 (figuras 20 y 27).

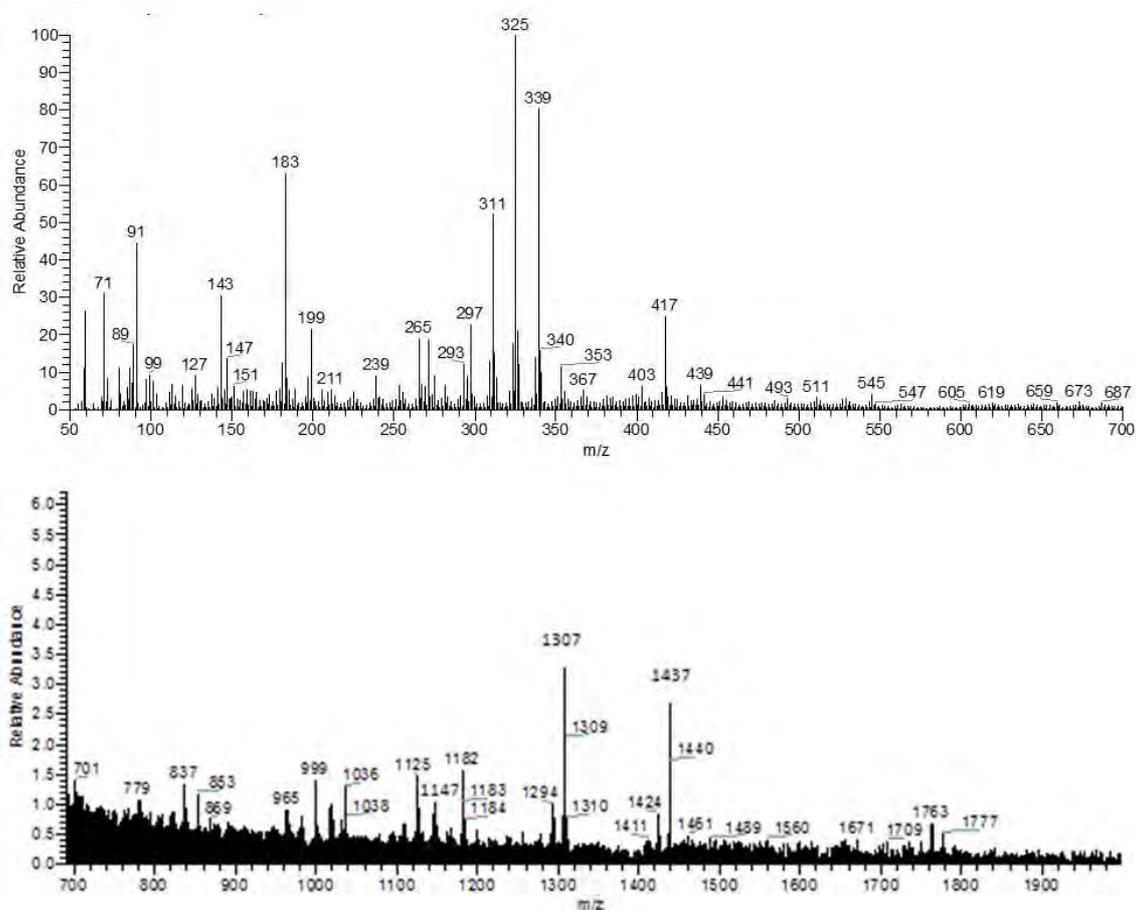


Figura 27 Espectros de masas componente lw29.1.4.

6.2.2. Asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C .

La asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C mostradas en el cuadro 8, se llevaron a cabo mediante el análisis de los espectros unidimensionales de ^1H (figura 28), así como de ^{13}C (figura 29); además, del uso de los espectros bidimensionales homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HMBC y HSQC).

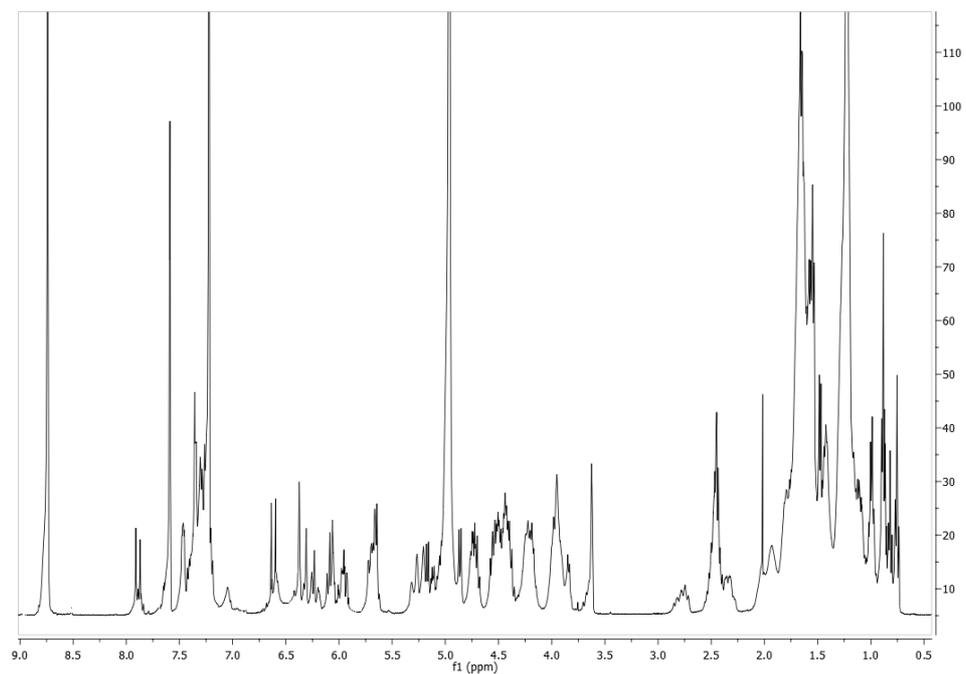


Figura 28. Espectro de RMN ^1H para el componente lw29.1.4.

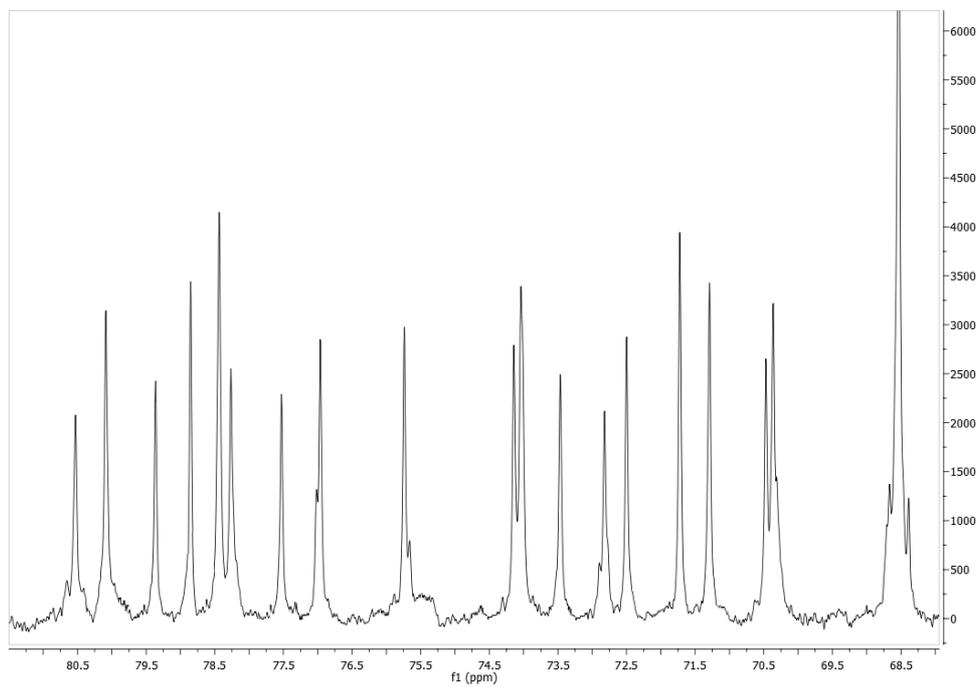


Figura 29. Espectro de RMN ^{13}C para el componente lw29.1.4.

Primero, se localizaron en el espectro de RMN ^{13}C las señales correspondientes a los carbonos anoméricos del oligosacárido, cuya localización es característica y se encuentra en la región de 98-105 ppm (figura 30, trazo vertical); se supo así que el componente de estudio era un pentasacárido ya que se muestran 5 señales en la zona antes mencionadas. Mediante el empleo de la técnica bidimensional heteronuclear HSQC se designó cada carbono anomérico con su respectivo protón (figura 30); la zona donde se localizaron las interacciones de los protones anoméricos fue entre 4.5 a 6.5 ppm (Pereda-Miranda, *et al.*, 2010).

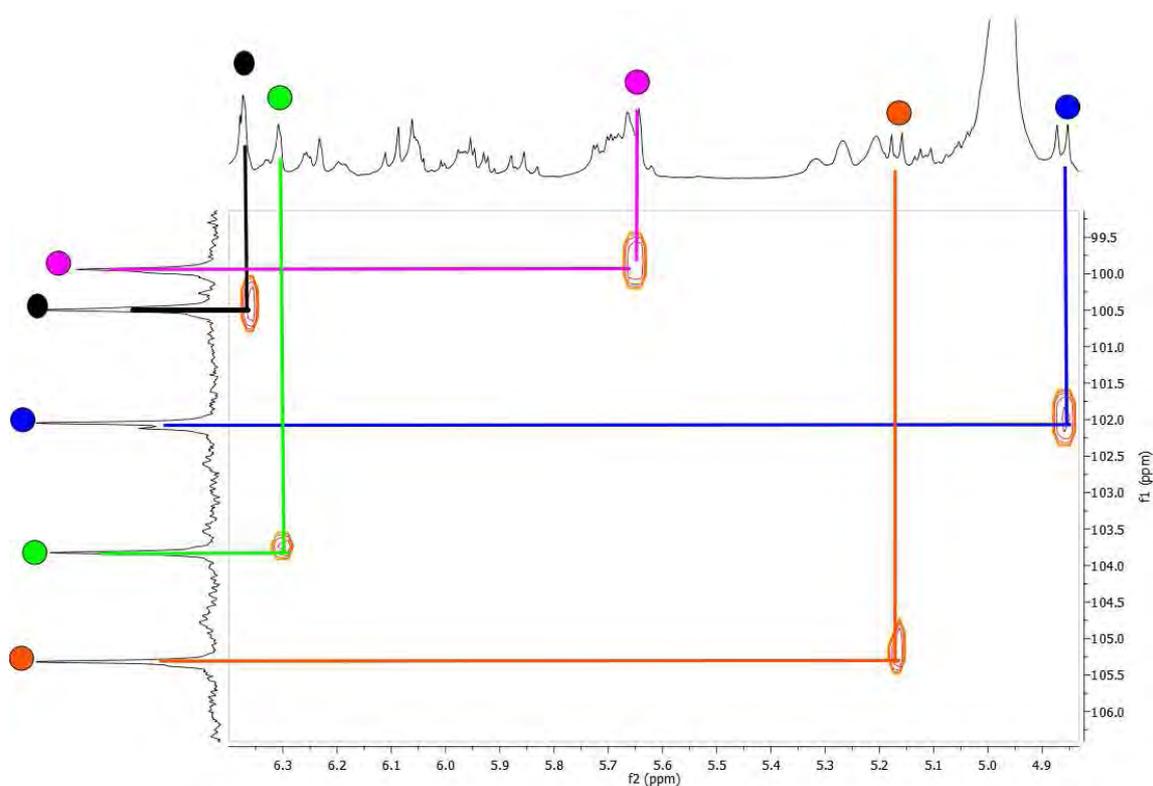


Figura 30. Ampliación del espectro HSQC, para el compuesto lw29.1.4. (azul=fucosa; fucsia=ram; negro=ram'; verde=ram''; anaranjado=glucosa).

Después se asignaron los protones de las unidades sacáridas del núcleo, empleando las técnicas bidimensionales homonucleares COSY (figura 31) y TOCSY (figura 32) y así encontrar las interacciones vecinales de cada unidad sacárida. Con el espectro COSY se observó la interacción entre protones vecinales a 3 enlaces de distancia, mediante el trazo de cuadros de conectividad, mientras que espectro TOCSY permitió

establecer tanto las interacciones vecinales como aquellas que se encuentran interactuando a larga distancia H-H a lo largo de toda la unidad monosacárida, mediante el trazo de líneas horizontales donde se encontraron interacciones, esto permitió corroborar las asignaciones previamente realizadas.

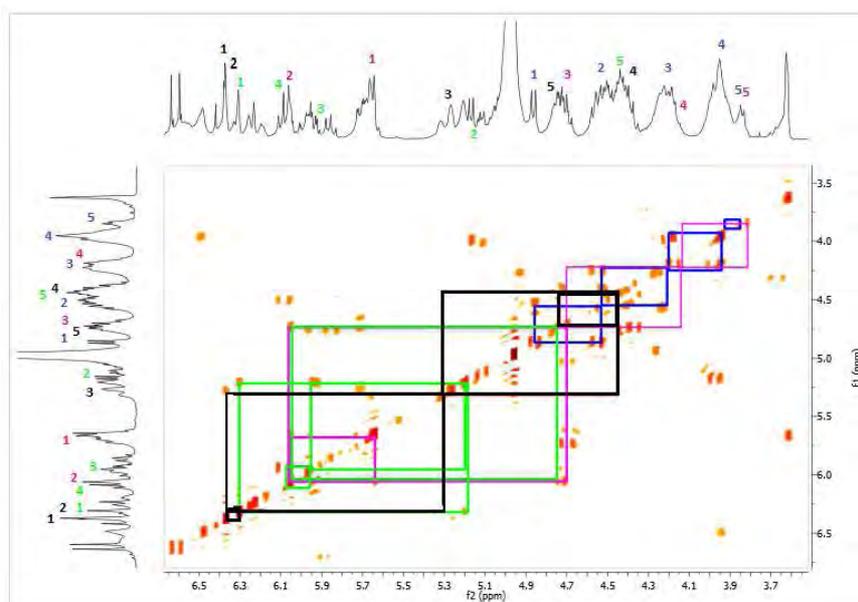


Figura 31. Ampliación del espectro COSY del componente lw29.1.4. (azul=fucosa; fucsia=ram; negro= ram'; verde=ram'')

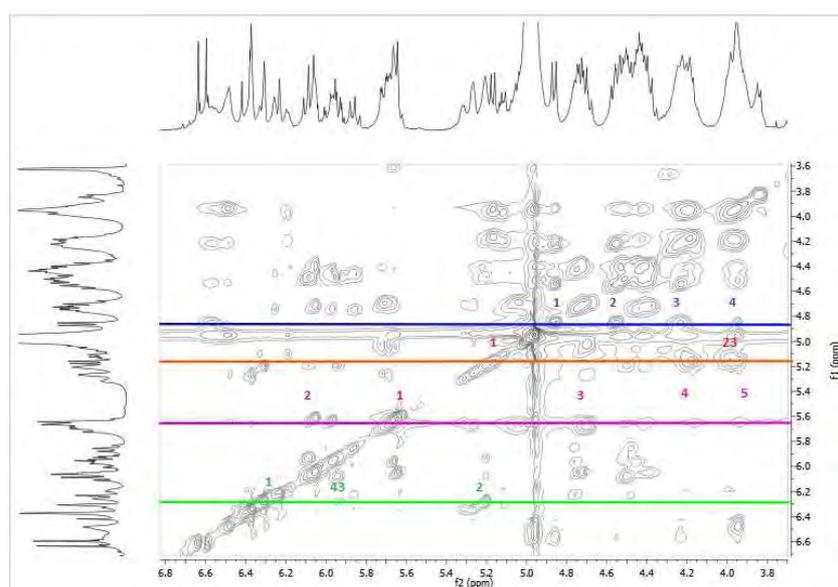


Figura 32. Ampliación del espectro TOCSY del componente lw29.1.4.

Cuadro 8. Datos espectroscópicos para RMN¹H y ¹³C para el componente lw29.1.4¹.

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

¹ Datos registrados a 400MHz y 100 MHz en C₅D₅N. Los desplazamientos químicos se reportan en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran entre paréntesis y se reportan en Hz. Los desplazamientos químicos señalados con asterisco (*) indican señales sobrepuestas. Los patrones de acoplamiento están indicados como: s= singulete, sa=señal ancha, d=señal doble, dq=doblete cuarteteado, t=señal triple, m=señal múltiple. Todas las asignaciones se hicieron por medio de experimentos de correlación homonuclear ¹H-¹H (COSY, TOCSY) y heteronuclear (HMBC, HSQC).

² Abreviaturas: fuc=fucosa, ram=ramnosa, glu=glucosa, jal=11-hidroxihexadecanoilo, octa=n-octadecanoil, dodeca=n-dodecanoil, Cna= trans-cinamoilo.

6.2.3. Caracterización de la secuencia de glicosidación y las posiciones de esterificación del componente lw 29.1.4.

Después de haber asignado cada uno de los carbonos con sus respectivos protones, se utilizó la técnica bidimensional heteronuclear HMBC (figura 33) para establecer la secuencia de glicosidación así como las posiciones de esterificación, mediante la búsqueda de las correlaciones entre carbonos e hidrógenos de una y otra unidad sacárida, así como

entre las correlaciones entre los protones de la unidad monosacárida con los grupos carbonilos que esterifican la molécula.

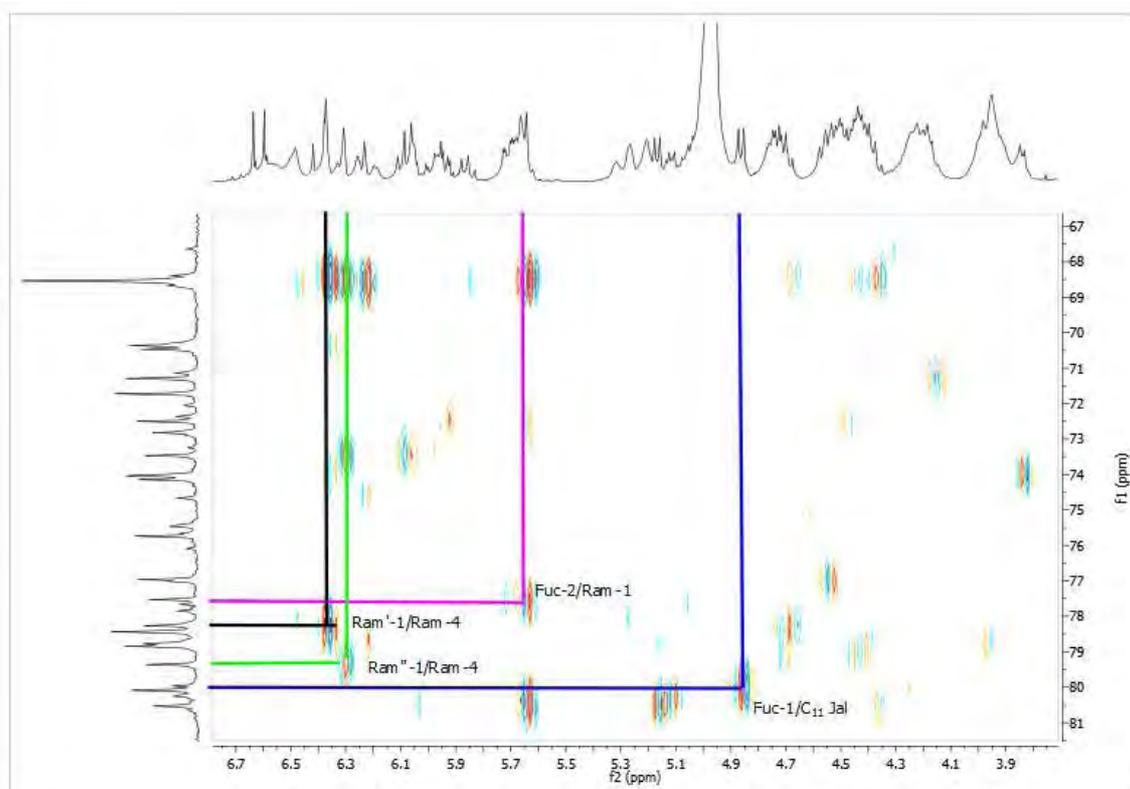


Figura 33. Ampliación del espectro HMBC para el componente lw29.1.4.

Las posiciones de las esterificaciones se verificaron mediante el análisis de los desplazamientos químicos de protón (cuadro 8), donde se observan las posiciones ram-2, ram'-2, ram''-3 y ram''-4 correlacionando con los carbonos de los grupos carbonilo correspondientes a los sustituyentes éster. Así, la aglicona de la macrolactona (ácido jalapínico) se localizó en la posición C-2 de la primera unidad de ramnosa (ram) por la correlación observada entre el C-1 de la lactona (173.5 ppm) y el protón H-2 de la ramnosa interna superior (6.06 ppm). El grupo dodecanoilo se localizó en la posición C-2 de la tercera unidad monosacárida (ram') por la correlación observada entre su carbonilo (173.8 ppm) con el protón H-2 de la segunda unidad de ramnosa (6.37 ppm). El grupo

cinamoilo se localizó en la posición C-3 de la ramnosa terminal (ram'') por la correlación observada entre su carbonilo (166.5 ppm) con el protón H-3 de la ramnosa terminal (ram'') (5.94 ppm). El sustituyente octanoilo se localizó en la posición C-4 de la ramnosa terminal (ram'') por la correlación observada entre su carbonilo (174.9 ppm) con el protón H-4 de la ramnosa terminal (6.09 ppm) (Figura 34).

6.2.4. Comparación con la literatura.

Buscando información en la literatura acerca de los datos obtenidos mediante RMN ^1H y RMN ^{13}C , así como de los datos recabados gracias a EM FAB en su modalidad negativa, se estableció que el núcleo obtenido durante el desarrollo de este proyecto, coincide cabalmente con el núcleo oligosacárido mayoritario que en trabajos anteriores se había encontrado en *I.wolcottiana*, el llamado "ácido operculinico A" (Ambrosio, 2007); después, mediante el análisis de la fragmentación de la molécula (sección 6.2.1, pág. 34) se pudo determinar cuáles eran los componentes que se encontraban esterificando en las posiciones descritas en las figuras 20 y 34.

Nuestros datos registrados en RMN y EM FAB coincidieron con los datos reportados para el compuesto de nombre **Intrapilosina VII**. (Bah, *et al.* 2007), cuya estructura ilustra la figura 34.

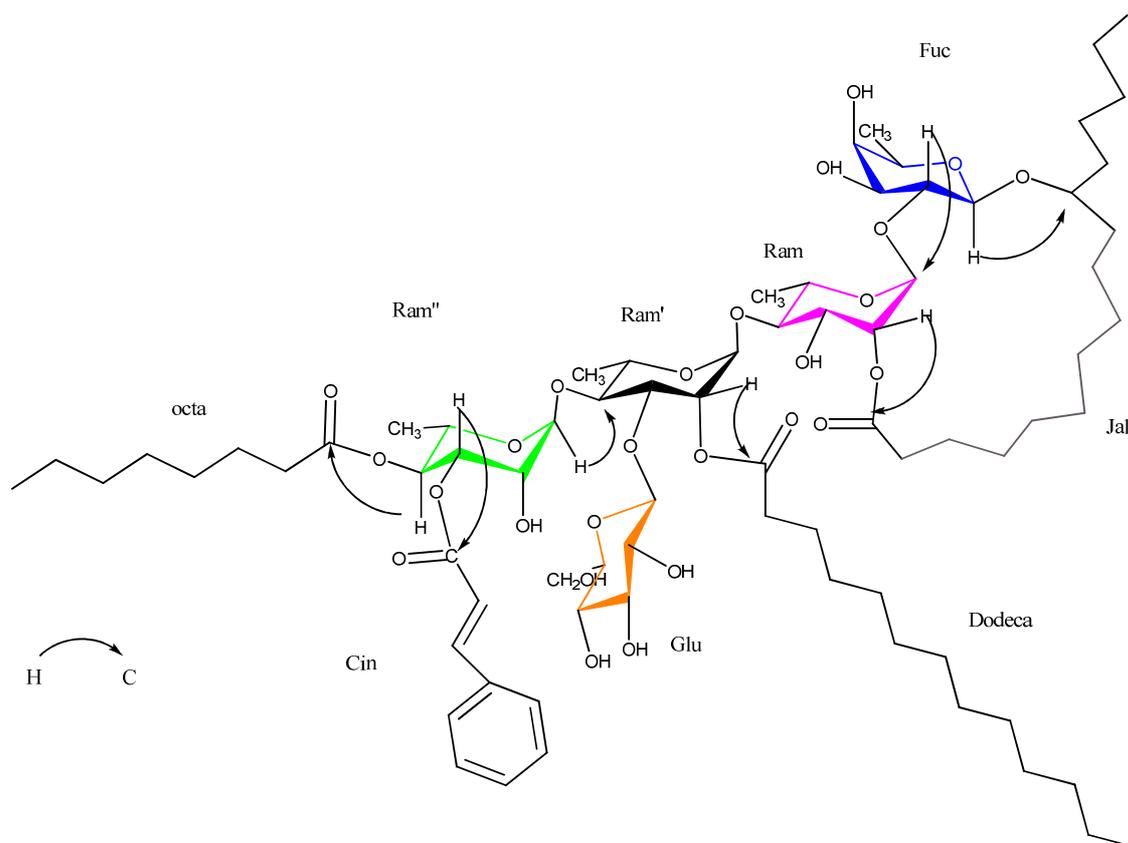


Figura 34. Molécula correspondiente al componente Iw29.1.4 (Intrapilosina VII).

Las correlaciones encontradas mediante el espectro HMBC se presentan en la figura 34 y se ilustran con flechas.

6.3. Componentes Iw29.1.2 e Iw29.6.

Estos componentes se encuentran aún en análisis de RMN y EM FAB y el análisis preliminar de las muestras sin reciclar han permitido establecer que son de naturaleza química correspondiente resinas glicosídicas, para comenzar entonces nuevamente con el proceso de elucidación estructural para cada componente.

7. Conclusiones.

- Se realizó el estudio de las fracciones V y VI, procedentes del extracto clorofórmico primario de *Ipomoea wolcottiana*.
- Se logró establecer las condiciones analíticas y el escalamiento a nivel preparativo, de separación y purificación de la subfracción de trabajo nombrada como lw29.
- Se encontró el núcleo oligosacárido conocido como Ácido Operculínico A (11-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→4)]-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→2)]-β-D-fucopiranosido del ácido (11S)-11-hidroxihexadecanoico).
- Las técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB) permitieron la adecuada identificación de la cadena pentasacárida encontrada en la fracción lw29.1.4, correspondiendo a la Intrapilosina VII.

8. Referencias

- Alonso-Castro, A. J.; Villarreal, M. L.; Salazar-Olivo, L. A.; Gómez-Sánchez, M.; Domínguez, F.; García-Carranza, A. (2011). Mexican medicinal plants used for cancer treatment: pharmacological, phytochemical and ethnobotanical studies. *J. Ethnopharm.* **133** (3) 952.
- Ambrosio Garduño. I. (2007). “Caracterización de la estructura química del núcleo glicosídico de las resinas de *Ipomoea wolcottiana*”. Tesis licenciatura QFB. Facultad de Química. Departamento de farmacia.
- Bah, M.; Chérigo, L.; Cardoso-Taketa, A.T.; Fragoso-Serrano, M.; Hammond, G.B.; Pereda-Miranda, R. (2007). Intrapilosins I-IV, pentasaccharides from the seeds of *Ipomoea intrapilosa*. *J. Nat. Prod.* **70**, 1153-1157.
- Chérigo L.; Pereda-Miranda R.; Fragoso-Serrano, M.; Jacobo-Herrera, N.; Kaatz, G. W. and Gibbons, S. (2008). Inhibitors of bacterial multidrug efflux pumps from the resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **31**, 1037-1045.
- Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R.; Gibbons, S. (2009). Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomoea murucoides*. *Phytochemistry* **70**, 222–227.
- Corona Castañeda, B. (2008). “Un nuevo lipopentacárido del ácido simónico B de las resinas glicosídicas del cacahuete (*Ipomoea murucoides*), una planta medicinal mexicana” Tesis Maestría en Ciencias Químicas. UNAM. Facultad de Química. Departamento de Farmacia.
- Corona-Castañeda, B.; Pereda-Miranda R. (2012). Morning Glory Resin Glycosides as Modulators of Antibiotic Activity in Multidrug-Resistant Gram-Negative Bacteria. *Planta Med.* **78**, 131-134.
- Díaz Pontones, D .M. (2009). “*Ipomoea*; un género con tradición”. Laboratorio de Bioquímica tisular. UAM-I. *ContactoS* **73**, 36-44 (2009).
- Figueroa-González, G.; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R. (2012). Reversal of multidrug resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. *J.Nat.Prod.* **75** 93-97.

- Grover. J. K.; Yadav, S.; Vats, V. (2002) Medicinal plants of India with anti-diabetic potential. *J Ethnopharmacol* **81**, 1, 81-100.
- MacLeod, J. K.; Ward. A. (1997). Structural Investigation of Resin Glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *J Nat Prod* **60**, 467.
- McDonald, A. (1991). Origin and diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Instituto de Biología. UNAM. Ser. Bot.* **62** (1), 65-82.
- Meira, M.; Pereira D. E.; David J. M.; Juceni, P. D. (2012). Review genus *Ipomoea*: Traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian J Pharm.* **22** (3), 682-703.
- Parra-Tabla, V. (2002). Historia natural de especies selectas: *Ipomoea wolcottiana* (Convolvulaceae). En: Noguera, F.; Vega, J.H.; Garcia-Aldrete, A.N. y Quezada, M. Historia Natural de Chamela. Universidad Nacional Autónoma de México. México, pp 159-106.
- Pereda-Miranda, R.; Rosas-Ramírez, D.; Castañeda-Gómez, J. (2010). Resin Glycosides from the Morning Glory Family. En: Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. 1^{ra} edición, Ed. Springer Wien, New York, pp. 79-122.
- Pereda-Miranda, R.; Bah, M. (2003). Biodynamic constituents in the mexican morning glories: purgative remedies transcending boundaries. *Curr Top Med Chem.* **3**, 111-131.
- Trease G.E.; Evans W.C. (2008) Pharmacognosy. 15^{va} edición. Ed. WB Saunders. Edinburg, pp. 33 y 288.