

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“PURIFICACIÓN DE GLICOLÍPIDOS DE INTERÉS  
AGRÍCOLA Y MEDICINAL A PARTIR DE LA PLANTA  
*Ipomoea tricolor* CAV. (CONVOLVULACEAE)”**

**TESIS INDIVIDUAL**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**WENDY VILLEDA IZQUIERDO**

**DIRIGIDA POR**

**Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2006**

**BIBLIOTECA CENTRAL UAQ**

No. Adq. H72540

No. Título \_\_\_\_\_

Clas T5

581.8

V729p

\_\_\_\_\_

# ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
INDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
II.1 Glicolípidos	4
II.1.1 Aislamiento y caracterización estructural de la tricolorina A	4
II.1.2 Metodología general de aislamiento de glicolípidos	5
II.1.3 Métodos espectroscópicos de elucidación estructural de los glicolípidos	8
II.1.3.1 Espectrometría de masas	8
II.1.3.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)	8
II.2 Alcaloides en <i>I. tricolor</i>	9
III. HIPÓTESIS	10
IV. OBJETIVOS	11
IV.1 General	11
IV.2 Específicos	11
V. METODOLOGÍA	12
V.1 Materiales	12
V.1.1 Material de estudio	12
V.1.2 Disolventes y reactivos para análisis cromatográficos	12
V.1.3 Material para análisis cromatográficos	12
V.1.4 Equipos e instrumentos	12
V.1.4.1 Para los análisis cromatográficos	12
V.1.4.2 Para los análisis espectroscópicos	13

V.2. Métodos	13
V.2.1 Implementación de condiciones en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)	13
V.2.2 Purificación de los compuestos	13
V.2.3 Identificación de Compuestos Aislados	14
VI. RESULTADOS	15
VII. DISCUSION	25
VIII. CONCLUSIONES	38
IX. BIBLIOGRAFÍA	39
X. ANEXOS	42

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Bandas colectadas de la fracción 38-40 de <i>Ipomoea tricolor</i> y los rendimientos obtenidos	17
2	Datos espectroscópicos comparativos en la RMN $^1\text{H}$ para el compuesto It38P6 y la tricolorina I ( $\delta$ en ppm, $J$ en Hz)	34

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía de la planta <i>I. tricolor</i> en etapa de floración	4
2	Estructuras de algunas de las tricolorinas (A, F y H) aisladas de <i>I. tricolor</i> (Fuc = fucosa, Glu = glucosa, Qui = quinovosa, Ram = ramnosa)	7
3	Alcaloides del ergot identificados en <i>I. tricolor</i>	9
4	Cromatograma de la fracción 38-40 de <i>I. tricolor</i>	16
5	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del pico It38P4	18
6	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del pico It38P4	19
7	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del pico It38P5	20
8	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del pico It38P5	21
9	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del pico It38P6	22
10	Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ del pico It38P6	23
11	Ampliación de la zona de los anoméricos	27
12	Región de los anoméricos del compuesto It38P5	30
13	Ampliación de la región de los protones anoméricos del compuesto It38P6	32
14	Espectro de masas de baja resolución modalidad FAB negativo del componente It38P6	33
15	Estructura química de la tricolorina I (It38P6) aislada de la fracción 38-40 de <i>Ipomoea tricolor</i>	36

## RESUMEN

Las especies vegetales de la familia Convolvulaceae, en particular las que integran el género *Ipomoea* constituyen una fuente importante de resinas glicosídicas, a las cuales se atribuyen numerosas actividades biológicas. El uso medicinal principal de esas resinas es como agentes purgantes. Sin embargo, la especie *I. tricolor* Cav. en particular, tiene interés en la agricultura, debido a que se emplea como cultivo de cobertura en los cañaverales para el control de las malas hierbas. La propiedad fitotóxica de sus resinas crudas ha sido ampliamente demostrada. Por lo tanto, esta especie puede ser una fuente potencial importante de herbicidas naturales biodegradables. Debido al interés agroquímico de la resina glicosídica de esta planta, la presente investigación tuvo como objetivos la separación, purificación y caracterización estructural de algunos de sus glicolípidos presentes en una fracción medianamente polar de la misma. Se logró purificar uno de los glicolípidos, utilizando la técnica de corte del núcleo y su reciclaje en la cromatografía de líquidos de alta resolución. Ese constituyente fue identificado como la tricolorina I, mediante el estudio de sus espectros de resonancia magnética nuclear. Un segundo constituyente se perfiló como novedoso, aunque se requerirá completar su purificación y caracterización estructural. Finalmente, se aisló una mezcla de dos isómeros inseparables en las condiciones de resolución implementadas que incluyeron una columna quiral Symmetry y la técnica de reciclaje.

## I. INTRODUCCIÓN

La investigación de productos naturales a partir de plantas de uso tradicional en la medicina y en la agricultura ha conducido a menudo al descubrimiento de nuevos compuestos con actividades biológicas importantes, ya sea para tratar o prevenir enfermedades, para ser usados en la agricultura como herbicidas naturales biodegradables o para fines económicos. *Ipomoea tricolor* Cav. (don Diego de día) (Convolvulaceae) es una de esas plantas, que en este caso particular se usa en el estado de Morelos como cultivo de cobertura para el control de las malas hierbas en los cañaverales.

Las especies del género *Ipomoea* se caracterizan por sus resinas glicosídicas, cuyas propiedades farmacológicas más reconocidas son sus efectos purgantes. Sin embargo, se ha reconocido cada vez con mayor evidencia que los oligosacáridos presentes en estas resinas constituyen además un almacén de información y desempeñan un papel clave en diferentes procesos biológicos complejos, dependiendo de su estructura molecular y, por lo tanto, de las interacciones específicas que presentan con otros constituyentes del organismo, principalmente las proteínas. Más recientemente, se ha descrito también su papel como mediadores de numerosas interacciones alelopáticas. Esto pone en evidencia la presencia de compuestos fitotóxicos como los principales constituyentes bioactivos de esta especie. Se ha postulado que estos glicolípidos desempeñan un papel importante en la ecología química de la familia de las convolvuláceas.

Aunque en la última década se ha avanzado en la caracterización química de esos metabolitos, un siglo de especulación ha transcurrido antes del aislamiento de los primeros glicolípidos naturales íntegros. Uno de los factores que ha limitado la investigación en estos campos ha sido la dificultad asociada con el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de los constituyentes individuales de estas resinas, las cuales fueron consideradas durante mucho tiempo como polímeros de alto peso molecular inseparables. Por esta razón, su caracterización química se limitó a la de sus productos de degradación obtenidos mediante su



saponificación, seguida de una hidrólisis ácida, la acetilación y/o la permetilación de esos productos.

El amplio espectro de actividades biológicas atribuidas a estas resinas de las convolvuláceas, la complejidad y la diversidad estructural de los glicolípidos individuales que las constituyen, convierten a estos metabolitos en un sujeto de estudio muy atractivo. Bajo esta óptica, la presente propuesta tiene como objetivo contribuir al aislamiento mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia y a la caracterización química de los constituyentes individuales de una fracción polar anteriormente poco explorada de las resinas de *Ipomoea tricolor*, las cuales demostraron en un estudio previo diversas propiedades herbicidas, antibacterianas y anticancerosas. El aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de esos glicolípidos constituyen un paso de primera importancia para continuar con la investigación de los mecanismos de acción involucrados en las actividades biológicas desarrolladas por estos glicolípidos.

## II. ANTECEDENTES

México forma parte de los principales países megadiversos del mundo y además cuenta con una rica tradición en el uso de plantas, no sólo para tratar diversos padecimientos, sino también para el control de malezas en los cultivos. Los usos medicinales de plantas, así como las observaciones ecológicas de campo han sido criterios muy valiosos para la selección de fuentes potenciales de compuestos biológicamente activos. Entre las plantas de importancia terapéutica, destacan las que integran el género *Ipomoea* de la familia Convolvulaceae. Las especies de este género se caracterizan por sintetizar resinas glicosídicas en sus células foliares, así como en sus raíces. Esas resinas constituyen una fuente importante de carbohidratos, como es el caso de *I. batatas* (el camote) que se consume como alimento. Otro aspecto que le da valor comercial a esas especies es su poder purgante, como es el caso de *I. purga*.

Por su parte, el cultivo de la planta *Ipomoea tricolor* (don Diego de día) es una práctica común en los cañaverales de diversos estados de la república mexicana, en particular en Morelos. *I. tricolor* (Figura 1) es una planta enredadera anual de crecimiento rápido, de tallos largos y flexibles que sobrepasan a veces los 4 m. Tiene las hojas grandes, en forma de corazón, con pecíolo corto, con forma de campana durante el verano y principios de otoño, de colores violetas, azules y blancos. Para erguirse, la planta necesita de un soporte. Se multiplica por semillas. La especie se usa como un agente muy eficiente para el control de las plantas nocivas a la caña de azúcar. Se deja crecer como cultivo de cobertura en la época de barbecho que se extiende de agosto a octubre. De esta forma, la planta crece, se expande, sintetiza y libera una resina que impide el crecimiento de las malas hierbas. El potencial alelopático de esta resina se demostró en estudios realizados a nivel de laboratorio, mediante la evaluación de la actividad inhibidora de los extractos orgánicos y acuosos sobre la germinación de semillas y el crecimiento radicular de *Amaranthus leucocarpus* Watts. y *Echinochloa cruz-galli* (L.) Beauv., las principales malezas invasivas de los cañaverales. Los extractos produjeron un fuerte efecto inhibidor del crecimiento radicular (Anaya y col., 1990; Calera y col., 1995; Mata y col., 1996).

Más recientemente, se han descrito otros agentes aleloquímicos aislados de otras especies de *Convolvulaceae* (Vyvyan, 2002).

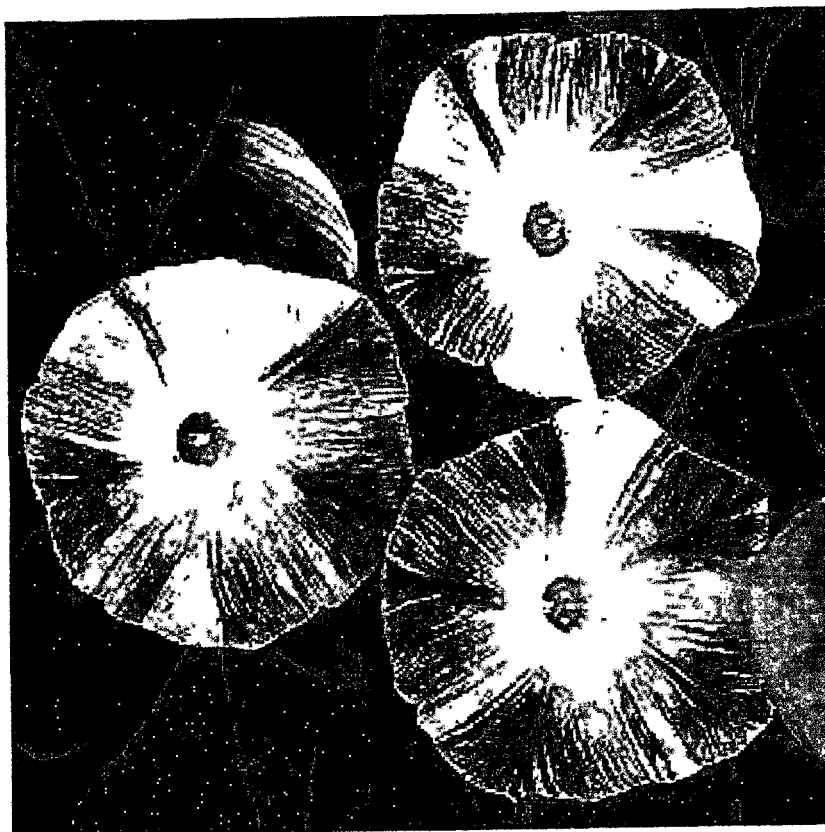


Figura 1. Fotografía de la planta *I. tricolor* en etapa de floración.

## II.1 Glicolípidos

### II.1.1 Aislamiento y caracterización estructural de la tricolorina A

El primer agente alelopático de *I. tricolor*, nombrado como tricolorina A (Figura 2), fue aislado y caracterizado tres años después de los ensayos farmacológicos llevados a cabo con los extractos. El proceso de purificación de este constituyente mayoritario de la fracción de menor polaridad de la resina de *I. tricolor* incluyó la cromatografía de partición centrífuga, seguida de la cromatografía

de líquidos de alta resolución (Pereda-Miranda y col., 1993). La elucidación estructural del principio aislado se logró combinando métodos químicos y espectroscópicos. Los primeros incluyeron la saponificación de la macrolactona, la acetilación del producto natural, su hidrólisis ácida y la identificación de los monosacáridos y de la aglicona resultantes, así como la preparación de su acetónido.

### II.1.2 Metodología general de aislamiento de glicolípidos

La determinación de mono y disacáridos mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución ha sido descrita en trabajos previos (Nikolov y col., 1985; Anonymous, 1998). Sin embargo, a pesar del amplio uso agrícola y medicinal de las especies del género *Ipomoea*, el aislamiento y la caracterización estructural de sus constituyentes individuales ha resultado infructuosa durante más de cien años. Los primeros glicolípidos purificados y caracterizados fueron los descritos en un trabajo pionero realizado con la resina (jalapina) de *I. orizabensis* (Noda y col., 1987). En el caso de *I. tricolor*, fue en la década de los noventa cuando se logró el aislamiento y la caracterización química de algunos de los constituyentes individuales alelopáticos de la resina de esta especie vegetal (Bah y Pereda-Miranda, 1996; 1997, Pereda-Miranda y Bah, 2003). El aspecto más relevante de los estudios químicos de esta especie fue implementar condiciones analíticas en la cromatografía de líquidos de alta resolución para la purificación de los constituyentes individuales de esas resinas que habían sido consideradas durante décadas como polímeros inseparables (Wagner, 1973). La separación de los mismos se logró mediante el empleo de una columna de aminopropilmetilsilicio y una fase móvil formada por acetonitrilo-agua (78:22). La técnica de reciclaje de picos fue de vital importancia para la purificación final de cada uno de ellos. Esas condiciones permitieron purificar diez compuestos, la tricolorina A y nueve constituyentes adicionales denominados como tricolorinas A-J, las cuales consistieron en glicolípidos integrados por cadenas heterosacáridas de tres, cuatro y seis monosacáridos, formando una macrolactona con el ácido 11(S)-11-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínico) en algunos de sus hidroxilos y también

ésteres con ácidos grasos saturados de bajo peso molecular, como son el 2-metilbutanoico ( $\alpha$ -metilbutiroilo), el 2-metilpropanoico (isobutiroilo) y el 2-metil-3-hidroxi-butanoico (niloilo). Los monosacáridos integrantes de esos metabolitos incluyen la glucosa, la ramnosa, la quinovosa y la fucosa. En la Figura 1, se muestran las estructuras tipo de un trisacárido (tricolorina F), un tetrasacárido (tricolorina A) y un dímero (tricolorina H).

Desde su aislamiento, esos compuestos han sido empleados para la investigación en numerosos ensayos biológicos y farmacológicos, incluyendo la actividad sobre el fotosistema II en cloroplastos (Achnine y col., 1999) y la inhibición de la enzima 1,3- $\beta$ -glucan sintasa (Castelli y col., 2002), la cual cataliza la síntesis del 1,3- $\beta$ -D-glucano, el polímero que forma la principal estructura de la pared celular de varios hongos patógenos. Esta actividad inhibidora demostró el potencial antifúngico de este compuesto.

Como suele ocurrir con los productos naturales, los rendimientos de los compuestos que se obtuvieron de la planta no fueron altos. Sin embargo, las diversas actividades biológicas y las estructuras peculiares de esos glicolípidos han incrementado el interés de numerosos grupos de investigación en el mundo para su síntesis en laboratorio (Füerstner y Müller, 1998, 1999; Füerstner, 2004; Brito-Arias, 2004; Lu y col., 1997a, 1997b, 1998; ). Esos grupos han logrado implementar métodos eficientes de síntesis de algunas de las tricolorinas. También, en un estudio encaminado hacia la búsqueda de mecanismos acción de esos glicolípidos, se ha llevado a cabo un estudio cristalográfico de la tricolorina A. La arquitectura de esta molécula en el estado sólido sugiere que la citotoxicidad de esa clase de macrolactonas es resultado de su habilidad para formar poros en la membrana celular (Rencurosi y col., 2004).

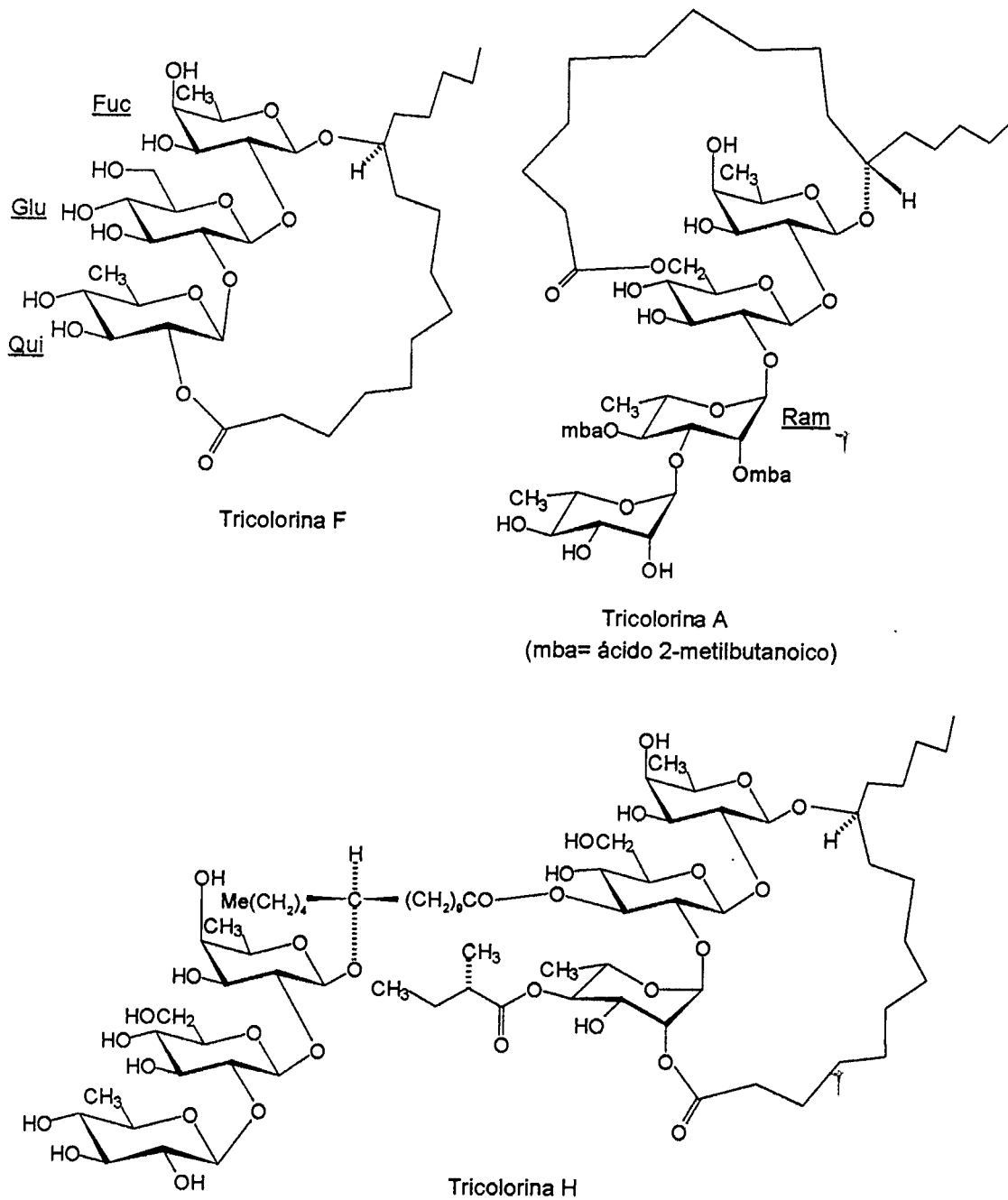


Figura 2. Estructuras de algunas de las tricolorinas (A, F y H) aisladas de *I. tricolor* (Fuc = fucosa, Glu = glucosa, Qui = quinovosa, Ram = ramnosa).

## II.1.3 Métodos espectroscópicos de elucidación estructural de los glicolípidos

### II.1.3.1 Espectrometría de masas

Tradicionalmente, la técnica del impacto electrónico sólo se ha limitado al análisis del tamaño de la aglicona (ácido jalapινόico) y de la configuración de su centro quiral C-11, así como de los derivados permetilados o peracetilados de los ácidos glicosídicos que se obtiene por saponificación de los compuestos naturales. Esos derivados se preparan para aumentar la volatilidad y la estabilidad de los ácidos. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de ionización suave, en especial la espectrometría de masas (EM) por bombardeo rápido de átomos (FAB: de sus siglas en inglés, Fast Atom Bombardment), hace posible llevar a cabo el análisis de los oligosacáridos naturales que constituyen compuestos no volátiles y termolábiles. Esa técnica permite establecer la secuencia de glicosilación y las unidades sacáridas portadoras de los grupos acilantes en los compuestos naturales, pero es particularmente útil en la determinación del tamaño de los dímeros. Sin embargo, a pesar de la valiosa información que se obtiene mediante la EM-FAB, esta metodología no permite distinguir entre monosacáridos isoméricos como por ejemplo la fucosa, la ramnosa y la quinovosa, o la glucosa, la galactosa y la manosa, ya que la composición obtenida sólo se define en términos de hexosa, desoxihexosa o pentosa. Tampoco esta técnica proporciona información sobre la posición exacta de los sustituyentes. Para determinar la naturaleza de los monosacáridos y los sitios de acilación y de glicosilación, es inevitable recurrir a métodos alternos, como las reacciones de degradación y de derivatización, seguida de la identificación de los productos obtenidos, todo eso combinando con la resonancia magnética nuclear, sobre todo si se trata de heteropolisacáridos.

### II.1.3.2 Resonancia magnética nuclear (RMN)

Esta metodología proporciona una panorámica más completa para la caracterización de la estructura de los glicolípidos, ya que permite determinar el número de monosacáridos, la configuración del centro anomérico de cada uno de ellos, los enlaces interglicosídicos, la secuencia de glicosilación y la naturaleza y el

sitio de unión de los grupos ligados, tales como los ácidos grasos. Para esos objetivos, se emplea la RMN de alta resolución en sus diferentes modalidades.

## II.2 Alcaloides en *I. tricolor*

Se ha descrito la presencia de numerosos alcaloides del ergot en esta especie, siete de los cuales han sido identificados mediante cromatografía de gases-espectrometría de masas (Figura 3). Esos alcaloides constituyen un marcador quimiotaxonómico adicional de las especies del género. Pero, quizás el aspecto más importante de esos metabolitos es su potente efecto neurotóxico en mamíferos, lo que los convierte en agentes protectores contra la depredación por herbívoros (Aerts y col., 1991; Amor-Prats y Harborne, 1993). Evidentemente, el uso tradicional de las especies de *Ipomoea* como alucinógenos se basa en los efectos de esos alcaloides. También se ha demostrado el potencial de interacción aleloquímica de esos alcaloides sobre artrópodos (insectos) (Amor-Prats y Harborne, 1993).

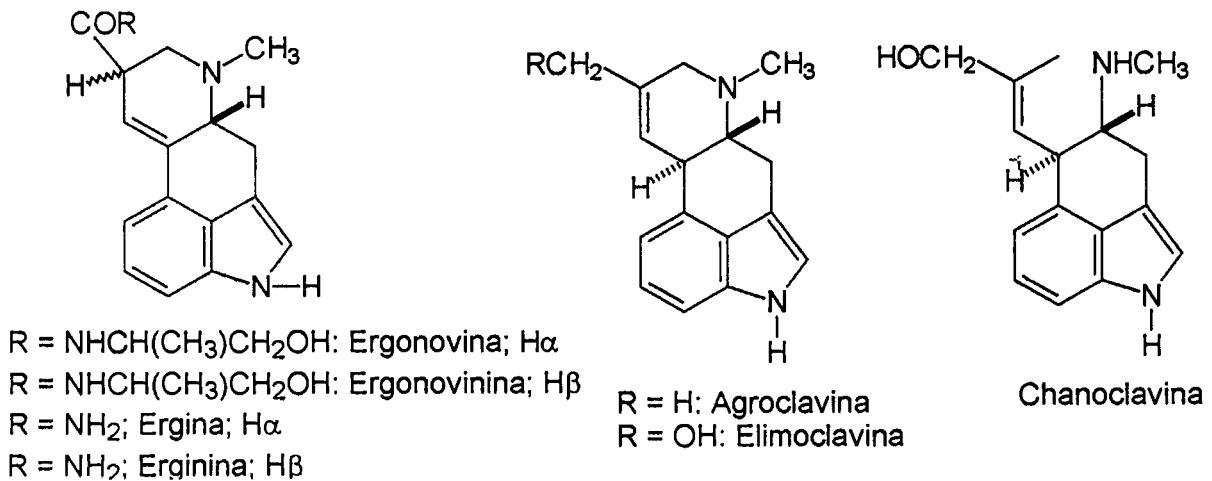


Figura 3. Alcaloides del ergot identificados en *I. tricolor*.



7

### III. HIPÓTESIS

La fracción de mediana polaridad de *Ipomoea tricolor* contiene lipopolisacáridos novedosos de alto peso molecular cuyo aislamiento y caracterización química puede contribuir al conocimiento de la compleja estructura química de esos metabolitos.

7

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 GENERAL

Purificar algunos de los constituyentes individuales de la fracción 38-40 (soluble en metanol) del extracto cloroformo-metanólico de *Ipomoea tricolor* Cav.

### IV.2 ESPECÍFICOS

- Implementar condiciones en la cromatografía de líquidos a nivel analítico para una máxima resolución de los constituyentes individuales de la fracción 38-40 de *I. tricolor*.
- Purificar algunos de los constituyentes más abundantes de la resina.
- Determinar la estructura química de los compuestos aislados, utilizando la espectroscopía de resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas de alta resolución.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Material de estudio

Para la realización de la presente propuesta, se recibió la fracción 38-40 de *I. tricolor* resultante de un fraccionamiento previo mediante cromatografías en columna abierta y flash (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

#### V.1.2 Disolventes y reactivos para análisis cromatográficos

Agua tridestilada grado HPLC.

Acetonitrilo grado HPLC de la marca Mallinkrodt o Baker.

#### V.1.3 Material para análisis cromatográficos

Membranas de nylon y polipropileno hidrofílico para filtración de disolventes ( 47 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de poro).

Jeringas micrométricas de vidrio de 50, 100 y 500  $\mu\text{l}$  para inyección de muestras.

Jeringa de purga de 10 ml.

Loops (líneas de inyección) de diversas capacidades (5, 10, 20, 50, 100, 200 y 500  $\mu\text{l}$ ).

Columnas analíticas PrepNova-Pak HR C18 (3.9 x 300 mm y 19 x 300 mm,  $\mu\text{Bondapak}$ ), aminopropilmetilsilicio ( $\text{NH}_2$ ) (3.9 x 300 mm y 19 x 250 mm) y Symmetry C18 (4.6 x 250 mm, 5  $\mu\text{m}$ ).

#### V.1.4 Equipos e Instrumentos

##### V.1.4.1 Para los análisis cromatográficos

Balanza analítica marca Ohaus (0.00001-250.0 g).

Aparato para punto de fusión Fisher-Johns provisto de un termómetro de 300 ° C de alcance.

Sistema Cromatográfico de la marca Waters equipado con una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, un detector de índice de refracción modelo

2410, un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizaron utilizando el programa Millennium<sup>32</sup> (Waters).

#### V.1.4.2 Para los análisis espectroscópicos

Se utilizó un equipo VARIAN UNITY INOVA-300 o 400 MHz. El espectro de masas en la modalidad FAB negativo se registró en un equipo modelo VG 7070E.

### V.2 Métodos

La fracción 38-40 seleccionada se analizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Bah y Pereda-Miranda, 1996). Se buscaron las condiciones óptimas de mejor resolución de sus constituyentes. Fueron probadas varias fases estacionarias y móviles. Una vez obtenidas las condiciones adecuadas, se purificaron algunos de los compuestos presentes, llevando a cabo numerosas inyecciones. Finalmente, se registraron los datos espectroscópicos de los compuestos purificados en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM).

#### V.2.1 Implementación de condiciones en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Para el análisis de la fracción, fue usada la columna hidrofóbica de aminopropilmetilsilicio. La fase móvil consistió en una mezcla de acetonitrilo-agua (83:17).

#### V.2.2 Purificación de los compuestos

Se intentó llevar a cabo el escalamiento a nivel preparativo para la purificación de los componentes de la mezcla. Sin embargo, nunca se logró una

reproducción óptima de las condiciones analíticas. Por lo tanto, la separación de las diferentes bandas se realizó utilizando la misma columna analítica.

### V.2.3 Identificación de Compuestos Aislados

Para la identificación del compuesto mayoritario purificado, se registraron sus espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) de  $^1\text{H}$  unidimensional y de  $^{13}\text{C}$  (Agrawal, 1992; Duus y col., 2000), así como sus espectros de masas de baja y alta resolución (Bah y Pereda-Miranda, 1997; Haig, 2001).

## VI. RESULTADOS

Perfil cromatográfico de la fracción 38-40

El análisis de la fracción 38-40 generó el cromatograma de la Figura 4. Se inyectaron en total 208.31 mg y se colectaron cuatro bandas marcadas con los tiempos de retención que se indican en el Cuadro 1.

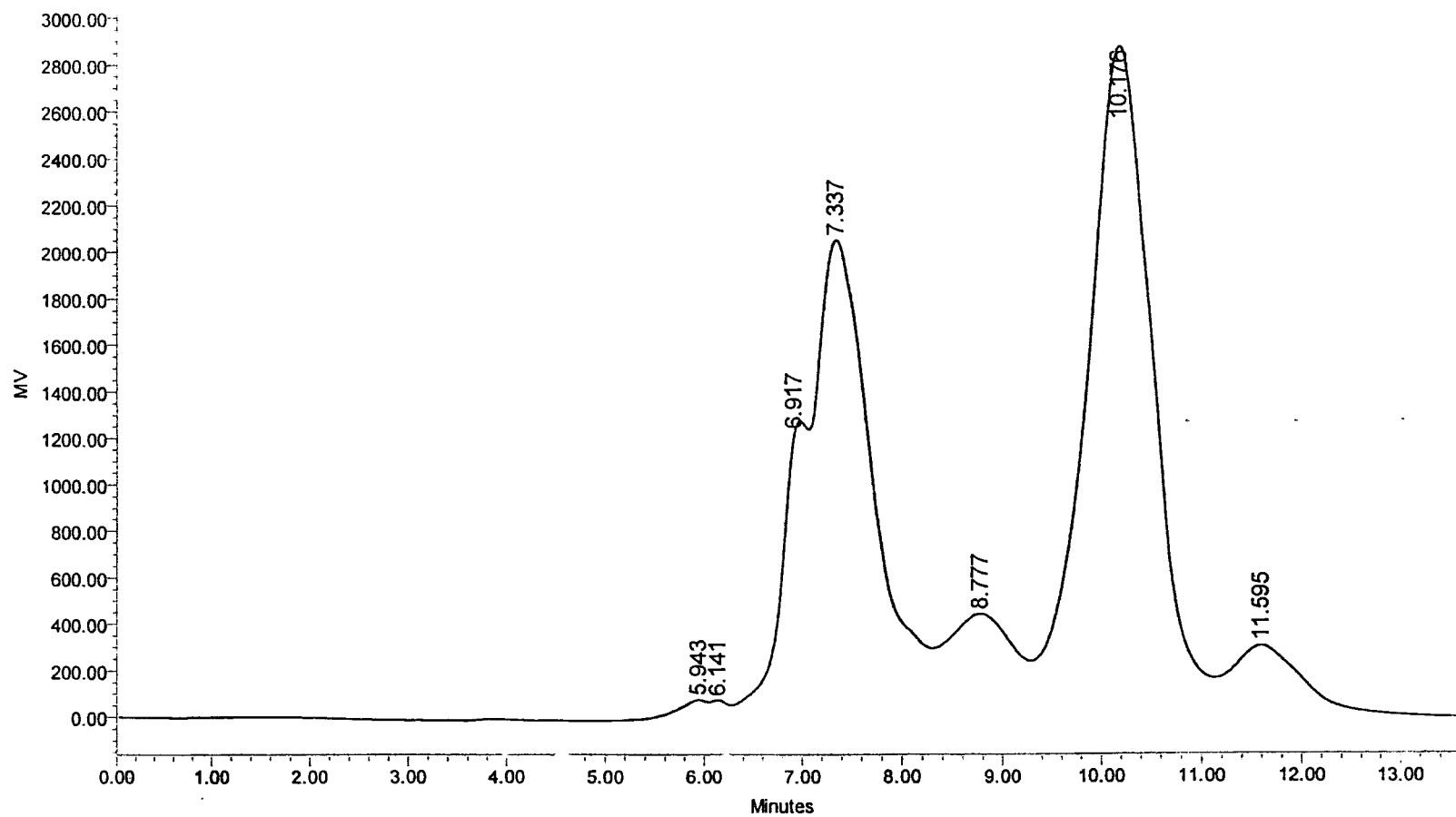


Figura 4. Cromatograma de la fracción It 38-40. Condiciones de análisis: Columna, amino micro-Bondapak (3.9 X 300 mm, 125 A, 10 micrometros); fase móvil: acetonitrilo-agua (83:17); flujo, 0.5 ml/min; detector, Índice de Refracción.

Cuadro 1. Bandas colectadas de la fracción 38-40 de *Ipomoea tricolor* y los rendimientos obtenidos.

Banda	Tiempo de retención (min)	Clave	Cantidades obtenidas (mg)
1	5.85–8.40	–	14.10
2	8.78	It38P4	7.88
3	10.17	It38P5	33.14
4	11.59	It38P6	49.88

Para tratar de identificar los constituyentes colectados, se registraron sus respectivos espectros de RMN  $^1\text{H}$  unidimensionales y  $^{13}\text{C}$  (ver Figuras 5-10).



USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P4 / Piridina  
1H 400 MHz  
Ref. Piridina 8.7 ppm  
400  
nib

Pulse Sequence: s2p41

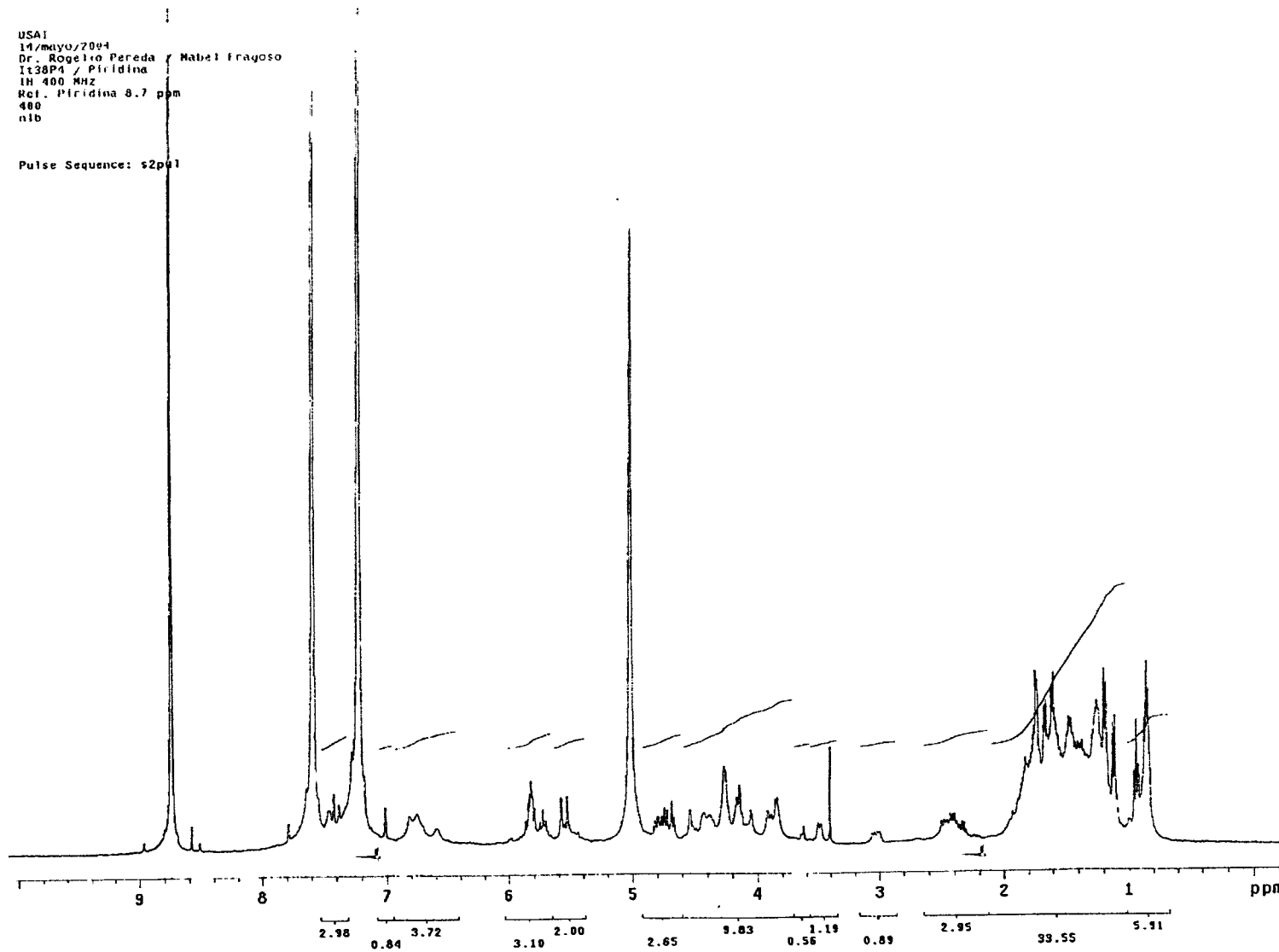
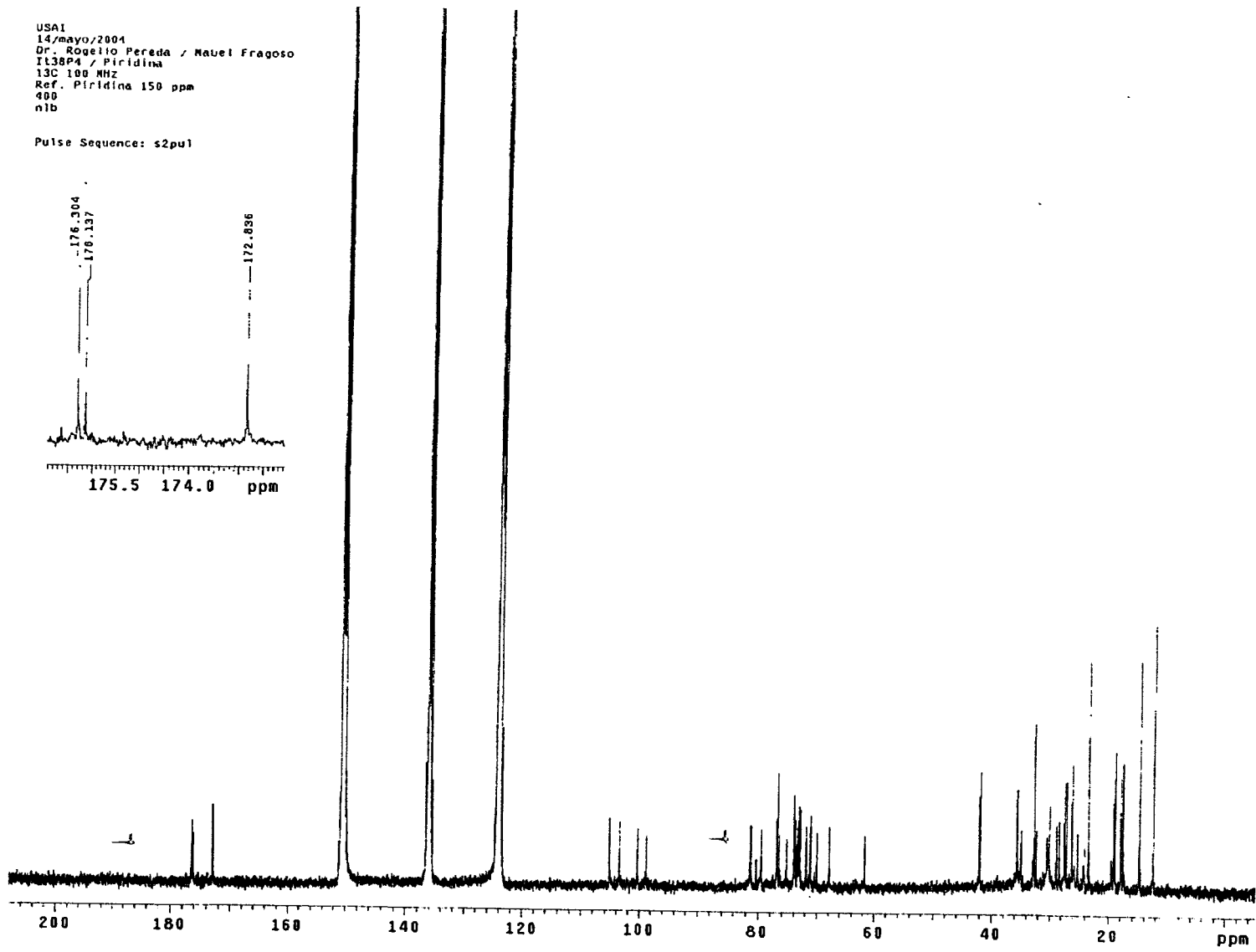


Figura 5. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del pico It38P4 en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Manuel Fragoso  
It38P4 / Piridina  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 150 ppm  
400  
nib

Pulse Sequence: s2pu1



19

Figura 6. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del pico It38P4 en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

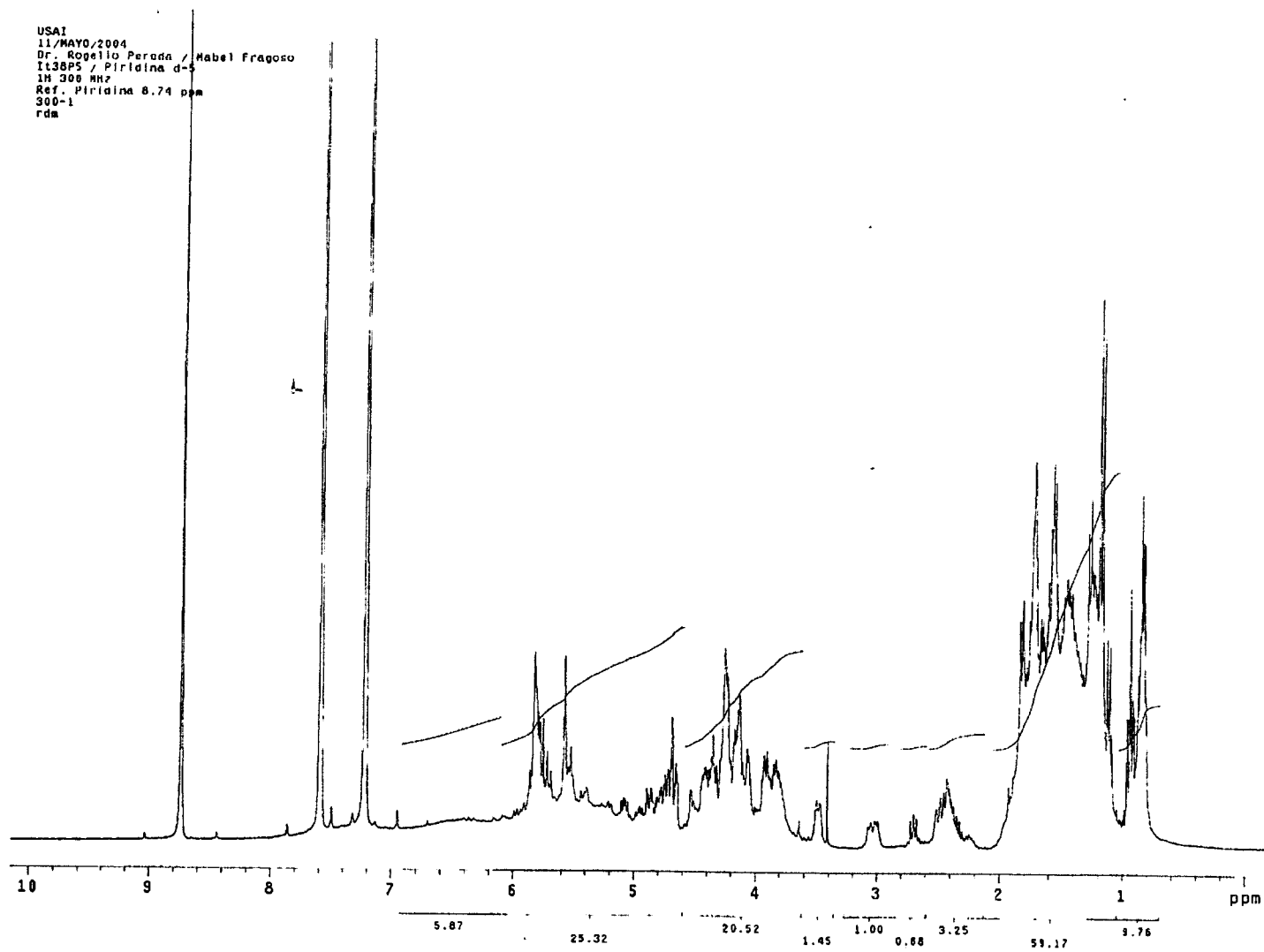


Figura 7. Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del pico It38P5 en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

USA1  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / MAbel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
13C 75 MHz  
Ref. Piridina 150.4 ppm  
300-1  
rda

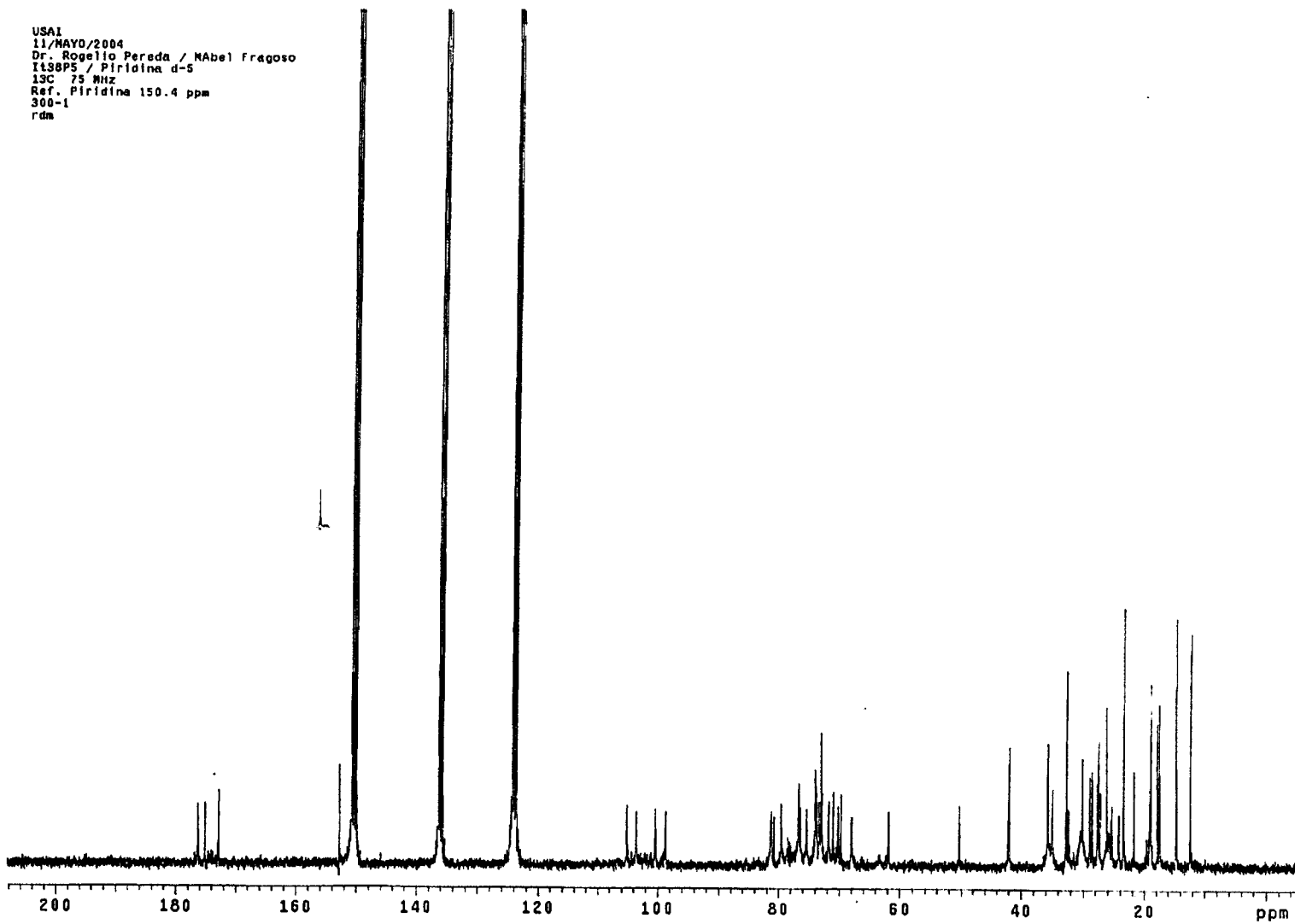


Figura 8. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del pico It38P5 en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

USAI  
06/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pareda / Mabel Fragoso  
It38P6 / C5D5N  
1H 400 MHz  
Ref. Piridina 8.73 ppm  
400  
rdm

Pulse Sequence: s2pul

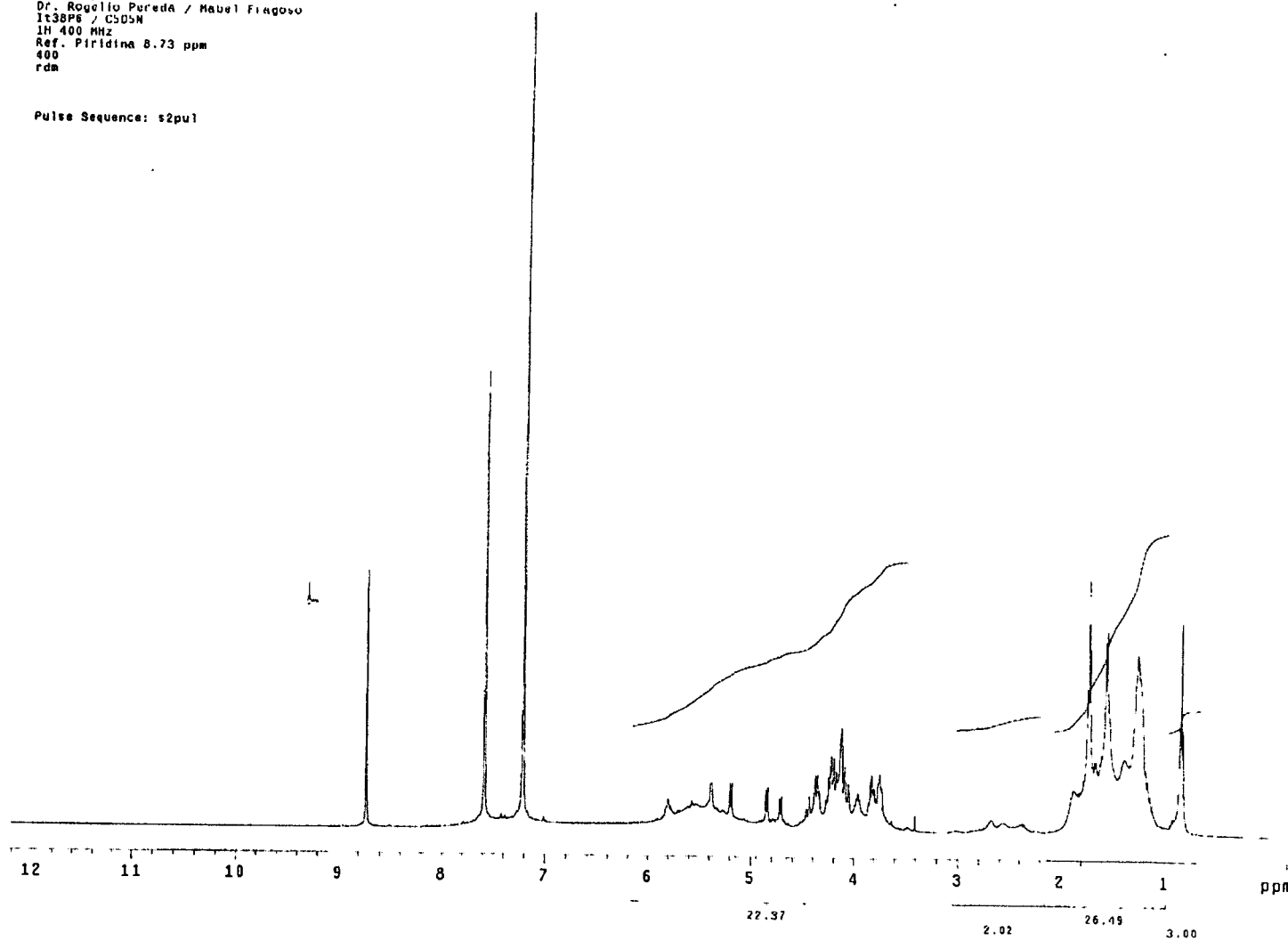


Figura 9. Espectro de RMN <sup>1</sup>H del pico It38P6 en C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N.

USAJ  
05/RAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P6 / C5D5N  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 135.5 ppm  
400  
rdm

Pulse Sequence: s2pu1

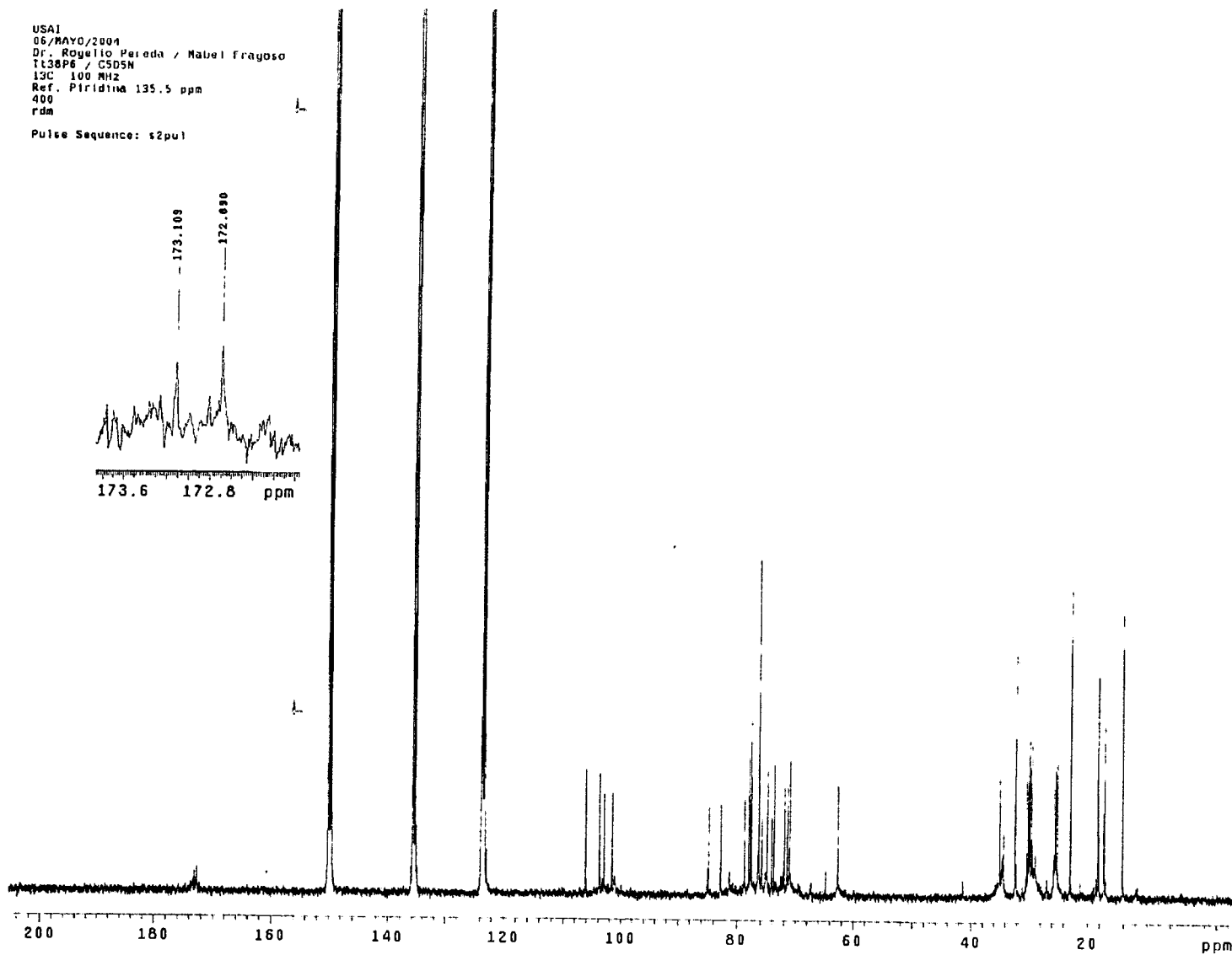


Figura 10. Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  del pico It38P6 en  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ .

Constantes físicas y espectroscópicas del compuesto It38P6:

P.f. 136-139 °C;  $[\alpha]_D$   $-70^\circ$  (c = 0.1, MeOH); RMN  $^1\text{H}$  ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): (d = doblete, a = ancho, t = triplete) 5.80 dd (8.8, 8.8 Hz), 5.33 d (7.6 Hz), 4.85 d (7.6 Hz), 4.72 d (7.6 Hz), 4.45 da (10.8 Hz), 2.68 m, 2.57 m, 2.34-2.40 m, 1.73 d (6.0 Hz), 1.57 d (6.0 Hz), 0.86 t (6.8 Hz);  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ): 173.1, 172.7, 106.1, 103.7, 101.5, 84.7, 82.7, 81.2, 78.7, 78.0, 77.7, 77.5, 76.3, 75.7, 74.9, 74.1, 73.7, 72.0, 71.4, 71.1, 64.7, 62.6, 35.0, 34.7, 34.4, 32.3, 30.1, 29.8, 29.7, 29.5, 29.3, 28.8, 25.7, 25.6, 25.4, 25.1, 22.9, 22.8, 18.3, 18.1, 17.3, 17.2, 14.2 14.1; EM-FAB negativo:  $m/z$  (intensidad relativa)  $[\text{M} - \text{H}]^-$  1415 (3.4), 725 (12), 707 (16.1), 579 (8), 417 (6.4); EM-FAB negativo de alta resolución:  $m/z$  1415.8007  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ,  $\text{C}_{68}\text{H}_{119}\text{O}_{30}$ , fórmula que requiere de 1415.7786 Daltones.

## VII. DISCUSIÓN

Entre todas las fases probadas, las condiciones que proporcionaron una mejor separación de los componentes fueron una columna de aminopropil metilsilicio, una fase móvil binaria formada por  $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$  (83:17) al flujo de 0.5 ml/min. Se intentó llevar a cabo el escalamiento a nivel preparativo para la purificación de los componentes individuales de la mezcla. Sin embargo, nunca se logró una reproducción óptima de las condiciones analíticas que dieron la mejor resolución. Por lo tanto, la separación de las diferentes bandas se realizó utilizando la misma columna analítica. Como puede apreciarse en el cromatograma obtenido (Figura 4), esta fracción contiene al menos 6 componentes. Los picos con los tiempos de retención que se encuentran en el intervalo 5.85–8.40 min fueron recolectados juntos debido a la pobre separación de los mismos, con la finalidad de buscar posteriormente mejores condiciones de resolución y de purificación de cada uno de ellos. Sin embargo, debido a la pobre cantidad de muestra obtenida en este caso, este paso no se llevó a cabo en el presente trabajo. Por lo tanto, en esta fase del estudio, se carece de elementos de discusión sobre la estructura química de sus constituyentes individuales. Se requerirán de numerosas inyecciones adicionales para continuar con ese estudio. Para los demás picos colectados, se registraron sus respectivos espectros de resonancia magnética nuclear en piridina deuterada ( $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$ ).

Pico con el  $t_R$  de 8.77 min

El pico minoritario con el  $t_R$  de 8.77 min (clave: It38P4, 7.88 mg) mostró en sus espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  señales para cuatro unidades sacáridas en  $\delta = 98.8$ , 100.3, 103.5 y 105.2 ppm (Figura 11) que representan carbonos anoméricos para cuatro monosacáridos, uno de los cuales es una unidad de hexosa (glucosa o galactosa), debido a la presencia de una señal en  $\delta 61.6$  ppm (Figura 6, Resultados) que corresponde al carbono 6 del hidroximetileno de este azúcar. Sin embargo, no se identificó la señal del protón anomérico. Tampoco con los datos disponibles se pudo determinar la naturaleza exacta de esta hexosa. Para resolver esa duda, se requerirá del espectro de RMN bidimensional  $^1\text{H}-^1\text{H}$  COSY o TOCSY



USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
1t36P4 / Piridina  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 150 ppm  
400  
n1b

Pulse Sequence: s2pu1

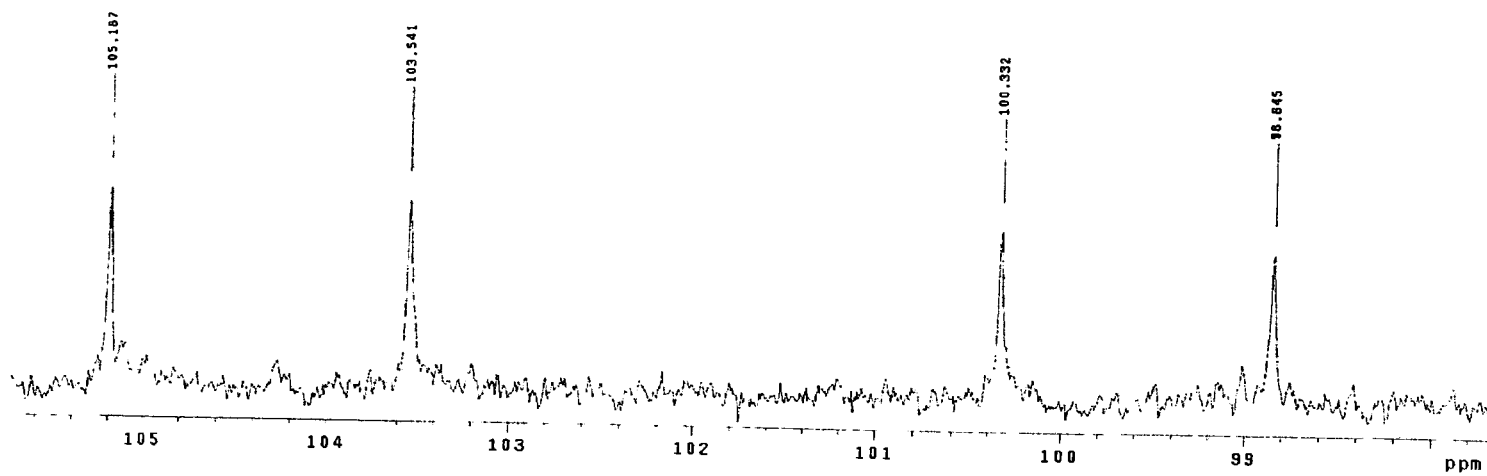


Figura 11. Ampliación de la zona de los carbonos anoméricos.

Los tres monosacáridos adicionales consisten en metilpentosas. Esta afirmación se basa en la observación de tres dobletes en la RMN  $^1\text{H}$  a  $\delta = 1.60$ ,  $1.66$  y  $1.73$  ppm que se atribuyen a las señales de los metilos de esas unidades. Los singuletes anchos en  $\delta = 5.58$  y  $5.53$  ppm (Figura 6, Resultados) corresponden evidentemente a las señales de los protones anoméricos de dos unidades de ramnosa (Bah y Pereda-Miranda, 1996). La naturaleza de la tercera unidad de metilpentosa no se pudo establecer con los datos espectroscópicos preliminares disponibles. Sin embargo, estas evidencias sugieren que el compuesto puede ser un tetrasacárido del ácido jalapínico (ácido 11S-11-hidroxihexadecanoico). La presencia de este ácido graso se corrobora mediante la observación de un carbonilo en  $\delta = 172.8$  ppm (Figura 6, Resultados). Asimismo, para el carbono de la posición 2 (Jal-2) y 16 (Jal-16) del jalapinolato, se observan las señales distintivas a  $\delta = 34.9$  y  $14.7$  ppm, respectivamente. También en el espectro RMN  $^1\text{H}$  se identifican algunas de las señales distintivas del ácido jalapínico, entre ellas, las que se encuentran en  $\delta = 3.85$  ppm (Jal-11),  $3.02$  (Jal-2a; dd,  $J = 6.8$  y  $16.8$  Hz) y  $2.47$  ppm (Jal-2b) y a  $\delta = 0.85$  ppm (Jal-16) (Figura 5, Resultados). Finalmente, la señal del carbono C-11 de este ácido se localiza en  $\delta 81.2$  ppm. Es importante mencionar que el ácido jalapínico ha sido el único involucrado para la formación de las macrolactonas en esta especie.

En la región de los carbonilos, se observan dos señales adicionales en  $\delta = 176.1$  y  $176.3$  ppm (Figura 5, Resultados), que de acuerdo a la literatura (Bah y Pereda-Miranda, 1996), corresponden a los carbonilos de dos ácidos grasos de cadena corta. Esos ácidos grasos consisten en el 2-metilbutanoilo. Esta afirmación se sustenta en la observación de algunas señales características observadas en la región de campo alto del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto It38P4, en particular, dos tripletes en  $\delta = 0.85$  y  $0.93$  ppm (Figura 5, Resultados), que corresponden a dos metilos de igual número de 2-metilbutiroilos. Esas señales se atribuyen a los metilos en la posición 3 de cada uno de esos grupos acilos. Las señales de los metilos en la posición 2 se encuentran situados en  $\delta 1.11$  y  $1.18$  ppm, respectivamente. La presencia de esos dos ácidos grasos se corrobora mediante las señales en  $\delta 41.9$  y  $42.1$  ppm, las cuales corresponden a

esos dos metilos en la posición 2 del 2-metilbutiroilo (Figura 6, Resultados). Las constantes espectroscópicas de este tetrasacárido no coinciden con ninguno de los descritos en la especie. Por lo tanto, debe ser de estructura novedosa en la misma. Una purificación adicional de este componente y el registro de sus espectros de RMN uni y bidimensionales homo y heteronucleares permitirán completar la elucidación de su estructura.

Pico con el  $t_R$  de 10.17 min

El componente con el tiempo de retención de 10.17 min (It38P5) (33.14 mg) muestra claramente estar constituido por la mezcla de dos componentes, dado que en la región de los anoméricos en el espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  se observan 4 pares de señales entre 98 y 106 ppm (Figura 12), reflejando una proporción relativa aproximada de 1:1.5. Ese patrón se extiende por todo el espectro. Un intento para resolver la mezcla mediante la técnica de reciclaje fue infructuoso. Eso hace pensar que esa mezcla binaria está integrada por dos isómeros que no se pudieron separar aún con el empleo de la técnica de reciclaje en una columna quiral (Symmetry C-18).

USA1  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
13C 75 MHz  
Ref. Piridina 150.4 ppm  
300-1  
rdm

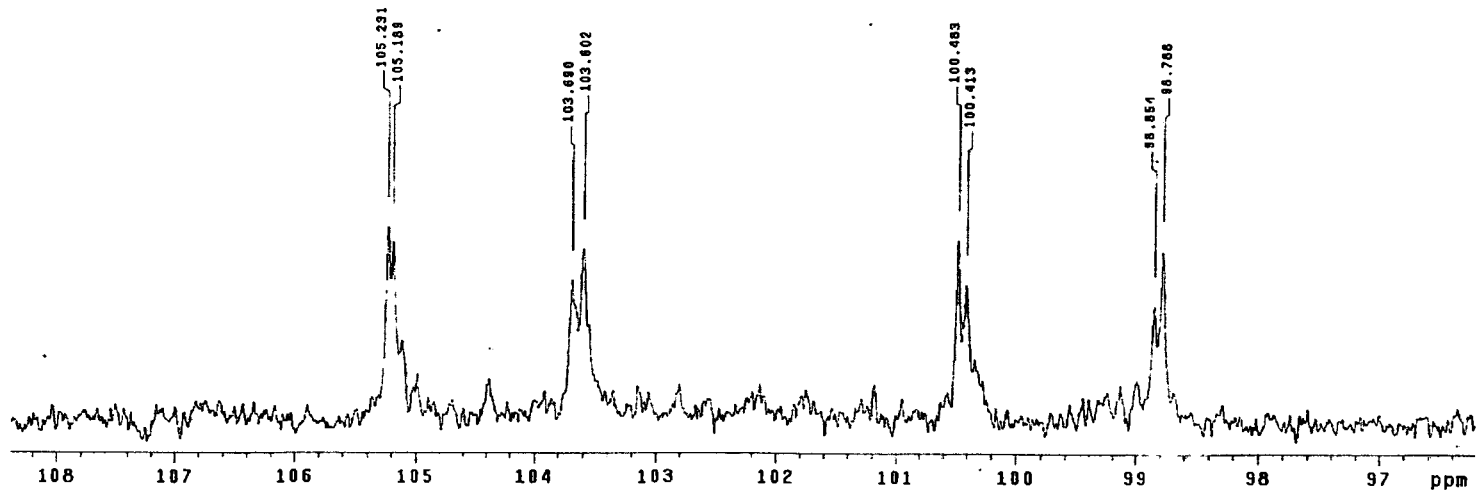


Figura 12. Región de los carbonos anoméricos del compuesto It38P5.

Pico con el  $t_R$  de 11.59 min

El pico con el  $t_R$  de 11.59 min (clave: It38P6) mostró dobletes en  $\delta = 5.19$  ( $J = 7.6$  Hz), 4.85 ( $J = 7.6$  Hz) y 4.72 ( $J = 7.6$  Hz) ppm, que corresponden a protones anoméricos (Figura 13). Esto supondría un trisacárido. Sin embargo, la observación de dos tripletes casi sobrepuestos a campo bajo en  $\delta = 5.80$  ppm ( $J = 9$  Hz) (Figura 13), sugiere dos sitios de acilación. Dado que no se detecta la presencia de ningún residuo de ácido adicional de cadena corta en los espectros de ese componente entre  $\delta = 2$  y 2.5 ppm, esta observación sugiere la presencia de dos ácidos jalapinólicos, lo cual hace pensar en la naturaleza dimérica de este constituyente. Esta hipótesis se refuerza con el espectro de masas obtenido para este compuesto mediante la técnica de bombardeo rápido de átomos en la modalidad de FAB negativo. Ese espectro fue de suma importancia para determinar el tamaño de la molécula natural, ya que mostró un ión quasi-molecular a  $m/z$  1415 ( $M - 1$ ) (Figura 14), permitiendo calcular la fórmula molecular  $C_{68}H_{120}O_{30}$  (PM = 1416). En ese espectro de masas, los picos de  $m/z$  707 y 725 corresponden a los fragmentos producidos por la ruptura del dímero alrededor del oxígeno del carboxilato que une a los dos monómeros. Dados los antecedentes químicos de esta especie, se comparó el conjunto de los espectros de RMN  $^1H$  y de  $^{13}C$  de este componente It38P6 con los reportados en trabajos anteriores al presente. Se observó que esos espectros coinciden exactamente con los de la tricolorina I (Cuadro 2), un hexasacárido aislado en trabajos anteriores (Bah y Pereda-Miranda 1997). Vale mencionar que la tricolorina I consistió en un dímero integrado por una unidad de la tricolorina F y otra del ácido glicosídico de ésta (ácido tricolórico C) (Figura 15).

USAI  
06/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Manuel Fragoso  
It38P6 / C5D5N  
1H 400 MHz  
Ref. Piridino 8.73 ppm  
400  
rdm

Pulse Sequence: s2pul

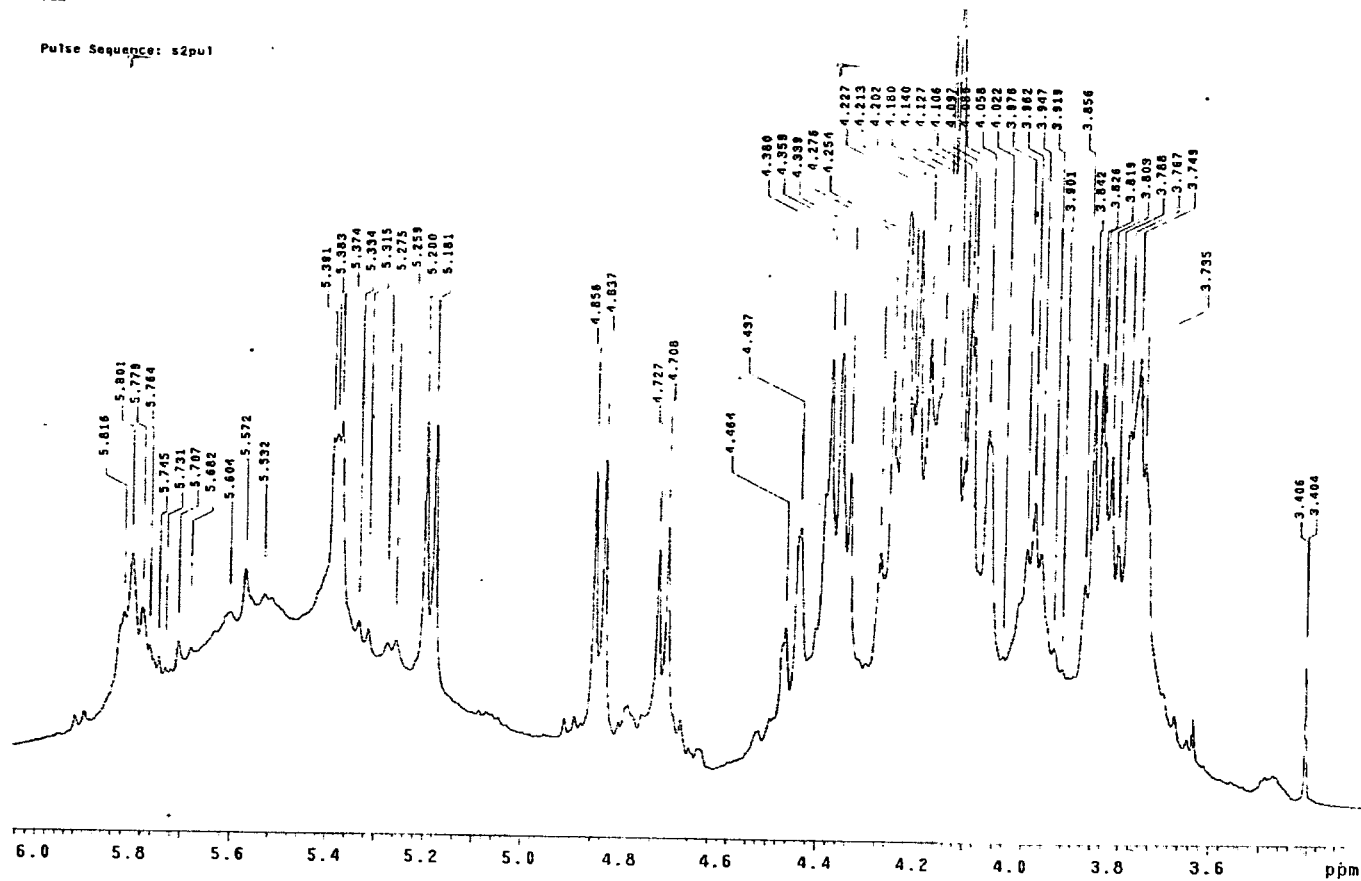


Figura 13. Ampliación de la región de los protones anoméricos del compuesto It38P6.

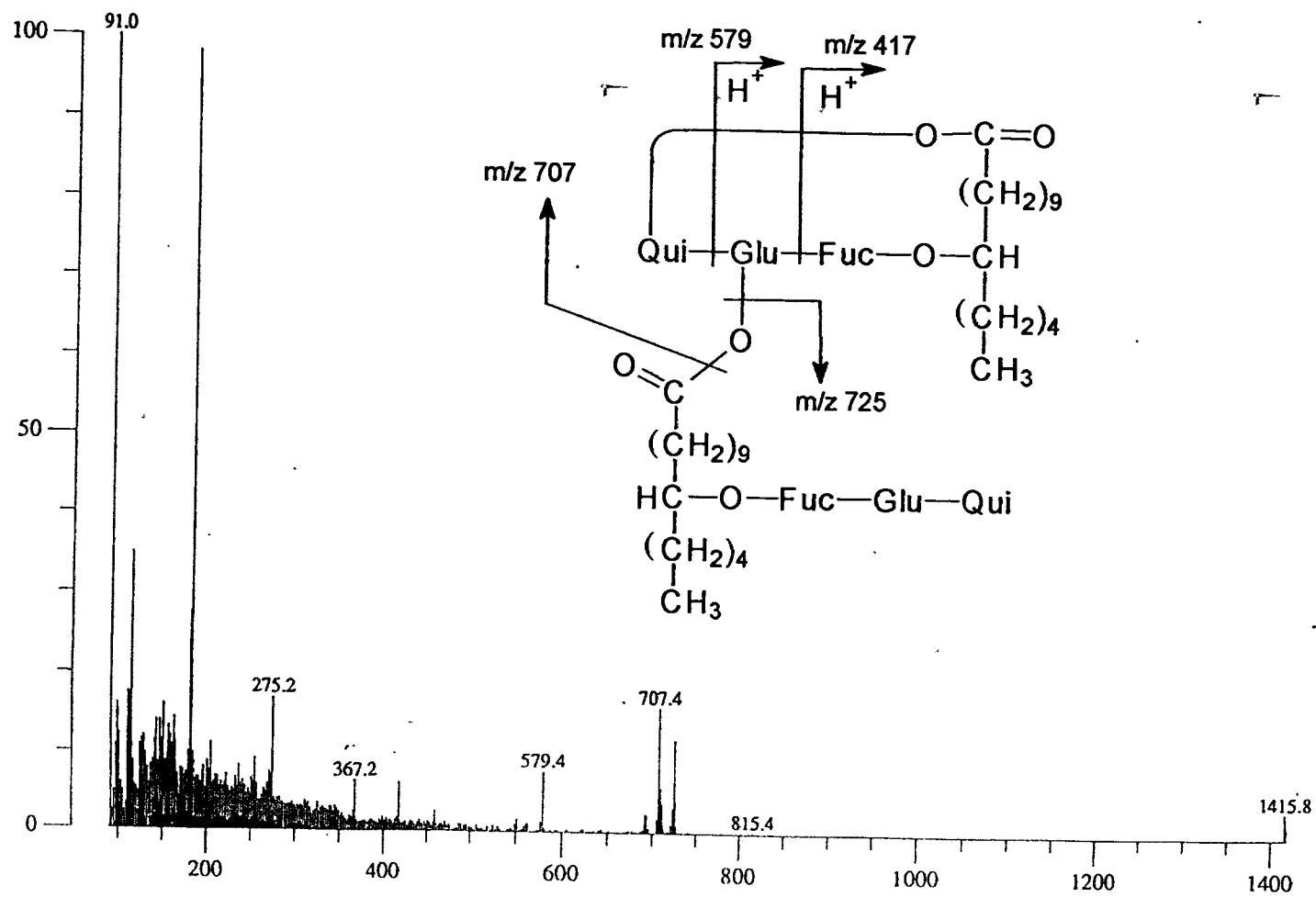


Figura 14. Espectro de masas de baja resolución modalidad FAB negativo del componente It38P6.

Cuadro 2. Datos espectroscópicos comparativos en la RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto It38P6 y la tricolorina I ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz).

It38P6		Tricolorina I	
$^1\text{H}$ (400 MHz) <sup>1</sup>	$^{13}\text{C}$ (100 MHz)	$^1\text{H}$ (500 MHz)	$^{13}\text{C}$ (125.7 MHz)
5.80 dd (8.8, 8.8 Hz)	173.1	5.76 dd (9.6, 9.6 Hz)	172.9
5.33 d (7.6 Hz)	172.7	5.53 d (7.5 Hz)	172.8 (2 x C=O),
5.19 d (7.6 Hz)	106.1	5.33 d (7.5 Hz)	106.1
4.85 d (7.6 Hz)	103.7	4.81 d (7.5 Hz)	103.7
4.72 d (7.6 Hz)	103.0	4.69 d (7.5 Hz)	103.0
4.45 da (10.8 Hz)	101.5	4.42 da (11.5 Hz)	101.6
2.68 m	84.7	2.66 m	84.8
2.57 m	82.7	2.56 m	82.6
2.40-2.34 m	81.2	2.36-2.34 m	81.3
1.73 d (6.0 Hz)	78.7	1.70 d (6.0 Hz)	78.8
1.57 d (6.0 Hz)	78.0	1.54 d (6.4 Hz)	78.0
0.86 t (6.8 Hz);	77.7	0.84 t (7.0 Hz)	77.6
	77.5		77.5
	76.3		76.3
	75.7		75.7
	74.9		75.1
	74.1		74.1
	73.7		73.7
	72.0		72.0
	71.4		71.5
	71.1		71.1
	62.6		62.7
	35.0		35.0
	34.7		34.7
	34.4		34.4
	32.3		32.3
	30.1		30.1
	29.8		29.8
	29.7		29.7
	29.5		29.5
	29.3		29.3
	28.8		28.8
	25.7		25.7
	25.6		25.6
	25.4		25.4
	25.1		25.1

<sup>1</sup>d, doblete; t, triplete, m, multiplete; a, ancho.



Cuadro 2. Datos espectroscópicos comparativos en la RMN  $^1\text{H}$  para el compuesto It38P6 y la tricolorina I ( $\delta$  en ppm,  $J$  en Hz) (continuación).

It38P6		Tricolorina I	
$^1\text{H}$ (400 MHz)	$^{13}\text{C}$ (100 MHz)	$^1\text{H}$ (500 MHz)	$^{13}\text{C}$ (125.7 MHz)
-	22.9	-	22.9
	22.8		22.8
	18.3		18.3
	18.1		18.1
	17.3		17.3
	17.2		17.2
	14.2		14.2
	14.1		14.1

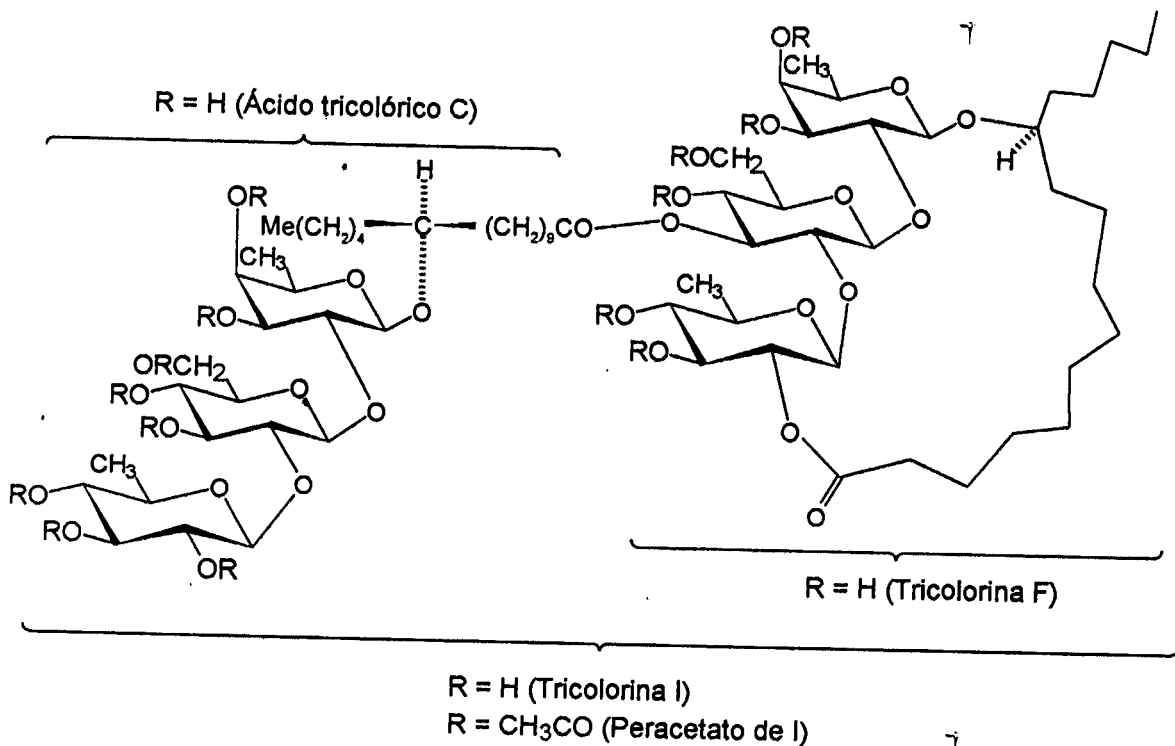


Figura 15. Estructura química de la tricolorina I (It38P6) aislada de la fracción 38-40 de *Ipomoea tricolor*.

Los espectros de RMN de este constituyente natural tuvieron poca resolución y por lo tanto, no permitieron una determinación estructural acertada. Por esa razón, en los estudios anteriores se tuvo que recurrir a la preparación del derivado peracetilado del compuesto para obtener una mayor dispersión de señales (Bah y Pereda-Miranda, 1997). Se obtuvieron los espectros de RMN de este derivado, incluyendo los homonucleares uni y bidimensionales ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY) y los heteronucleares  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  en las modalidades de HETCOR y HMBC. Eso permitió asignar la casi totalidad de los núcleos de  $^1\text{H}$  y de  $^{13}\text{C}$  en este derivado, así como establecer la secuencia de glicosilación y la unión de las dos unidades monoméricas en el compuesto natural. La estructura química del compuesto It38P6 fue establecida como el ácido (11S)-hidroxihexadecanoico 11-O- $\beta$ -D-quinovopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)-O- $\beta$ -D-{3-O-(11S)-hidroxihexadecanoil 11-O- $\beta$ -D-quinovopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)-O- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-fucopiranosido}}-glucopiranosil-(1  $\rightarrow$  2)- $\beta$ -D-fucopiranosido-(1,2''-lactona) (Figura 15).

## VIII. CONCLUSIONES

En la búsqueda de nuevos glicolípidos que enriquezcan el conocimiento del metabolismo secundario de esta planta, el compuesto purificado It38P6 coincidió con la tricolorina I, uno de los metabolitos anteriormente descritos en la especie vegetal. Sin embargo, es muy probable que los isómeros detectados, pero cuya separación en su forma natural fue imposible en el presente trabajo, constituyan nuevas estructuras químicas. Por lo tanto, es conveniente preparar derivados de esta mezcla mediante la saponificación de la misma, su acetilación exhaustiva o su permetilación para caracterizar sus núcleos básicos, aunque eso sacrificaría cualquier evaluación farmacológica de los compuestos naturales.

La fracción metanólica del extracto de *Ipomoea tricolor* contiene algunos isómeros cuya separación en forma natural se ve difícil, aun con el empleo de la técnica de reciclaje en una columna quiral. Eso justifica en parte el escaso progreso registrado en la determinación del perfil químico de especies del género *Ipomoea* a lo largo de varias décadas.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Achnine, L., Pereda-Miranda, R., Iglesias-Prieto, R., Moreno-Sánchez, R., Lotina-Hennsen, B. 1999.** Tricolorin A, a potent natural uncoupler and inhibitor of photosystem II acceptor side of spinach chloroplasts. *Physiologia Plantarum*: Vol. 106: 246-252.
- Aerts, R.J., Snolijer, W., Aerts-Teerlink, O., Van der Meijden, E., Verpoorte, R. 1991.** Control and biological implications of alkaloid synthesis in *Cinchona* seedlings. *Phytochemistry*: Vol. 30: 3571-3577.
- Agrawal, P.K. 1992.** Review Article Number 70. NMR spectroscopy in the structural characterization of oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry*: Vol. 31: 3307-3330.
- Amor-Prats, D., Harborne, J.B. 1993.** Allelochemical effects of ergoline alkaloids from *Ipomoea parasitica* on *Heliothis virescens*. *Chemoecology*: Vol. 41: 55-61.
- Anaya, A.L., Calera, M.R., Mata, R., Pereda-Miranda, R. 1990.** Allelopathic potential of compounds isolated from *Ipomoea tricolor* Cav. (Convolvulaceae). *Journal of Chemical Ecology*: Vol. 16: 2145-2152.
- Anonymous. 1998.** Oligosaccharides. *Carbohydrate Chemistry*: Vol. 30: 62-89.
- Bah, M., Pereda-Miranda, R. 1996.** Detailed FAB-Mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor*. *Tetrahedron*: Vol. 52: 13063-13080.
- Bah, M., Pereda-Miranda, R. 1997.** Isolation and Structural Characterization of New Glycolipid Ester Type Dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*: Vol. 53: 9007-9022.
- Brito-Arias, M., Pereda-Miranda, R., Heathcock, C.H. 2004.** Synthesis of Tricolorin F. *Journal of Organic Chemistry*: Vol. 69: 4567-4570.
- Calera, M.R., Anaya, A.L., Gavilanes-Ruiz, M. 1995.** Effect of phytotoxic resin glycoside on activity of H<sup>+</sup>-ATPase from plasma membrane. *Journal of Chemical Ecology*: Vol. 21: 289-297.

- Castelli, M.V., Cortés, J.C., Escalante, A.M., Bah, M., Pereda-Miranda, R., Ribas, J.C., Zacchino, S.A. 2002.** *In Vitro* inhibition of 1,3- $\beta$ -glucan synthase by glycolipids from Convolvulaceous species. *Planta Medica*: Vol. 68: 739-742.
- Duus, J.Ø., Gottfredsen, C.H., Bock, K. 2000.** Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations. *Chemical Reviews*: Vol. 100: 4589-5614.
- Füerstner, A. 2004.** Total syntheses and biological assessment of macrocyclic glycolipids. *European Journal of Organic Chemistry*: Vol. 5: 943-958.
- Füerstner, A., Müller, T. 1998.** Metathesis Route to Resin Glycosides: Formal Total Synthesis of Tricolorin A. *Journal of Organic Chemistry*: Vol. 63: 424-425.
- Füerstner, A., Müller, T. 1999.** Efficient total syntheses of resin glycosides and analogues by ring-closing olefin metathesis. *Journal of the American Chemical Society*: Vol. 121: 7814-7821.
- Haig, T. 2001.** Application of hyphenated chromatography-mass spectrometry techniques to plant allelopathy research. *Journal of Chemical Ecology*: Vol. 27: 2363-2396.
- Lu, S-F., O'yang, Q-Q., Guo, Z-W., Yu, B., Hui, Y-Z. 1997a.** The first total synthesis of tricolorin A. *Angewandte Chemie, International Edition in English*: Vol. 36: 2344-2346.
- Lu, S-F., O'yang, Q-Q., Guo, Z-W., Yu, B., Hui, Y-Z. 1997b.** Total Synthesis of Tricolorin A. *Journal of Organic Chemistry*: Vol. 62: 8400-8405.
- Lu, S-F., O'yang, Q-Q., Guo, Z-W., Yu, B., Hui, Y-Z. 1998.** Synthesis of propyl O-( $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 3)-[2,4-di-O-(2*s*-methylbutyryl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl]-(1 $\rightarrow$ 2)-(3-O-acetyl- $\beta$ -D-glucopyranosyl)-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fucopyranoside, the tetrasaccharide moiety of Tricolorin A. *Chinese Journal of Chemistry*: Vol. 16: 78-89.
- Mata, R., Pereda-Miranda, R., Lotina-Hennsen, B. 1996.** Natural Products from Mexican Plants as a Source of Potential Herbicide Agents. In *Secondary Metabolites from Mexican Plants: Chemistry and Biological Properties*. Rodríguez-Hann, L., Pandalai, S.G., Eds., Reserach Singpost: Trivandrum, 59-68.

- Nikolov, Z.L., Meagher, M.M., Reilly, P.J.. 1985.** High performance liquid chromatography of disaccharides on amine-bonded silica columns. *Journal of Chromatography*: Vol. 319: 51-57.
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T., Okabe, M. 1987.** Resin glycosides. I. Isolation and structure elucidation of orizabin-I, II, III and IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *Tetrahedron*: Vol. 43: 3889-3902.
- Pereda-Miranda, R., Bah, M. 2003.** Biodynamic constituents in the Mexican morning glories: Purgative remedies transcending boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry*: Vol. 3: 111-131.
- Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A.L., Wickramaratne, D.B., Pezzuto, J.M., Kinghorn, A.D. 1993.** Tricolorin A, major phytochemical inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products*: Vol. 56: 571-582.
- Rencurosi, A., Mitchell, E.P., Ciosi, G., Pérez, S., Pereda-Miranda, R., Imberty, A. 2004.** Crystal structure of tricolorin A: Molecular rationale for the biological properties of resin glycosides found in some Mexican herbal remedies. *Angewandte Chemie International Edition*: Vol. 43: 2-6.
- Vyvyan, J.R. 2002.** Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals. *Tetrahedron*: Vol. 58: 1631-1646.
- Wagner, H. 1973.** The Chemistry of Resin Glycosides of the Convolvulaceae Family. In *Medicine and Natural Sciences. Chemistry in Botanical Classification*. Bendz, G., Santensson, J. Eds., Academic Press: New York, 235-240.

7

ANEXO:

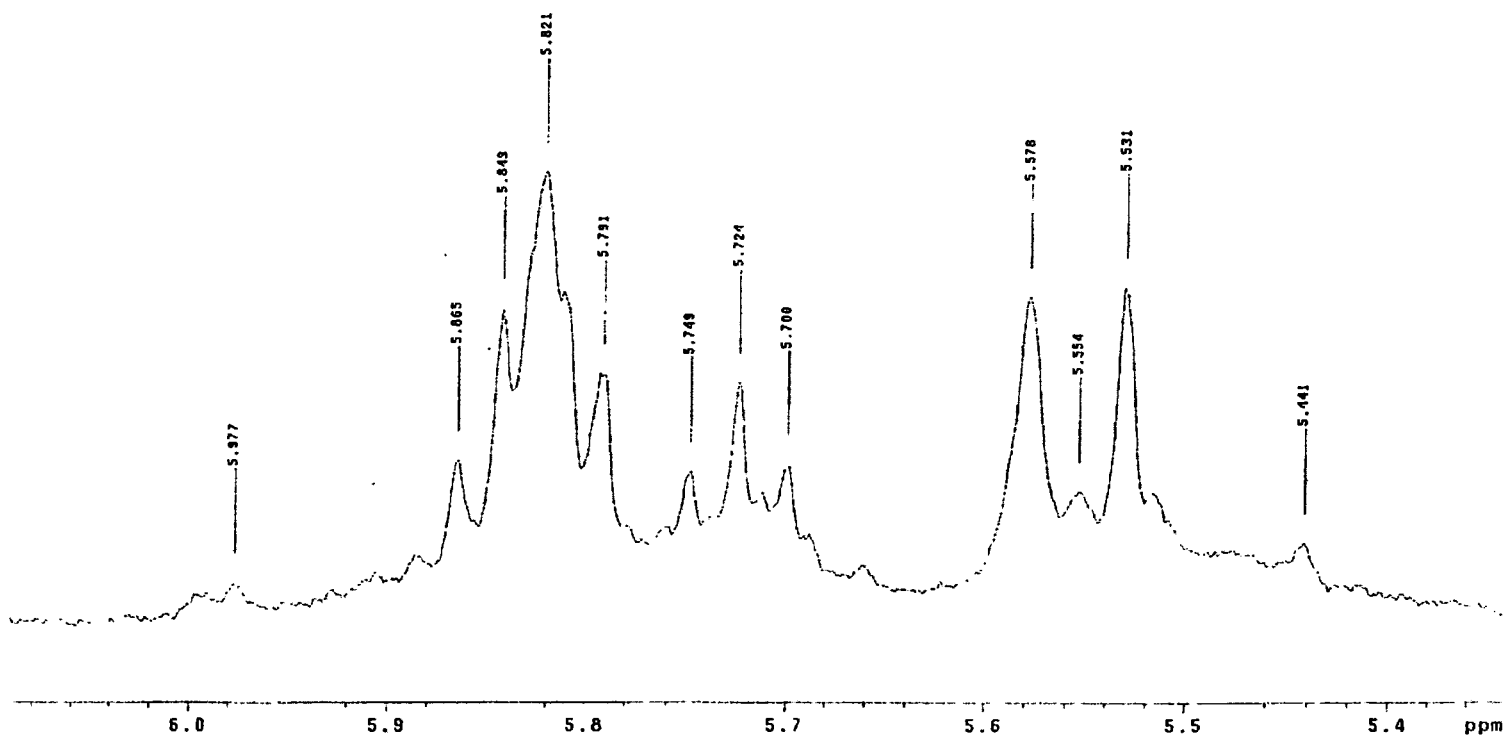
7

7



USAI  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Nabel Fragoso  
It38P4 / Piridina  
1H 400 MHz  
Ref. Piridina 8.7 ppm  
400  
n1b

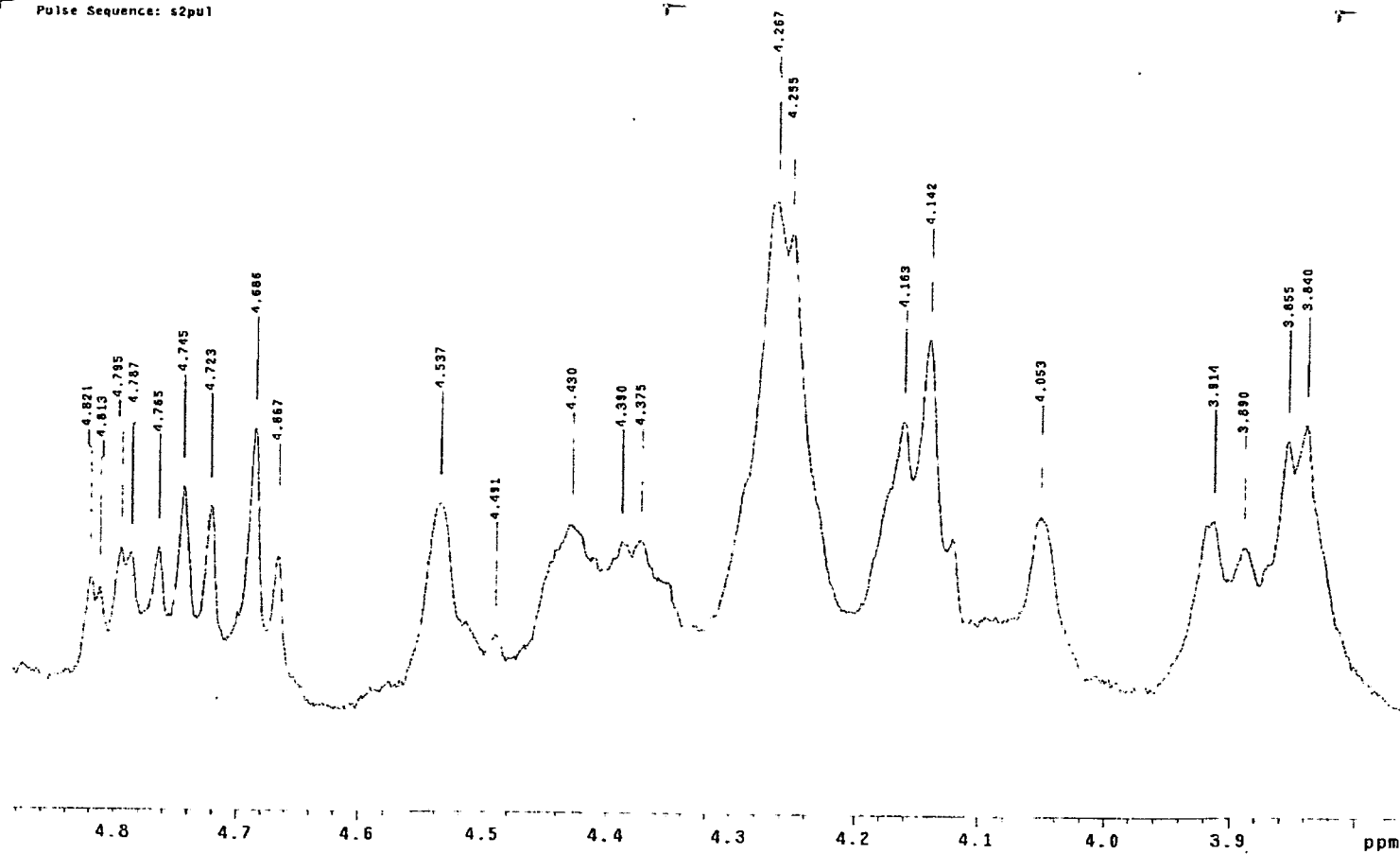
Pulse Sequence: s2pu1



Ampliación del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del componente It38P4 en la región de los protones anoméricos.

USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P4 / Piridina  
1H 400 MHz  
Ref. Piridina 8.7 ppm  
400  
nib

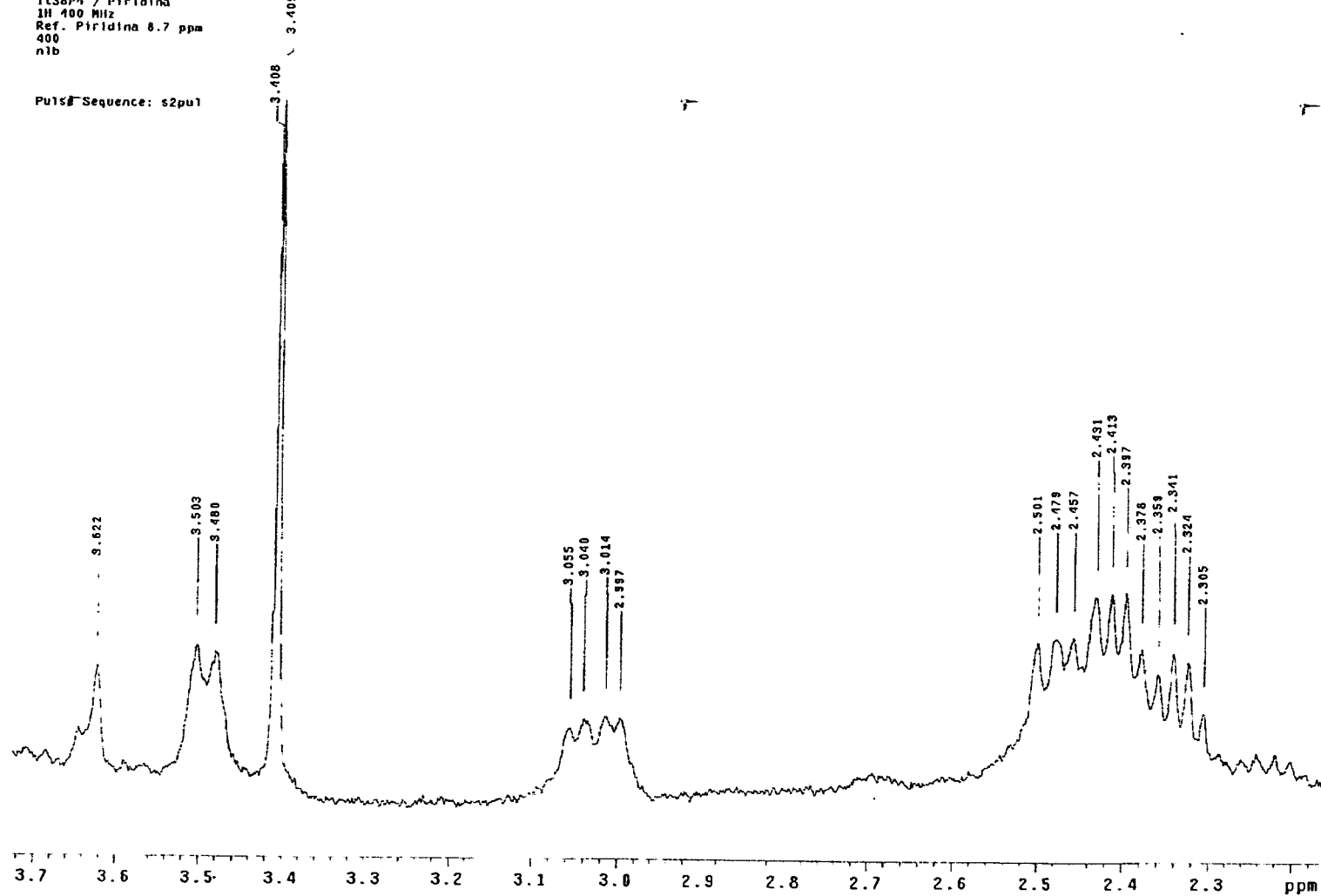
Pulse Sequence: s2pu1



Ampliación de una región de campo bajo del espectro de RMN <sup>1</sup>H del componente It38P4.

USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragozo  
It38P4 / Piridina  
1H 400 MHz  
Ref. Piridina 8.7 ppa  
400  
n1b

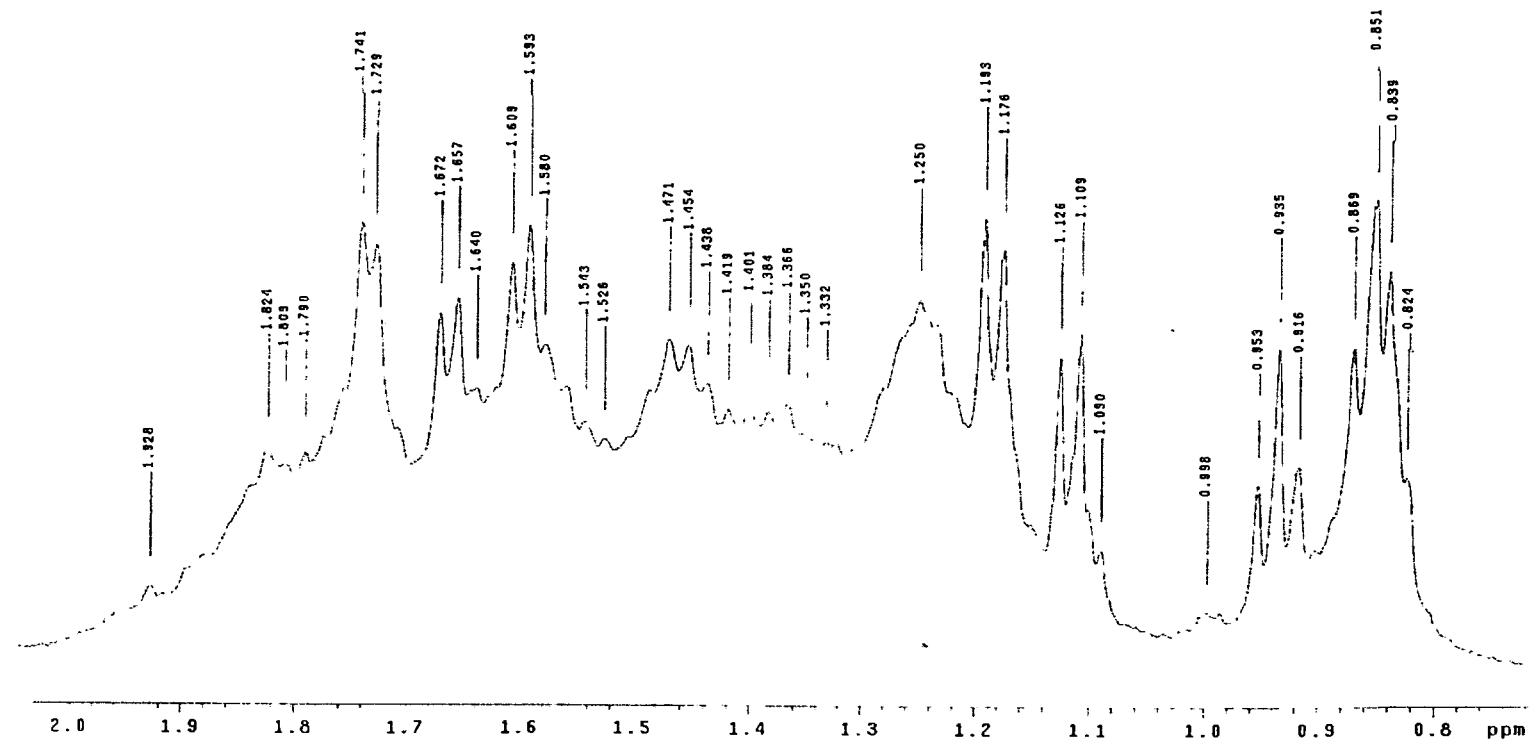
Pulse Sequence: s2pu1



Ampliación de una región de campo alto del espectro de RMN <sup>1</sup>H del componente It38P4.

USAI  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Tragos  
It38P4 / Piridina  
1H 400 MHz  
Ref. Piridina 8.7 ppm  
400  
n1b

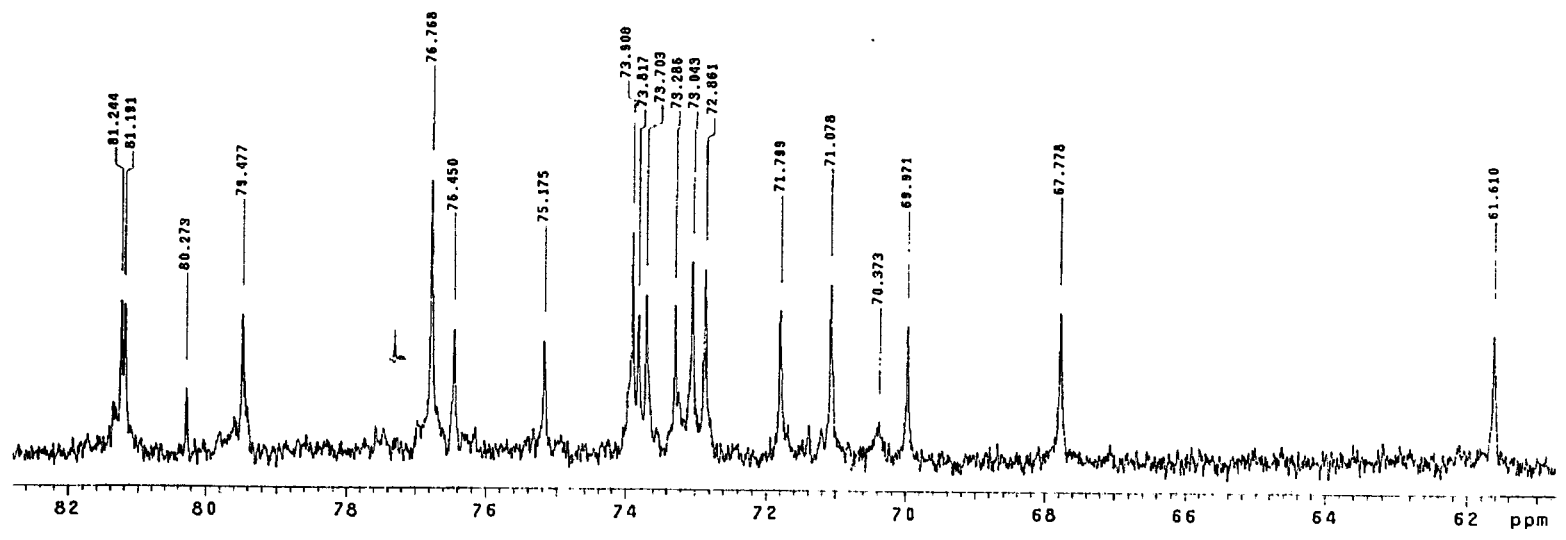
Pulse Sequence: s2pul



Ampliación de una región de campo alto del espectro de RMN <sup>1</sup>H del componente It38P4.

USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P4 / Piridina  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 150 ppm  
400  
nib

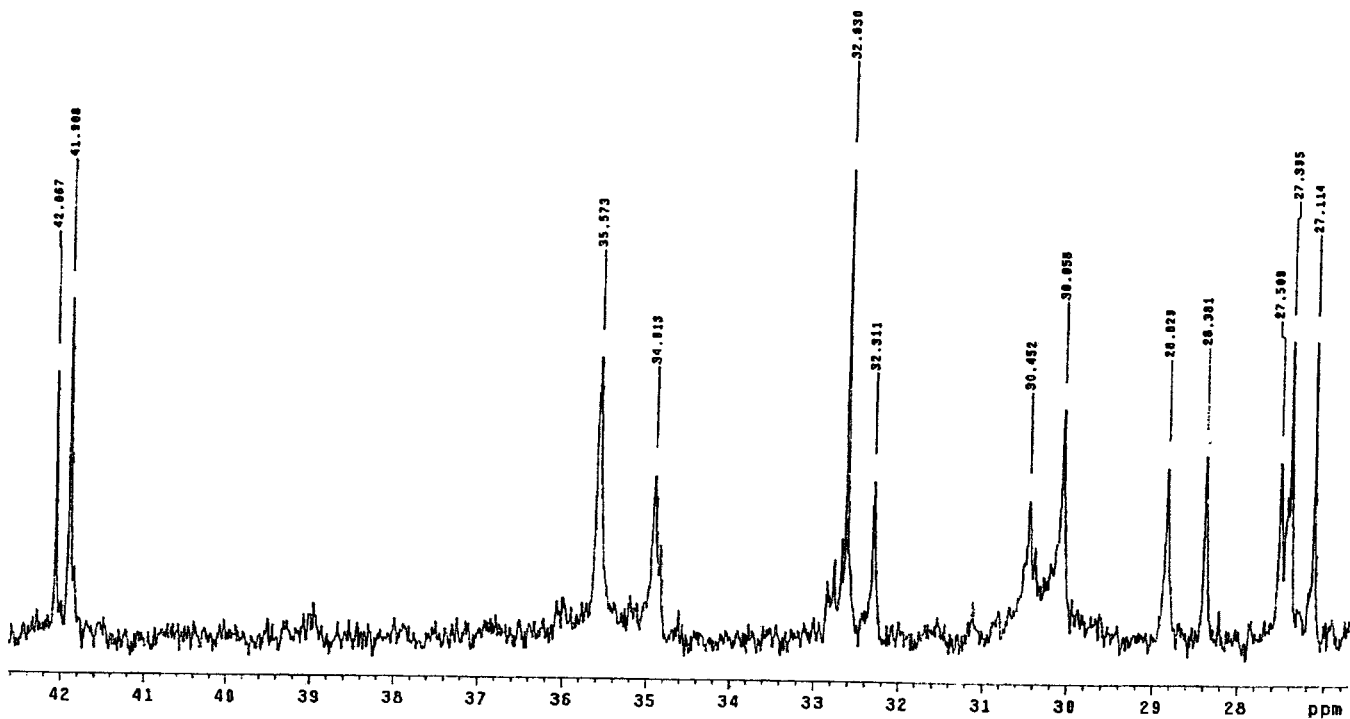
Pulse Sequence: s2pu1



Porción de los metinos no anoméricos del pico It38P4.

USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P4 / Piridina  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 150 ppm  
400  
n1b

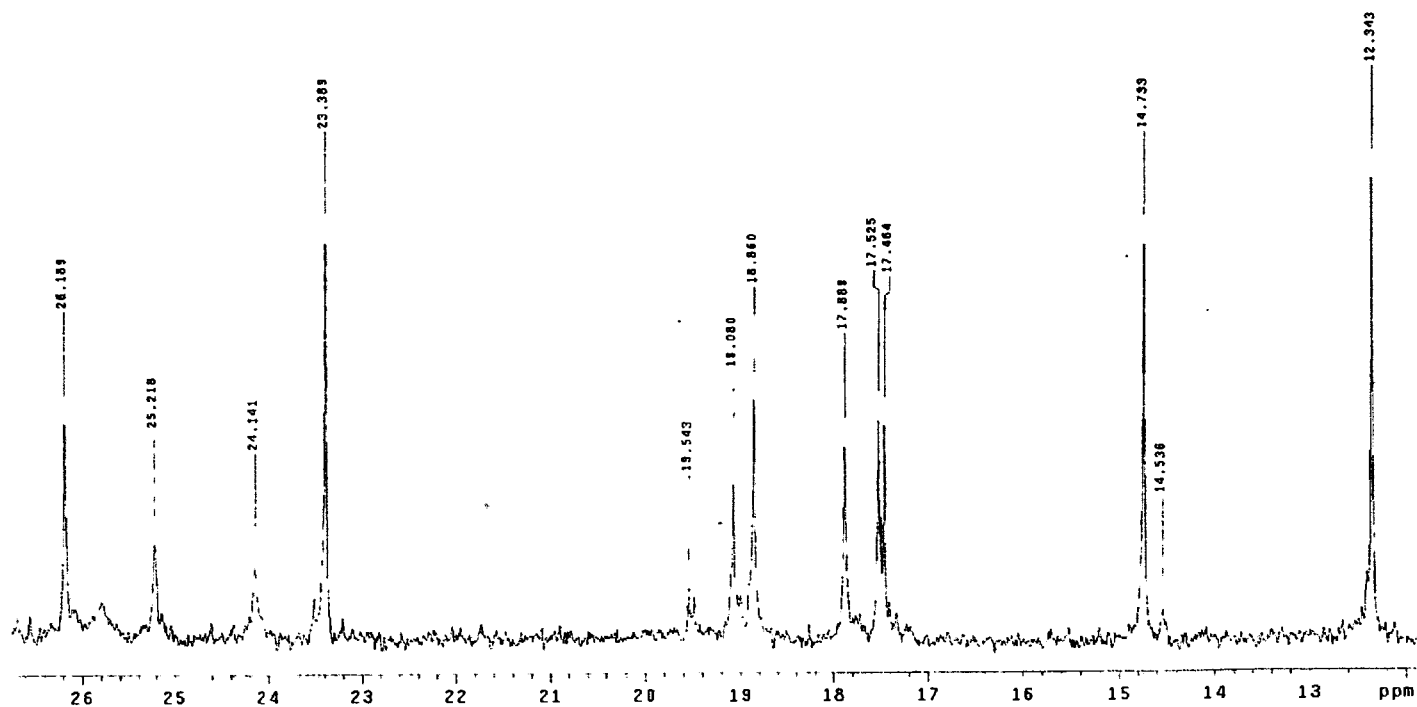
Pulse Sequence: s2pu1



Ampliación de una región del espectro de  $^{13}\text{C}$  de It38P4.

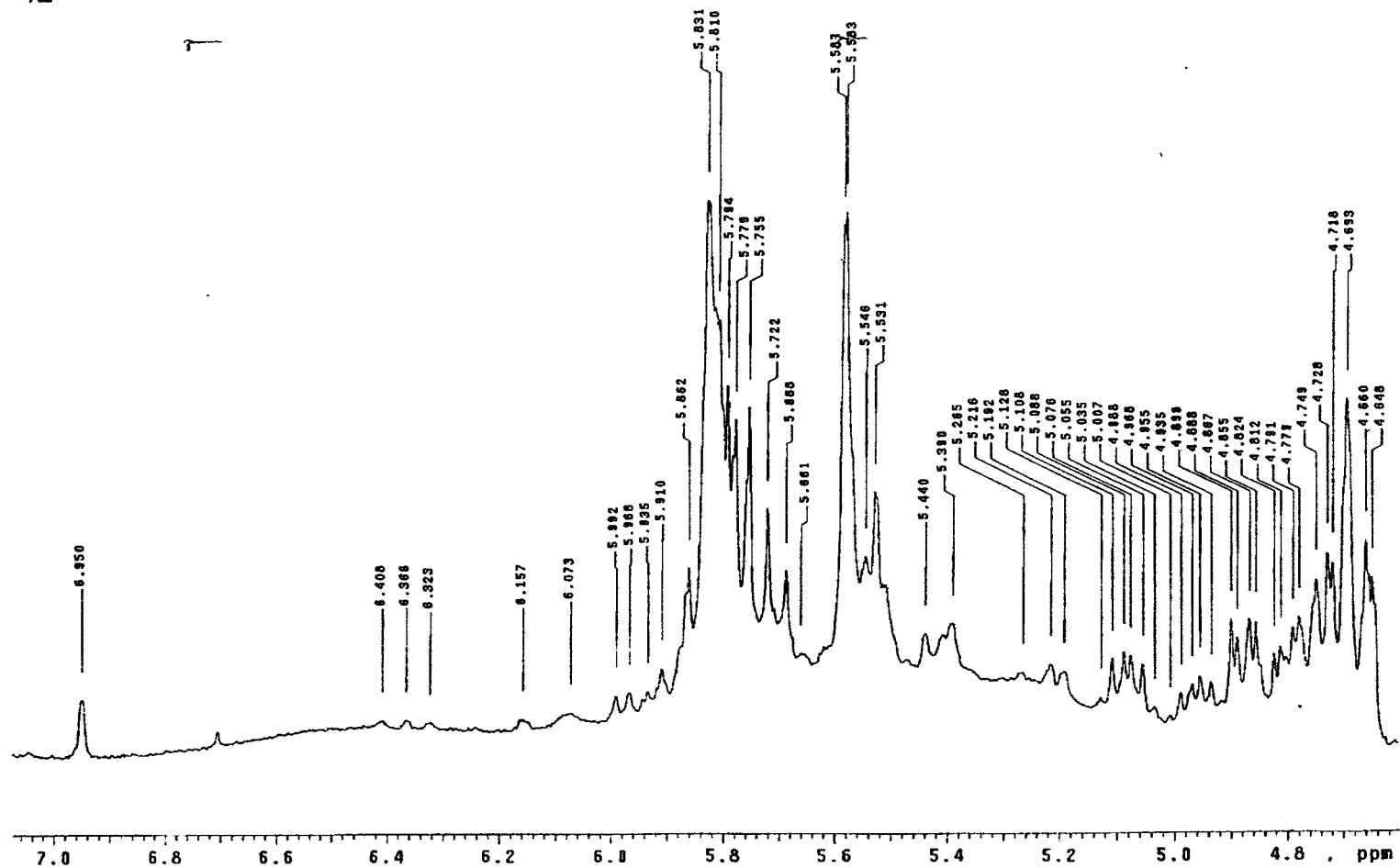
USA1  
14/mayo/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
I138P4 / Piridina  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 150 ppm  
400  
n1b

Pulse Sequence: s2pu1



Ampliación de la región de campo alto del espectro de <sup>13</sup>C de I138P4.

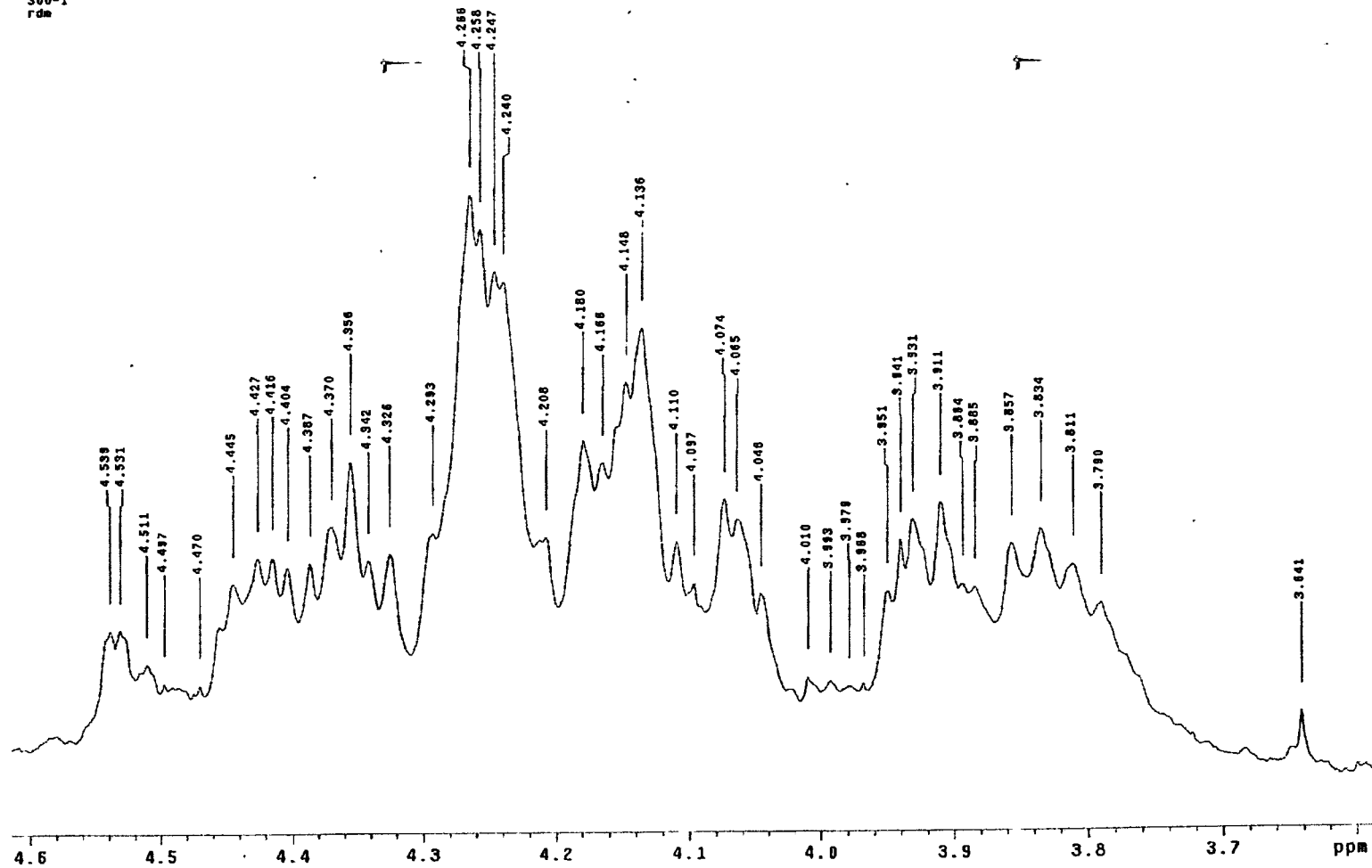
USA1  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
1H 300 MHz  
Ref. Piridina 0.74 ppm  
300-1  
rdm



Ampliación de una región de campo bajo del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del componente It38P5.

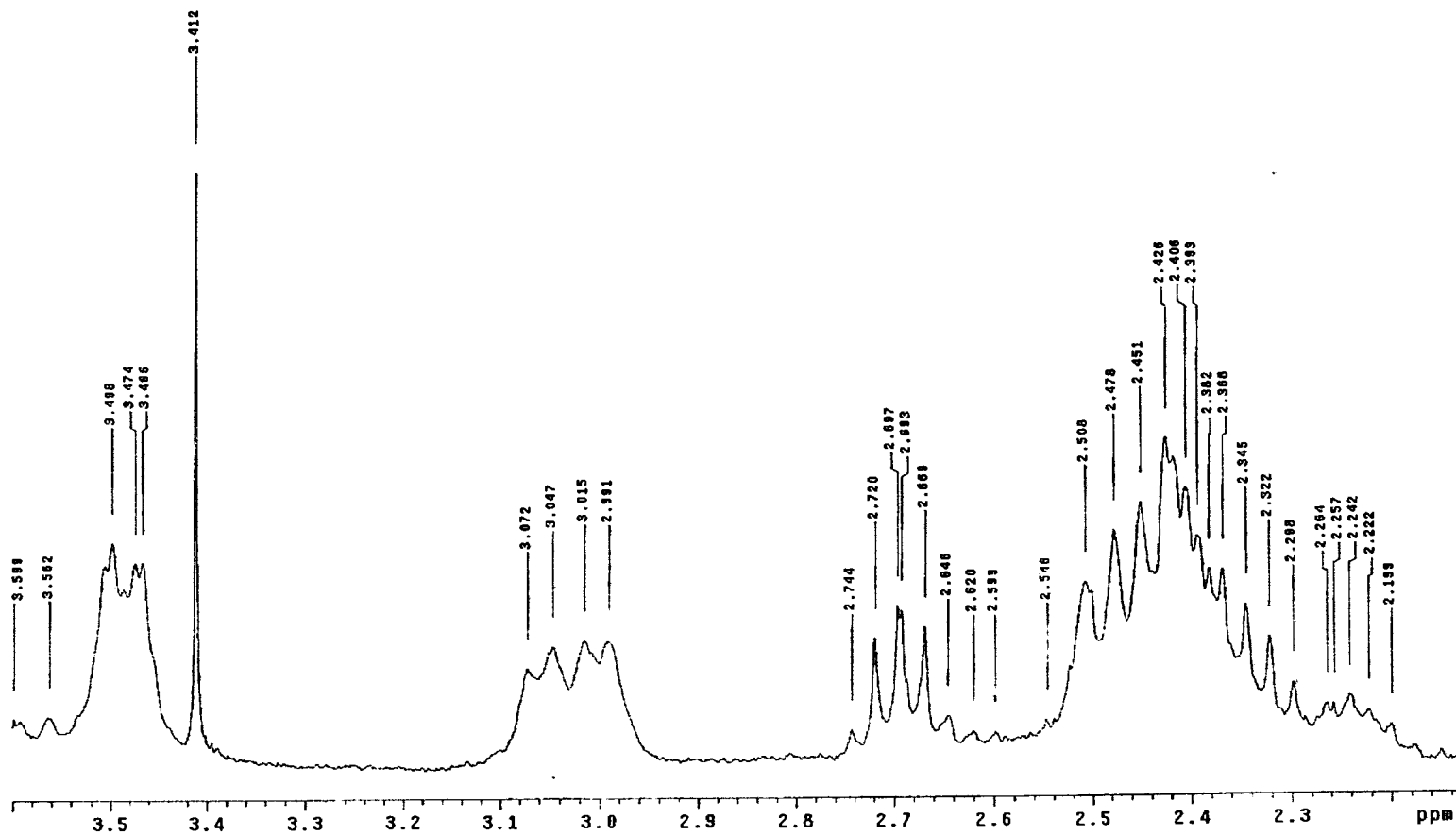


USAI  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
1H 300 MHz  
Ref. Piridina 8.74 ppm  
300-1  
rdm



Ampliación de una región del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del componente It38P5.

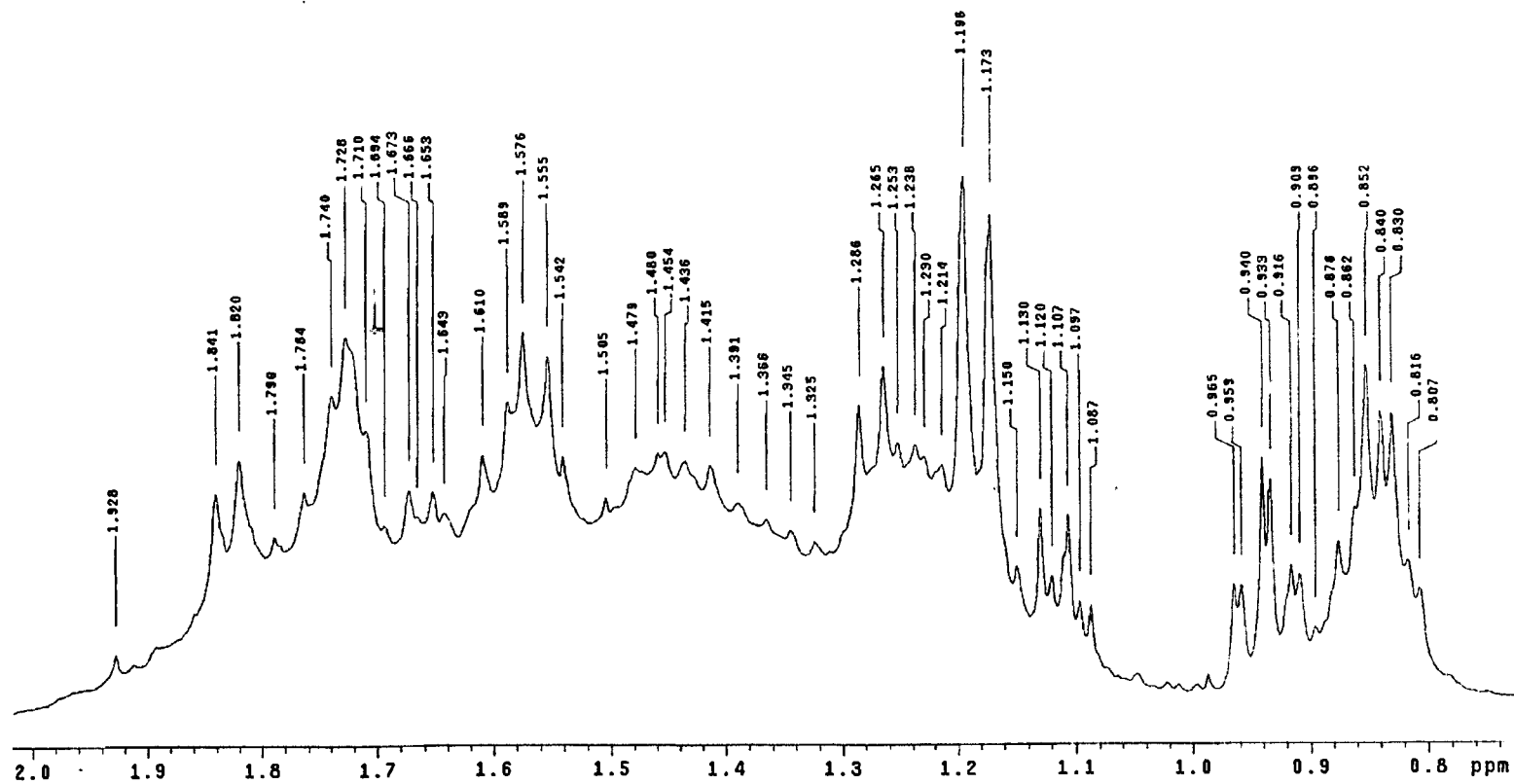
USA1  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
1H 300 MHz  
Ref. Piridina 6.74 ppm  
300-1  
rdm



Ampliación de una región del espectro de RMN  $^1\text{H}$  del componente It38P5.

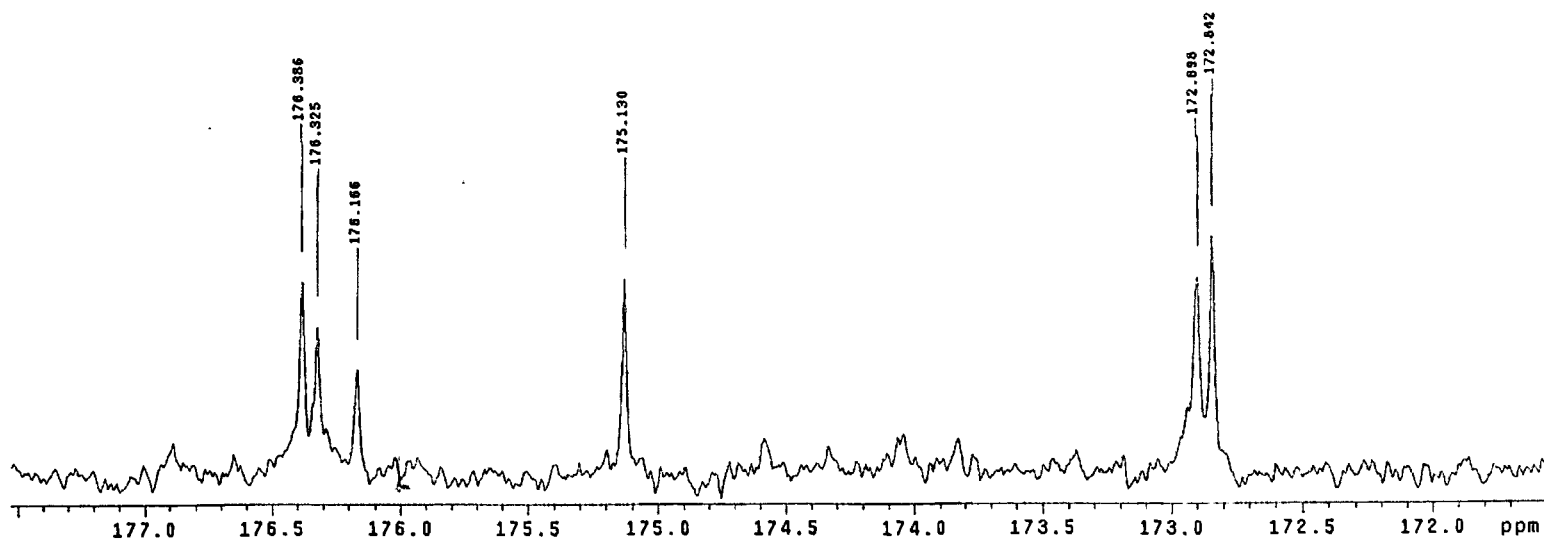
USAI  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
1H 300 MHz  
Ref. Piridina 8.74 ppm  
300-1  
rda

53



Ampliación de la región de campo alto del espectro de RMN <sup>1</sup>H del componente It38P5.

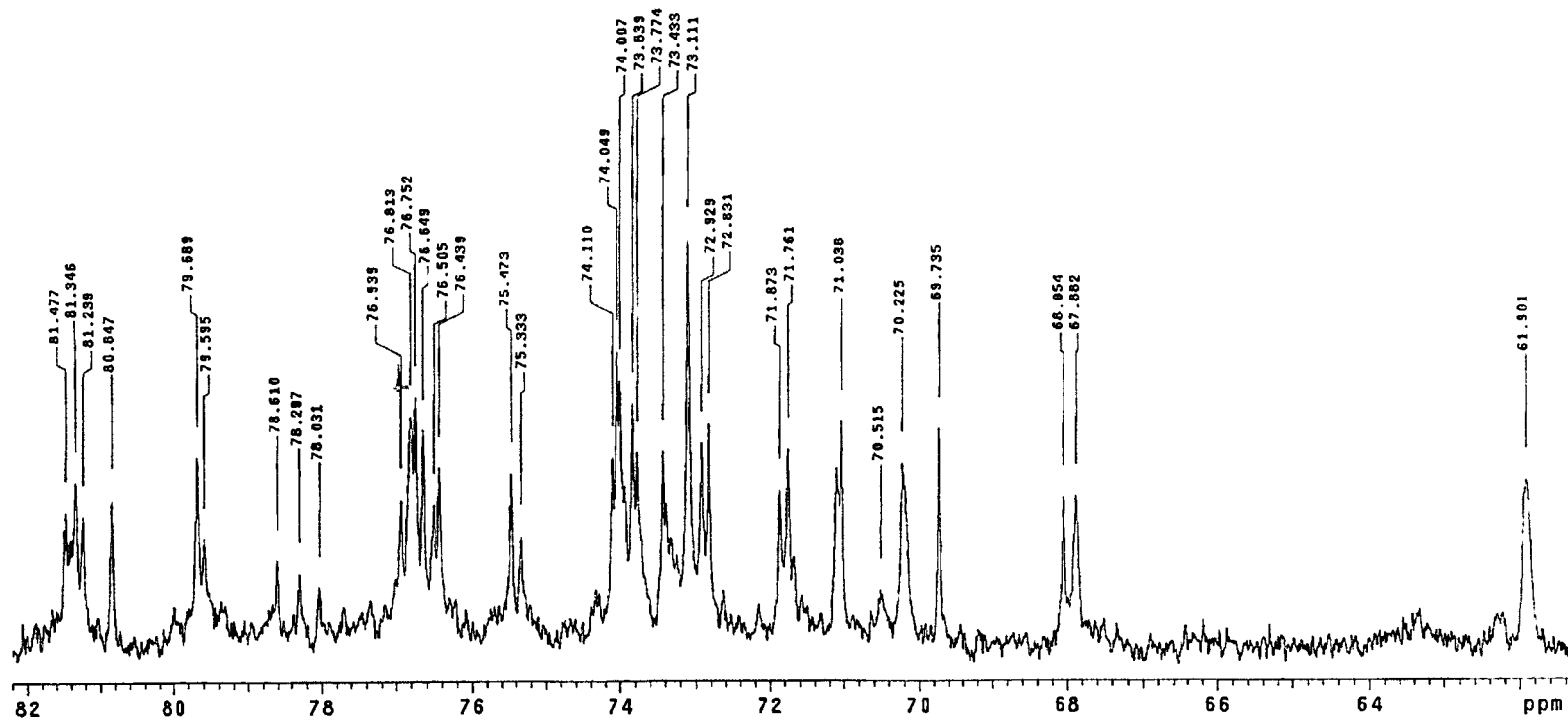
USA1  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Parada / MAbel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
13C 75 MHz  
Ref. Piridina 150.4 ppm  
300-1  
rdm



Región de los carbonilos del compuesto It38P5.

USA1  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
13C 75 MHz  
Ref. Piridina 150.4 ppm  
300-1  
rdm

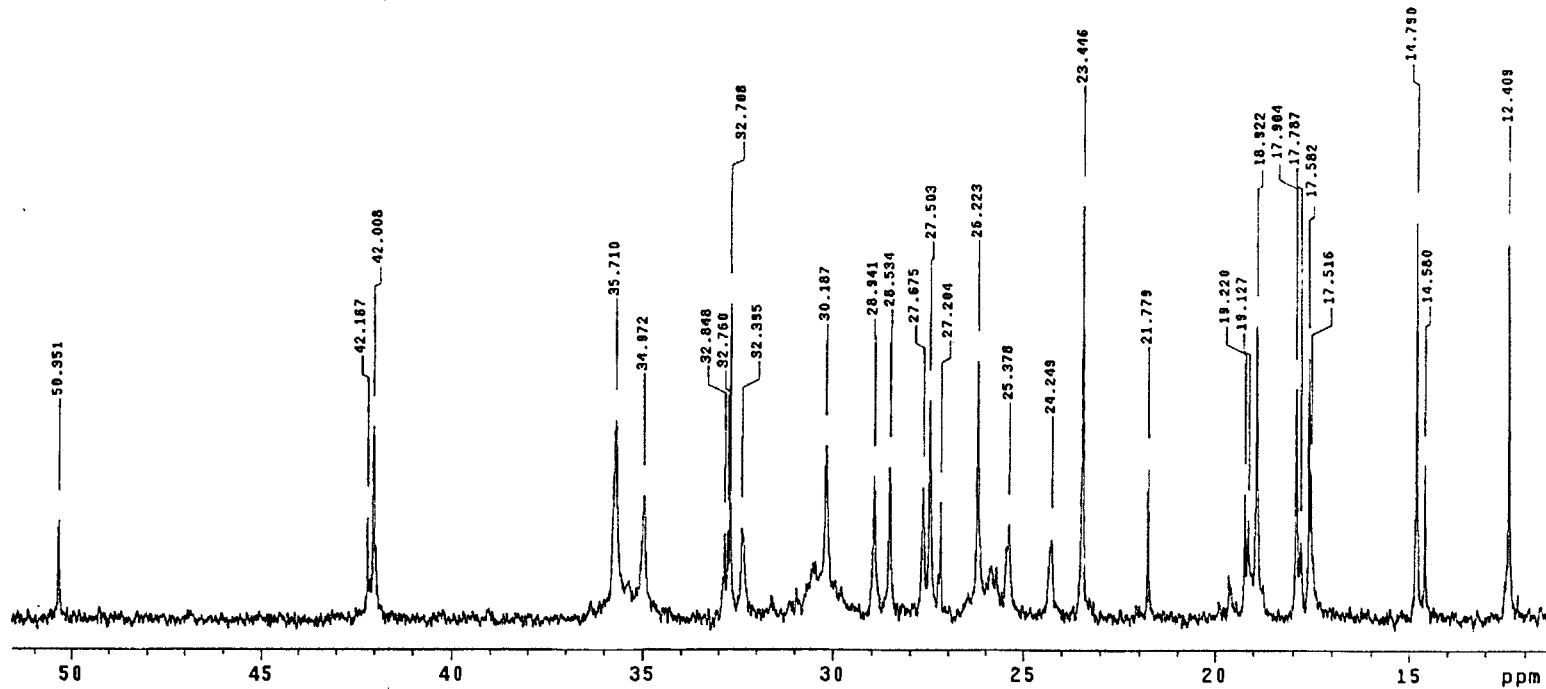
55



Región de los metinos no anoméricos del compuesto It38P5.

USAI  
11/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / MAbel Fragoso  
It38P5 / Piridina d-5  
13C 75 MHz  
Ref. Piridina 150.4 ppm  
300-1  
rda

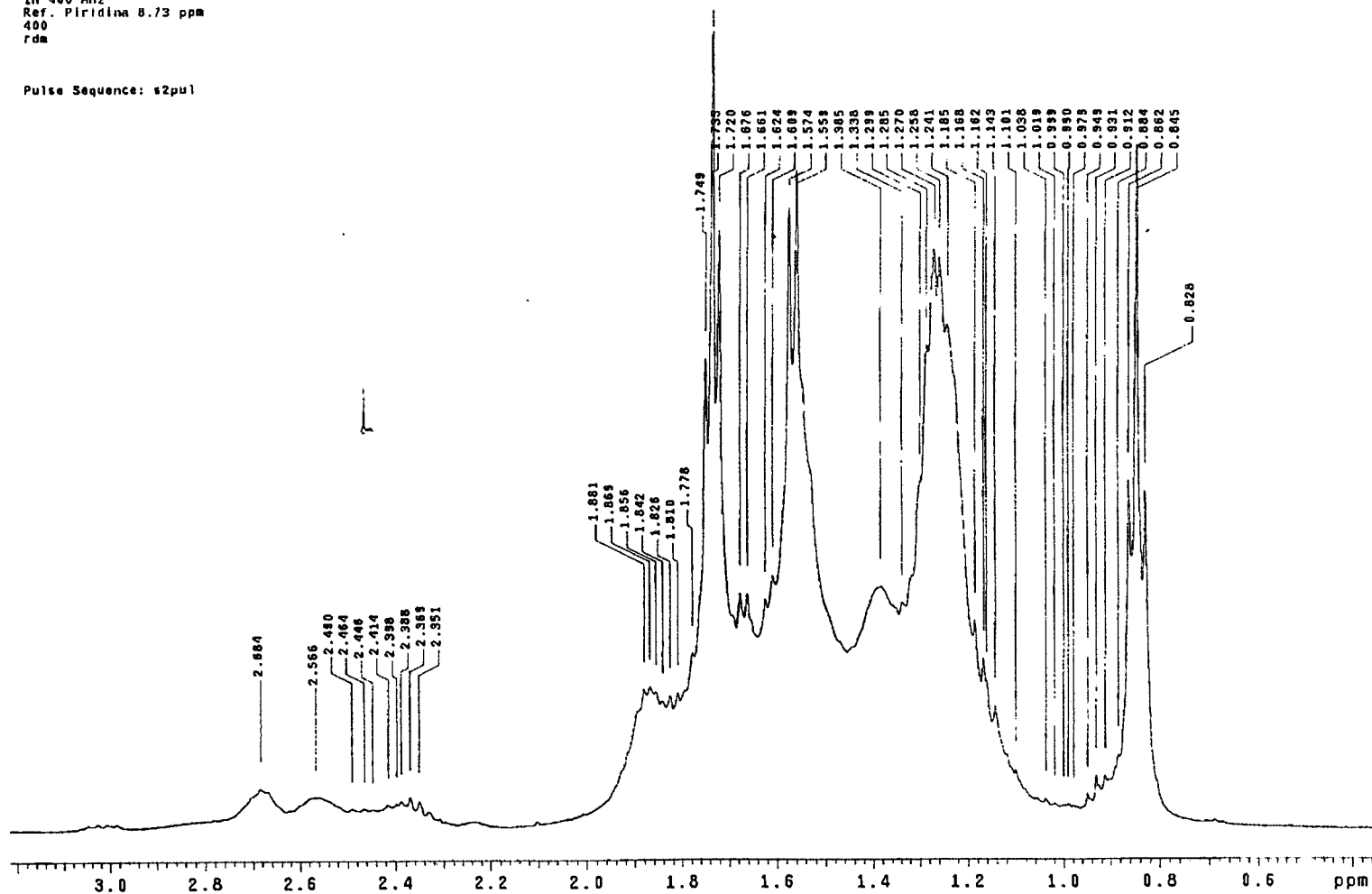
99



Región de campo alto del compuesto It38P5.

USA1  
06/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Perada / Mabel Fragoso  
It38P6 / C505N  
1H 400 MHz  
Ref. Piridina 8.73 ppm  
400  
rdm

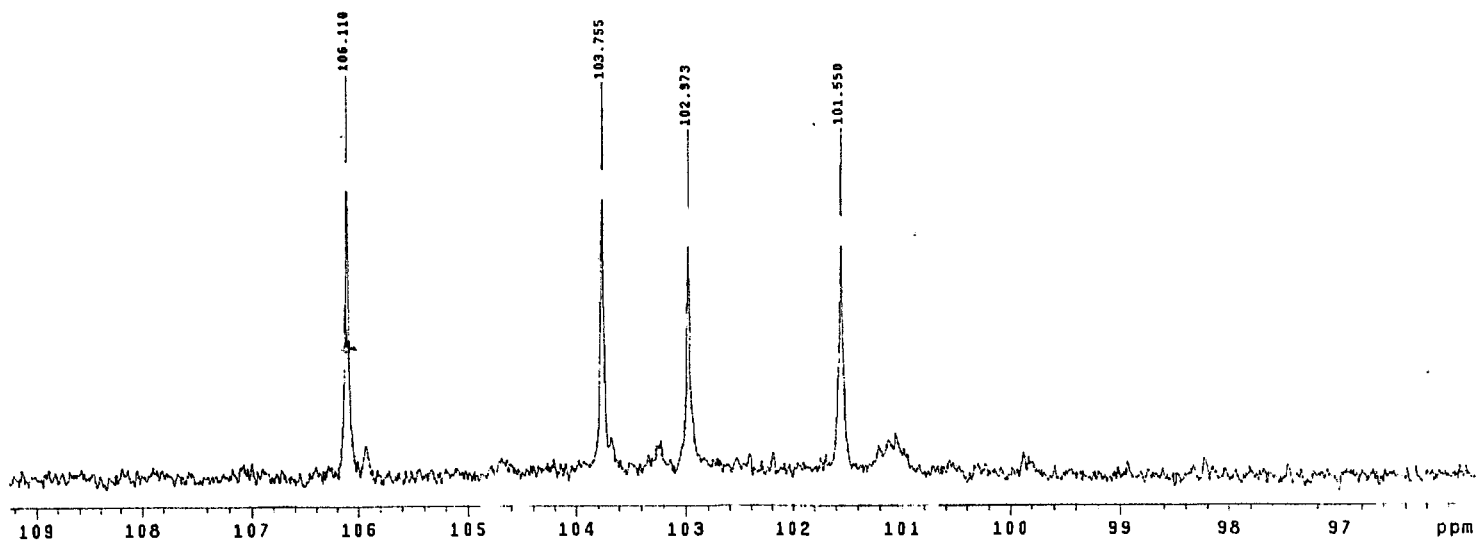
Pulse Sequence: s2pu1



Región de los metilos del espectro de RMN <sup>1</sup>H del componente It38P6.

USAI  
06/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Nabel Fraquoso  
It38P6 / C5D5N  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 135.5 ppm  
400  
rdm

Pulse Sequence: s2pul

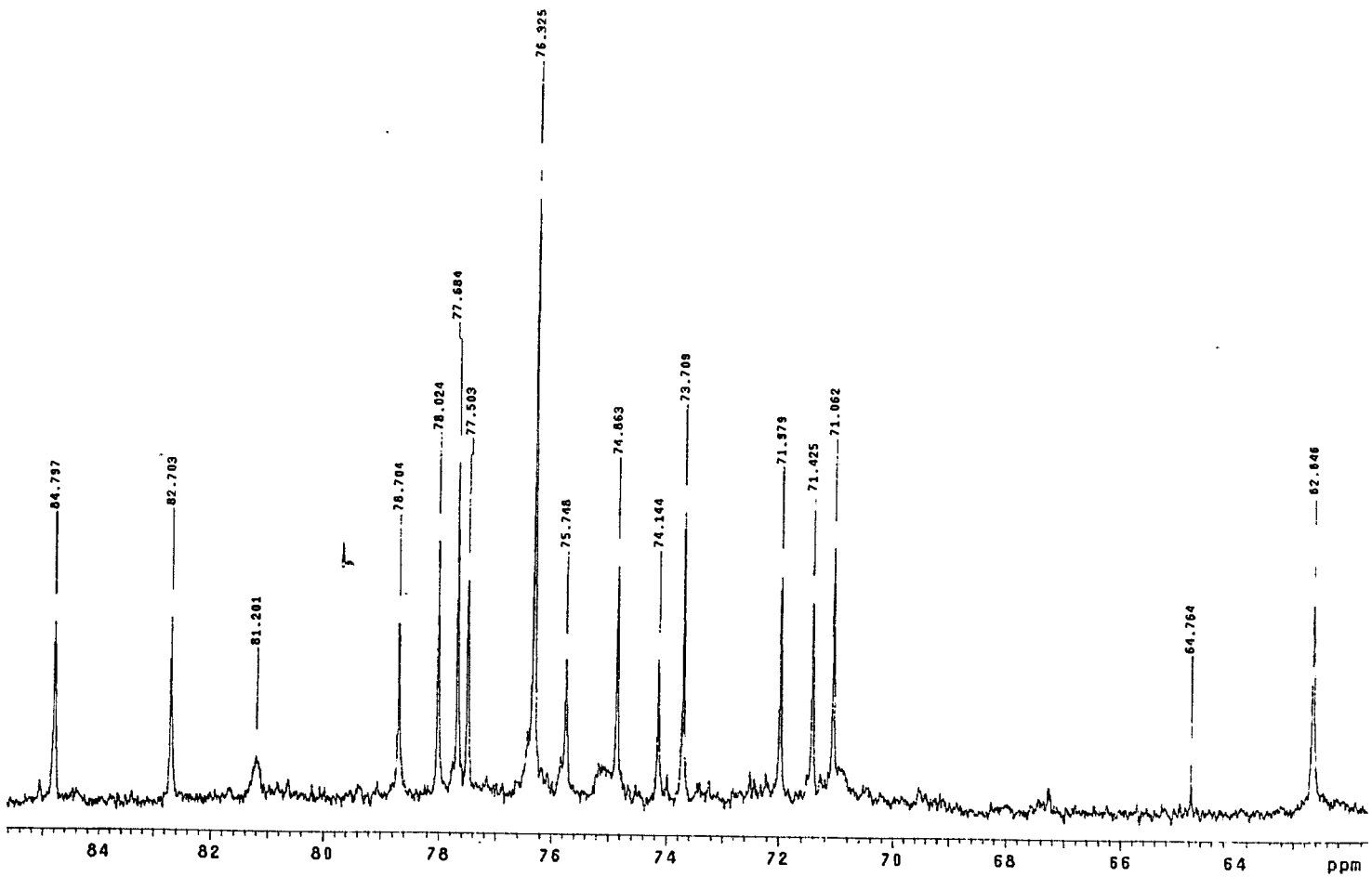


Región de los carbonos anoméricos del compuesto It38P6.



USAI  
06/MAYO/2004  
Dr. Rogelio Pereda / Mabel Fragoso  
It38P6 / C505H  
13C 100 MHz  
Ref. Piridina 135.5 ppm  
400  
rdm

Pulse Sequence: s2pu1



Región de los metinos no anoméricos del compuesto It38P6.