
Universidad del Mar

Campus Puerto Ángel



“Estudio químico de “*Sicyos bulbosus*”

TESIS PRESENTADA A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE
LA UNIVERSIDAD DEL MAR, COMO REQUISITO NECESARIO PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
CON LA ESPECIALIDAD EN QUÍMICA AMBIENTAL

PRESENTA:

I.Q. ANGEL ULISES OROZCO VALENCIA

Puerto Angel, Oaxaca

2009

RESUMEN

Se presenta un estudio químico realizado en el tubérculo de *Sicyos bulbosus*, especie perteneciente a la familia de las cucurbitáceas y presumible en poseer actividad antialimentaria. Se aisló y caracterizó del extracto metanólico del tubérculo un compuesto novedoso con nombre de: **ácido 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil]-28-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→3)-β-D-xilanopiranosil-(1→4)-[β-D-apiofuranosil-(1→3)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-L-arabinopiranosil] poligalácico**, que para este trabajo se identificó como el componente mayoritario del extracto el cual se denominó PNM (Producto natural mayoritario). Su aislamiento y obtención involucró como primeras etapas la separación del extracto mediante técnicas cromatográficas tales como la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), cromatografía en columna abierta (CCA) y cromatografía en capa fina (CCF). La elucidación estructural de este compuesto requirió el empleo de técnicas espectrométricas de masas (IE y BAR) y espectroscópicas de RMN en 1D (¹H y ¹³C) y 2D (COSY, TOCSY, HSQC y HMBC). Para facilitar la elucidación estructural se preparó el derivado peracetilado del PNM (derivado peracetilado del **ácido 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→3)-β-D-glucopiranosil]-28-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→3)-β-D-xilanopiranosil-(1→4)-[β-D-apiofuranosil-(1→3)]-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-β-L-arabinopiranosil] poligalácico**.) el cual se llamó PNM_{ac} (Producto natural mayoritario acetilado).

DEDICATORIA

CON TODO EL AMOR Y CARIÑO A MI FAMILIA

AGRADECIMIENTOS

Agradezco con mucho reconocimiento la colaboración y dirección de este trabajo por parte de la Dra. Beatriz Hernández Carlos así como el apoyo técnico de la M.C. Miriam Carmona Pineda, también agradezco la participación de los profesores Dr. Marco Vinicio Ramírez Mares, M. en C. María del Rocío Gutiérrez Ortiz, Dra. Judith Amador Hernández, Dr. Aitor Aizpuru y M. en C. Alejandro Regalado Méndez, así como todo el personal e instalaciones de la Universidad del Mar campus Puerto Angel que hizo posible la realización de este trabajo. Agradezco al CONACYT por haberme otorgado una beca de estudios con el número de registro 201844.

ÍNDICE

	Página
RESUMEN	i
DEDICATORIA	ii
AGRADECIMIENTOS	iii
ÍNDICE	iv
ABREVIATURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. CONTAMINACIÓN AMBIENTAL POR PLAGUICIDAS	1
1.2. LOS METABOLITOS SECUNDARIOS COMO UNA ALTERNATIVA AMBIENTAL	2
1.3. ESTRUCTURA Y CLASIFICACIÓN DE LAS SAPONINAS	4
1.4. LAS CUCURBITÁCEAS	7
1.4.1 USOS TRADICIONALES	7
1.4.2. LAS SAPONINAS EN LAS CUCURBITÁCEAS	8
1.5. METODOLOGÍA EN EL ESTUDIO QUÍMICO DE LAS SAPONINAS	12
1.5.1. EXTRACCIÓN	12
1.5.2. ELIMINACIÓN DE MONOSACÁRIDOS Y DISACÁRIDOS DEL EXTRACTO	12
1.5.3. SEPARACIÓN Y PURIFICACIÓN	12
1.5.4. REACCIONES DE DEGRADACIÓN	13

1.5.5. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL	14
1.5.5.1. ESPECTROMETRÍA DE MASAS	14
1.5.5.1.1. IONIZACIÓN POR IMPACTO ELECTRÓNICO (IE)	14
1.5.5.1.2. BOMBARDEO DE ÁTOMOS RÁPIDOS (BAR)	14
1.5.5.2. ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)	15
1.5.5.2.1. RMN ¹ H	16
1.5.5.2.2. RMN ¹³ C	16
1.5.5.2.3. DEPT	17
1.5.5.2.4. COSY HH	17
1.5.5.2.5. TOCSY HH	17
1.5.5.2.6. HETCOR	18
1.5.5.2.7. HSQC	18
1.5.5.2.8. HMBC	18
2. ANTECEDENTES	19
2.1. <i>SICYOS BULBOSUS</i>	19
2.2. JUSTIFICACIÓN	20
3. OBJETIVOS	21
3.1. OBJETIVO GENERAL	21
3.2. OBJETIVOS PARTICULARES	21
4. METODOLOGÍA	22
4.1. EQUIPOS	22
4.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS	22

4.3. OBTENCIÓN DEL PRODUCTO NATURAL MAYORITARIO (PNM)	22
4.3.1. COLECTA Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	22
4.3.2. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL	23
4.3.3. SEPARACIÓN DEL PNM DEL EXTRACTO POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR	23
4.3.4. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR)	23
4.4. OBTENCIÓN DE LA AGLICONA	24
4.4.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA	24
4.4.2. EXTRACCIÓN DE LA AGLICONA	25
4.4.3. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA	25
4.5. PREPARACIÓN DE DERIVADOS	26
4.5.1. ACETILACIÓN DEL PNM	26
4.5.2. METILACIÓN DE LA AGLICONA MAYORITARIA (Ama)	27
4.6. EXPERIMENTOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y ESPECTROSCOPIA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	28
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	29
5.1. PERFIL CROMATOGRÁFICO DEL PNM	29
5.2. ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DEL PNM	32
5.2.1. UNIDAD DE AGLICONA	32
5.2.1.1. ESPECTRO DE MASAS POR IE DE LA Agmet	32
5.2.1.2. ESPECTRO DE RMN ¹³ C DEL PNM	34
5.2.1.3. ESPECTRO DE RMN ¹³ C DEL PNM _{ac}	36
5.2.2. CADENAS OLIGOSACÁRIDAS	37

5.2.2.1. ESPECTROS DE RMN PARA EL PNM _{ac}	37
5.2.2.2. ESPECTROS DE RMN PARA EL PNM	57
5.2.2.3. ESPECTRO DE MASAS POR BAR DEL PNM	62
5.2.3. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL PNM	63
6. CONCLUSIONES	64
7. BIBLIOGRAFÍA	65
8. APÉNDICE	70

ABREVIATURAS

Agl	Aglicona
Agmet	Aglicona mayoritaria metilada
Ama	Aglicona mayoritaria
Ami	Aglicona minoritaria
Api	Apiosa
Ara	Arabinosa
BAR	Bombardeo de átomos rápidos
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CDCl₃	Triclorometano deuterado
CD₃OD	Metanol deuterado
CLAR	Cromatografía de líquidos de alta resolución
COSY	Correlation spectroscopy
C₁₈	Columna cromatografica de octadecilo
δ	Desplazamiento químico en ppm
DEPT	Distortionless enhancement by polarization transfer
eV	Electrón-volts
g	Gramos
Glu	Glucosa externa
Glu'	Glucosa interna
HETCOR	Heteronuclear single quantum coherence
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
Hz	Hertz
IE	Impacto electrónico
J	Constante de acoplamiento en Hz
Ram	Ramnosa externa

Ram'	Ramnosa interna
RMN¹H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RMN¹³C	Resonancia magnetica nuclear del carbono 13
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
TMS	Tetrametilsilano
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mV	Milivolts
m/z	Masa/ carga
N	Concentración normal
PNM	Producto natural mayoritario
PNMac	Producto natural mayoritario acetilado
ppm	Partes por millón
T_R	Tiempo de retención
umas	Unidades de masa
μL	Microlitros
μm	Micrómetros
Xil	Xilosa

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
TABLA 1.1 Especies de cucurbitáceas que contienen agliconas tipo oleanano	9
TABLA 5.1 Desplazamientos químicos (δ) de la aglicona correspondiente al PNM con el ácido poligalácico de otras saponinas RMN ¹³ C en CD ₃ OD	35
TABLA 5.2 Desplazamientos químicos (δ) de la aglicona correspondiente al PNM _{ac} con la aglicona de Acmh2. RMN ¹³ C en CDCl ₃	36
TABLA 5.3 Correlaciones entre las señales de ¹ H y ¹³ C para la Ara del PNM _{ac}	40
TABLA 5.4 Correlaciones entre las señales de ¹ H y ¹³ C para la Ram' del PNM _{ac}	43
TABLA 5.5 Correlaciones entre las señales de ¹ H y ¹³ C para la Api del PNM _{ac}	47
TABLA 5.6 Correlaciones entre las señales de ¹ H y ¹³ C para la Xil del PNM _{ac}	47
TABLA 5.7 Correlaciones entre las señales de ¹ H y ¹³ C para la Ram del PNM _{ac}	50

TABLA 5.8 Correlaciones entre las señales de ^1H y ^{13}C para la Glu' del PNMMac	53
TABLA 5.9 Desplazamientos químicos (δ) de ^1H y ^{13}C de los monosacáridos presentes en el PNMMac, en CD_3Cl a 75 MHz	56
TABLA 5.10 Desplazamientos químicos (δ) de ^1H y ^{13}C de los monosacáridos presentes en el PNM, en CD_3OD a 75 MHz	61

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1.1 Plaguicidas naturales antiguos	3
Figura 1.2 Moléculas con potencial plaguicida	4
Figura 1.3 Molécula de saponina (Ácido 3-O-[β-D-glucopiranosil-(1→3) -β-D-glucopiranosil]-28-O-[α-L-ramnopiranosil-(1→3) -β-D-xilopiranosil-(1→4)-α-L-ramnopiranosil-(1→2) -α-L-arabinopiranosil]poligalácico)	5
Figura 1.4 Esqueletos triterpénicos originados por el oxidoescualeno	6
Figura 1.5. Agliconas tipo oelanano	9
Figura 1.6. Aglicona tipo cucurbitano	10
Figura 1.7 Triterpenoides cucurbitanos aislados de la especie <i>Momordica charantia</i> .	10
Figura 1.8 Cucurbitacina C	10
Figura 1.9 Cucurbitacinas que poseen actividad antialimentaria contra las pulgas	11
Figura 1.10 Cucurbitacinas con actividad terapéutica en humanos	11

Figura 2.1 Bosquejo general (A) y fotografía (B) de <i>Sicyos bulbosus</i>	19
Figura 4.1 Placa revelada de la reacción de hidrólisis ácida	24
Figura 4.2 Placa revelada del extracto hidrolizado y filtrado	25
Figura 5.1 Cromatogramas del extracto de <i>S. bulbosus</i> (0.01 mg)	29
Figura 5.2 Cromatograma del extracto de <i>S. bulbosus</i> (50 mg)	30
Figura 5.3 Cromatograma de los componentes mayoritarios del extracto <i>S. bulbosus</i> (30 mg)	30
Figura 5.4 Cromatograma del PNM del extracto <i>Sicyos bulbosus</i> (15 mg)	31
Figura 5.5 Espectro de masas por IE de la Agmet	32
Figura 5.6 Reacción retro Diels-Alder en C12 y C13	33
Figura 5.7 Generación del ion m/z 203 y 189 por el ion m/z 262	33
Figura 5.8 Generación del ion m/z 133	33
Figura 5.9 Estructura general del ácido poligalácico	34
Figura 5.10 Sección del espectro de ^{13}C del PNMac en CDCl_3 a 75 MHz, zona de carbonos anoméricos (δ 90-112)	37
Figura 5.11 Sección del espectro HSQC del PNMac en CDCl_3 a 75 MHz	38

Figura 5.12a Sección del espectro de ^1H del PNMMac en CDCl_3 a 75 MHz	38
Figura 5.12b Sección del espectro de ^1H del PNMMac en CDCl_3 a 75 MHz	39
Figura 5.13 Sección del espectro HMBC del PNMMac en CDCl_3 a 75 MHz, correlación entre la señal del H1 (δ 5.87) de Ara con la del C28 (δ 173.2) de Agl	39
Figura 5.14 Enlace glicosídico entre el C1 de Ara con el C28 de Agl (R)	40
Figura 5.15 Correlaciones de la Ara por los experimentos HSQC, COSY HH y HMBC	40
Figura 5.16 Sección del espectro COSY HH del PNMMac en CDCl_3 a 75 MHz, correlación entre la señal del H1 (δ 5.87) con la del H2 (δ 3.76) de Ara	41
Figura 5.17a Sección del espectro HMBC del PNMMac en CDCl_3 a 75 MHz, correlación entre la señal del H2 (δ 3.76) de Ara con la del C1 (δ 97.6) de Ram'	41
Figura 5.17b Sección del espectro HMBC del PNMMac en CDCl_3 a 75 MHz, correlación entre la señal del C2 (δ 73.7) de Ara con la del H1 (δ 4.83) de Ram'	42
Figura 5.18 Enlace glicosídico entre el C2 de Ara con el C1 de Ram'	42
Figura 5.19 Correlaciones de la Ram' por los experimentos	

HSQC, COSY HH y HMBC.	43
Figura 5.20 Sección del espectro HSQC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlaciones de la Ram' entre la señal del C3 (δ 76.4) con la del H3 (δ 3.91), y C4 (δ 75.9) con la del H4 (δ 3.62)	44
Figura 5.21a Sección del espectro HMBC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del H3 (δ 3.91) de Ram' con la del C1 (δ 107.5) de Api	44
Figura 5.21b Sección del espectro HMBC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C3 (δ 76.4) de Ram' con la del H1 (δ 5.24) de Api	45
Figura 5.22a Sección del espectro HMBC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del H4 (δ 3.62) de Ram' con la del C1 (δ 100.2) de Xil	45
Figura 5.22b Sección del espectro HMBC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C4 (δ 75.9) de Ram' con la del H1 (δ 4.76) de Xil	46
Figura 5.23 Enlaces glicosídicos entre el C3 de Ram' con el C1 de Api, y el C4 de Ram' con el C1 de Xil	46
Figura 5.24 Correlaciones de la Api por los experimentos HSQC, COSY HH y HMBC	47
Figura 5.25 Correlaciones de la Xil por los experimentos	

HSQC, COSY HH y HMBC	48
Figura 5.26 Sección del espectro HSQC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C3 (δ 79.7) con la del H3 (δ 3.97) de Xil	48
Figura 5.27a Sección del espectro HMBC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del H3 (δ 3.97) de Xil con la del C1 (δ 98.6) de Ram	49
Figura 5.27b Sección del espectro HMBC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C3 (δ 79.7) de Xil con la del H1 (δ 4.87) de Ram	49
Figura 5.28 Enlace glicosídico entre el C3 de Xil con el C1 de Ram	50
Figura 5.29 Correlaciones de la Ram por los experimentos HSQC, COSY HH y HMBC	50
Figura 5.30 Cadena oligosacárida enlazada al C28 de la Agl, elucidada desde el PNMac por los experimentos HSQC, COSY HH y HMBC	51
Figura 5.31 Sección del espectro HSQC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C3 (δ 80.2) con la del H3 (δ 3.46) de Agl	51
Figura 5.32a Sección del espectro HMBC del PNMac en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C3 (δ 80.2) de Agl con la del H1 (δ 4.36) de Glu'	52

Figura 5.32b Sección del espectro HMBC del PNM _{ac} en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del H3 (δ 3.46) de Agl con la del C1 (δ 102.1) de Glu'	52
Figura 5.33 Enlace glicosídico ente el C1 de Glu' con el C3 de Agl	53
Figura 5.34 Correlaciones de la Glu' por los experimentos HSQC, COSY HH y HMBC	53
Figura 5.35 Sección del espectro HSQC del PNM _{ac} en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C3 (δ 78.7) con la del H3 (δ 3.86) de Glu'	54
Figura 5.36a Sección del espectro HMBC del PNM _{ac} en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del H3 (δ 3.86) de Glu' con la del C1 (δ 100.9) de Glu	54
Figura 5.36b Sección del espectro HMBC del PNM _{ac} en CDCl ₃ a 75 MHz, correlación entre la señal del C3 (δ 78.7) de Glu' con la del H1 (δ 4.58) de Glu	55
Figura 5.37 Enlace glicosídico entre el C3 de Glu' con el C1 de Glu	55
Figura 5.38 Sección del espectro de ¹³ C del PNM en CD ₃ OD a 75 MHz	57
Figura 5.39 Sección del espectro de ¹³ C del PNM en CD ₃ OD a 75 MHz, zona anomérica ampliada para los monosacáridos Glu, Glu' y Xil	57

Figura 5.40 Sección del espectro HSQC del PNM en CD ₃ OD a 75 MHz	58
Figura 5.41 Sección del espectro de ¹ H del PNM en CD ₃ OD a 75 MHz	58
Figura 5.42 Sección del espectro HMBC del PNM en CD ₃ OD a 75 MHz, correlación entre la señal del C28 (δ 177.0) de Agl con la del H1 (δ 5.59) de Ara	59
Figura 5.43 Sección del espectro HMBC del PNM en CD ₃ OD a 75 MHz	60
Figura 5.44 Espectro de masas por ionización BAR del PNM (glicerol)	62
Figura 5.45 Estructura molecular del PNM de <i>S. bulbosus</i>	63

2. ANTECEDENTES

2.1. *SICYOS BULBOSUS*

Sicyos bulbosus pertenece a la familia de las cucurbitáceas, las especies de esta familia tienen diversos usos tradicionales en nuestro país como en la medicina y alimento (Lira y Caballero, 2002). *S. bulbosus* fue descrita por primera vez en el año 2004 en el Estado de Oaxaca (Arévalo *et. al.*, 2004), señalándose que su hábitat corresponde a la zona de bosques templados con una altitud entre 2254 y 2500 m sobre el nivel del mar, y que su época de floración abarca desde el mes de Junio hasta Agosto. Aunque no hay ningún reporte sobre algún estudio químico hecho sobre el género *Sicyos*, si se ha reportado que la especie *Sicyos parviflorus* del Estado de Oaxaca es comestible, y que también las hojas y frutos de la especie *Sicyos longisepalus* del estado de Chiapas, se han usado contra las verrugas y costras de la piel (Lira y Caballero, 2002). En la figura 2.1 se muestran imágenes de la especie *S. bulbosus*.

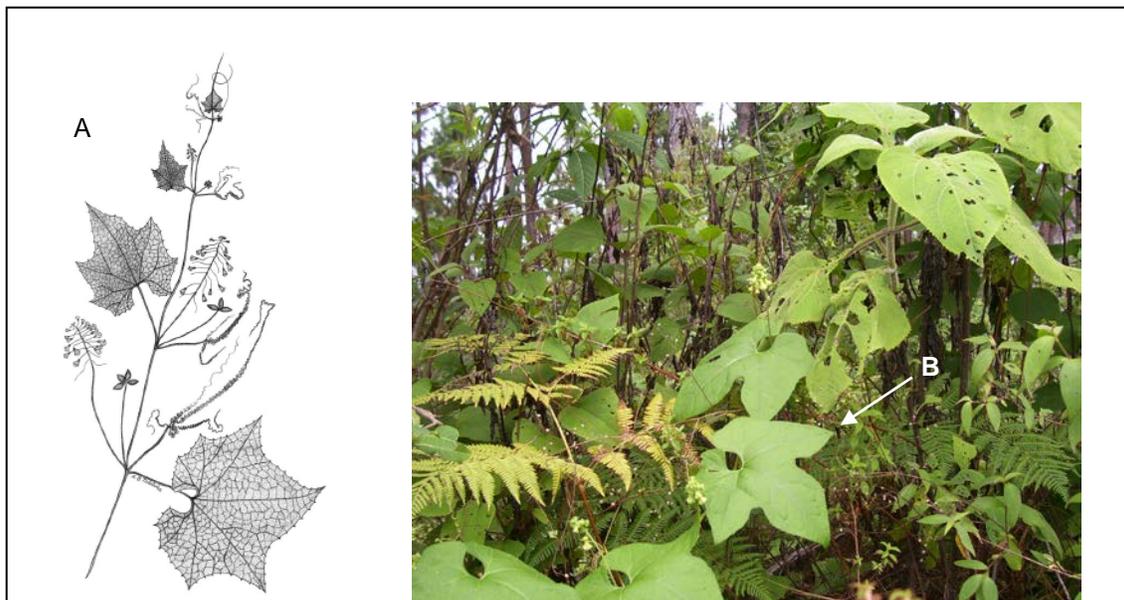


Figura 2.1 Bosquejo general (A) (Arevalo *et. al.*, 2004) y fotografía (B) de *Sicyos bulbosus*.

2.2. JUSTIFICACIÓN

Los metabolitos secundarios denominados triterpenos glicosidados o saponinas, han tenido un gran aporte hacia la industria cosmética y alimenticia, pero resulta más interesante su aplicación hacia la medicina como fármacos y muy recientemente hacia los problemas ambientales al ser usados como plaguicidas naturales, surfactantes naturales usados como jabón (Vincken *et. al.*, 2007) y en la remoción de hidrocarburos derramados accidentalmente sobre el mar, lagos y suelos (Urum y Pekdermi, 2004).

Las saponinas han sido aisladas de una gran diversidad de especies vegetales, se destaca por ejemplo su presencia en la familia de las cucurbitáceas, ya que en México existen 142 especies y Oaxaca es el único Estado de la Republica Mexicana que cuenta con la mayor abundancia de especies pertenecientes a esta familia, teniendo un total de 53 (Lira y Caballero, 2002), por lo tanto es digno mencionar la gran riqueza con que cuenta el Estado de Oaxaca y el gran aporte de nuevo conocimiento que podría existir en el aislamiento de saponinas para diversos fines. De las 53 especies existentes en el estado de Oaxaca, solo 11 han reportado tener usos tradicionales (Lira y Caballero, 2002), y de estas 11 solo 2 han tenido un estudio químico, como es el caso de las especies

Microsechium helleri (León *et. al.*, 1998) y *Momordica charantia* (Fatope *et. al.*, 1990), que en el interés ambiental las saponinas aisladas de estas han mostrado tener actividad como plaguicidas naturales.

S. bulbosus no tiene estudios químicos debido a que fue muy reciente su descubrimiento (Arévalo *et. al.*, 2004), sin embargo, debido a la abundancia y distribución de cucurbitáceas en el Estado de Oaxaca, se tiene una gran oportunidad para estudiar los metabolitos secundarios que constituyen esta especie que en esencia se podría presumir que son saponinas. Por lo tanto este trabajo se sustenta en aislar y caracterizar la estructura química del metabolito secundario mayoritario, haciendo hincapié que esta etapa es fundamental y preliminar para posteriores estudios agrobiológicos como la actividad insecticida o antialimentaria, que desde el punto de vista de las ciencias ambientales es relevante conocer los productos naturales que tengan estas propiedades y permitan combatir la problemática de las plagas, reduciendo así el uso de los plaguicidas sintéticos que ocasionan daños al ambiente con el desequilibrio ecológico.

3. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

- ♦ Efectuar el estudio químico de la especie cucurbitácea *Sicyos bulbosus* que se encuentra en el Estado de Oaxaca.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ♦ Aislar y purificar la saponina mayoritaria de *Sicyos bulbosus*.
 - ♦ Efectuar la elucidación estructural de la saponina aislada de *Sicyos bulbosus* mediante espectrometría de masas y espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN).
-
-

4. METODOLOGÍA

4.1. EQUIPOS.

- ◆ Espectrómetro de RMN marca Varian Mercury a 300 y 75.4 MHz y disolventes CDCl_3 y CD_3OD .
- ◆ Espectrómetro de masas marca Hewlett Packard 5989-A a 70 eV.
- ◆ Cromatógrafo de líquidos marca Perkin Elmer (bomba cuaternaria serie 200) con detector de índice de refracción (serie 200) e interfase NCI 900.
- ◆ Rotavapor LABOROTA 400 Heidolph.
- ◆ Liofilizadora Frezzone 4.5 LABCONCO.

4.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

- ◆ Para las pruebas en cromatografía de capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios (5 x 2 cm) de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck), en las placas para el análisis de azúcares y agliconas se utilizó como solución reveladora sulfato cérico amoniacal.
- ◆ En la cromatografía a columna abierta (CCA) se emplearon como soportes: sílica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck), sefadex-G10 (Sigma) y LiChroprep RP-18 (40-63 μm) (Merck).
- ◆ Para la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se usó una columna analítica y preparativa de fase inversa C₁₈.

Columna analítica: Alltima C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) Alltech.

Columna preparativa: Econosil C₁₈ (250 mm x 22 mm, 10 μm) Alltech.

4.3. OBTENCIÓN DEL PRODUCTO NATURAL MAYORITARIO (PNM)

A continuación se establece el procedimiento para la obtención de la saponina mayoritaria o producto natural mayoritario (PNM) de *Sicyos bulbosus*.

4.3.1. COLECTA Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

El material botánico de *S. bulbosus* se colectó en época de floración en la comunidad de San Miguel Suchixtepec, Distrito de Mihuatlán Estado de Oaxaca. Se obtuvieron 320 g de tubérculo, el cual se secó a temperatura ambiente a la sombra y en un lugar fresco para evitar reacciones de degradación.

Posteriormente se cortó en pedazos pequeños y se maceró en metanol durante dos semanas en ausencia de luz y a temperatura ambiente.

4.3.2. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

El extracto se obtuvo separando el material botánico por decantación y filtración simple, empleando papel de celulosa y finalmente eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo se agitó con acetato de etilo hasta la formación de un precipitado blanquecino que se recuperó por filtración, obteniéndose 40 g (12.5%) de extracto seco.

4.3.3. SEPARACIÓN DEL PNM DEL EXTRACTO POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

Para eliminar los monosacáridos y disacáridos del extracto seco se requirió la cromatografía de exclusión molecular en columna abierta, para ello se disolvió una muestra de 1 g del extracto seco de *S. bulbosus* en aproximadamente 5 mL de metanol (CH₃OH), posteriormente la muestra se eluyó en una columna cromatográfica abierta (CCA) con soporte de sefadex-G10 (sigma), la fase móvil utilizada fue metanol. Se colectaron fracciones de 50 mL, las fracciones 1 y 2 se reunieron, y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor, el residuo se disolvió en 5 mL de metanol. La finalidad de este procedimiento fue separar el producto natural de las unidades libres de monosacáridos y disacáridos que se encontraban en el extracto, así la purificación se realizó sin interferencias (Ver tema 1.5.2.).

4.3.4. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Antes de introducir la muestra libre de monosacáridos y disacáridos al cromatógrafo de líquidos de alta resolución, ésta se eluyó en una columna abierta con soporte C₁₈ (LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Merck) y fase móvil de metanol, la muestra obtenida se concentró a presión reducida en un rotavapor y se disolvió en un volumen aproximado de 10 mL (100 mg/mL) en composición metanol/agua (50:50). En esta etapa se eliminaron sustancias que pudieran ser retenidas por la columna C₁₈. Finalmente la muestra se filtró a través de acrodiscos LC 13 mm de 0.45 µm PVDF, y se inyectó un volumen de 500 µL (aproximadamente 50 mg) al cromatógrafo de líquidos usando un detector de índice de refracción y una columna preparativa C₁₈, la fase móvil utilizada fue metanol/agua (65:35) y el caudal operado en el cromatógrafo fue de 5 mL/min.

El PNM que se seleccionó y colectó después de su purificación por CLAR, se concentró en el rotavapor para remover toda la cantidad de metanol y el agua se eliminó en una liofilizadora. La cantidad total obtenida en peso del PNM seco (183 mg) se volvió a inyectar al cromatógrafo de líquidos a una concentración de 30 mg/mL de una disolución metanol/agua (50:50), de esta manera se aseguraría una pureza total, las condiciones de operación fueron las mismas así como la columna preparativa C₁₈, sin embargo, la fase móvil se cambió a metanol/agua (55:45) para tener una mayor resolución sobre el PNM. Para obtener cantidades suficientes en peso del PNM seco y puro, se repitieron los puntos 4.3.3 a 4.3.4 por cada 1 g del extracto *S. bulbosus*, así se trataron 12.3 g del extracto y se obtuvieron 137 mg del PNM.

4.4. OBTENCIÓN DE LA AGLICONA

Para confirmar con mayor validez la estructura química de la unidad de aglicona, fue necesario efectuar la degradación del extracto de *S. bulbosus*, separando y analizando únicamente la aglicona mayoritaria. A continuación se menciona el procedimiento que se efectuó.

4.4.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se hidrolizaron 2 g del extracto seco de *S. bulbosus* utilizando 20 mL de una solución acuosa de ácido clorhídrico (HCl) 1.3 N, la mezcla se sometió a reflujo con mínima agitación. Después de 2 horas de reflujo se monitoreó el avance de la reacción por CCF, la fase móvil

empleada fue una disolución de metanol/cloroformo (75:25) y se uso como referencia la muestra sin hidrolizar, las placas se revelaron con una disolución de sulfato cérico amoniacal. En la figura 4.1 se presenta una placa revelada.

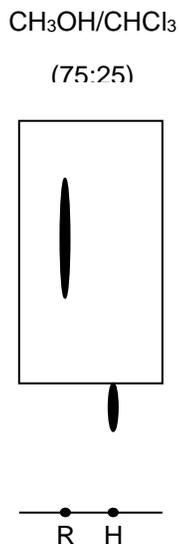


Figura 4.1 Placa revelada de la reacción de hidrólisis ácida, donde R = referencia (extracto seco *S. bulbosus*) y H = extracto hidrolizado.

Transcurridas las 4 horas desde el inicio del reflujo, las placas reveladas tuvieron una apariencia similar a la de la figura 4.1, notando que en la muestra hidrolizada (H) la mayor parte de su contorno superior había desaparecido, lo cual fue indicativo de que el extracto ya estaba siendo consumido en la reacción de hidrólisis, sin embargo para asegurar un mayor avance en la reacción la muestra se mantuvo a reflujo por otras 8 horas.

4.4.2. EXTRACCIÓN DE LA AGLICONA

Finalizada la reacción de hidrólisis se procedió a neutralizar la solución (20 mL) hasta un pH de 7 con 7 mL de una disolución metanólica de hidróxido de potasio (KOH) 3.57 N. Para eliminar el agua y el metanol en la mezcla de reacción, se usaron 20 porciones de 10 mL de metanol (200 mL), así por cada porción que se utilizaba, la mezcla de metanol-agua era eliminada a presión reducida en el rotavapor. La siguiente etapa fue eliminar las sales generadas por la neutralización, disolviendo el residuo en 15 mL de metanol y filtrando a través de papel Whatmman número 40, lavando las sales con porciones de 15 mL de

metanol, en total se usaron 7 porciones de 15 mL cada una (105 mL). Para comprobar la extracción de la aglicona la mezcla se analizó por CCF usando como fase móvil una disolución de acetato de etilo/hexano (60:40), las placas se revelaron con sulfato cérico amoniaco (Fig. 4.2). Se obtuvieron dos unidades de aglicona, la mayoritaria (Ama) tuvo un factor de retención (R_f) de 0.2 y fue el componente prioritario a estudiar. Posteriormente la mezcla de reacción se sometió a CCA.

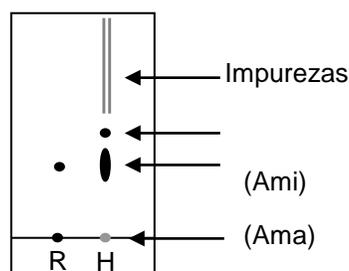


Figura 4.2 Placa revelada, H = extracto hidrolizado y filtrado de *S. bulbosus*, Ami = aglicona minoritaria, Ama = aglicona mayoritaria, R = referencia, muestra de una aglicona reconocida (ácido poligaláctico).

4.4.3. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

El residuo de la hidrólisis ácida se soportó en sílica gel y se sometió a CCA usando como soporte sílica gel 60 (0.040-0.063 mm).

Como fase móvil para la separación se usaron mezclas de acetato de etilo/hexano con una composición en polaridad ascendente desde la proporción 10:90 hasta 30:70. Se recolectaron fracciones de 100 mL, a los cuales se les eliminó el disolvente en un rotavapor y se analizaron por CCF, para esto se usó como fase móvil una solución de acetato de etilo/hexano (60:40), y como muestra de referencia se utilizó la solución hidrolizada y filtrada (Fig. 4.6), las placas se revelaron con sulfato cérico amoniaco. Se hace resaltar que el cambio de polaridad en la CCA no necesariamente se hizo cada 500 mL de volumen eluido, sino de acuerdo a las pruebas de CCF ya que también eluyeron impurezas, las cuales fue necesario eliminar antes de recolectar las agliconas, las impurezas eluyeron en la fase móvil

de acetato de etilo/hexano con composición 10:90 a 20:80. La primera unidad de aglicona (Ami) eluyó a partir de la composición 25:75 (acetato de etilo/hexano), para la segunda aglicona (Ama) la elución correspondió a la composición 30:70 (acetato de etilo/hexano). Las fracciones que contenían las agliconas Ami y Ama se reunieron por separado, se eliminó el disolvente, y los sólidos se lavaron con metanol. De 2 gr de extracto de *S. bulbosus* se obtuvieron 20 mg de Ami y 25 mg de Ama.

4.5. PREPARACIÓN DE DERIVADOS

Se preparó el derivado peracetilado del producto natural mayoritario (PNM) y el derivado metilado de la aglicona mayoritaria (Ama), esto fue previo a los experimentos de masas por IE, FAB, RMN¹H y RMN ¹³C.

4.5.1. ACETILACIÓN DEL PNM

En la reacción de acetilación se utilizaron 95 mg del PNM, al cual se le adicionaron 10 mL de anhídrido acético, 0.5 mL de piridina y 0.5 g de tamiz molecular. La reacción se sometió a reflujo durante 30 horas aproximadamente. Después de transcurrido este tiempo se procedió a verificar el grado de acetilación, para esto en primer lugar la reacción se detuvo y se dejó reposar por 1 hora con 10 mL de agua, esto fue para hidrolizar el anhídrido acético que estaba en exceso. En seguida la mezcla de reacción se extrajo con 20 mL (3 veces) de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 15 mL de ácido clorhídrico acuoso (HCl) 0.01 N para eliminar la piridina. El exceso de ácido clorhídrico se neutralizó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y se lavó con agua destilada hasta un pH neutro.

Finalmente la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), el disolvente se eliminó a presión reducida con un rotavapor y el residuo se analizó por CCF empleando como fase móvil una disolución de acetato de etilo/hexano (65:35), las placas se revelaron con sulfato cérico amoniacal. El residuo se volvió a acetilar en las mismas condiciones descritas durante otras 15 horas, la extracción y análisis por CCF se efectuó de la misma manera. Se obtuvieron 144.1 mg del PNM acetilado (PNMac) sin purificar, el cual se sometió a separación en una CCA con soporte de sílica gel 60 (0.040-0.063 mm),

usando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo/hexano en polaridad ascendente, la composición inicial de la mezcla fue de 10:90 (acetato de etilo/hexano), el cambio de polaridad se hizo sobre cada 250 mL de fase móvil eluída, estableciendo 10 unidades de magnitud en su variación, así la siguiente composición fue de 20:80 (acetato de etilo/hexano). La fase móvil eluída a partir de la composición en 50:50 se recolectó en fracciones de 100 mL, el disolvente posteriormente se eliminó en un rotavapor y mediante CCF se verificó la pureza del PNMac, la fase móvil en la CCF fue una mezcla de acetato de etilo/hexano (70:30), revelando las placas con sulfato cérico amoniacal. El PNMac eluyó de la CCA a partir de la fase móvil en composición 60:40 (acetato de etilo/hexano), las muestras se colectaron, el disolvente se eliminó, y el residuo fue de 125.1 mg de PNMac puro.

4.5.2. METILACIÓN DE LA AGLICONA MAYORITARIA (Ama).

La reacción de metilación se hizo con diazometano generado in situ a partir de la N-nitroso-N-metil urea ($\text{CH}_3\text{N}(\text{NO})\text{CONH}_2$) (Blatt, 1941). Se pesó 1 mg de la aglicona mayoritaria (Ama), la cual se disolvió en 5 mL de metanol. Por separado se preparó una solución de 5 mL de hidróxido de potasio (KOH) acuoso al 50% y se adicionaron 5 mL de éter etílico; la mezcla se dejó en un baño de hielo por 5 minutos y se le añadieron 500 mg aproximadamente de N-nitroso-N-metil urea. Una vez terminado el burbujeo indicativo de la formación del diazometano, la solución etérea amarilla sobrenadante se decantó y se secó sobre lentejas de KOH. Posteriormente el sobrenadante se vació sobre la muestra disuelta, la esterificación del ácido fue instantánea; la formación del derivado metilado se visualizó por CCF eluyendo con una solución acetato de etilo/hexano (75:25). Una vez ocurrida la reacción se eliminó el éter y el diazometano restante por agitación, finalmente se secó la muestra a presión reducida y se obtuvo la aglicona mayoritaria metilada (Agmet).

4.6. EXPERIMENTOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en dos espectrómetros marca Varian Mercury-300 MHz, uno de ellos con modo de detección inversa. Los espectros de ^1H , ^{13}C , GATED, COSY, gHSQC y gHMBC, se obtuvieron a temperatura ambiente y en disolventes

como: CD_3OD y CDCl_3 , los disolventes dependieron de la muestra. Los desplazamientos químicos (δ) fueron ajustados de acuerdo al desplazamiento del TMS ó del disolvente usado.

Los experimentos gHSQC y gHMBC se obtuvieron con incrementos de tiempo de 1024 y 256 con 64 y 128 transientes para cada incremento y con tiempos de relajación de 1.0 s. El análisis de RMN mencionado se efectuó únicamente sobre el producto natural mayoritario (PNM) (107 mg) y su derivado peracetilado (PNMac) (120 mg). En la espectrometría de masas por ionización de impacto electrónico (IE), se analizó únicamente la Agmet (1 mg). Para la espectrometría de masas por ionización con bombardeo de átomos rápidos, el registro fue en modo negativo y como matriz se utilizó el glicerol, el análisis se hizo tanto con el PNM (5 mg) como con el PNMac (5 mg).

4. METODOLOGÍA

4.1. EQUIPOS.

- ◆ Espectrómetro de RMN marca Varian Mercury a 300 y 75.4 MHz y disolventes CDCl_3 y CD_3OD .
- ◆ Espectrómetro de masas marca Hewlett Packard 5989-A a 70 eV.
- ◆ Cromatógrafo de líquidos marca Perkin Elmer (bomba cuaternaria serie 200) con detector de índice de refracción (serie 200) e interfase NCI 900.
- ◆ Rotavapor LABOROTA 400 Heidolph.
- ◆ Liofilizadora Frezzone 4.5 LABCONCO.

4.2. MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.

- ◆ Para las pruebas en cromatografía de capa fina (CCF) se utilizaron cromatofolios (5 x 2 cm) de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck), en las placas para el análisis de azúcares y agliconas se utilizó como solución reveladora sulfato cérico amoniacal.
- ◆ En la cromatografía a columna abierta (CCA) se emplearon como soportes: sílica gel 60 (0.040-0.063 mm) (Merck), sefadex-G10 (Sigma) y LiChroprep RP-18 (40-63 μm) (Merck).
- ◆ Para la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se usó una columna analítica y preparativa de fase inversa C₁₈.

Columna analítica: Alltima C₁₈ (250 mm x 4.6 mm, 5 μm) Alltech.

Columna preparativa: Econosil C₁₈ (250 mm x 22 mm, 10 μm) Alltech.

4.3. OBTENCIÓN DEL PRODUCTO NATURAL MAYORITARIO (PNM)

A continuación se establece el procedimiento para la obtención de la saponina mayoritaria o producto natural mayoritario (PNM) de *Sicyos bulbosus*.

4.3.1. COLECTA Y PREPARACIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

El material botánico de *S. bulbosus* se colectó en época de floración en la comunidad de San Miguel Suchixtepec, Distrito de Mihuatlán Estado de Oaxaca. Se obtuvieron 320 g de tubérculo, el cual se secó a temperatura ambiente a la sombra y en un lugar fresco para evitar reacciones de degradación.

Posteriormente se cortó en pedazos pequeños y se maceró en metanol durante dos semanas en ausencia de luz y a temperatura ambiente.

4.3.2. EXTRACCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL.

El extracto se obtuvo separando el material botánico por decantación y filtración simple, empleando papel de celulosa y finalmente eliminando el disolvente a presión reducida. El residuo se agitó con acetato de etilo hasta la formación de un precipitado blanquecino que se recuperó por filtración, obteniéndose 40 g (12.5%) de extracto seco.

4.3.3. SEPARACIÓN DEL PNM DEL EXTRACTO POR CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR.

Para eliminar los monosacáridos y disacáridos del extracto seco se requirió la cromatografía de exclusión molecular en columna abierta, para ello se disolvió una muestra de 1 g del extracto seco de *S. bulbosus* en aproximadamente 5 mL de metanol (CH₃OH), posteriormente la muestra se eluyó en una columna cromatográfica abierta (CCA) con soporte de sefadex-G10 (sigma), la fase móvil utilizada fue metanol. Se colectaron fracciones de 50 mL, las fracciones 1 y 2 se reunieron, y el disolvente se eliminó a presión reducida en un rotavapor, el residuo se disolvió en 5 mL de metanol. La finalidad de este procedimiento fue separar el producto natural de las unidades libres de monosacáridos y disacáridos que se encontraban en el extracto, así la purificación se realizó sin interferencias (Ver tema 1.5.2.).

4.3.4. PURIFICACIÓN POR CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA RESOLUCIÓN (CLAR).

Antes de introducir la muestra libre de monosacáridos y disacáridos al cromatógrafo de líquidos de alta resolución, ésta se eluyó en una columna abierta con soporte C₁₈ (LiChroprep RP-18, 40-63 µm, Merck) y fase móvil de metanol, la muestra obtenida se concentró a presión reducida en un rotavapor y se disolvió en un volumen aproximado de 10 mL (100 mg/mL) en composición metanol/agua (50:50). En esta etapa se eliminaron sustancias que pudieran ser retenidas por la columna C₁₈. Finalmente la muestra se filtró a través de acrodiscos LC 13 mm de 0.45 µm PVDF, y se inyectó un volumen de 500 µL (aproximadamente 50 mg) al cromatógrafo de líquidos usando un detector de índice de refracción y una columna preparativa C₁₈, la fase móvil utilizada fue metanol/agua (65:35) y el caudal operado en el cromatógrafo fue de 5 mL/min.

El PNM que se seleccionó y colectó después de su purificación por CLAR, se concentró en el rotavapor para remover toda la cantidad de metanol y el agua se eliminó en una liofilizadora. La cantidad total obtenida en peso del PNM seco (183 mg) se volvió a inyectar al cromatógrafo de líquidos a una concentración de 30 mg/mL de una disolución metanol/agua (50:50), de esta manera se aseguraría una pureza total, las condiciones de operación fueron las mismas así como la columna preparativa C₁₈, sin embargo, la fase móvil se cambió a metanol/agua (55:45) para tener una mayor resolución sobre el PNM. Para obtener cantidades suficientes en peso del PNM seco y puro, se repitieron los puntos 4.3.3 a 4.3.4 por cada 1 g del extracto *S. bulbosus*, así se trataron 12.3 g del extracto y se obtuvieron 137 mg del PNM.

4.4. OBTENCIÓN DE LA AGLICONA

Para confirmar con mayor validez la estructura química de la unidad de aglicona, fue necesario efectuar la degradación del extracto de *S. bulbosus*, separando y analizando únicamente la aglicona mayoritaria. A continuación se menciona el procedimiento que se efectuó.

4.4.1. HIDRÓLISIS ÁCIDA

Se hidrolizaron 2 g del extracto seco de *S. bulbosus* utilizando 20 mL de una solución acuosa de ácido clorhídrico (HCl) 1.3 N, la mezcla se sometió a reflujo con mínima agitación. Después de 2 horas de reflujo se monitoreó el avance de la reacción por CCF, la fase móvil

empleada fue una disolución de metanol/cloroformo (75:25) y se uso como referencia la muestra sin hidrolizar, las placas se revelaron con una disolución de sulfato cérico amoniacal. En la figura 4.1 se presenta una placa revelada.

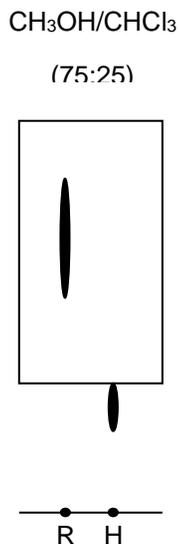


Figura 4.1 Placa revelada de la reacción de hidrólisis ácida, donde R = referencia (extracto seco *S. bulbosus*) y H = extracto hidrolizado.

Transcurridas las 4 horas desde el inicio del reflujo, las placas reveladas tuvieron una apariencia similar a la de la figura 4.1, notando que en la muestra hidrolizada (H) la mayor parte de su contorno superior había desaparecido, lo cual fue indicativo de que el extracto ya estaba siendo consumido en la reacción de hidrólisis, sin embargo para asegurar un mayor avance en la reacción la muestra se mantuvo a reflujo por otras 8 horas.

4.4.2. EXTRACCIÓN DE LA AGLICONA

Finalizada la reacción de hidrólisis se procedió a neutralizar la solución (20 mL) hasta un pH de 7 con 7 mL de una disolución metanólica de hidróxido de potasio (KOH) 3.57 N. Para eliminar el agua y el metanol en la mezcla de reacción, se usaron 20 porciones de 10 mL de metanol (200 mL), así por cada porción que se utilizaba, la mezcla de metanol-agua era eliminada a presión reducida en el rotavapor. La siguiente etapa fue eliminar las sales generadas por la neutralización, disolviendo el residuo en 15 mL de metanol y filtrando a través de papel Whatmman número 40, lavando las sales con porciones de 15 mL de

metanol, en total se usaron 7 porciones de 15 mL cada una (105 mL). Para comprobar la extracción de la aglicona la mezcla se analizó por CCF usando como fase móvil una disolución de acetato de etilo/hexano (60:40), las placas se revelaron con sulfato cérico amoniaco (Fig. 4.2). Se obtuvieron dos unidades de aglicona, la mayoritaria (Ama) tuvo un factor de retención (R_f) de 0.2 y fue el componente prioritario a estudiar. Posteriormente la mezcla de reacción se sometió a CCA.

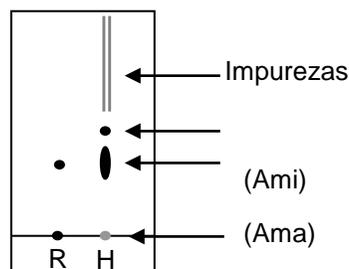


Figura 4.2 Placa revelada, H = extracto hidrolizado y filtrado de *S. bulbosus*, Ami = aglicona minoritaria, Ama = aglicona mayoritaria, R = referencia, muestra de una aglicona reconocida (ácido poligaláctico).

4.4.3. SEPARACIÓN CROMATOGRÁFICA.

El residuo de la hidrólisis ácida se soportó en sílica gel y se sometió a CCA usando como soporte sílica gel 60 (0.040-0.063 mm).

Como fase móvil para la separación se usaron mezclas de acetato de etilo/hexano con una composición en polaridad ascendente desde la proporción 10:90 hasta 30:70. Se recolectaron fracciones de 100 mL, a los cuales se les eliminó el disolvente en un rotavapor y se analizaron por CCF, para esto se usó como fase móvil una solución de acetato de etilo/hexano (60:40), y como muestra de referencia se utilizó la solución hidrolizada y filtrada (Fig. 4.6), las placas se revelaron con sulfato cérico amoniaco. Se hace resaltar que el cambio de polaridad en la CCA no necesariamente se hizo cada 500 mL de volumen eluido, sino de acuerdo a las pruebas de CCF ya que también eluyeron impurezas, las cuales fue necesario eliminar antes de recolectar las agliconas, las impurezas eluyeron en la fase móvil

de acetato de etilo/hexano con composición 10:90 a 20:80. La primera unidad de aglicona (Ami) eluyó a partir de la composición 25:75 (acetato de etilo/hexano), para la segunda aglicona (Ama) la elución correspondió a la composición 30:70 (acetato de etilo/hexano). Las fracciones que contenían las agliconas Ami y Ama se reunieron por separado, se eliminó el disolvente, y los sólidos se lavaron con metanol. De 2 gr de extracto de *S. bulbosus* se obtuvieron 20 mg de Ami y 25 mg de Ama.

4.5. PREPARACIÓN DE DERIVADOS

Se preparó el derivado peracetilado del producto natural mayoritario (PNM) y el derivado metilado de la aglicona mayoritaria (Ama), esto fue previo a los experimentos de masas por IE, FAB, RMN¹H y RMN ¹³C.

4.5.1. ACETILACIÓN DEL PNM

En la reacción de acetilación se utilizaron 95 mg del PNM, al cual se le adicionaron 10 mL de anhídrido acético, 0.5 mL de piridina y 0.5 g de tamiz molecular. La reacción se sometió a reflujo durante 30 horas aproximadamente. Después de transcurrido este tiempo se procedió a verificar el grado de acetilación, para esto en primer lugar la reacción se detuvo y se dejó reposar por 1 hora con 10 mL de agua, esto fue para hidrolizar el anhídrido acético que estaba en exceso. En seguida la mezcla de reacción se extrajo con 20 mL (3 veces) de acetato de etilo. La fase orgánica se lavó con 15 mL de ácido clorhídrico acuoso (HCl) 0.01 N para eliminar la piridina. El exceso de ácido clorhídrico se neutralizó con una solución acuosa saturada de bicarbonato de sodio (NaHCO₃) y se lavó con agua destilada hasta un pH neutro.

Finalmente la fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄), el disolvente se eliminó a presión reducida con un rotavapor y el residuo se analizó por CCF empleando como fase móvil una disolución de acetato de etilo/hexano (65:35), las placas se revelaron con sulfato cérico amoniacal. El residuo se volvió a acetilar en las mismas condiciones descritas durante otras 15 horas, la extracción y análisis por CCF se efectuó de la misma manera. Se obtuvieron 144.1 mg del PNM acetilado (PNMac) sin purificar, el cual se sometió a separación en una CCA con soporte de sílica gel 60 (0.040-0.063 mm),

usando como fase móvil una mezcla de acetato de etilo/hexano en polaridad ascendente, la composición inicial de la mezcla fue de 10:90 (acetato de etilo/hexano), el cambio de polaridad se hizo sobre cada 250 mL de fase móvil eluída, estableciendo 10 unidades de magnitud en su variación, así la siguiente composición fue de 20:80 (acetato de etilo/hexano). La fase móvil eluída a partir de la composición en 50:50 se recolectó en fracciones de 100 mL, el disolvente posteriormente se eliminó en un rotavapor y mediante CCF se verificó la pureza del PNMac, la fase móvil en la CCF fue una mezcla de acetato de etilo/hexano (70:30), revelando las placas con sulfato cérico amoniacal. El PNMac eluyó de la CCA a partir de la fase móvil en composición 60:40 (acetato de etilo/hexano), las muestras se colectaron, el disolvente se eliminó, y el residuo fue de 125.1 mg de PNMac puro.

4.5.2. METILACIÓN DE LA AGLICONA MAYORITARIA (Ama).

La reacción de metilación se hizo con diazometano generado in situ a partir de la N-nitroso-N-metil urea ($\text{CH}_3\text{N}(\text{NO})\text{CONH}_2$) (Blatt, 1941). Se pesó 1 mg de la aglicona mayoritaria (Ama), la cual se disolvió en 5 mL de metanol. Por separado se preparó una solución de 5 mL de hidróxido de potasio (KOH) acuoso al 50% y se adicionaron 5 mL de éter etílico; la mezcla se dejó en un baño de hielo por 5 minutos y se le añadieron 500 mg aproximadamente de N-nitroso-N-metil urea. Una vez terminado el burbujeo indicativo de la formación del diazometano, la solución etérea amarilla sobrenadante se decantó y se secó sobre lentejas de KOH. Posteriormente el sobrenadante se vació sobre la muestra disuelta, la esterificación del ácido fue instantánea; la formación del derivado metilado se visualizó por CCF eluyendo con una solución acetato de etilo/hexano (75:25). Una vez ocurrida la reacción se eliminó el éter y el diazometano restante por agitación, finalmente se secó la muestra a presión reducida y se obtuvo la aglicona mayoritaria metilada (Agmet).

4.6. EXPERIMENTOS EN ESPECTROMETRÍA DE MASAS Y ESPECTROSCOPÍA DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR.

Los experimentos de RMN se llevaron a cabo en dos espectrómetros marca Varian Mercury-300 MHz, uno de ellos con modo de detección inversa. Los espectros de ^1H , ^{13}C , GATED, COSY, gHSQC y gHMBC, se obtuvieron a temperatura ambiente y en disolventes

como: CD_3OD y CDCl_3 , los disolventes dependieron de la muestra. Los desplazamientos químicos (δ) fueron ajustados de acuerdo al desplazamiento del TMS ó del disolvente usado.

Los experimentos gHSQC y gHMBC se obtuvieron con incrementos de tiempo de 1024 y 256 con 64 y 128 transientes para cada incremento y con tiempos de relajación de 1.0 s. El análisis de RMN mencionado se efectuó únicamente sobre el producto natural mayoritario (PNM) (107 mg) y su derivado peracetilado (PNMac) (120 mg). En la espectrometría de masas por ionización de impacto electrónico (IE), se analizó únicamente la Agmet (1 mg). Para la espectrometría de masas por ionización con bombardeo de átomos rápidos, el registro fue en modo negativo y como matriz se utilizó el glicerol, el análisis se hizo tanto con el PNM (5 mg) como con el PNMac (5 mg).

5.2.3. ESTRUCTURA MOLECULAR DEL PNM

La configuración anomérica para cada monosacárido presente en el PNM, se caracterizó por sus constantes de acoplamiento entre el carbono e hidrógeno anomérico ($^1J_{CH}$). De acuerdo a lo descrito (Perlin y Casu, 1969; Bock y Pedersen, 1975), las $^1J_{CH}$ con valores aproximados en 170 Hz para carbonos e hidrógenos anoméricos tienen la configuración α , debido a que los hidrógenos anoméricos ocupan una posición ecuatorial, por otro lado las $^1J_{CH}$ con valores aproximados de 160 Hz tienen la configuración β , en este caso los hidrógenos anoméricos ocupan posiciones axiales. Por lo tanto los monosacáridos Glu, Glu' y Xil con $^1J_{CH}$ de 156.1, 159.2 y 159.1 Hz poseen una configuración β , mientras los monosacáridos Ara, Ram', Ram con iguales $^1J_{CH}$ de 171 Hz tienen una configuración α . La configuración de la Api se determinó que era β por la comparación en los desplazamientos químicos de su C1 (δ 112.0) y C2 (δ 77.7) con otro estudio similar (Hiradate *et al.*, 1999).

De acuerdo a los experimentos de RMN sobre el PNM_{ac} y PNM así como el experimento de masas por ionización BAR, se propone la siguiente estructura molecular para el PNM obtenido de la especie *S. bulbosus* (Fig. 5.45):

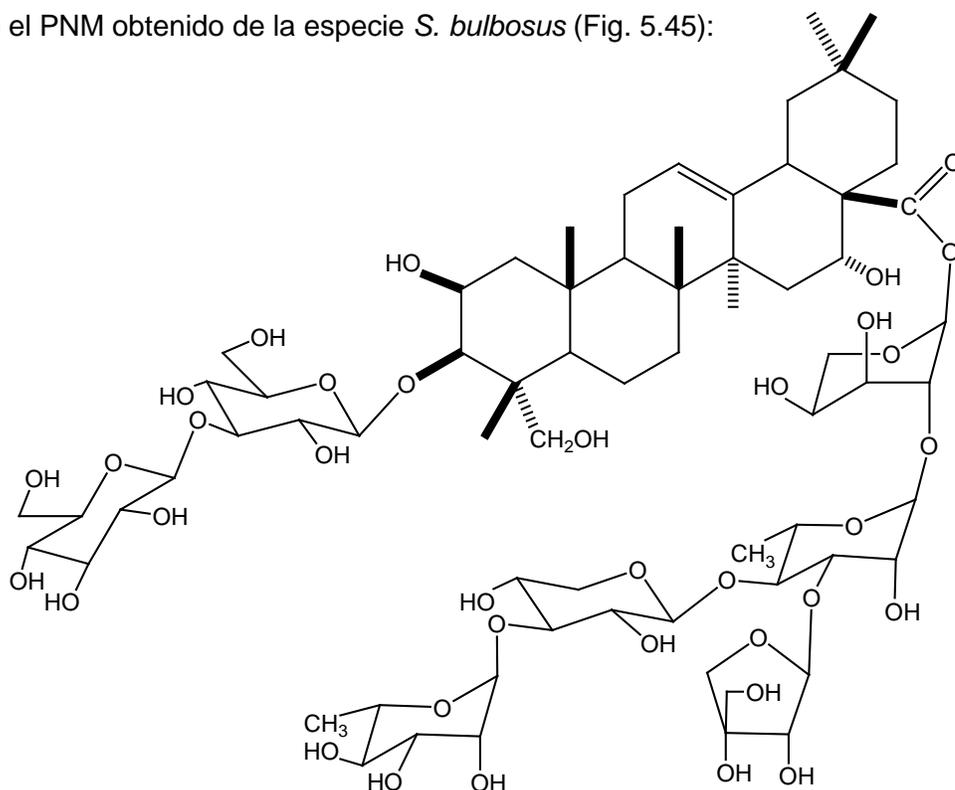


Figura 5.45 Estructura molecular d

6. CONCLUSIONES

- ♦ A partir del extracto metanólico del tubérculo de *Sicyos bulbosus* se describe y caracteriza por primera vez el compuesto mayoritario (PNM): **ácido 3-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosil]-28-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-xilanopiranosil-(1 \rightarrow 4)- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-**
-
-

β -L-arabinopiranosil] poligalácico, con fórmula molecular de $C_{69}H_{112}O_{36}$ y con un peso de 1516 umas.

- ♦ Se describe y caracteriza por primera vez el derivado peracetilado del **ácido 3-O- $[\beta$ -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-glucopiranosil]-28-O- $[\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 3)- β -D-xilanopiranosil-(1 \rightarrow 4)- $[\beta$ -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 3)]- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -L-arabinopiranosil] poligalácico**.
- ♦ Este es el primer estudio químico realizado en *Sicyos bulbosus*, resaltando que se ha iniciado una línea de investigación sobre los distintos componentes extraídos de esta especie.

7. BIBLIOGRAFÍA

Achenbach Hans, Waibel Reiner, Hefter-bübl Ursula y Constenla A. Manuel. Constituents of *Fevillea cordifolia*: new norcucurbitacin and cucurbitacin glycosides. *J. Nat. Prod.* 1993, 56: 1506-1519.

Adel M. M., Sehnal F., y Jurzysta M. Effects of alfalfa saponins on the moth *Spodoptera litorialis*. *Journal of Chemical Ecology.* 2000 26: 1065–1078.

Agerbirk N., Olsen C. E., Bibby B. M., Frandsen H. O., Brow I. D., Nielsen J. K., y Renwick Jaa. A saponin correlated with variable resistance of *Barbarea vulgaris* to the diamondback moth *Plutella xylostella*. *Journal of Chemical Ecology*. 2003, 29: 1417–1433.

Agrawal K. Pawan. NMR spectroscopy in the structural elucidation of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*. 1992, 31: 3307-3330.

Agrawal K. Pawan y Pathak K. Ashin. Nuclear magnetic resonance spectroscopic approaches for the determination of interglycosidic linkage and sequence in oligosaccharides. *Phytochem. Anal.* 1996, 7: 113-130.

Aladesanmi J. Adetunji. **Tetrapleura tetraptera: molluscicidal activity and chemical constituents.** *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 2007, 4: 23-36.

Arévalo Rodríguez Isela, Lira Rafael y Dávila Patricia. Two new species of *Sicyos* (Cucurbitaceae) from Guerrero and Oaxaca, México. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 2004, 145: 373-378.

Bird Colin. *Química Ambiental*. Editorial Reverté S. A. 2da. Edición, 2001.

Barber Michael, Bordoll R. Robert, Elliott J. Gerard, Sedgwick R. Donald y Tyler N. Andrew. Fast atom bombardment mass spectrometry. *Anal. Chem.* 1982, 54: 645A-657A.

Bhowmik C. Prasanta, e Inderjit. Challenges and opportunities in implementing allelopathy for natural weed management. *Crop Protection*. 2003, 22: 661-671.

Blatt A. H. *Organic Syntheses*. Editorial John Wiley and Sons Ltd. 2a. Edición, 1941

Bock Klaus y Pedersen Christian. A study of ^{13}C coupling constants in pentopyranoses and some of their derivatives. *Acta Chemica Scandinavica*. 1975, 29: 258-264.

Breitmaier Eberhard. Structure by NMR in organic chemistry: a practical guide. Editorial John Wiley and Sons Ltd. 1ra. Edición, 2002.

Budzikiewicz H., Wilson J. M. y Djerassi Carl. Mass spectrometry in structural and stereochemical problems. XXXII: pentacyclic triterpenes. *J. Am. Chem. Soc.* 1963, 85: 3688-3699.

Carmona Pineda Miriam. Estudio químico de *Sechium Mexicanum*. Tesis de maestría, 2007. Universidad del Mar.

Carpinella C. María, Defago T. María, Valladares Graciela, y Palacios M. Sara. Antifeedant and insecticide properties of a limonoid from *Melia azedarach* (Meliaceae) with potential use for pest management. *J. Agric. Food Chem.* 2003, 51: 369-374.

Castro V, Ramírez E, Mora G, Iwase Y, Nagao T, Okabe H, Matsunaga H, Katano M y Ori M. Structures and antiproliferative activity of saponins from *Sechium pittieri* and *S. talamancense*. *Chem. Pharm. Bull.* 1997, 45: 349-358.

Céspedes L. Carlos, Calderón S. José, Lina Laura, y Aranda Eduardo. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). *J. Agric. Food Chem.* 2000, 48: 1903-1908.

Chapagain B.P., Saharan V., y Wiesman Z. Larvicidal activity of saponins from *balanites aegyptiaca* callus against *aedes aegypti* mosquito. *Bioresour. Technol.* 2008, 99: 1165-1168.

Chen Chao Jian, Chiu Hua Ming, Nie Lin Rui, Cordell A. Geoffrey y Qiu X. Samuel. Cucurbitacins and cucurbitanos glycosides: structures and biological activities. *Nat. Prod. Rep.* 2005, 22: 386-399.

Cummings E., Hundal H. S., Wackerhage H., M. Hope, M. Belle, E. Adeghate y J. Singh. *Momordica charantia* fruit juice stimulates glucose and amino acid uptakes in L6 myotubes. *Mol. Cell. Biochem.* 2004, 261: 99-104.

Diatewa M, Samba CB, Assah TC, Abena AA. Hypoglycemic and antihyperglycemic effects of diethyl ether fraction isolated from the aqueous extract of the leaves of *Cogniauxia podoleana* Baillon in normal and alloxan-induced diabetic rats.

J Ethnopharmacol. 2004, 92: 229-32.

Duke O. Stephen, Romagni G. Joanne, y Dayan E. Franck. Natural products as sources for new mechanisms of herbicidal action. *Crop Protection.* 2000, 19: 583-589.

Eisner Thomas y Jerrold Meinwald. Chemical ecology: the chemistry of biotic interaction. Editorial Academia nacional de ciencias, 1ra. Edición, 1995.

Fatope O. Majekodunmi, Takeda Yoshio, Yamashita Hiroyasu, Okabe Hikaru y Yamauchi Tatsuo. New cucurbitane triterpenoids from *Momordica charantia*. *J. Nat. Prod.* 1990, 53: 1491-1497.

Freed V. H., Chiou C. T., y Haque R. Chemodynamics: transport and behavior of chemicals in the environment, a problem in environmental health. *Environmental Health Perspectives.* 1977, 20: 55-70.

Fu W, Shimizu N, Dou D, Takeda T, Fu R, Pei Y., y Chen Y. Five new triterpenoid saponins from the roots of *Platycodon grandiflorum*. *Chem. Pharm. Bull.* 2006, 54: 557-560.

Garcidueñas Rojas Manuel, y González Gómez Hilda. Herbicidas de origen natural. *Ciencia UANL.* 2002, 5: 160-164.

Golawska S. Deterrence and toxicity of plants saponins for the pea aphid *acyrthosiphon pisum harris*. *J. Chem. Ecol.* 2007, 33: 1598-1606.

Herlt J. Anthony, Mander N. Lewis, Pongoh Emma, Rumampuk J. Rymond, y Tarigan Ponis. Two major saponins from seeds of *Barringtonia asiatica*: putative antifeedants toward *Epilachna* sp. Larvae. *J. Nat. Prod.* 2002, 65: 115-120.

Hiradate Syuntaro, Yada Hiroshi, Ishii Tadashi, Nakajima Naoko, Ohnishi-Kameyama Mayumi, Sugie Hajime, Zungsontiporn Siriporn, Fujii Yoshiharu. Three plant growth inhibiting saponins from *Duranta repens*. *Phytochemistry.* 1999, 52:1223-1228.

Hussein H. M., Dimetry N., Zidan Z., Iss-hak E. R., y Sehna If.. Effects of insect growth regulators on the hairy rose beetle, *Triponota squalida* (Coleoptera Scarabeidae). *Journal of Applied Entomology.* 2005 129: 142-148.

Inose Y, Toshio M y Ueno A. Studies on the constituents of *Solidago virga-aurea* L. II. Structure of solidagosaponins X-XX. *Chem. Pharm. Bull.* 1992, 40: 946-953.

Joshi Ravindra C., Ricardo San Martín, Saez-Navarrete Cesar, Alarcon John, Sainz Javier, Antolin M. Mina, Martin Antonio R., y Leocadio S. Sebastian. Efficacy of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins against golden apple snail (*Pomacea canaliculata*) in the Philippines under laboratory conditions. *Crop protection.* 2008, 27: 553-557.

Klayman Daniel L., Lin A. J., Acton N., Scovill J. P., Hoch J. M., Milhous W. K., Theoharides A. D., y Dobek A. S. Isolation of artemisinin (qinghaosu) from *Artemisia annua* growing in the United States. *J. Nat. Prod.* 1984, 47: 715-717.

Kupchan Morris S., Smith M. Roger, Aynehchi Yaghoub y Maruyama Masao. Tumor inhibitors. LVI. Cucurbitacins O, P, and Q, the cytotoxic principles of *Brandegea bigelovii*. *J. Org. Chem.* 1970, 35: 2891-2894.

León Ismael, Enriquez G. Raul, Mclear Stewart, Reynolds F. William y Yu Margaret. Isolation and identification by 2D NMR of two new complex saponins from *Microsechium helleri*. *Magn. Reson. Chem.* 1998, 36: S111-S117.

Lira Rafael y Caballero Javier. Ethnobotany of the wild mexican cucurbitaceae. *Economic Botany.* 2002, 56: 380-398.

[Marquina S.](#), [Maldonado N.](#), [Garduño-Ramírez M. L.](#), [Aranda E.](#), [Villarreal M. L.](#), [Navarro V.](#), [Bye R.](#), [Delgado G.](#), y [Alvarez L.](#) *Phytochemistry.* 2001, 56: 93-97.

Nes David y Glenn W. Patterson. Effects of tetracyclic and pentacyclic triterpenoids on growth of *Phytophthora cactorum*. *J. Nat. Prod.* 1981, 44: 215-220.

Oleszek W. A. Chromatographic determination of plant saponins. *J. Chromatogr. A.* 2002, 967: 147-162.

Perlin A.S., y Casu B. Carbon-13 y proton magnetic resonance spectra of D-Glucose-¹³C. *Tetrahedron Letters.* 1969, 34: 2921-2924.

-
-
- Reynolds F. William y Enríquez G. Raúl. Choosing the best pulse sequences, acquisition parameters, postacquisition processing strategies, and probes for natural product structure elucidation by NMR spectroscopy. *J. Nat. Prod.* 2002, 65: 221-244.
- Saade Lira Rafael. Cucurbitáceas. Flora del bajío y de regiones adyacentes. Febrero del 2001, fascículo 92: 1-120.
- Sahu N. Triterpenoids saponins of *Mimusops elengi*. *Phytochemistry*. 1996, 41: 883-886.
- Schöpke T, Agha H, Gras V, Hiller K. Triterpenoid saponins from *Bellium bellidioides*. *Phytochemistry*. 1994, 36: 449-453.
- Schöpke T, Al-Tawaha, Wray Victor, Nimtz Manfred, Meyer Anke y Hiller Karl. Triterpenoid saponins from the aerial parts of *Aster Bellidiastrum*. *Phytochemistry*. 1995, 40: 1489-1492.
- Silva G., Lagunes A., Rodríguez J. C., y Rodríguez D. Insecticidas vegetales; una vieja y nueva alternativa en el control de plagas. *Revista Manejo Integrado de Plagas (CATIE)* 2002.
- Tan Ninghua, Zhou Jun, y Zhao Shouxun. Advances in structural elucidation of glucoronide oleanane-type triterpene carboxylic acid 3,28-O-bisdesmodides (1962-1997). *Phytochemistry*. 1999, 52: 153-192.
- Taylor W. G. Fields P. G., y Sutherland D. H. Insecticidal components from field pea extracts: soyasaponins and lysolecithins. *J. Agric Food Chem.* 2004, 52: 7484-7490.
- Tomczyk Anna, Kropczynska Danuta, Ptak Aleksandra, Titova Marija, Shumilo Nikolaj, Oreshnikov Aleksander, Nosov Aleksander, y Furmanowa Mirosława. Effect of *Polyscias Filicifolia* Bayley extracts on the behavior of the leaf miner *Cameraria Ohridella* Deschka and Dimic on horse chestnut trees. *Acta biologica Cracoviensia*. 2007, 49: 55-60.
- Turk Amos, Turk Jonathan y Wittes T. Janet. *Ecología, contaminación y medio ambiente*. Editorial McGraw Hill. 1ra. Edición, 1973.
-
-

Urum K., y Pekdermi T. Evaluation of biosurfactants for crude oil contaminated soil washing. *Chemosphere*. 2004, 57: 1139-1150.

Vincken Jean Paul, Heng Lynn, Aede de Groot, y Gruppen Harry. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochemistry*. 2007, 68: 275-297.

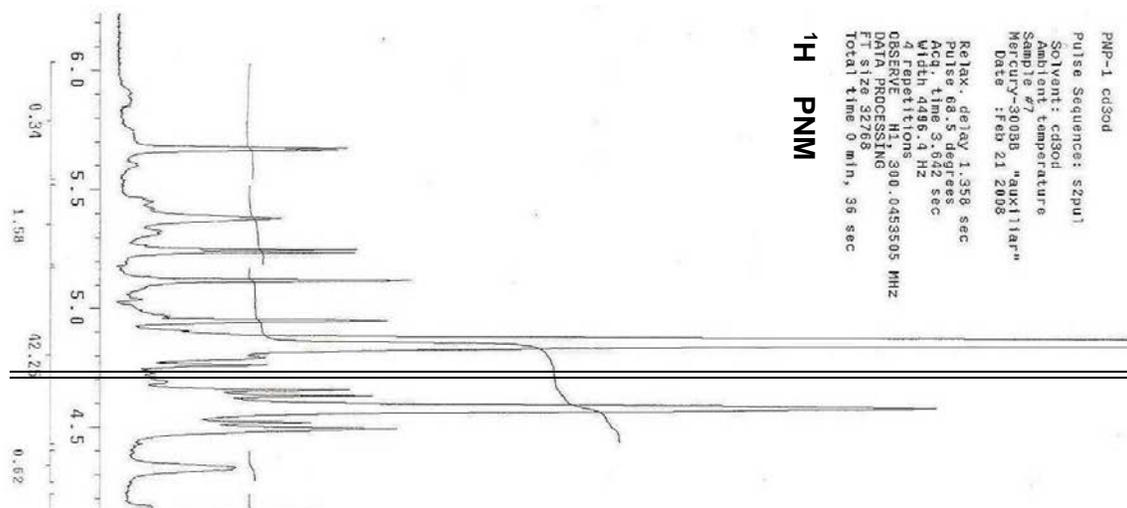
Wiesman Z., y Chapagain B.P. Laboratory evaluation of natural saponin as a bioactive agent against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens*. *Dengue Bulletin*. 2003, 27:168-173.

Williard H. Hobart, Merrit L. Lyane, Dean A. John, Settle A. Frank. Métodos instrumentals de análisis. Editorial iberoamericana. 7ma. Edición, 1988.

Wink Michael. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry*. 2003, 64: 3-19.

Wolfender Jean-Luc, Maillard Marc, Marston Andrew y Hostettmann Kurt. Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides. *Phytochem. Anal.* 1992, 3: 193-214.

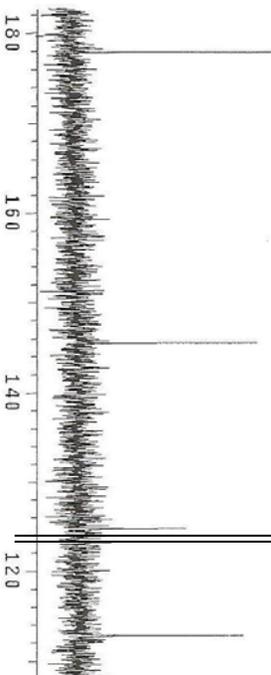
8. APÉNDICE



PNP-1 cd30d
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vmmr1/vmmr/sys/data
Sample directory: auto_18feb2008
Pulse Sequence: szpul
Solvent: CD3OD
Ambient Temperature
Sample #7
File: 0902
Mercury-30088 "aux11tar"
Date: Feb 18 2008

Relax. delay 2.000 sec
Pulse 45.0 degrees
Acq. time 1.784 sec
Width 18867.9 Hz
5000 Repetitions
OBSERVE C13, 75.4462953 MHz
DECUPLE H1, 300.0468048 MHz
Power 33 db
Contingency on
WaitZns disabled
DATA PROCESSING
Line broadening 1.0 Hz
FT size 131072
Total time 5 hr, 21 min, 40 sec



PNP-1.cd30d
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrSYS/data
Sample directory: auto_18Feb2008

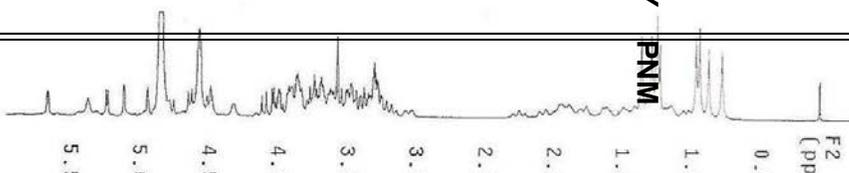
Pulse Sequence: relayh

Solvent: CD3OD
Sample temperature
Sample #7
Name: 0390
Mercury: 300MHz, "gx311ar"
Date: Feb 18 2008

Relax. delay 1.000 sec
AQ 30.45
AQ 30.45
Acq. time 0.213 sec
Width 4807.7 Hz
2D width 4807.7 Hz
3 repetitions
512 increments
OBSERVE H1, 300.0453678 MHz
DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sq. sine bell 0.106 sec
FT size 4095 X 4095
Total time 1 hr, 35 min, 38 sec

¹³C PNM

COSY PNM



PPP-1 cd3cd
STANDARD IN OSSERVE

Archive directory: /export/home/vmmr1/vmmr/sys/data
Sample directory: auto_18feb2008

Pulse Sequence: TOCSY

Solvent: CD3OD

Ambient temperature

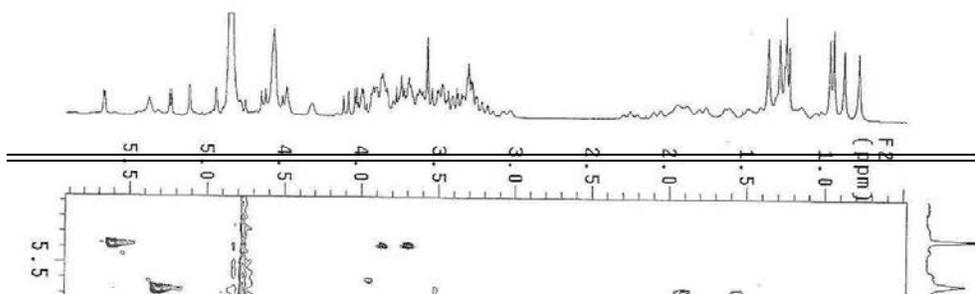
Sample #7

File: 0904

Mercury-300SB "auxiliary"

Date : Feb 18 2008

Relax. delay 1.000 sec
Mixing 0.080 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4807.7 Hz
2D Width 4807.7 Hz
8 Repetitions
2 K Size increments
OBSERVE H1, 300.0453678 MHz
DATA PROCESSING
Data Acquisition 0.099 sec
F1 Data Resolution
Gauss apodization 0.098 sec
FT size 4096 X 4096
Total time 3 hr, 28 min, 45 sec

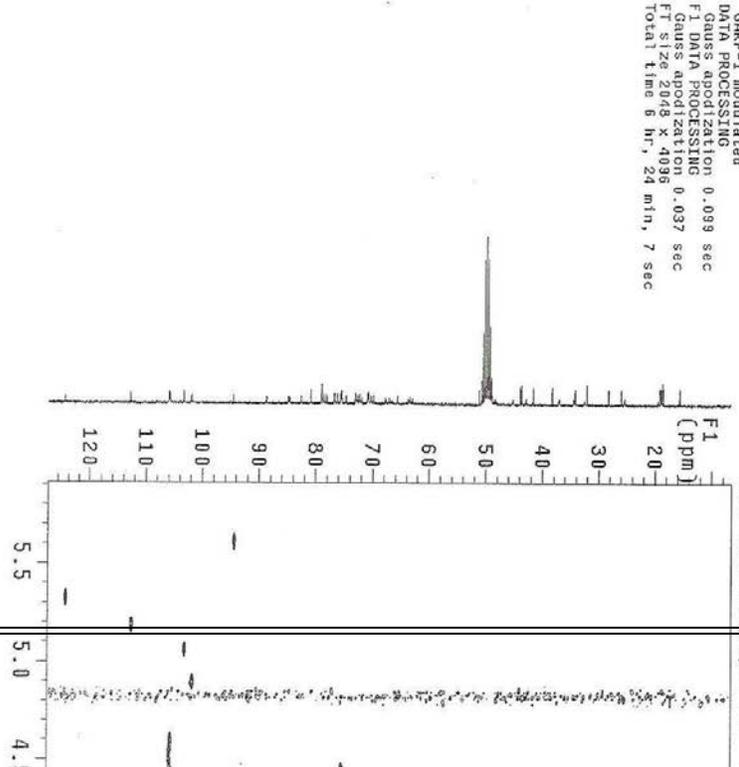


TOCSY PNM

PMP-1 cd3od
STANDARD IH OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrSYS/data
Sample directory: auto_1bf1eb2098
Pulse Sequence: gHSQC
Solvent: CD3OD
Ambient temperature
Sample #7
File: 0906
Mercury-35088 "auxiliary"
Date : Feb 18 2008

Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.213 sec
Width 4807.7 Hz
2D Width 12820.5 Hz
32 repetitions
2 x 256 increments
OBSERVE H1, 300.0453678 MHz
DECUPLE G13, 75.4921039 MHz
Power 16 dB
Power during acquisition
of data
GARP-1 modulated
DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.099 sec
F1 DATA PROCESSING
Gauss apodization 0.037 sec
F2 size 2048 x 4096
Total time 6 hr, 24 min, 7 sec



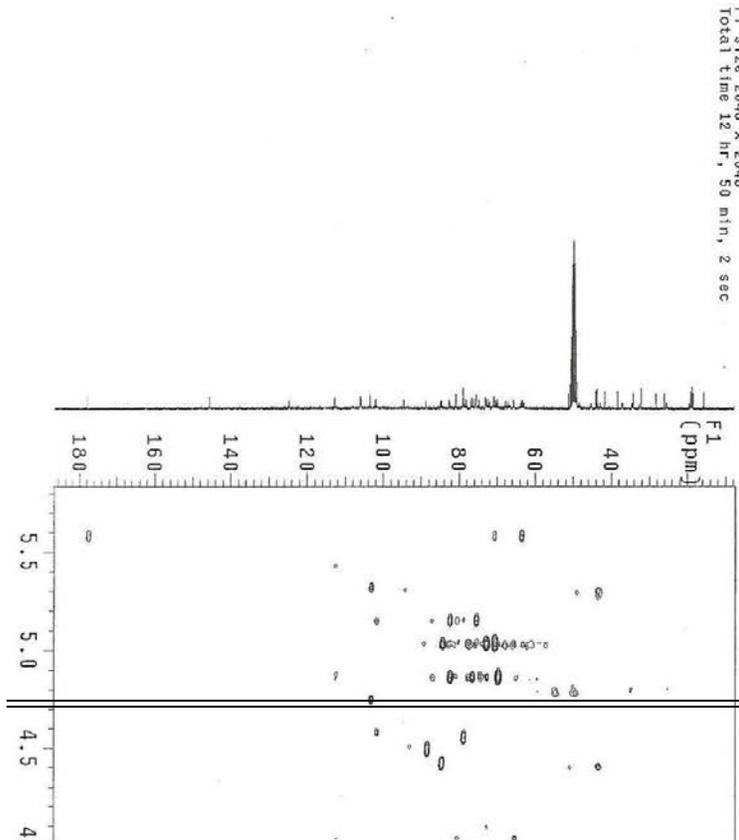
PNP-1 c130d
STANDARD 1H OBSERVE

Archive directory: /export/home/vnmr1/vnmrSYS/data
Sample directory: auto_19Feb2008
File: PNP10N

Pulse Sequence: ghm3c
Solvent: CD3OD
Applicant: temperature
Sample #: Mercury-300BB, "aux11ia"
Date : Feb 20 2008

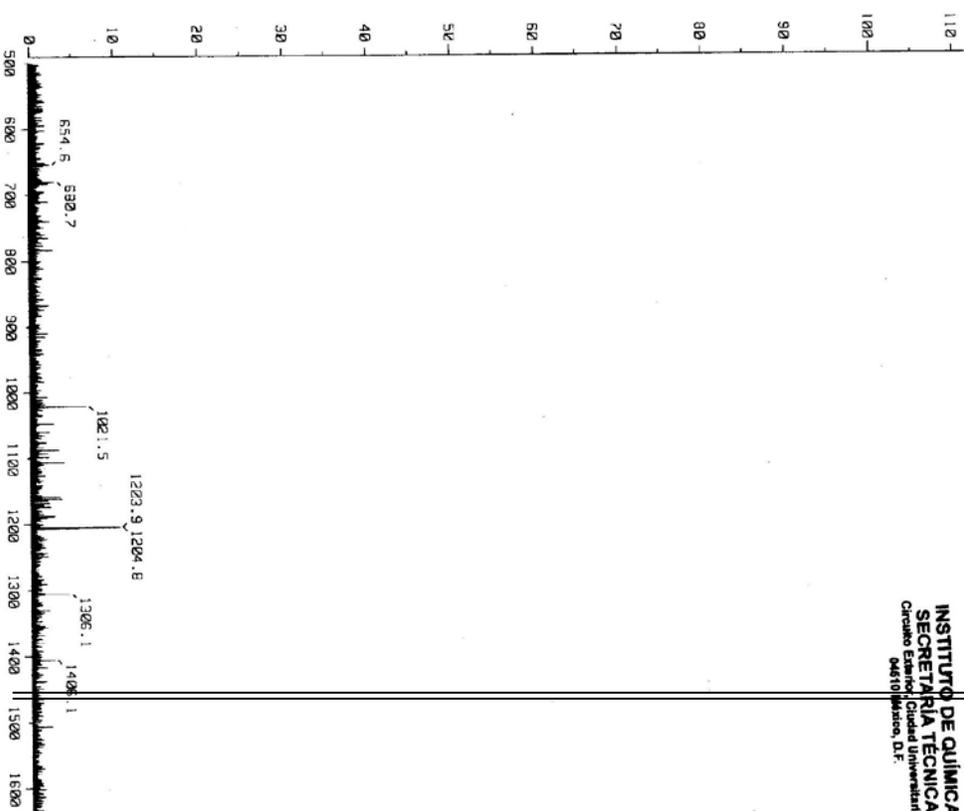
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 21.5 sec
Width 4847.9 Hz
20 Width 18115.9 Hz
64 repetitions
512 increments
OBSERVE H1, 300.0453763 MHz
DATA PROCESSING
Sine bell 0.107 sec
F1 DATA PROCESSING
Sine bell 0.011 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 12 hr, 50 min, 2 sec

HSQC PNM



HMBC PNM

[Mass Spectrum]
Data : Dr-Barriz-Hernandez-0204 Date : 11-Mar-2008 18:45
Sample : 76-STE-1314 PNP/Pe
Institute : Universidad-del-Har
Method : Direct Ion Mode : FSB-
Spectrum Type : Normal Ion (F-Linear)
Scan# : (1,5)
RF : 1.18 min Int. : 18.02
Output m/z range : 500.0000 to 2595.5549 Cut Level : 0.00 %
1254150



INSTITUTO DE QUIMICA
SECRETARIA TECNICA
Ciudad Universitaria
México, D.F.



Espectro de masas (FAB) PNMMac
