

# NUEVOS GLICÓSIDOS ACILADOS DE CIANIDINA PROVENIENTES DE *IPOMOEA CAIRICA*

Andrew G. Mercader<sup>a</sup> y Alicia B. Pomilio<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Investigaciones Físicoquímicas Teóricas y Aplicadas (INIFTA, UNLP, CCT La Plata-CONICET), Diag. 113 y 64, Sucursal 4, C.C. 16, 1900 La Plata, Argentina. [amercader@inifta.unlp.edu.ar](mailto:amercader@inifta.unlp.edu.ar)

<sup>b</sup>Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL, CONICET, UBA), Facultad de Farmacia y Bioquímica/Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires, 1113 Buenos Aires, Argentina. [pomilio@ffyb.uba.ar](mailto:pomilio@ffyb.uba.ar);

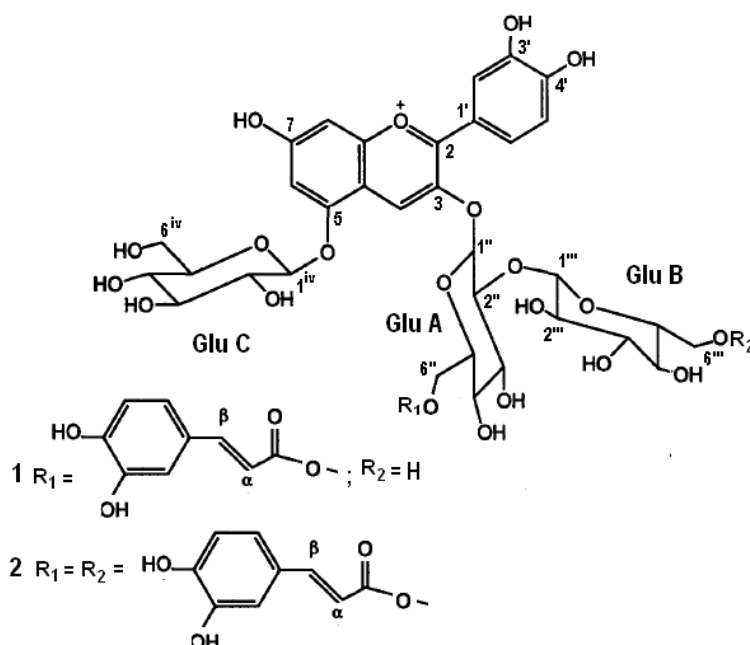
## Introducción

Los glicósidos acilados de antocianidinas presentan estructuras complejas, siendo difícil su extracción y separación, más teniendo en cuenta su sensibilidad a la luz, al oxígeno del aire, al pH y a la temperatura. El objetivo de este trabajo ha sido continuar investigando las antocianinas aciladas presentes en la especie argentina *Ipomoea cairica* (L.) Sweet (familia: Convolvuláceas).<sup>1</sup> Esta familia ha sido poco estudiada desde el punto de vista químico.

Estos compuestos son sales de flavilio, es decir poseen el ion oxonio. Las etapas de extracción, separación y purificación requieren el uso de atmósfera de nitrógeno (o argón), protección de la luz y permanente control de pH.

Las antocianinas aciladas obtenidas en la etapa previa mostraron actividad antioxidante, antimutagenicidad y acción hipoglucemiante.

En este trabajo nos referiremos a la extracción, purificación y elucidación estructural de dos antocianinas aciladas, **1** y **2**, mediante métodos químicos y análisis de datos espectroscópicos.



## Materiales y Métodos

**Material vegetal:** Las plantas de *Ipomoea cairica* (L.) Sweet fueron identificadas por especialistas taxónomos, guardando material de herbario que incluía flores.

**Extracción y aislamiento de las antocianinas:** Las flores se extrajeron por inmersión en HCl/MeOH 0,01% y 0,1%, así como también con ácido acético/MeOH. Los cromatogramas de los extractos crudos obtenidos con distintos medios fueron comparados respecto al rendimiento y degradación. La separación de las antocianinas se realizó mediante TLC y HPLC preparativo.

La determinación estructural se realizó por métodos químicos y análisis espectroscópico.

**Hidrólisis:** La hidrólisis ácida permitió determinar la aglicona, los azúcares y la presencia de un derivado del ácido cinámico. También se hizo una hidrólisis alcalina para eliminar los grupos acilo.

**Cromatografía en capa delgada:** Se utilizaron placas de celulosa analíticas y preparativas con ácido fórmico al 10% como solvente de desarrollo.

**Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC):** Se utilizaron Solvente A (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,5% en H<sub>2</sub>O) y Solvente B (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 1,5%, CH<sub>3</sub>COOH 20%, MeCN 25% en H<sub>2</sub>O) para cromatografía analítica y Solvente A (CH<sub>3</sub>COOH 15% en H<sub>2</sub>O) a 520 nm con detector de arreglo de diodos y Solvente B (CH<sub>3</sub>COOH 15%, MeCN 30% en H<sub>2</sub>O) para HPLC preparativa a 330 nm.

**Análisis espectroscópicos:** Los espectros UV-Vis se registraron en un espectrofotómetro en 0,01% de HCl-MeOH. Se determinó el desplazamiento batocrómico producido por la adición de AlCl<sub>3</sub>-MeOH al 5%.

Los espectros de <sup>1</sup>H-RMN y <sup>13</sup>C-RMN se midieron en un espectrómetro Bruker 700 (Universidad de Heidelberg) en DMSO-*d*<sub>6</sub>:TFA-*d*<sub>1</sub> = 9:1 con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Se realizaron espectros mono- y bidimensionales.

## Resultados y Discusión

De las antocianinas obtenidas interesaron dos de ellas, **1** y **2**, que mostraron ser derivados de cianidina. Por hidrólisis ácida ambas dieron los mismos componentes: cianidina y glucosa, y en el hidrolizado se obtuvo ácido cafeico. Por hidrólisis alcalina, ambas dieron cianidina 3-*O*-soforósido-5-*O*-glucósido.

La distinción entre ambas antocianinas residía evidentemente en la cantidad de grupos cafeoilo, siendo un desafío determinar el tipo de unión y a qué unidades se conectaban los acilos.

En los espectros UV-Vis, la absorción alrededor de 330 nm confirmó la presencia del acilo en ambos compuestos. Los máximos de absorción ( $\lambda_{\text{vis.máx}}$ ) de **1** y **2** mostraron desplazamiento batocrómico por adición de AlCl<sub>3</sub> (de ca. 7 nm) debido a la presencia de grupo catecol y a que las posiciones 3 y 5 de la aglicona estarían ocupadas). Se estimó que el número de acilos correspondía a uno en **1** en base a los valores de  $E_{\text{acilo.máx}}/E_{\text{vis.máx}}$  (absorbancia a  $\lambda_{\text{acilo.máx}}$ /absorbancia a  $\lambda_{\text{vis.máx}}$ ) de 0,49 y a dos en el compuesto **2** por el valor obtenido de esa relación.

Las estructuras completas se establecieron por análisis de los espectros <sup>13</sup>C- y <sup>1</sup>H-RMN, con experimentos 2D. Las señales a campos bajos ( $\delta_{\text{H}}$  6 -9) correspondieron a la aglicona y al ácido cafeico. Se pudo determinar la presencia de cianidina por las señales características correspondientes al núcleo benzopirilio y al anillo B aromático 1,3,4-trisustituido. La presencia de la unidad de (*E*)-cafeoilo en el espectro se confirmó con el núcleo aromático 1,3,4-trisustituido teniendo las señales de protones (*E*)-olefínicos con una constante de acoplamiento grande ( $J_{\alpha,\beta}$  = 16 Hz). A campos altos ( $\delta_{\text{H}}$  3-6), los espectros mostraron también que las 3 unidades de azúcar de la molécula correspondían a glucosa con la configuración  $\beta$ -*D*-glucopiranosilo, debido a las resonancias a un campo menor ( $\delta_{\text{H}}$  4,78-5,68) de todos los protones anoméricos y los valores *J* grandes (*J* = 7,2-9,4 Hz) de los protones anoméricos y los protones del anillo. Al comparar los espectros de las antocianinas aciladas **1** y **2** con el de la correspondiente no acilada (se obtuvo la misma para ambos compuestos) y con la aglicona, se pudieron apreciar las posiciones de glicosidación y las de acilación.

También se determinó la unión interglucosídica como  $\beta(1\rightarrow2)$ . Los espectros NOESY y HMBC dieron más datos directos sobre la presencia de la unión  $\beta$ -D-Glu<sub>B</sub>(1 $\rightarrow$ 2)Glu<sub>A</sub> del sofrósido.

Se confirmaron las relaciones de conexión entre una unidad de aglicona, tres azúcares y un grupo acilo para **1** y lo mismo pero con dos acilos para **2** por mediciones NOESY y HMBC. Resultó importante en HMBC la correlación entre la señal del H anomérico de Glu<sub>A</sub> (H-1<sup>iv</sup>) y la del C-3 de la cianidina, la del H anomérico de Glu<sub>C</sub> (H-1<sup>iv</sup>) y el C-5 de cianidina, la del H anomérico de Glu<sub>B</sub> (H-1<sup>iii</sup>) y el C-2 de Glu<sub>A</sub> (C-2<sup>ii</sup>), la del H-2 de Glu<sub>A</sub> (H-2<sup>ii</sup>) y el C-1 de Glu<sub>B</sub> (C-1<sup>iii</sup>). También fue clave la correlación de la señal del H-6 de Glu<sub>A</sub> (H-6<sup>ii</sup>) y la del C del carbonilo del grupo cafeoilo para el compuesto **1**. Lo mismo para el compuesto **2** pero agregada la correlación de la señal de H-6 de Glu<sub>B</sub> (H-6<sup>iii</sup>) con la del C del carbonilo del cafeoilo. Todo lo cual proporcionó la prueba decisiva de que el grupo acilante estaba unido a G<sub>A</sub>-6OH (= HO-6<sup>ii</sup>) en **1** y los dos grupos acilantes en G<sub>A</sub>-6OH (= HO-6<sup>ii</sup>) y G<sub>B</sub>-6OH (= HO-6<sup>iii</sup>) en **2**.

En conclusión, el compuesto **1** fue inequívocamente determinado como cianidina-3-O-(2-O-(6<sup>ii</sup>-O-(*E*)-cafeoíl- $\beta$ -D-glucopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosido)-5-O- $\beta$ -D-glucopiranosido y el compuesto **2** fue identificado como: cianidina-3-O-(2-O-(6<sup>ii</sup>,6<sup>iii</sup>-O-di-(*E*)-cafeoíl- $\beta$ -D-glucopiranosil)- $\beta$ -D-glucopiranosido)-5-O- $\beta$ -D-glucopiranosido (ver Fig.), mediante métodos químicos y análisis de datos espectroscópicos. Se realizaron estudios de estabilidad de cada compuesto acilado y sin acilar.

## Referencias

1. Eich E. *Solanaceae and Convolvulaceae - Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economical Significance*. Springer: Berlin, Heidelberg, 2008.