

NUEVOS GLICÓSIDOS ACILADOS DE CIANIDINA PROVENIENTES DE *IPOMOEA CAIRICA*

Andrew G. Mercader^a y Alicia B. Pomilio^b

^aInstituto 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

^bInstituto 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;

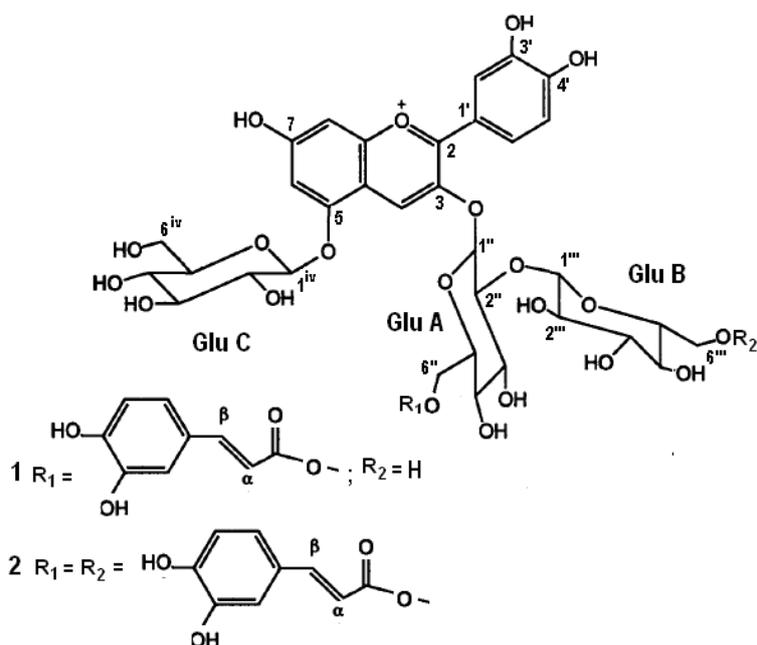
Introducción

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).¹ 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 (H₃PO₄ 1,5% en H₂O) y Solvente B (H₃PO₄ 1,5%, CH₃COOH 20%, MeCN 25% en H₂O) para cromatografía analítica y Solvente A (CH₃COOH 15% en H₂O) a 520 nm con detector de arreglo de diodos y Solvente B (CH₃COOH 15%, MeCN 30% en H₂O) 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 AlCl₃-MeOH al 5%.

Los espectros de ¹H-RMN y ¹³C-RMN se midieron en un espectrómetro Bruker 700 (Universidad de Heidelberg) en DMSO-*d*₆:TFA-*d*₁ = 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 AlCl₃ (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 ¹³C- y ¹H-RMN, con experimentos 2D. Las señales a campos bajos (δ_{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 (δ_{H} 3-6), los espectros mostraron también que las 3 unidades de azúcar de la molécula correspondían a glucosa con la configuración β -*D*-glucopiranosilo, debido a las resonancias a un campo menor (δ_{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 β -D-Glu_B(1 \rightarrow 2)Glu_A del soforósido.

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_A (H-1^{iv}) y la del C-3 de la cianidina, la del H anomérico de Glu_C (H-1^{iv}) y el C-5 de cianidina, la del H anomérico de Glu_B (H-1ⁱⁱⁱ) y el C-2 de Glu_A (C-2ⁱⁱ), la del H-2 de Glu_A (H-2ⁱⁱ) y el C-1 de Glu_B (C-1ⁱⁱⁱ). También fue clave la correlación de la señal del H-6 de Glu_A (H-6ⁱⁱ) 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_B (H-6ⁱⁱⁱ) con la del C del carbonilo del cafeoilo. Todo lo cual proporcionó la prueba decisiva de que el grupo acilante estaba unido a G_A-6OH (= HO-6ⁱⁱ) en **1** y los dos grupos acilantes en G_A-6OH (= HO-6ⁱⁱ) y G_B-6OH (= HO-6ⁱⁱⁱ) en **2**.

En conclusión, el compuesto **1** fue inequívocamente determinado como cianidina-3-O-(2-O-(6ⁱⁱ-O-(*E*)-cafeoíl- β -D-glucopiranosil)- β -D-glucopiranosido)-5-O- β -D-glucopiranosido y el compuesto **2** fue identificado como: cianidina-3-O-(2-O-(6ⁱⁱ,6ⁱⁱⁱ-O-di-(*E*)-cafeoíl- β -D-glucopiranosil)- β -D-glucopiranosido)-5-O- β -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.