

## Identificación de dos nuevas antocianinas aciladas obtenidas de *Ipomoea cairica*.

Andrew G. Mercader<sup>1</sup> y Alicia B. Pomilio<sup>2</sup>

<sup>1</sup> INIFTA, Universidad Nacional de La Plata, Diag. 113 y 64, Suc. 4 CC 16, B1900 La Plata, Argentina. Tel: (+54) (11) 6091 3759; Fax: (+54) (11) 6091 2100, int. 3759; [andrewgmercader@gmail.com](mailto:andrewgmercader@gmail.com)

<sup>2</sup>Área de Hematología, Departamento de Bioquímica Clínica, Hospital de Clínicas “José de San Martín”, Universidad de Buenos Aires, Av. Córdoba 2351, C1120AAF Buenos Aires, Argentina. Tel: (+54) (11) 4814 3952. [abpomilio@sinectis.com.ar](mailto:abpomilio@sinectis.com.ar); [pomilio@ffyb.uba.ar](mailto:pomilio@ffyb.uba.ar)

### Introducción

Continuamos estudiando las antocianinas aciladas presentes en la especie argentina *Ipomoea cairica* (L.) Sweet (familia: Convolvuláceas).<sup>1</sup> 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. 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 nuevas antocianinas aciladas, **1** y **2**, mediante métodos químicos y análisis de datos espectroscópicos.

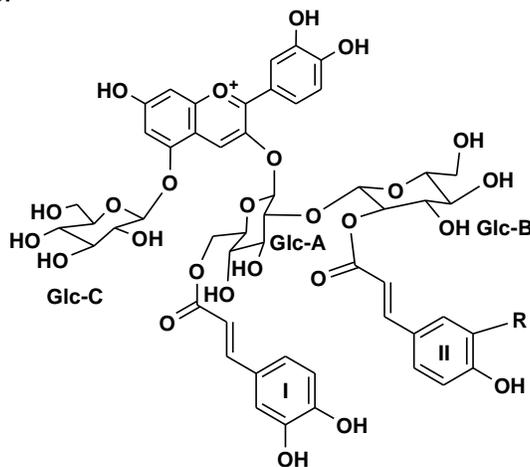


Figura 1: Antocianinas aciladas **1** y **2** de *Ipomoea cairica*. (1): R = H; (2): R = OH.

### 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 ácida:** Permitió en cada caso determinar la aglicona, los azúcares y la presencia de un derivado del ácido cinámico.

**Hidrólisis alcalina:** Cada antociana acilada fue sometida a una hidrólisis alcalina para obtener la antociana desacilada y aparte 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 ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  1,5% en  $\text{H}_2\text{O}$ ) y Solvente B ( $\text{H}_3\text{PO}_4$  1,5%,  $\text{CH}_3\text{COOH}$  20%, MeCN 25% en  $\text{H}_2\text{O}$ ) para cromatografía analítica y Solvente A ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  15% en  $\text{H}_2\text{O}$ ) a 520 nm con detector de arreglo de diodos y Solvente B ( $\text{CH}_3\text{COOH}$  15%, MeCN 30% en  $\text{H}_2\text{O}$ ) 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  $\text{AlCl}_3$ -MeOH al 5%.

Los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN y  $^{13}\text{C}$ -RMN se midieron en un espectrómetro Bruker 700 (Universidad de Heidelberg) en  $\text{DMSO}-d_6$ :TFA- $d_1 = 9:1$  con tetrametilsilano (TMS) como estándar interno. Se realizaron espectros mono- y bidimensionales

## Resultados y Discusión

El extracto crudo contenía varias antocianinas según análisis por HPLC, por lo que fue necesario realizar sucesivas cromatografías para la separación y purificación.

La hidrólisis ácida de los pigmentos produjo la misma aglicona, cianidina, *D*-glucosa como único azúcar y los siguientes grupos acilo que resultaron ser derivados del ácido cinámico: La antocianina **1** dio ácido cafeico y ácido *p*-cumárico, mientras que **2** dio ácido cafeico, confirmado por HPLC con muestras auténticas. La hidrólisis alcalina de las dos antocianinas produjo sólo una antocianina desacilada identificada por espectro de masa FAB, espectro  $^1\text{H}$ -NMR (una cianidina y tres moléculas de glucosa; constante de acoplamiento *vicinal*; protones anoméricos) y análisis de  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY como cianidina-3-*O*-[2-*O*-( $\beta$ -*D*-glucopiranosil)- $\beta$ -*D*-glucopiranosido]-5-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido, que es cianidina-3-*O*-soforósido-5-*O*- $\beta$ -*D*-glucósido. Por degradación con  $\text{H}_2\text{O}_2$  de esta antocianina desacilada se produjo soforosa.

En los espectros UV-Vis, las absorciones en la región 319-327 nm de **1** y **2** también confirmaron la presencia de grupos cafeoilo y *p*-coumaroilo. Se identificaron dos grupos acilo para **1** y **2** sobre la base de los valores de  $E_{\text{máx.acilo}}/E_{\text{máx.vis}}$ .

Las estructuras completas de **1** y **2** fueron establecidas por  $^1\text{H}$ - y  $^{13}\text{C}$ -NMR y experimentos 2D NMR, tales como DQF-COSY, NOESY y HMBC. Las señales  $^{13}\text{C}$  y  $^1\text{H}$  fueron asignadas. Las señales  $^1\text{H}$  a campos bajos ( $\delta_{\text{H}}$  6-9 ppm) mostraron señales características de la aglicona y de los grupos acilo, cafeoilo y *p*-coumaroilo. Las grandes constantes de acoplamiento ( $J_{\alpha,\beta} \approx 16$  Hz) para los protones olefínicos de los grupos acilo confirmaron que todos presentaban configuración *E*.

Las uniones entre una aglicona y tres unidades de glucosa y grupos acilo para los compuestos **1** y **2** fueron determinadas por las mediciones NOESY y HMBC. Así por ejemplo, en los espectros HMBC de **1** y **2**, los claros picos de entrecruzamiento  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  entre H-1 de Glc-A y C-3 de cianidina; H-1 de Glc-B y C-2 de Glc-A; H-2 de Glc-A y C-1 de Glc-B; así como H-1 de Glc-C y C-5 de cianidina, confirmaron las uniones de Glc-A al HO-3 de cianidina, Glc-B al HO-2 de Glc-A y Glc-C al HO-5 de cianidina respectivamente.

Los picos de correlación de las señales de Glc-A y del carbono carbonílico del acilo de **1** y **2** mostraron la presencia de un grupo acilo unido al HO-6 de Glc-A en ambos compuestos. Los picos de correlación entre las señales de H-2 de Glc-B y el carbono carbonílico del acilo indicaron que el segundo grupo acilo estaba unido al HO-2 de Glc-B en ambos compuestos.

Faltaba determinar cómo ubicar los grupos cafeoilo y *p*-cumaroilo en el caso del compuesto **1**. La comparación de los picos de correlación mostró que el compuesto **1** presentaba una correlación entre H-2 de Glc-B y la señal del carbono carbonílico del *p*-cumaroilo que indicó que el grupo *p*-cumaroilo era el acilo en HO-2 de Glc-B. El compuesto **2**, en cambio, mostró correlaciones HMBC del carbono del carbonilo del grupo cafeoilo con H-2 de Glc-B.

Por lo tanto, el compuesto **1** se identificó inequívocamente como cianidina-3-*O*-[2-*O*-(2-*O*-(*E*)-*p*-cumaroil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-6-*O*-(*E*)-cafeoil- $\beta$ -*D*-glucopiranosido]-5-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido (Fig. 1).

El compuesto **2** se identificó como cianidina-3-*O*-[2-*O*-(2-*O*-(*E*)-cafeoil- $\beta$ -*D*-glucopiranosil)-6-*O*-(*E*)-cafeoil- $\beta$ -*D*-glucopiranosido]-5-*O*- $\beta$ -*D*-glucopiranosido (Fig. 1). Estas antocianinas aciladas no se habían informado anteriormente.

A.G.M. es Investigador de CONICET. A.B.P. es Investigadora Superior de CONICET.

## Referencias

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

---