

26
29.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"ESTUDIO FITOQUIMICO PRELIMINAR DE LA
RESINA GLICOSIDICA DE *Ipomoea purga*".

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
HARLEM HAYDEE CRUZ BAILON



262222

MEXICO, D. F.

EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO

Presidente Dra. MATA ESSAYAG RACHEL

Vocal Dr. PEREDA MIRANDA ROGELIO GREGORIO

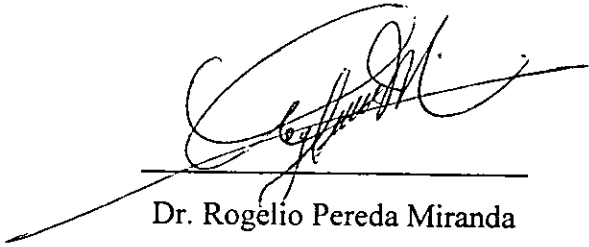
Secretario M. en C. CASTAÑEDA LOPEZ PERLA CAROLINA

1er. Suplente M. en C. ROJAS TOME IRMA SUSANA

2do. Suplente M. en C. CHAVEZ VELASCO DANIEL

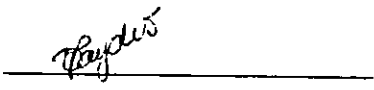
Sitio donde se desarrolló el tema: Lab. 123. Departamento de Farmacia, Conjunto E.
Facultad de Química.

Asesor:



Dr. Rogelio Pereda Miranda

Sustentante:



Harlem Haydeé Cruz Bailón

Es el indígena el que se lanza a la conquista de sus derechos, a la lucha por la vida y finalmente es el indígena el que se mantiene en la antesala de la muerte.

Esta frase no es de mi autoría, es sólo que no recuerdo el nombre del sabio que la dijo

DEDICATORIAS

A mi mamá y a mi papá, por estar siempre conmigo, por quererme mucho, por dejarme ser y porque sin ustedes no pensaría como lo hago, por enseñarme que las cosas que realmente tienen valor son aquellas que podemos compartir con los demás.

A mis hermanos, Esther, Silvia y Pepe, porque sin ustedes la vida sería muy aburrida.

Gracias a ustedes no tengo ni una sola meta en la vida, ustedes saben para quienes son las metas, lo que tengo son puñados de sueños por realizar, y es aquí donde inevitablemente tengo que citar a alguien muy conocido, las palabras no expresan lo que yo quisiera así que...

Los quiero mucho.

Har.

A mis amigas Lluvia, Mariana, Diana y Carmen, por compartir tantos momentos conmigo y estar siempre cerca.

Gina, Gina, Gina creíste que me había olvidado de ti, pues no, es que cada vez que me acuerdo de ti, me acuerdo de otra persona, gracias por ser mi amiga.

Oscarillo que puedo decirte, realizar esta tesis no hubiera sido divertida sin ti, gracias chavito.

A la M. en C. Beatriz Hernández Carlos, por su amistad, compañerismo, paciencia y los conocimientos brindados en la realización de esta tesis, nótese el tono de solemnidad, O.K. Gracias Bety.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 123, Miriam, Emma, Moustapha y Mabel, por hacer agradable el tiempo que pase con ustedes.

Indudablemente, no podía faltar el Dr. Rogelio Pereda, por brindarme la oportunidad de estar aquí, por su única e incomparable dirección, por su genialidad, por lo enigmático de su carácter, por mil cosas que no puedo explicar, simplemente...

Gracias a todos.

AGRADECIMIENTOS.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo económico de los siguientes proyectos DGAPA-UNAM (Dirección General de Asuntos del Personal Académico) IN205197 y CONACyT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) convenio 400313-5-25118N.

Agradezco al "Subprograma 127" de la Facultad de Química-UNAM por la beca con la que fui beneficiada.

Al personal de la USAI (Unidad de Servicio y Apoyo a la Investigación), a la M. en C. Nuria Estorau, al M. en C. José Luis Gallegos y a la Q. Marisela Gutiérrez, por el registro de los espectros de RMN, espectrometría de masas y rotación óptica.

A las M. en C. Isabel Chávez y Beatriz Quiroz de los laboratorios de RMN del Instituto de Química de la UNAM, por el registro de los espectros de RMN.

INDICE

	Página
I. Lista de cuadros.	II
II. Lista de figuras.	III
III. Lista de espectros.	V
IV. Lista de Abreviaturas.	V
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	4
2.1 Familia Convolvulaceae. Aspectos etnobotánicos generales.	4
2.2 Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae.	5
2.3 Propiedades biológicas de las resinas glicosídicas.	12
2.4 Características etnobotánicas de la raíz de jalapa, <i>Ipomoea purga</i> .	13
2.5 Estudios fitoquímicos de la raíz de <i>Ipomoea purga</i> .	15
3. Justificación.	17
4. Objetivos.	17
5. Parte experimental.	18
5.1 Procedimientos generales.	18
5.1.1 Cromatografía en columna (CC).	18
5.1.2 Cromatografía en capa fina (CCF).	18
5.1.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	18
5.1.4 Determinación de las constantes físicas.	18
5.2 Material vegetal.	19
5.3 Preparación del extracto de la raíz de <i>Ipomoea purga</i> .	19
5.4 Fraccionamiento primario del extracto metanólico.	19
5.5 Preparación de los derivados.	21
5.5.1 Hidrólisis alcalina.	21
5.5.2 Reacción de alquilación con diazometano.	21
5.5.3 Reacción de acetilación del compuesto 1.	23
5.5.4 Hidrólisis ácida del compuesto 1.	24
5.5.4.1 Hidrólisis ácida.	24

5.5.4.2 Sililación del convolvulinato de metilo.	24
5.6 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).	26
5.6.1 Preparación de los disolventes.	26
5.6.2 Preparación de las muestras.	26
5.6.3 Análisis de IV-M mediante HPLC.	26
5.6.3.1 Condiciones instrumentales a nivel analítico.	27
5.6.3.2 Condiciones instrumentales a nivel preparativo.	28
5.6.4 Purificación del derivado peracetilado (2) mediante HPLC.	28
5.6.4.1 Condiciones instrumentales a nivel analítico.	29
5.6.4.2 Condiciones instrumentales a nivel preparativo.	29
6. Resultados y discusión.	30
6.1 Extracción y fraccionamiento de la convolvulina de la raíz de <i>Ipomoea purga</i> .	30
6.2 Aislamiento por HPLC del éster metílico del ácido glicosídico mayoritario.	32
6.3 Purificación del derivado peracetilado (2) mediante HPLC.	36
6.4 Caracterización de los productos de hidrólisis ácida del compuesto 1.	38
6.4.1 Caracterización de la aglicona.	38
6.4.2 Caracterización de los carbohidratos.	39
6.5 Caracterización espectrométrica y espectroscópica del compuesto 1.	43
7. Conclusiones.	49
8. Bibliografía.	50
9. Espectros.	54

I. LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Ejemplos de principios activos encontrados en plantas que son prototipos para el desarrollo de otros fármacos.	2
Cuadro 2. Ejemplos selectos de principios activos descubiertos a partir de	

plantas superiores.	3
Cuadro 3. Principales productos de las reacciones degradativas (hidrólisis básica y ácida) de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas.	6
Cuadro 4. Datos de citotoxicidad de la escamonina I, la tricolorina A y sus ácidos glicosídicos asociados.	13
Cuadro 5. Características etnobotánicas de <i>Ipomoea purga</i> .	13
Cuadro 6. Fraccionamiento de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> .	20
Cuadro 7. Análisis mediante HPLC de la mezcla de carbohidratos obtenida a partir de la hidrólisis ácida de la convolvulina de <i>Ipomoea purga</i> .	25
Cuadro 8. Coelución de la mezcla de carbohidratos con los estándares L-ramnosa, D-fucosa y D-glucosa.	41
Cuadro 9. Coelución de la mezcla de monosacáridos con el estándar D-quinovosa.	42
Cuadro 10. Señales diagnósticas detectadas en la RMN ^1H y ^{13}C para el núcleo oligosacárido del compuesto 1.	45
Cuadro 11. Señales diagnósticas detectadas en la RMN ^1H y ^{13}C para el núcleo oligosacárido del derivado peracetilado del compuesto 1.	45
Cuadro 12. Conectividades heteronucleares $^3J_{13\text{C}-1\text{H}}$ observadas en la resonancia magnética nuclear bidimensional heteronuclear (HMBC).	46

II. LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Estructuras de las orizabinas I-IV de <i>Ipomoea orizabensis</i> .	7
Figura 2. Merremina, dímero encontrado en la resina glicosídica de <i>Merremia hungaiensis</i> .	8
Figura 3. Tricolorinas A-H de <i>Ipomoea tricolor</i> .	11
Figura 4. Apariencia macroscópica de la Xalapa verdadera, <i>Ipomoea purga</i> .	13
Figura 5. D-quinovósido descrito por Singh y Stacey.	16
Figura 6. Escamonina I componente mayoritario de la jalapina de <i>Ipomoea purga</i> .	16

Figura 7. Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas a partir de la convolvulina (A) y de la reacción de hidrólisis básica de cada una de éstas (B).	30
Figura 8. Procedimiento de análisis.	31
Figura 9. Cromatograma de líquidos que ilustra la separación de la muestra IV-M bajo condiciones analíticas.	33
Figura 10. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo generado durante el proceso de purificación del compuesto mayoritario (1).	34
Figura 11. Empleo de la técnica de reciclaje de la muestra para la purificación de la compuesto 1.	35
Figura 12. Placa cromatográfica que muestra el R_f desarrollado por el compuesto peracetilado (2).	36
Figura 13. Cromatograma que muestra la separación a nivel analítico del compuesto 2.	37
Figura 14. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo generado durante la purificación del compuesto 2.	38
Figura 15. Espectro de masas y patrón de fragmentación observado para el derivado sililado del convolvulinato de metilo.	39
Figura 16. Cromatograma de líquidos de la mezcla de monosacáridos obtenida durante la hidrólisis ácida del compuesto 1.	40
Figura 17. Coelución de la mezcla de carbohidratos con los estándares L-ramnosa, D-fucosa y D-glucosa.	41
Figura 18. Coelución de la mezcla de monosacáridos con el estándar D-quinovosa.	42
Figura 19. Espectro de masas FAB-Negativo del compuesto 1.	44
Figura 20. Conectividades heteronucleares $^3J_{13C-1H}$ observadas en la resonancia magnética nuclear bidimensional heteronuclear (HMBC).	47
Figura 21. Estructura del ácido glicosídico constitutivo del núcleo oligosacárido de las resinas glicosídicas de <i>Ipomoea purga</i> .	48

III. LISTA DE ESPECTROS

	Página
Espectro No. 1. RMN ^1H del compuesto 1.	55
Espectro No. 2. RMN ^{13}C del compuesto 1.	56
Espectro No. 3. RMN ^1H del compuesto 2.	57
Espectro No. 4. RMN ^{13}C del compuesto 2.	58
Espectro No. 5. RMN ^1H del convolvulinato de metilo.	59
Espectro No. 6. RMN ^{13}C del convolvulinato de metilo.	60

IV. LISTA DE ABREVIATURAS

- ° C: grado centígrado.
- $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$: piridina deuterada.
- CHCl_3 : cloroformo.
- CH_3CN : acetonitrilo.
- cm: centímetro.
- Cov: ácido convolvulínico.
- d: señal doble.
- Da: daltones
- dc: señal doble de cuádruples.
- dd: señal doble de dobles.
- d.i.: diámetro interno.
- Fuc: D-fucosa.
- g: gramos.
- Glu: D-glucosa.
- H_3BO_3 : ácido bórico.
- Hex: hexano.
- H_2O : agua.
- Hz: hertzios.
- J*: constante de acoplamiento.
- 3J : constante de acoplamiento a tres enlaces.

Qui: D-quinovosa.
{M}⁺: ión molecular.
{M-1}⁻¹: ión cuasimolecular.
Me₂CO: acetona.
MeOH: metanol.
mg: miligramo.
Mhz: megahertzios.
mL: mililitro.
μL: microlitro.
μm: micrometro.
mm: milímetros.
m/z: relación masa-carga
N: Normalidad.
N₂: nitrógeno.
nm: nanómetro
p.f.: punto de fusión.
ppm: partes por millón.
RA: reactivo analítico.
Ram: L-ramnosa.
R_f: factor de retención.
RMN ¹³C: resonancia magnética nuclear de carbono 13.
RMN ¹H: resonancia magnética nuclear protónica.
s: señal simple.
ss: señal sobrepuesta.
t_R: tiempo de retención.
TMS: tetrametilsilicio.

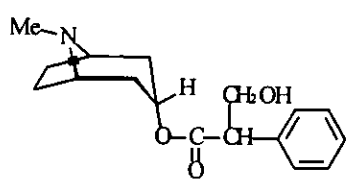
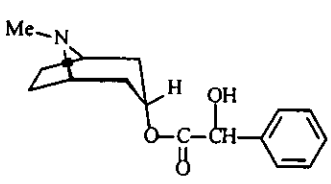
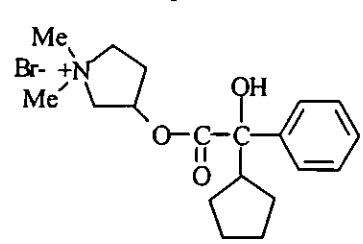
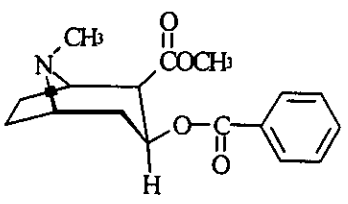
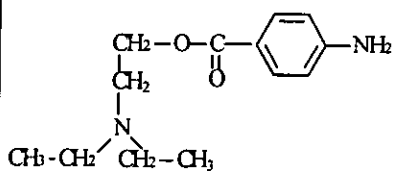
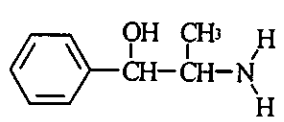
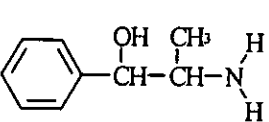
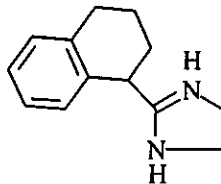
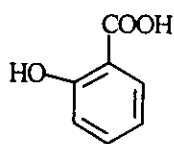
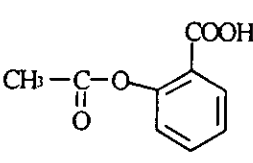
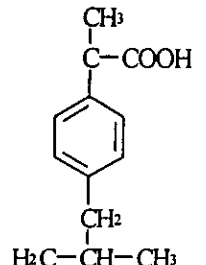
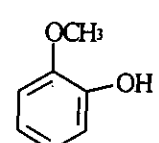
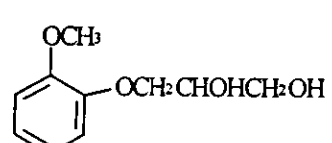
1. INTRODUCCION

Desde tiempos remotos hasta nuestros días, el hombre ha tratado de curar sus enfermedades mediante el empleo de productos de origen natural, esto debido principalmente a que cerca del 80% de los 5,200 millones de personas que viven en el mundo, carecen de los medios necesarios para adquirir medicina alópata, por lo que para suplir sus necesidades mínimas de salud recurren a las plantas medicinales utilizadas en la medicina tradicional. Estas plantas resultan ser fuentes potenciales de sustancias con actividad biológica, por lo que son los candidatos ideales para el estudio de la seguridad y eficacia de los principios activos que contienen, al mismo tiempo que se desarrollan nuevos productos galénicos que cumplan con los estándares de calidad requeridos para el tratamiento de una enfermedad (Farnsworth, 1994).

En la actualidad se estima que el 50% del total de las prescripciones médicas corresponden a sustancias químicas sintéticas, el 12% son de productos derivados de microorganismos, el 6% derivados de animales, el 7% de origen mineral y al menos el 25% de los fármacos usados en EE.UU. y Canadá, son de origen vegetal (Robbers, *et al.*, 1996). Considerando los porcentajes antes mencionados, se desprende que las plantas son una fuente importante de compuestos con una gran variedad de actividades biológicas; estas sustancias pueden tener eficacia clínica por sí mismas (e.g. la digitalis) o bien, el producto natural puede ser prototipo para el desarrollo de nuevos fármacos semi o sintéticos (e.g. la aspirina). En el cuadro 1 se ejemplifican algunos principios activos obtenidos de diversas fuentes y sus correspondientes derivados semi y sintéticos (Farnsworth, 1994; Robbers, *et al.*, 1996).

La selección de las plantas que han de ser estudiadas en la búsqueda de nuevos principios activos, se ha llevado a cabo de muy diversas maneras, ya sea por recolección al azar en áreas donde existe una enorme diversidad biológica, aunque esta estrategia proporciona en realidad muy pocos principios activos. Algunos investigadores prefieren estudiar especies estrechamente relacionadas con aquellas que se sabe producen compuestos útiles (criterio quimiotaxonómico), otros eligen especies que se encuentran en un hábitat particular o que muestran características fenotípicas que proporcionan indicios de la producción de metabolitos activos capaces de ejercer algún efecto sobre los

Cuadro 1. Ejemplos de principios activos encontrados en plantas que son prototipos para el desarrollo de otros fármacos.

Producto natural (Actividad)	Producto semisintético	Derivado sintético
<p>Atropina (Anticolinérgico)</p> 	<p>Homatropina</p> 	<p>Glicopirrolato</p> 
<p>Cocaína (Anestésico local)</p> 	-	<p>Procaína</p> 
<p>Efedrina (Adrenomimético)</p> 	<p>Fenilpropanolamina</p> 	<p>Tetrahydrozolina</p> 
<p>Acido salicílico (Analgésico)</p> 	<p>Aspirina</p> 	<p>Ibuprofeno</p> 
<p>Guayacol (Expectorante)</p> 	<p>Guaifenesina</p> 	-

animales (criterio ecológico). Finalmente, la teoría etnobotánica supone que las especies vegetales utilizadas en la medicina tradicional son fuentes potenciales de sustancias con aplicación terapéutica. De esta manera, se han descubierto numerosos principios activos como la escopolamina, la quinina, la teofilina, la reserpina y la vinblastina, entre otros. En el cuadro 2 se ejemplifican algunos principios activos obtenidos a partir de plantas superiores y su uso medicinal (Cox, 1994).

Cuadro 2. Ejemplos selectos de principios activos descubiertos a partir de plantas superiores.

Fármaco	Uso medicinal	Planta
Codeína	Alivia el dolor y la tos	<i>Papaver somniferum</i>
Pilocarpina	Decrementa la presión intraocular	<i>Pilocarpus jaborandi</i>
Pseudoefedrina	Reduce la congestión nasal	<i>Ephedra sinica</i>
Reserpina	Disminuye la presión sanguínea	<i>Rauwolfia serpentina</i>
Vinblastina	Combate la enfermedad de Hodgkin's	<i>Catharanthus roseus</i>

2. ANTECEDENTES

2.1 Familia Convolvulaceae. Aspectos etnobotánicos generales.

La familia de las convolvuláceas se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, siendo especialmente numerosa en las zonas tropicales de Asia y América. En ella se agrupan cerca de 55 géneros y 1650 especies, los géneros más representativos son *Convolvulus* (250 especies), *Ipomoea* (500 especies), *Pharbitis*, *Argyreia* (91 especies) y *Cuscuta* (170 especies) (Trease, 1995).

Muchas de las especies de la familia Convolvulaceae poseen importancia económica y medicinal, por ejemplo, la raíz de *Calystegia sepium* se consume como alimento en Nueva Zelanda (Barton, 1959); *Ipomoea muricata* (L.) e *Ipomoea hederacea* se utilizan en la medicina tradicional India como laxantes y carminativos (Noda, *et al.*, 1988); en Brasil, *Ipomoea operculata* se usa con el mismo fin, además de ser un sustituto de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) en Europa (Ono, *et al.*, 1989), al igual que *Convolvulus scammonia* (Noda, *et al.*, 1990). En el caso de *Merremia hungaiensis* (L.) la raíz se emplea en la medicina tradicional china para el tratamiento de la hepatitis crónica y las hernias (Noda, *et al.*, 1994); *Merremia mammosa* se usa en Indonesia para el tratamiento de la diabetes, afecciones de la garganta y del sistema respiratorio (Kitagawa, *et al.*, 1988). La raíz y las hojas de *Ipomoea batatas* son útiles para el tratamiento de la leucemia, anemia, hipertensión, diabetes y hemorragias (Noda, *et al.*, 1992); las hojas y los tallos de *Cuscuta americana* (L.) se emplean contra la inflamación y erupciones de la piel; las hojas de *Ipomoea pes-caprae* (L.) se usan contra la fiebre y *Operculina pteripes* (G. Don) se usa contra las picaduras de víbora, escorpión e insectos, así como para el tratamiento de hemorragias (Coe, *et al.*, 1996).

En México, las especies del género *Ipomoea* se utilizan con fines alimenticios y medicinales desde la época prehispánica. Por ejemplo, *Ipomoea batatas* es una especie de reconocido valor nutritivo, ya que su raíz conocida como camote es rica en almidón y azúcar (Pereda-Miranda, 1995), a las raíces de *Ipomoea purga* e *Ipomoea orizabensis* se les otorgan propiedades purgantes y el tubérculo de *Ipomoea stans* se emplea para combatir los ataques epilépticos (Martínez, 1959).

2.2 Resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae.

El contenido químico de estas especies se caracteriza principalmente por la presencia de alcaloides de tipo indólico, como el ácido lisérgico, el cual es un alucinógeno encontrado en las especies *Rivea corymbosa*, *Ipomoea tricolor*, y en varias especies del género *Argyreia*. También, se ha encontrado un segundo grupo de constituyentes, las resinas glicosídicas, las que representan mezclas complejas de glicolípidos. Se considera que estos últimos son los responsables de los efectos purgantes de las especies de convolvuláceas utilizadas en la medicina tradicional (Trease, 1995).

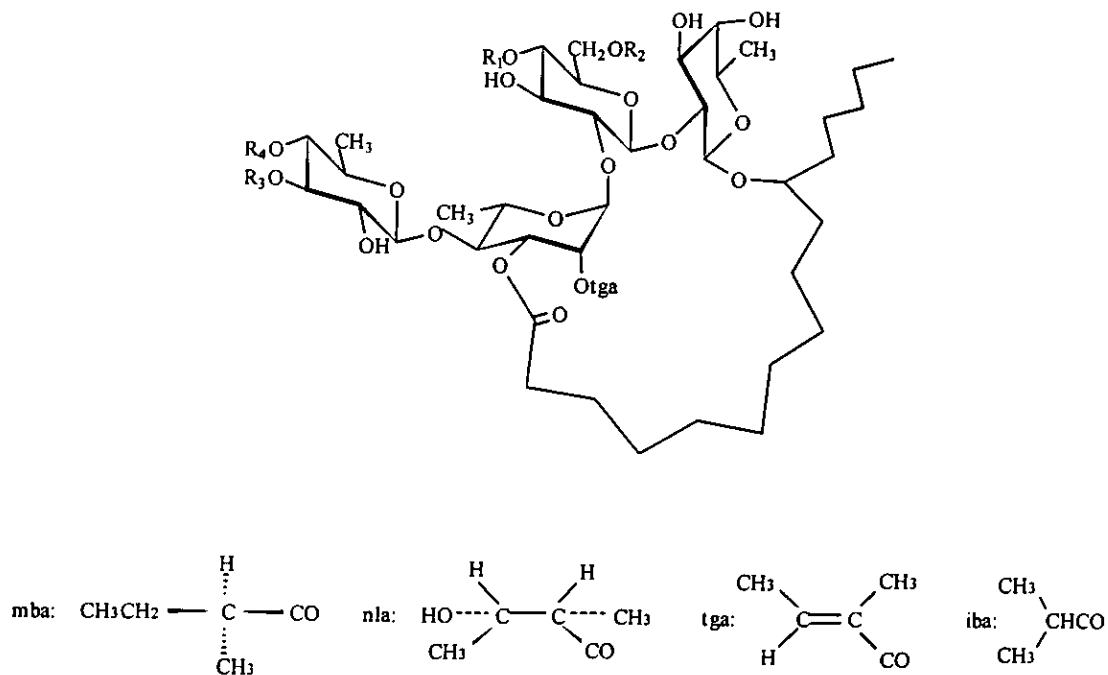
Las llamadas resinas glicosídicas han sido sujetas a numerosas investigaciones químicas desde mediados del siglo XIX, sin embargo, debido a su complejidad, la cual dificulta su aislamiento en forma pura, éstas han sido estudiadas mediante sus productos de hidrólisis básica y ácida, revelando que están constituidas por ácidos grasos volátiles de cadena corta, ácidos grasos hidroxilados y azúcares (Wagner, 1973). En el cuadro 3 se enlistan algunos de los productos que con mayor frecuencia se obtienen de los procesos degradativos de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas.

En la actualidad, estas reacciones son empleadas para facilitar y confirmar la estructura de estas complejas resinas glicosídicas, en conjunto con la elucidación estructural del producto natural mediante el empleo de técnicas espectroscópicas (como la Resonancia Magnética Nuclear) y espectrométricas (Bah, 1997). Numerosos estudios han demostrado que, las resinas glicosídicas están compuestas de un ácido graso hidroxilado unido a una porción oligosacárida la cual, se combina a su vez con la función ácida de la aglicona para formar un éster macrocíclico, en donde la porción oligosacárida se encuentra comúnmente acilada por ácidos orgánicos de bajo peso molecular (Bah, 1997).

Cuadro 3. Principales productos de las reacciones degradativas (hidrólisis básica y ácida) de las resinas glicosídicas de las Convolvuláceas.

Ácidos volátiles	Ácidos grasos hidroxilados	Azúcares
ác. acético	7-OH-C ₁₀	D-Glucosa
ác. propiónico	11-OH-C ₁₆	D-Quinovosa
ác. isobutírico	11-OH-C ₁₄	L-Ramnososa
ác. tiglico	3,12-di-OH-C ₁₆	D-Fucosa
ác. 2-metilbutírico	3,11-di-OH-C ₁₄	D-Xilosa
ác. <i>n</i> -valérico	tri-OH-C ₁₄	6-deoxi-gulosa
ác. isovalérico		
ác. nílico		
ác. cinámico		
ác. exogónico		
ác. <i>n</i> -octanóico		
ác. <i>n</i> -decanóico		
ác. <i>n</i> -dodecanóico		
ác. hexadecanóico		
ác. octadecanóico		
ác. eicosanóico		

La investigación realizada por Noda y colaboradores (1987) constituye el primer trabajo que describe el aislamiento de los constituyentes individuales de una resina glicosídica de las convolvuláceas, mediante el empleo de técnicas cromatográficas (HPLC a nivel preparativo) para la separación y purificación de las orizabinas I, II, III, y IV de la jalapina de la raíz de *Ipomoea orizabensis* (Fig 1). La estructura molecular de estos oligosacáridos se determinó mediante técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (FAB) de alta resolución.



Orizabina I: $R_2 = \text{nla}$, $R_4 = \text{mba}$, $R_1 = R_3 = \text{H}$

Orizabina II: $R_2 = \text{nla}$, $R_4 = \text{iba}$, $R_1 = R_3 = \text{H}$

Orizabina III: $R_2 = R_4 = \text{nla}$, $R_1 = R_3 = \text{H}$

Orizabina IV: $R_2 = \text{nla}$, $R_3 = \text{iba}$, $R_1 = R_4 = \text{H}$

Figura 1. Estructuras de las orizabinas I-IV de *Ipomoea orizabensis*.

No sólo se han identificado las resinas glicosídicas de algunas especies del género *Ipomoea*, también se han realizado estudios de otros géneros de la familia de las convolvuláceas como son *Pharbitis* (Ono, *et al.*, 1990; 1992), *Quamoclit* (Ono, *et al.*, 1992), *Merremia* (Noda, *et al.*, 1994; 1995; Kitagawa, *et al.*, 1996; 1996, 1997) y *Convolvulus* (Noda, *et al.*, 1990; Kogetsu, *et al.*, 1991). Una investigación bibliográfica de los glicolípidos de las resinas presentes en las convolvuláceas cubrió la literatura publicada hasta septiembre de 1997 (Bah, 1997). De éstos, cabe destacar el estudio fitoquímico de *Merremia hungaiensis* en donde se describió la primera estructura

dimérica de las resinas, denominada merremina, en la que el núcleo oligosacárido macrocíclico se encuentra acilado por el mismo ácido glicosídico constitutivo. La estructura de este dímero se muestra en la figura 2 (Noda, *et al.*, 1995). Este tipo de estructura se encuentra presente también en la resina glicosídica de *Ipomoea tricolor*, en la que se identificaron los dímeros de las tricolorinas F y G, e.g. la tricolorina H, además se han identificado tetrasacáridos del ácido jalapínico, las tricolorinas A-E (Fig.3) (Pereda-Miranda, 1995; Bah y Pereda-Miranda, 1997; Bah, 1997).

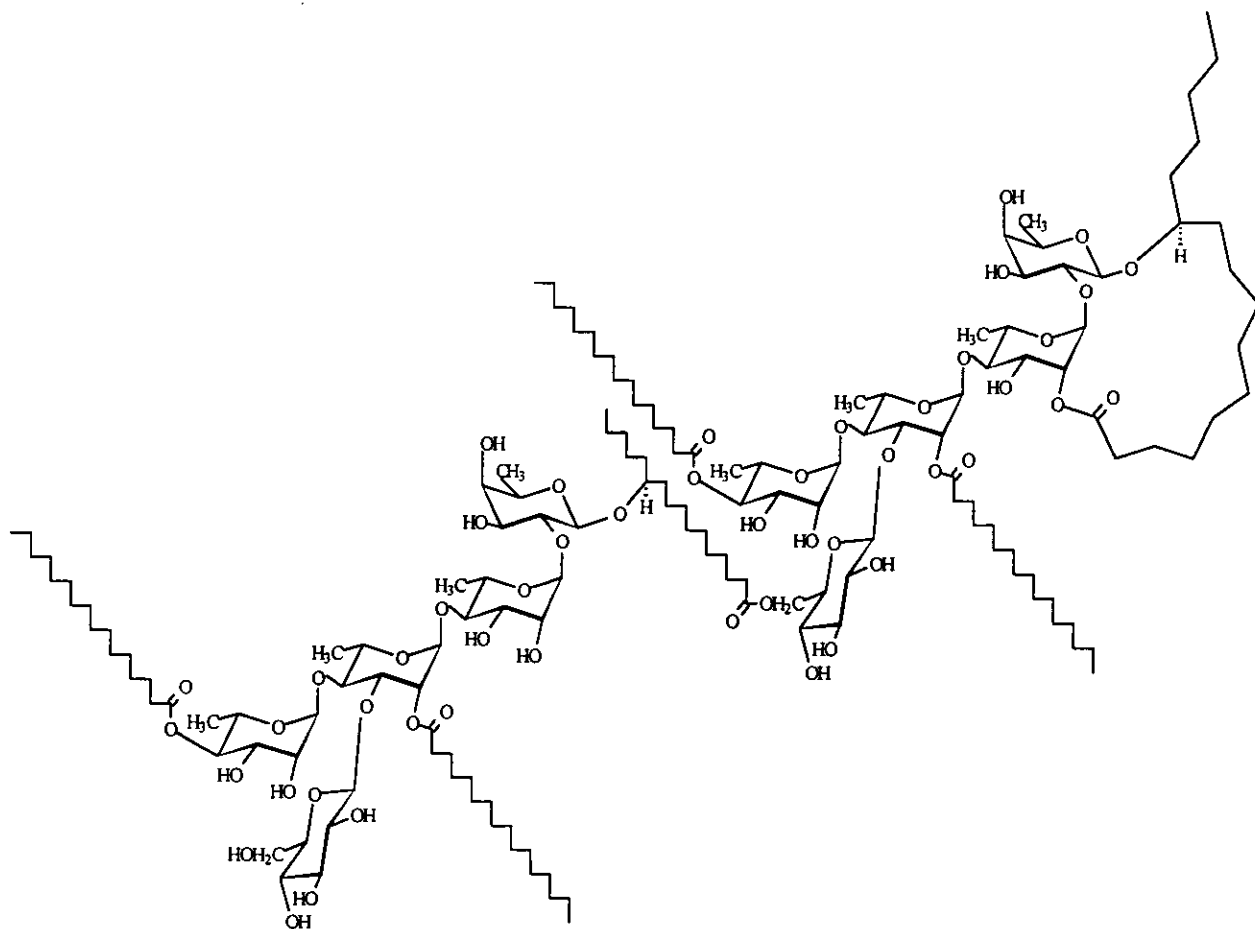
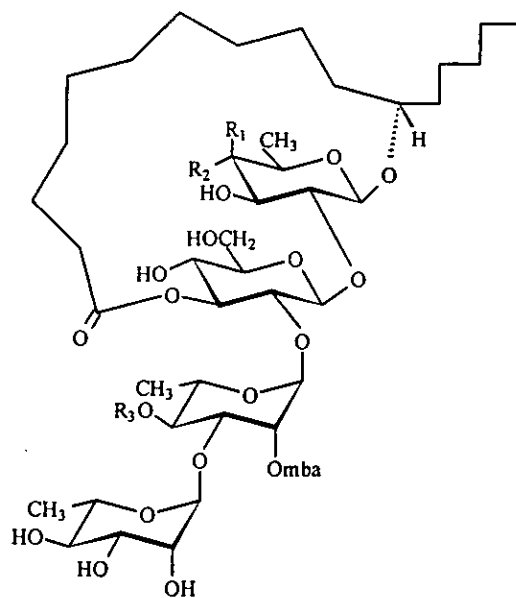


Figura 2. Merremina, dímero encontrado en la resina glicosídica de *Merremia hungaiensis*.

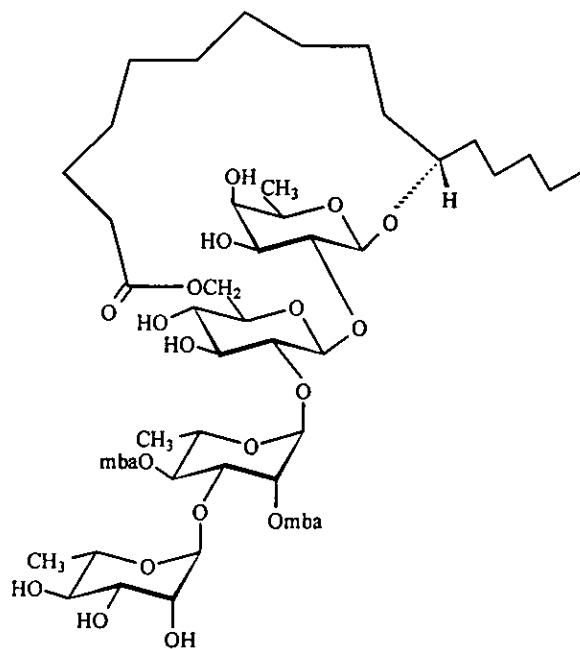


Tricolorina A: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{mba}$

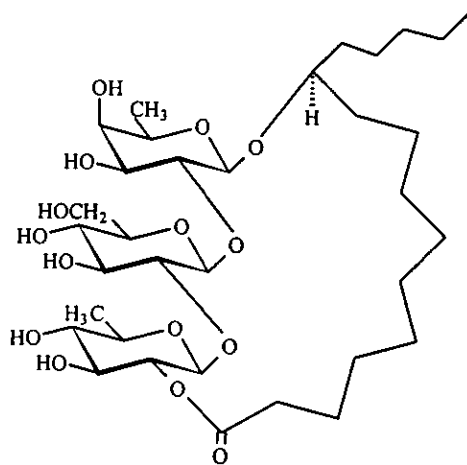
Tricolorina B: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{iba}$

Tricolorina C: $R_1 = \text{OH}$, $R_2 = \text{H}$, $R_3 = \text{nla}$

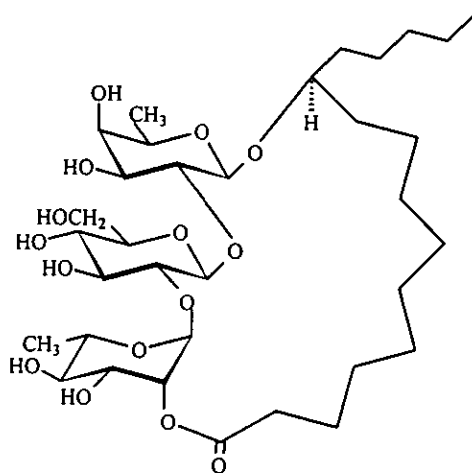
Tricolorina E: $R_1 = \text{H}$, $R_2 = \text{OH}$, $R_3 = \text{mba}$



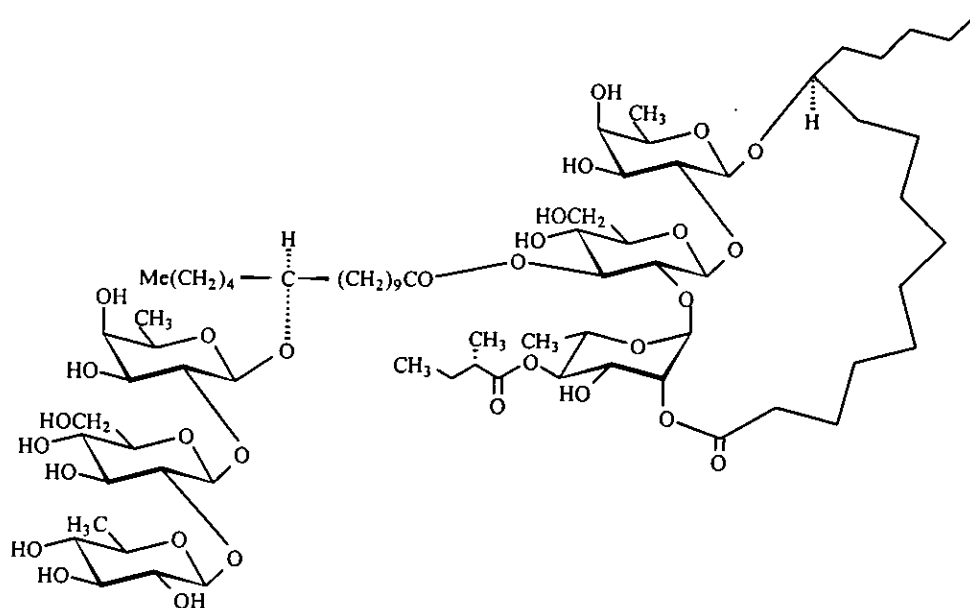
Tricolorina D



Tricolorina F



Tricolorina G



Tricolorina H

Figura 3. Tricolorinas A-H de *Ipomoea tricolor*.

2.3 Propiedades biológicas de las resinas glicosídicas.

No sólo se ha logrado el aislamiento y elucidación estructural de estas resinas, también se han investigado algunos aspectos relacionados con su potencial biológico. Estos glicolípidos además de ser poderosos catárticos, son agentes antimicrobianos, analgésicos, espasmolíticos, hipotensores, insecticidas (Bieber, *et al.*, 1986), fitotóxicos y citotóxicos (Pereda-Miranda, 1995). Así mismo, se ha reportado que algunos presentan actividad antiserotónica (Kitagawa, *et al.*, 1988). En todos estos estudios se encontró que la lactona macrocíclica constituye una característica estructural importante para la actividad de estos compuestos, ya que al hidrolizarse este enlace éster la actividad biológica disminuye considerablemente como se ejemplifica en los siguientes datos de citotoxicidad para la escamonina I (Fig. 5), la tricolorina A (Fig. 3) y sus ácidos glicosídicos asociados (Pereda-Miranda, 1995).

Cuadro 4. Datos de citotoxicidad de la escamonina I, la tricolorina A y sus ácidos glicosídicos asociados.

Compuesto	Línea celular* DE ₅₀ (µg/mL)				
	A-549	MCF-7	HT-29	KB	P-388
Escamonina I	3.25	3.21	3.00	2.5	2.8
Ac. escamónico	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20
Tricolorina A	3.18	2.05	2.06	> 20	2.2
Ac. tricolórico	> 20	> 20	> 20	> 20	> 20

* Abreviaciones: A-549, cáncer humano de pulmón; MCF, cáncer de mama; HT-29, cáncer de colón; KB, cáncer nasofaríngeo; P-388, leucemia linfocítica murina.

2.4 Características etnobotánicas de la raíz de jalapa, *Ipomoea purga*.

La raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) ha sido usada desde tiempos prehispánicos por sus propiedades purgantes. Los primeros exploradores españoles conocieron tales propiedades a través de los aztecas y tlaxcaltecas y la introdujeron a Europa en el año de 1565. Sin embargo, debido a que no se conocía exactamente su origen botánico muchos de los tubérculos exportados eran parecidos a la purga y se denominaron con el nombre de falsas jalapas (Martínez, 1959). La figura 4 ilustra la morfología de la auténtica raíz de jalapa. Entre las especies denominadas falsas jalapas se encuentran *Ipomoea simulans* (Williams, 1970), *Ipomoea orizabensis* (Linajes, 1994) y *Convolvulus scammonia* (Youngken, 1950). En el cuadro 4 se resumen las características etnobotánicas de *Ipomoea purga*.

Cuadro 5. Características etnobotánicas de *Ipomoea purga*.

Familia	Convolvulaceae
Nombre científico	<i>Ipomoea purga</i> (Hayne). Sinónimos: <i>Exogonium purga</i> (Bentham), <i>Convolvulus officinalis</i> (Pelletan), <i>Calonyction galeottii</i> (Mart), <i>Convolvulus purga</i> (Wender), <i>Convolvulus jalapa</i> (Shiede), <i>Ipomoea jalapa</i> (Nutt & Coxe), <i>Ipomoea schiedeana</i> (Zuccar).



Figura 4. Copia facsimilar del manuscrito Historia Natural (1801) del Fr. Juan Navarro en donde se ilustra la apariencia macroscópica de la Xalapa verdadera, *Ipomoea purga*.

Nombres vulgares	Tolompatl, tlanoquiloni, cacamotic, caxlatlampan, jalapa de Veracruz, purga, jalapa oficinal, jalapa tuberosa, jalapa de México, jalapa pesada, jalapa hembra, raíz de jalapa, limoncillo, brionia índica, brionia mexicana, michoacán negro, jalapa oficial.
Descripción	Planta trepadora, con dos o tres tallos herbáceos volubles y delgados. Hojas alternas codiformes, enteras y lisas, de 6 a 15 cms de largo por 3 a 8 de ancho. Las flores son solitarias, de corola rojiza, campanulada. La raíz, que es la parte aprovechable, está constituida por un sistema de raíces tuberosas, moreno oscuras. En la raíz se concentran varias zonas primero una corteza oscura, después una zona parenquimatosa amarillenta, luego una zona blanca y por último una parte central amarillo oscura. En el tejido hay células de látex, encontradas en filas longitudinales, y estas células son el origen de los puntos resinosos oscuros que se observan en la droga. Su sabor dulce al principio, es después acre y desagradable (Wallis, 1966)
Hábitat	<i>Ipomoea purga</i> se distribuye en las faldas del este de la Sierra Madre Oriental de México, en los estados de Hidalgo, Puebla, Oaxaca y Veracruz (McDonald, 1987), a altitudes entre 1800 y 2400 m, en áreas donde la precipitación anual es de 1500 y 2100 mm (Linajes, 1994). Esta planta se cultiva además en otros ambientes cálidos como en India y Jamaica, pero estos países no compiten con México en el suministro de la droga (Linajes, 1994).
Usos	La raíz de jalapa se emplea en la medicina tradicional como catártico, diurético y purgativo, es usado además para la constipación, cólicos, colitis, disenteria, gastritis, dolor en los intestinos e inflamación. Administrado junto con ruibarbo es un excelente vermífugo (Duke, 1988). La infusión de la planta se dice que es útil para el tratamiento de

	<p>úlceras y llagas. Es aconsejable en el caso de hidrocefalia, fiebre gastroneurótica o enteromeningitis (Martínez, 1959).</p> <p>Farmacológicamente, se clasifica como un catártico hidragogo (Wallis, 1966), siendo un purgante energético en altas dosis y un laxante suave a bajas dosis (Martínez, 1959). Se cree que las resinas actúan en la primera sección del intestino delgado, incrementando los movimientos peristálticos (Linajes, 1994).</p>
Dosis	<p>La dosis usual es de 1 g. De 0.5 a 1 g o 2 g de polvo de raíz produce efectos intensos, acompañados de náuseas, a veces con vómitos.</p> <p>Dosis de 4 ó 5 g de la resina producen la muerte (Sosa, 1993).</p>

2.5 Estudios fitoquímicos de la raíz de *Ipomoea purga*.

La raíz se encuentra constituida principalmente por una resina de naturaleza glicosídica (8-12%), parte de esta resina es soluble en éter y se conoce como jalapina y la porción insoluble se denomina convolvulina, encontrándose en una proporción de 0.3 y 0.7, respectivamente (Martínez, 1959).

Mannich y Schumann fueron los primeros en identificar que la reacción de hidrólisis de las resinas producía los ácidos tíglico, butírico, isovalérico y exogónico, además del ácido convolvulinólico, el ipuranol, la glucosa y la ramnosa (Wagner, 1973). Posteriormente, Votocek describió la presencia de la D-quinovosa en la convolvulina de *Ipomoea purga*, y fueron Singh y Stacey los que aislaron este carbohidrato en forma de glicósido del ácido 11-hidroxitetradecanóico como el constituyente mayoritario de esta resina (Singh y Stacey, 1973). También, se describió la estructura de la escamonina I como el constituyente citotóxico mayoritario de la jalapina de la raíz, glicolípido que también se encuentra presente en la jalapina de *Convolvulus scammonia* (Noda, *et al.*, 1990, Pereda-Miranda, 1995). Las figuras 5 y 6 muestran las estructuras de estos compuestos.

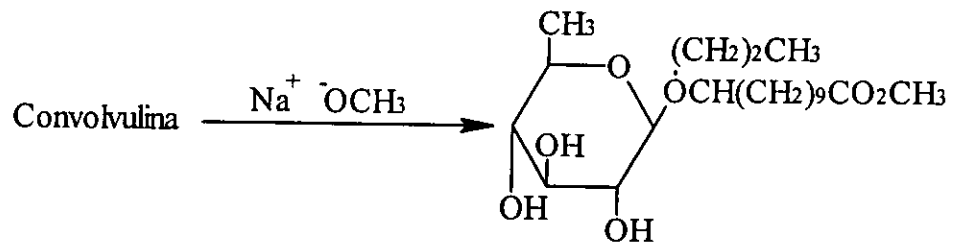


Figura 5. D-quinovósido descrito por Singh y Stacey (1973).

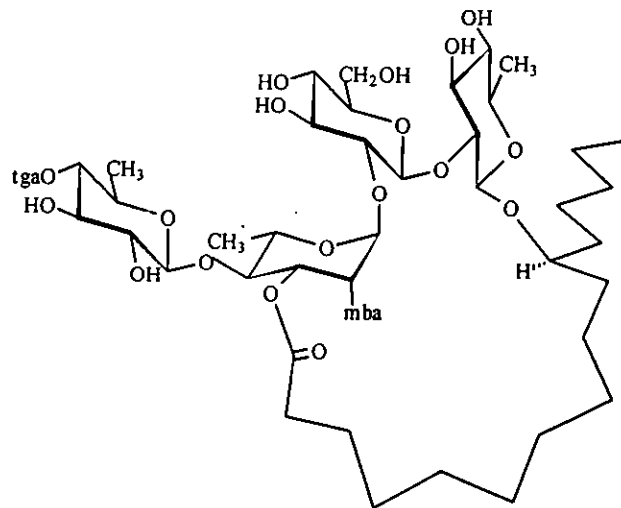


Figura 6. Escamonina I componente mayoritario de la jalapina de *Ipomoea purga*.

3. JUSTIFICACION

Una evaluación preliminar del potencial biológico de la jalapina y la convolvulina de la raíz de jalapa, *Ipomoea purga*, demostró que estos crudos resinosos presentaban un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo efectos antimicrobiano, citotóxico y modulador de la actividad enzimática de la proteína cinasa C (Pereda-Miranda, 1995).

Estas evaluaciones evidenciaron el potencial que presentan los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga* como fuentes potenciales de principios biodinámicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Caracterizar la estructura molecular del ácido glicosídico mayoritario generado durante la saponificación de las resinas glicosídicas que constituyen la convolvulina de *Ipomoea purga*. La presente investigación fitoquímica de la convolvulina de la raíz de jalapa, permitirá establecer la naturaleza química del núcleo oligosacárido presente en los constituyentes mayoritarios de las resinas glicosídicas de esta especie medicinal.

4.2 Objetivos específicos.

4.2.1 Efectuar la hidrólisis básica de la convolvulina de *Ipomoea purga* y lograr la purificación mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) del ácido glicosídico mayoritario presente en esta glicorresina.

4.2.2 Efectuar la hidrólisis ácida del ácido glicosídico e identificar la naturaleza química de la aglicona y de los carbohidratos que constituyen al núcleo oligosacárido.

4.2.3 Realizar el análisis de las evidencias espectroscópicas (RMN de H^1 y C^{13}) y espectrométricas (EM FAB-negativo) para lograr establecer la estructura molecular del ácido glicosídico mayoritario presente en la convolvulina de *Ipomoea purga*.

3. JUSTIFICACION

Una evaluación preliminar del potencial biológico de la jalapina y la convolvulina de la raíz de jalapa, *Ipomoea purga*, demostró que estos crudos resinosos presentaban un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo efectos antimicrobiano, citotóxico y modulador de la actividad enzimática de la proteína cinasa C (Pereda-Miranda, 1995).

Estas evaluaciones evidenciaron el potencial que presentan los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga* como fuentes potenciales de principios biodinámicos.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general.

Caracterizar la estructura molecular del ácido glicosídico mayoritario generado durante la saponificación de las resinas glicosídicas que constituyen la convolvulina de *Ipomoea purga*. La presente investigación fitoquímica de la convolvulina de la raíz de jalapa, permitirá establecer la naturaleza química del núcleo oligosacárido presente en los constituyentes mayoritarios de las resinas glicosídicas de esta especie medicinal.

4.2 Objetivos específicos.

4.2.1 Efectuar la hidrólisis básica de la convolvulina de *Ipomoea purga* y lograr la purificación mediante la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) del ácido glicosídico mayoritario presente en esta glicorresina.

4.2.2 Efectuar la hidrólisis ácida del ácido glicosídico e identificar la naturaleza química de la aglicona y de los carbohidratos que constituyen al núcleo oligosacárido.

4.2.3 Realizar el análisis de las evidencias espectroscópicas (RMN de H^1 y C^{13}) y espectrométricas (EM FAB-negativo) para lograr establecer la estructura molecular del ácido glicosídico mayoritario presente en la convolvulina de *Ipomoea purga*.

5. PARTE EXPERIMENTAL

5.1 PROCEDIMIENTOS GENERALES.

5.1.1 Cromatografía en columna (CC).

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice (Kieselgel 60 Merck; gránulos de 0.063-0.2 mm), desactivada al 25% con agua destilada.

5.1.2 Cromatografía en capa fina (CCF).

Para el análisis mediante cromatografía en capa fina se utilizaron cromatoplasmas cubiertas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck, 5 x 10 cm de dimensión y 0.25 mm de espesor), desactivadas con una solución de H₃BO₃ 0.036 N. Esta solución se aplicó por aspersion y el exceso de agua se evaporó mediante calentamiento en una parrilla a 90°C durante 5 minutos. Para fines de purificación, se utilizaron placas preparativas de gel de sílice 60 F₂₅₄ (Merck, 20 x 20 cm de dimensión y 0.25 mm de espesor).

Una vez aplicada la muestra sobre la placa y encontrado el sistema de disolventes adecuado para separar los constituyentes de cada muestra problema, se observó el resultado de la elución cromatográfica bajo la luz ultravioleta (254 y 365 nm). Este procedimiento permitió detectar las zonas que presentaron absorción, para posteriormente revelar la placa con una solución ácida de sulfato cérico [sulfato cérico (12 g), hielo (350 mg), y ácido sulfúrico concentrado (22.2 mL)]. Las placas se rociaron de manera homogénea con este agente cromógeno y se desarrolló el color por calentamiento en una parrilla a 90° C durante 2 minutos.

5.1.3 Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Los análisis mediante cromatografía líquida se realizaron en un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de entrega de disolventes 600E, un refractómetro diferencial modelo 410 y una computadora (OptiPlex 466/Le, Dee). El control del equipo, así como la adquisición y el procesamiento de la información cromatográfica, se realizó a través del programa Millennium 2000 Software (Waters).

5.1.4 Determinación de las constantes físicas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Johns y no están corregidos. Los espectros de RMN ¹H y ¹³C se obtuvieron en un aparato Varian XL-500 y

en una unidad Bruker AMX-500, los cuales operaron a una frecuencia de 500 y 300 MHz para el registro de los espectros de RMN-¹H y a 125 MHz para los de ¹³C. Se utilizó como disolvente C₅D₅N, usando TMS como una referencia interna. La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer 241, empleando MeOH y CHCl₃ (RA) como disolvente. El registro de los espectros de masas se realizó mediante el bombardeo rápido de átomos (FAB) y, en algunos casos, requirió del acoplamiento de un cromatógrafo de gases al espectrómetro de masas modelo JEOL SX10A, utilizando la técnica de impacto electrónico (IE).

5.2 Material vegetal.

Para el estudio fitoquímico se recolectaron 10 kg de la raíz de Jalapa (*Ipomoea purga*) en el municipio de Xico, en el estado de Veracruz. La identificación del material vegetal la realizaron el Biólogo Alberto Linajes y el Dr. Victor Rico. Un espécimen de *Ipomoea purga* se depositó en el Herbario del Instituto de Ecología, A.C.

5.3 Preparación del extracto de la raíz de *Ipomoea purga*.

La raíz de Jalapa (10 Kg de material fresco) se secó a temperatura ambiente y pulverizó mediante un molino de granos para obtener 4683.2 g de material vegetal. Se efectuó el desgrase de la materia prima con *n*-hexano y el residuo se maceró con CHCl₃ para obtener 357.7 g de la jalapina, porción de las resinas glicosídicas soluble en éter. Posteriormente, se maceró con MeOH durante 7 días, al término de los cuales se filtró y concentró el disolvente para obtener 950.0 g de la convolvulina. Se realizó el análisis por CCF de los dos extractos con un sistema de elución ternario constituido por CHCl₃-MeOH-H₂O (70:30:5) y se observó el mismo comportamiento cromatográfico para ambos extractos, por lo tanto, los subsecuentes análisis se realizaron con la convolvulina.

5.4 Fraccionamiento primario del extracto metanólico.

El fraccionamiento de 154.8 g del extracto se llevó a cabo en una columna cromatográfica de 9.5 cm de diámetro interno por 75 cm de longitud, empacada con 900 g de gel de sílice. Se utilizaron sistemas de elución de polaridad creciente constituidos por mezclas de CHCl₃-Me₂CO y Me₂CO-MeOH en diferentes proporciones.

El volumen de los eluatos fue de 500 mL los cuales se concentraron por destilación a presión reducida. Las fracciones obtenidas se analizaron mediante CCF y se

reunieron aquellas que resultaron semejantes. Las fracciones 1 a 88 se desecharon debido a la ausencia de glicolípidos. El cuadro 6 presenta los resultados del fraccionamiento de la convolvulina de *Ipomoea purga*.

Cuadro 6. Fraccionamiento de la convolvulina de *Ipomoea purga*.

Sistema de elución	Sistema de elución CCF CHCl ₃ :MeOH:H ₂ O	Eluatos combinados	No. de fracciones
CHCl ₃ (100%)	70:30:5	1-15	-
CHCl ₃ (100%)	70:30:5	16-21	-
CHCl ₃ (100%)	70:30:5	22-37	-
CHCl ₃ :Me ₂ CO (9:1)		38-40	-
CHCl ₃ :Me ₂ CO (9:1)	70:30:5	41-48	-
CHCl ₃ :Me ₂ CO (8:2)		49-56	
CHCl ₃ :Me ₂ CO (6:4)		57-67	
CHCl ₃ :Me ₂ CO (1:1)		68	
CHCl ₃ :Me ₂ CO (1:1)	70:30:5	69-87	-
CHCl ₃ :Me ₂ CO (25:75)		88	
CHCl ₃ :Me ₂ CO (25:75)	70:30:5	89-90	I
CHCl ₃ :Me ₂ CO (25:75)	70:30:5	91-105	II
CHCl ₃ :Me ₂ CO (25:75)	70:30:5	106-112	III
Me ₂ CO (100%)		113-114	
Me ₂ CO (100%)	70:30:5	115-118	IV
Me ₂ CO (100%)	70:30:5	119-126	V
Me ₂ CO:MeOH (1:1)		127-145	

5.5 Preparación de los derivados.

Debido a la complejidad estructural de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas, para el desarrollo del presente trabajo se contempló la formación de derivados a través de las reacciones de hidrólisis básica y ácida para la cuantificación de los productos de degradación de los oligosacáridos naturales y las reacciones de metilación y acetilación de los glicolípidos resultantes de la saponificación. Estas reacciones en su conjunto permitieron establecer la naturaleza del ácido glicosídico mayoritario que constituye el núcleo oligosacárido estructural de la convolvulina de *Ipomoea purga*.

5.5.1 Hidrólisis alcalina.

Se tomaron 100 mg de las fracciones I a V para realizar la hidrólisis alcalina. A cada una de éstas se le adicionó 2 mL de KOH al 5% y la mezcla de reacción se calentó a reflujo (90° C) durante una hora. Al concluir la reacción, la mezcla resultante se ajustó a un pH de 4 con HCl 4N y se extrajo con Et₂O (2 x 10 mL). La fase orgánica se desechó. La fase acuosa se extrajo con *n*-butanol (2 x 10 mL) y esta última se concentró a presión reducida.

Se realizó además el análisis en CCF de los productos de reacción, observándose que todas las fracciones generaban el mismo perfil cromatográfico y como el rendimiento de productos en la fracción IV fue mayor, los análisis posteriores se realizaron con los derivados de dicha fracción. Para lo cual, se procedió a la saponificación de 300 mg adicionales para obtener un total de 231.8 mg de la mezcla de ácidos glicosídicos.

5.5.2 Reacción de alquilación con diazometano.

Preparación del diazometano. Una solución de KOH (14 mg en 24 µL de H₂O más 72 µL de EtOH) se hizo reaccionar con N-metil-N-nitroso-O-toluen-sulfonamida (71.0 mg) en 84 µL de Et₂O. La mezcla se mantuvo a 58-60° C en baño María con agitación. El CH₂N₂ generado se colectó en 10 mL de Et₂O en un baño de hielo.

Alquilación de la mezcla de ácidos glicosídicos. 231.8 mg de la fracción IV hidrolizada se disolvieron en 40 mL de metanol y se alquilaron con un exceso de solución etérea de CH₂N₂ a una temperatura de 5° C. Se adicionó esta solución hasta que cesó el desprendimiento de N₂, la mezcla de reacción se concentró a presión reducida y se analizó

por CCF (CHCl₃-MeOH-H₂O, 6:4:1). La comparación cromatográfica con la materia prima permitió observar que los compuestos de la mezcla de reacción perdieron polaridad y, de esta manera, se determinó que la reacción se había completado. Mediante este procedimiento se obtuvieron 240 mg de la fracción metilada (IV-M).

La fracción IV-M se analizó por cromatografía líquida preparativa y la aplicación de esta técnica permitió la purificación del ácido glicosídico mayoritario en forma de su éster metílico (1). Se obtuvieron 68 mg del derivado 1 con un tiempo de retención de 24.7 min; $pf = 152 - 154^\circ C$; $\{\alpha\}_D^{20} = -77^\circ$ ($c = 1$, MeOH); EM (FAB-Negativo) m/z (%): {M-1} 1165 (32.97), 1019 (8.03), 857 (6.60), 711 (1.07), 565 (5.75), 403 (0.79), 257 (0.93), 242 (0.51). RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N, TMS): 5.74 (d, $J = 7.5$ Hz, Glu-1), 4.32-4.24 (ss, Glu-2), 4.32-4.24 (ss, Glu-3), 4.04-3.97 (ss, Glu-4), 3.80-3.74 (ss, Glu-5), 4.43 (dd, $J = 12.0, 2.5$ Hz, Glu-6), 4.24 (dd, $J = 12.0, 5.5$ Hz, Glu-6'), 4.76 (d, $J = 7.5$ Hz, Qui-1), 4.18-4.12 (ss, Qui-2), 4.62 (dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, Qui-3), 3.52 (dd, $J = 8.5, 8.5$ Hz, Qui-4), 3.68 (dc, $J = 9.0, 6.5$ Hz, Qui-5), 1.44 (d, $J = 6.0$ Hz, Qui-6), 5.09 (d, $J = 8.0$ Hz, Qui'-1), 4.06 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Qui'-2), 4.04-4.00 (ss, Qui'-3), 3.62 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Qui'-4), 3.74 (dc, $J = 9.5, 6.5$ Hz, Qui'-5), 1.66 (d, $J = 6.0$, Qui'-6), 6.23 (d, $J = 7.5$, Glu'-1), 4.04-3.97 (ss, Glu'-2), 4.53 (dd, $J = 8.5, 8.5$ Hz, Glu'-3), 4.04-3.97 (ss, Glu'-4), 4.18-4.12 (ss, Glu'-5), 4.55-4.50 (ss, Glu'-6), 4.18-4.12 (ss, Glu'-6'), 5.77 (d, $J = 7.5$ Hz, Fuc-1), 4.32 (dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Fuc-2), 4.32-4.24 (ss, Fuc-3), 3.97-4.04 (ss, Fuc-4), 4.12-4.18 (ss, Fuc-5), 1.53 (d, $J = 6.5$ Hz, Fuc-6), 6.44 (d, $J = 2.0$ Hz, Ram-1), 4.85 (ss, Ram-2), 5.30 (dd, $J = 3.0, 9.5$ Hz, Ram-3), 4.80 (dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Ram-4), 5.19 (dc, $J = 10.0, 6.5$ Hz, Ram-5), 1.94 (d, $J = 6.0$ Hz, Ram-6), 3.63 (s, MeO), 2.32 (t, $J = 8.0$, Cov-2), 3.80 (m, Cov-11), 0.906 (t, $J = 7.0$, Cov-14). RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N, TMS): 102.40 (Glu-1), 77.83 (Glu-2), 76.40 (Glu-3), 72.53 (Glu-4), 77.45 (Glu-5), 62.81 (Glu-6), 102.15 (Qui-1), 80.85 (Qui-2), 78.47 (Qui-3), 77.08 (Qui-4), 72.12 (Qui-5), 18.25 (Qui-6), 104.76 (Qui'-1), 76.11 (Qui'-2), 77.45 (Qui'-3), 76.77 (Qui'-4), 73.60 (Qui'-5), 18.56 (Qui-6), 100.57 (Glu'-1), 84.72 (Glu'-2), 76.77 (Glu'-3), 72.20 (Glu'-4), 79.48 (Glu'-5), 63.32 (Glu'-6), 102.92 (Fuc-1), 73.40 (Fuc-2), 74.93 (Fuc-3), 72.82 (Fuc-4), 71.01 (Fuc-5), 16.94 (Fuc-6), 100.14 (Ram-1), 71.73 (Ram-2), 78.18 (Ram-3), 78.91 (Ram-4), 67.69

(Ram-5), 18.97 (Ram-6), 51.17 (MeO), 173.99 (Cov-1), 34.14 (Cov-2), 80.10 (Cov-11), 14.35 (Cov-14).

5.5.3 Reacción de acetilación del compuesto 1.

25 mg del éster metílico se disolvieron en 0.5 mL de Ac₂O y 0.5 mL de piridina. Esta mezcla se dejó reaccionar a temperatura ambiente con agitación durante 24 horas. El compuesto acetilado se extrajo de la siguiente manera: se adicionaron 2 mL de agua destilada y la mezcla de reacción se agitó durante 5 minutos; se adicionaron 3 mL de agua destilada y se realizaron tres extracciones sucesivas con 10 mL de AcOEt cada una. La fase orgánica se lavó con 2 porciones de 5 mL cada una de HCl 1 N; a la misma se le adicionó una solución saturada de NaHCO₃ (5 mL) y, por último, se lavó 2 veces con agua destilada (5 mL por cada extracción). La fase orgánica se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. El producto peracetilado se purificó por cromatografía líquida preparativa, obteniéndose 26 mg del derivado **2** con un t_R de 17.6 min; pf = 98 - 100° C; {α}_D^{20°} = - 50° (c = 1, CHCl₃); EM (FAB-Negativo) m/z (%): {M-1}⁻ 1795 (0.55). RMN ¹H (500 MHz, C₅D₅N, TMS): 5.06 (d, J = 8.0 Hz, Glu-1), 4.14 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, Glu-2), 5.62 (dd, J = 9.0, 9.0 Hz, Glu-3), 5.28 (dd, J = 9.8, 9.8, Glu-4), 4.00 (ddd, J = 10.0, 6.0, 3.0 Hz, Glu-5), 4.60-4.55 (ss, Glu-6), 4.25-4.21 (ss, Glu-6'), 4.65 (d, J = 7.5 Hz, Qui-1), 4.14 (dd, J = 8.0, 8.0 Hz, Qui-2), 5.54 (dd, J = 9.0, 9.0 Hz, Qui-3), 5.02 (dd, J = 9.5 Hz, Qui-4), 4.10 (dc, J = 6.0, 9.4 Hz, Qui-5), 1.27 (d, J = 6.15 Hz, Qui-6), 5.41-5.40 (ss, Glu'-1), 4.17 (dd, J = 8.3, 8.3 Hz, Glu'-2), 5.52 (dd, J = 8.6, 8.6 Hz, Glu'-3), 5.24 (dd, J = 9.5, 9.5 Hz, Glu'-4), 4.30-4.21 (ss, Glu'-5), 4.50-4.45 (ss, Glu'-6), 4.34 (dd, J = 12.0, 2.0 Hz, Glu'-6'), 5.18 (d, J = 8.3 Hz, Qui'-1), 5.48 (dd, J = 9.0, 9.0 Hz, Qui'-2), 5.61 (dd, J = 9.5, 9.5 Hz, Qui'-3), 5.42 (dd, J = 9.4, 9.4 Hz, Qui'-4), 3.91 (dc, J = 9.5, 6.0 Hz, Qui'-5), 1.38 (d, J = 6.0 Hz, Qui'-6), 5.53 (d, J = 7.1 Hz, Fuc-1), 5.73 (dd, J = 8.0, 10.0 Hz, Fuc-2), 5.54 (dd, J = 9.2, 3.6 Hz, Fuc-3), 5.83 (d, J = 3.3 Hz, Fuc-4), 4.30-4.21 (ss, Fuc-5), 1.25 (d, J = 6.3 Hz, Fuc-6), 5.40 (ss, Ram-1), 5.61 (ss, Ram-2), 4.60-4.55 (ss, Ram-3), 4.30-4.21 (ss, Ram-4), 4.50-4.45 (ss, Ram-5), 1.78 (d, J = 6.0 Hz, Ram-6), 3.56 (s, MeO), 2.367 (t, J = 7.5, Cov-2), 3.683 (m, Cov-11), 0.977 (t, J = 7.0, Cov-14). RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N, TMS): 101.33 (Glu-1), 72.70 (Glu-2), 76.24 (Glu-3), 70.00 (Glu-4), 72.40 (Glu-5), 63.39 (Glu-6), 100.93 (Qui-1), 77.09 (Qui-2), 75.78 (Qui-3),

74.46 (Qui-4), 69.38 (Qui-5), 17.96 (Qui-6), 102.50 (Glu'-1), 78.41 (Glu'-2), 75.78 (Glu'-3), 70.02 (Glu'-4), 69.58 (Glu'-5), 62.77 (Glu'-6), 101.73 (Qui'-1), 72.24 (Qui'-2), 73.97 (Qui'-3), 74.21 (Qui'-4), 71.21 (Qui'-5), 18.18 (Qui'-6), 101.11 (Fuc-1), 69.64 (Fuc-2), 72.70 (Fuc-3), 71.21 (Fuc-4), 71.67 (Fuc-5), 16.31 (Fuc-6), 97.41 (Ram-1), 73.85 (Ram-2), 78.63 (Ram-3), 77.10 (Ram-4), 67.81 (Ram-5), 19.20 (Ram-6), 51.38 (MeO), 34.34 (Cov-2), 80.75 (Cov-11), 14.65 (Cov-14).

5.5.4 Hidrólisis ácida del compuesto 1.

5.5.4.1 Hidrólisis ácida.

Con el fin de lograr la caracterización de los carbohidratos y de la aglicona que constituyen al ácido glicosídico mayoritario de la convolvulina de *Ipomoea purga*, se realizó la hidrólisis en medio ácido de 40 mg del compuesto 1. Esta reacción utilizó 2.5 mL de HCl 1N, la mezcla se calentó a 90° C a reflujo durante 5 horas y, al terminó de las cuales, se diluyó la mezcla con 5 mL de H₂O y se extrajo con éter (2 x 10 mL), obteniéndose 19.5 mg de la aglicona. La fase acuosa se neutralizó con KOH 1 N y se extrajo con *n*-butanol (2 x 10 mL). La fase orgánica se lavó con agua y se concentró a presión reducida para obtener una mezcla de carbohidratos (0.38 mg).

La aglicona (19.5 mg) se metiló con un exceso de solución etérea de CH₂N₂ a una temperatura de 5° C. La mezcla resultante se concentró al vacío y se purificó mediante CCF, utilizando como sistema de elución CHCl₃-Hex-Me₂CO (40:55:5). Este procedimiento permitió la obtención de 7.3 mg del compuesto 3 y cuyo R_f fue de 0.452; pf = 27 - 29° C; $\{\alpha\}_D^{20} = + 1.5^\circ$ (c = 2, CHCl₃).

5.5.4.2 Sililación del convolvulinato de metilo.

3 mg de la aglicona metilada (3) se hicieron reaccionar con 0.2 mL del reactivo SIGMA SIL-A, una mezcla de trimetilclorosilano-hexametildisilazano-piridina (1:3:9), a una temperatura de 70° C durante 5 min para formar el derivado sililado 4, el cual se analizó por cromatografía de gases acoplada a un espectrómetro de masas. La temperatura de análisis en la columna fue de 100° C durante el primer minuto y se programó para alcanzar 250° C a una velocidad de calentamiento de 10° C/min. EM-IE m/z (%) {M}⁺ 330 (0.27), 315 (3.46), 287 (66.79), 258 (9.51), 145 (100.00), 73 (35.45).

5.5.4.3 Análisis de la mezcla de carbohidratos mediante HPLC.

El primer paso para la caracterización de los monosacáridos que constituyen el núcleo oligosacárido del derivado 1, fue el análisis comparativo de los tiempos de retención de la muestra problema con los generados por muestras auténticas mediante la cromatografía líquida en una columna para el análisis de carbohidratos (Waters).

Condiciones instrumentales a nivel analítico.

Columna: Waters-análisis de carbohidratos (aminopropilmetilsilicio), diámetro de partícula de 10 μm ; 3.9 mm de diámetro interno x 300 mm de longitud.

Fase móvil: $\text{CH}_3\text{CN-H}_2\text{O}$, 85:15 (Shaw, 1988).

Flujo: 0.5 y 1.0 mL/min.

Detector: índice de refracción.

Concentración de las muestras: 15 y 5 mg/mL.

Volumen de la línea de inyección: 20 μL .

Sensibilidad: 128 RIU.

Tipo de elución: isocrática.

Aplicando estas condiciones instrumentales se obtuvieron los tiempos de retención que se incluyen en el cuadro 7 para las muestras auténticas (t_{R1} y t_{R2}) y la muestra problema (t_{R3}).

Cuadro 7. Análisis mediante HPLC de la mezcla de carbohidratos obtenida a partir de la hidrólisis ácida de la convolvulina de *Ipomoea purga*^a.

Monosacárido	t_{R1} (0.5 mL/min)	t_{R2} (1.0 mL/min)	t_{R3} (1.0 mL/min)
L-Ramnosa	12.3	6.8	6.8
D-Quinovosa	12.7	7.1	7.2
D-Fucosa	14.4	8.2	8.3
D-Glucosa	22.9	13.6	13.6

^a. Tiempos de retención registrados para cada muestra auténtica utilizada como referencia de comparación: t_{R1} corresponde al registro con un flujo de la fase móvil de 0.5 mL/min (concentración de la muestra, 15 mg/mL); t_{R2} representa al registro a un flujo de 1.0 mL/min (concentraciones de la muestra, 5 mg/mL); t_{R3} incluye los tiempos de retención para los monosacáridos identificados en la muestra problema a una concentración de 19 mg/mL, utilizando un flujo de 1.0 mL/min.

5.6 Cromatografía líquida de alta resolución.

Con el propósito de lograr la purificación del ácido glicosídico mayoritario presente en la convolvulina de *Ipomoea purga*, se requirió de la implementación de la técnica de HPLC a nivel analítico y preparativo, la primera permitió determinar las condiciones instrumentales más adecuadas, i.e., el flujo, el sistema de elución y el tipo de columna para la resolución de la mezcla problema. La segunda, se utilizó con el fin de separar y purificar al derivado mayoritario para su posterior análisis espectroscópico. Los procedimientos a nivel preparativo utilizaron las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo, así como el rasurado y el reciclaje de picos (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

5.6.1 Preparación de los disolventes.

Los disolventes utilizados fueron H₂O, CH₃CN, CHCl₃ y Me₂CO grado HPLC (Mallinckrodt). Estos se filtraron a través de un filtro Millipore conectado al vacío, empleando una membrana de filtración de fluoruro de polivinilideno de 0.45 µm. El agua desionizada se obtuvo a través de un sistema Milli-Q-plus (Millipore). Cada uno de los disolventes se desgasificaron mediante un burbujeo con un sistema de helio a una velocidad de 100 mL/min durante 15 minutos.

5.6.2 Preparación de las muestras.

Todas las muestras de prueba se disolvieron en la fase móvil elegida para su separación y se filtraron cuando fue necesario a través de una unidad de filtración Iso-Disc con una membrana de fluoruro de polivinilideno de 0.45 µm (Millipore).

5.6.3 Análisis de IV-M mediante HPLC.

La muestra IV-M fue soluble (1 mg en 6 mL) en el sistema binario CH₃CN-H₂O (4:1), por lo que se realizó la separación preliminar de esta mezcla problema en la columna analítica µBondapak NH₂.

5.6.3.1 Condiciones instrumentales a nivel analítico.

Columnas: columna de fase enlazada μ Bondapak-NH₂ (aminopropilmetilsilicio); diámetro de partícula de 10 μ m; 3.9 mm de diámetro interno x 300 mm de longitud.

Fase móvil: CH₃CN-H₂O, 4:1.

Flujo: 0.5 mL/min.

Detector: índice de refracción.

Concentración de la muestra: 10 mg/mL.

Volumen de la línea de inyección: 20 μ L.

Sensibilidad: 64 RIU.

Tipo de elución: isocrática.

El cromatograma resultante presentó un componente mayoritario con un tiempo de retención de 22.7 minutos (1). Posteriormente, se procedió con el escalamiento de las condiciones instrumentales para la purificación del derivado 1 mediante HPLC a nivel preparativo. La cantidad de muestra y la velocidad de flujo empleados a este nivel se calcularon con base en las siguientes ecuaciones:

Cantidad de muestra a separar a nivel preparativo (Mp).

$$M_p = M_a (L_p/L_a) (d_p^2/d_a^2)$$

Flujo de la fase móvil a nivel preparativo (Fp).

$$F_p = F_a (L_p/L_a) (d_p^2/d_a^2)$$

Donde:

M = Cantidad de muestra a separar

F = Flujo de la fase móvil.

L = Longitud de la columna.

d = Diámetro de la columna.

Los subíndices a y p corresponden a las condiciones analíticas y preparativas respectivamente.

De esta manera fue posible reproducir la separación de los compuestos a nivel preparativo una vez que se habían separado bajo las condiciones instrumentales analíticas.

5.6.3.2 Condiciones instrumentales a nivel preparativo.

Columna: μ Bondapak-NH₂ (aminopropilmetilsilicio); diámetro de partícula 10 μ m; 19 mm de diámetro interno x 150 mm de longitud.

Fase móvil: CH₃CN-H₂O, 4:1.

Flujo: 4.5 mL/min.

Detector: índice de refracción.

Concentración de las muestras: 48 mg/mL.

Volumen de la línea de inyección: 500 μ L.

Sensibilidad: 64 RIU.

Tipo de elución: isocrática.

En total, se inyectaron 240 mg de la muestra IV-M, distribuidos en 10 inyecciones y se obtuvieron 68 mg del compuesto 1. Estos se purificaron mediante reinyección de la muestra, utilizando las mismas condiciones de separación y controlando el sistema cromatográfico en el modo de reciclaje (Bah y Pereda-Miranda, 1996). Este procedimiento permitió garantizar una pureza mayor al 99.9%.

5.6.4 Purificación del derivado peracetilado 2 mediante HPLC.

El compuesto 2 se purificó mediante cromatografía líquida y para tal efecto se determinó la efectividad en el sistema cromatográfico de la mezcla de disolventes empleada para su elución en la CCF. El compuesto problema desarrolló un $R_f = 0.29$ con la fase móvil binaria constituida por CHCl₃-Me₂CO (9:1). De esta manera, se decidió hacer un análisis preliminar en la columna analítica de gel de sílice utilizando las condiciones instrumentales que a continuación se describen para el desarrollo cromatográfico.

5.6.4.1 Condiciones instrumentales a nivel analítico.

Columna: gel de sílice μ porosil; diámetro de partícula de 10 μ m; 3.9 mm de diámetro interno x 300 mm de longitud.

Fase móvil: CHCl_3 - Me_2CO , 4:1

Flujo: 0.5 mL/min.

Detector: índice de refracción.

Concentración de la muestra: 20 mg/mL.

Volumen de la línea de inyección: 20 μ L.

Sensibilidad: 64 RIU.

Tipo de elución: isocrática.

El cromatograma resultante presentó un pico único con un tiempo de retención de 13.8 minutos. Estas condiciones analíticas se extrapolaron a una columna preparativa de gel de sílice para lograr la purificación del compuesto 2.

5.6.4.2 Condiciones instrumentales a nivel preparativo.

Columna: gel de sílice ISCO; diámetro de partícula 10 μ m; 21.2 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud.

Fase móvil: CHCl_3 - Me_2CO , 4:1.

Flujo: 5 mL/min.

Detector: índice de refracción.

Concentración de la muestra: 42 mg/mL.

Volumen de la línea de inyección: 500 μ L.

Sensibilidad: 64 RIU.

Tipo de elución: isocrática.

Se inyectaron 42 mg del derivado 2 repartidos en dos inyecciones para obtener 26 mg del compuesto peracetilado que presentó un tiempo de retención de 17.6 min.

6. RESULTADOS Y DISCUSION.

6.1 Extracción y fraccionamiento de la convolvulina de la raíz de *Ipomoea purga*.

El procedimiento de extracción aplicado a la raíz de *Ipomoea purga* permitió obtener 357.7 g de jalapina y 950.0 g de convolvulina. Una porción de esta última (154.8 g) se fraccionó por medio de una cromatografía en columna abierta utilizando diversos sistemas de elución de polaridad creciente (CHCl_3 , Me_2CO y MeOH) con la finalidad de obtener mezclas de menor complejidad y garantizar su completa solubilidad en metanol, ya que con esta técnica no es posible lograr la separación de los glicolípidos individuales que constituyen a las resinas glicosídicas. Se obtuvieron cinco fracciones, las cuales se sometieron a una saponificación con el objetivo de preparar los ácidos glicosídicos derivados. En la figura 7 se muestran los cromatogramas generados mediante la CCF correspondientes al fraccionamiento de la convolvulina y a la reacción de hidrólisis básica de ésta.

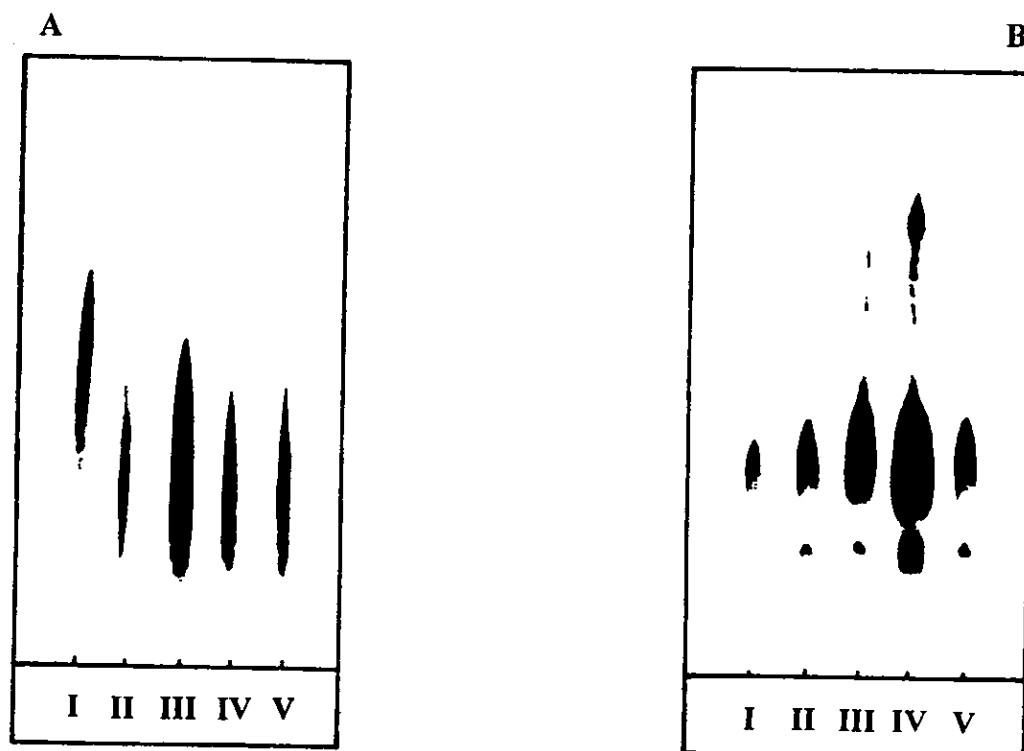


Figura 7. Cromatografía en capa fina de cada una de las fracciones obtenidas a partir de la convolvulina (A) y de la reacción de hidrólisis básica de cada una de éstas (B), eluidas con un sistema de elución ternario CHCl_3 - MeOH - H_2O (7:3:0.5 y 6:4:1, respectivamente).

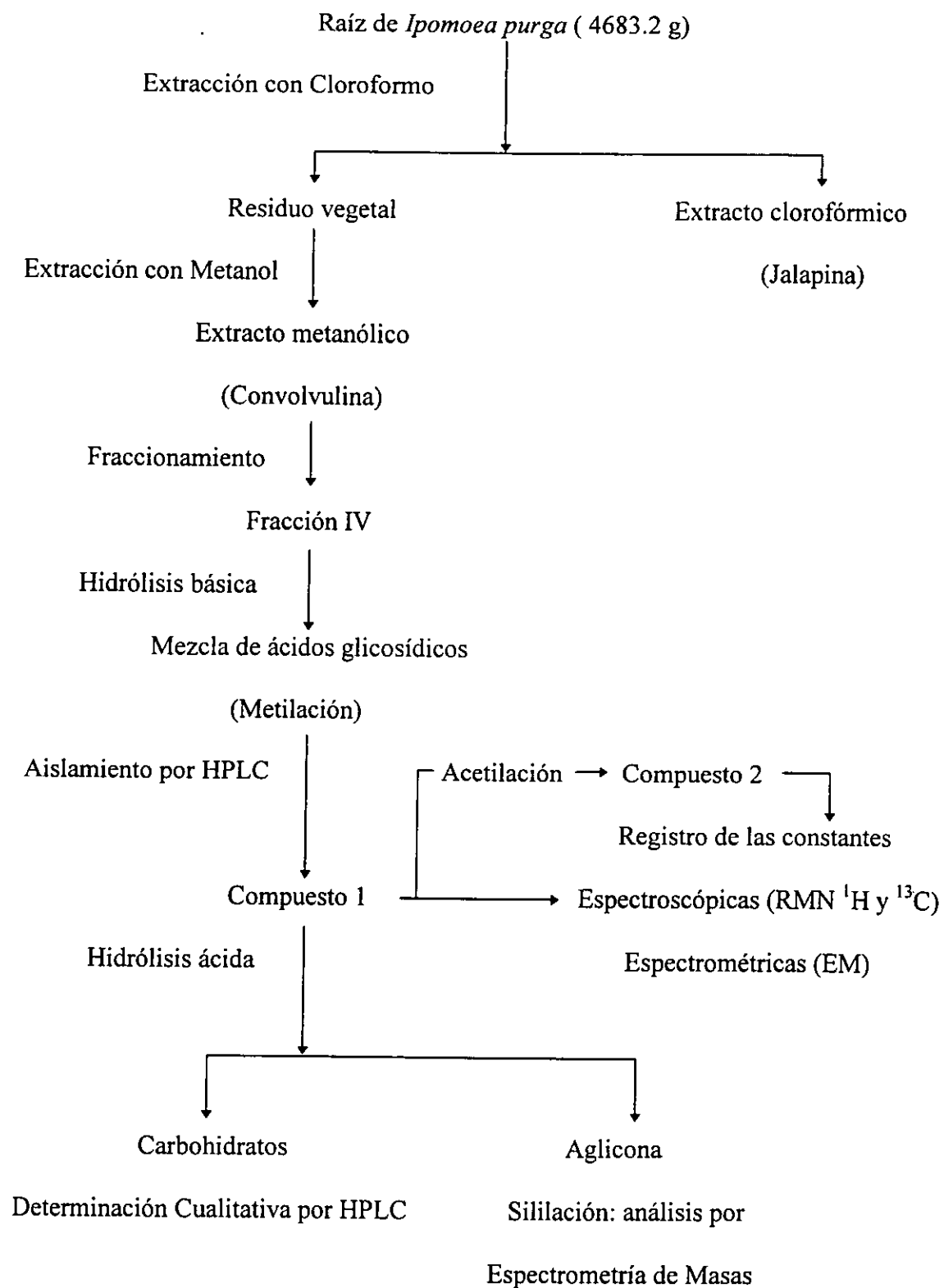


Figura 8. Procedimiento de Análisis.

Este análisis cromatográfico demostró una homogeneidad entre los productos de saponificación obtenidos en cada una de las fracciones. Posteriormente, se procedió a realizar la purificación del ácido glicosídico mayoritario a partir de la fracción IV mediante el empleo de la cromatografía de líquidos (HPLC).

La figura 8 resume los procedimientos de análisis aplicados durante el estudio de la raíz de *Ipomoea purga*, mismos que permitieron el aislamiento del ácido glicosídico mayoritario y la caracterización de su estructura molecular.

6.2 Aislamiento por HPLC del éster metílico del ácido glicosídico mayoritario.

Debido a la gran similitud estructural de los glicolípidos constitutivos de las resinas glicosídicas de las especies de la familia Convolvulaceae, es necesaria la aplicación de la técnica de HPLC a nivel preparativo para lograr la separación y la purificación de estos compuestos (Bah y Pereda-Miranda, 1996; 1997).

Esta técnica analítica también representa la herramienta de elección para la purificación de los ácidos glicosídicos generados durante los procesos de saponificación de las resinas (Bah y Pereda-Miranda, 1996).

En la literatura, se ha descrito la separación de los ácidos glicosídicos de otras especies de convolvuláceas empleando una columna empacada con gel de sílice y un sistema de elución que consiste de CHCl_3 -MeOH- H_2O en una proporción 6: 4: 0.3 (Ono, *et al.*, 1990). Sin embargo, se decidió disminuir la polaridad de la fracción de prueba (IV) realizando una reacción de metilación y evaluando su comportamiento cromatográfico en una fase estacionaria de gel de sílice enlazada (aminopropilmetilsilicio).

De esta manera, se realizó una separación preliminar de la fracción IV-M en la columna analítica $\mu\text{Bondapak-NH}_2$ bajo las condiciones enlistadas en la sección 5.6.3.1. El cromatograma resultante se muestra en la figura 9.

Para determinar si la separación había sido exitosa se evaluaron los parámetros de capacidad, selectividad, resolución y eficiencia del pico mayoritario (Willard, 1991), resultando los siguientes valores para cada uno de ellos:

t_0	Pico	t_R	k'	α	R	N
7.2 min	1	22.7 min	2.2	1.1	1	1312.3

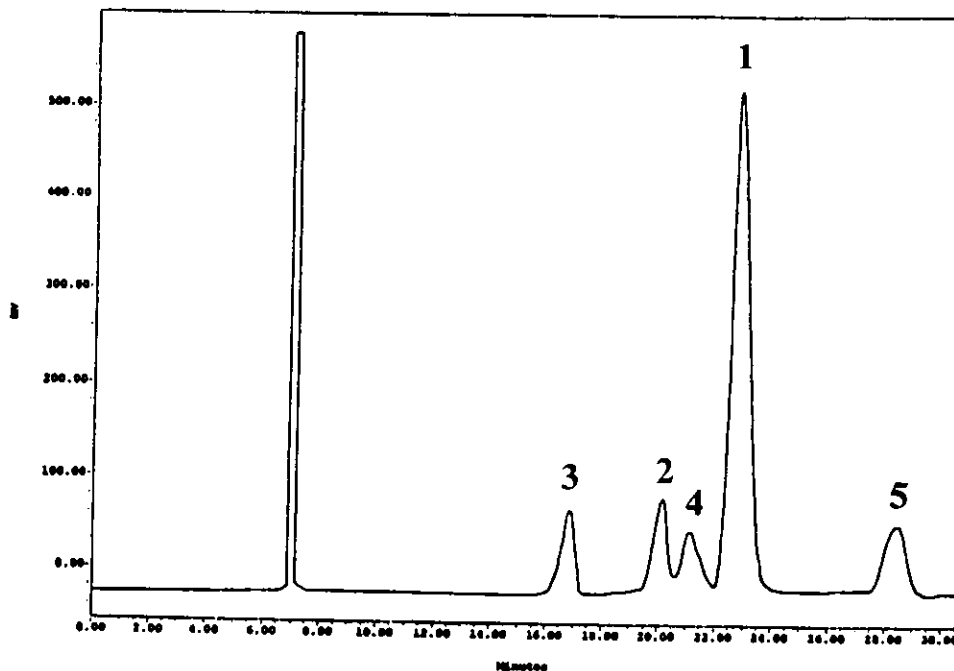


Figura 9. Cromatograma de líquidos que ilustra la separación de la muestra IV-M bajo condiciones analíticas. Este análisis permitió la detección de cinco componentes: 1, $t_R = 22.7$ min. (62.0 %); 2, $t_R = 20.1$ min. (9.8 %); 3, $t_R = 16.8$ min. (9.6 %); 4, $t_R = 21.4$ min. (9.5 %); 5, $t_R = 28.5$ min. (8.4 %). **Condiciones de análisis:** Equipo, Waters; Detector, índice de refracción (Waters 410 Differential Refractometer, 64 RIU); Columna, NH₂ (μ Bondapak, 30 x 0.39 cm d.i., 125 Å, 10 μ m); sistema de elución, 20% de H₂O en CH₃CN; flujo, 0.5 mL/min; concentración de la muestra, 10 mg/mL.

A continuación se describe el significado de cada uno de los parámetros evaluados:

Tiempo muerto (t_0). Es el tiempo que tarda en eluir de la columna un soluto no retenido.

Factor de capacidad (k'). Representa el número de tiempos muertos en los que tarda en eluir un soluto determinado. Para que exista la separación de una mezcla es necesario que los solutos se retengan y eluyan después de lo que lo hace un soluto no retenido. La capacidad debe ser entonces mayor a 1.

$$k' = (t_{Rn} - t_0) / t_0$$

Selectividad (α). Es la relación del tiempo en que dos picos permanecen en la fase estacionaria. Si α es igual a 1 los compuestos no se separan.

$$\alpha = (t_{Rn} - t_0) / (t_{Rn-1} - t_0)$$

Eficiencia (N). Es la capacidad del sistema cromatográfico para separar una mezcla.

$$N = 16 (t_{Rn} / W_n)^2$$

Resolución (R). Es la capacidad del sistema cromatográfico para separar dos picos. Una resolución igual a 1 garantiza una separación del 97%.

$$R = (t_{Rn} - t_{Rn-1}) / 0.5 (W_n + W_{n-1})$$

Donde:

t_R = tiempo de retención de un pico determinado.

W = ancho de la base del pico.

Estos parámetros indican que la separación cromatográfica obtenida con las condiciones instrumentales seleccionadas fue adecuada. De esta manera, la resolución del compuesto mayoritario ($t_R = 22.7$ min.) en relación con el constituyente minoritario que eluye con anterioridad ($t_R = 21.4$ min.) fue satisfactoria y garantizó una pureza del 97%.

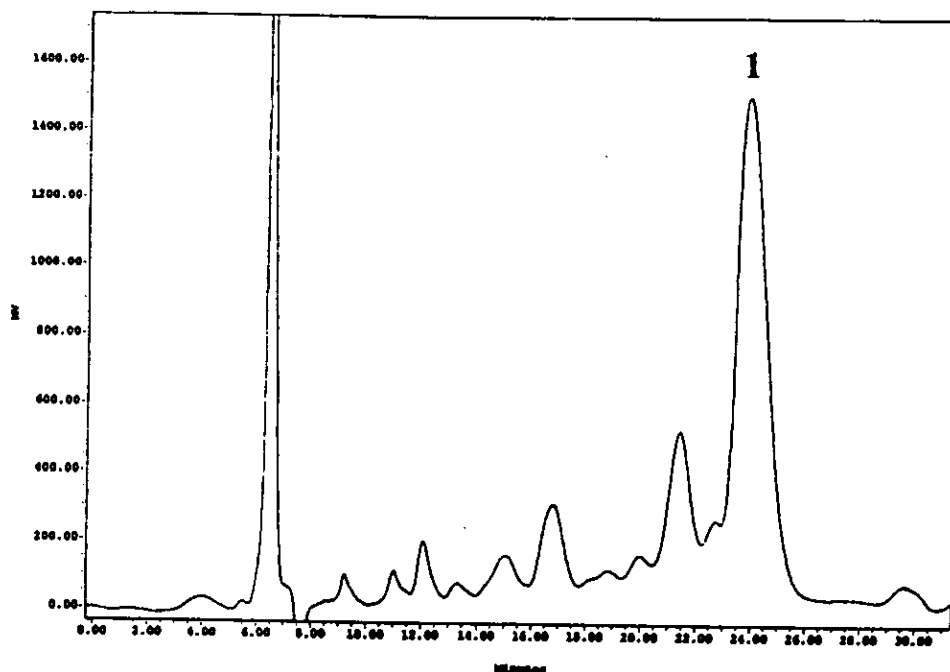


Figura 10. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo generado durante el proceso de purificación del compuesto mayoritario (1) ($t_R = 24.7$ min.). **Condiciones de análisis:** Equipo, Waters; Detector, índice de refracción (Waters 410 Differential Refractometer, 64 RIU); Columna, NH_2 ($\mu\text{Bondapak}$, 15.0×1.9 cm d.i., 125 \AA , $10 \mu\text{m}$); sistema de elución, 20% de H_2O en CH_3CN ; flujo, 4.5 mL/min; concentración de la muestra, 48 mg/mL.

Estas condiciones instrumentales a nivel analítico se escalaron a nivel preparativo para el aislamiento del compuesto mayoritario de acuerdo con los procedimientos descritos en la parte experimental (ver sección 5.6.3.1).

Con este escalamiento la cantidad de muestra a separar a nivel preparativo fue de 24 mg, con un flujo de la fase móvil de 6.0 mL/min, este flujo incrementa la presión del sistema cromatográfico y podría ocasionar un daño en la celda del detector por lo que se decidió disminuirlo hasta 4.5 mL/min.

La figura 10 ilustra el cromatograma generado mediante el escalamiento de las condiciones instrumentales analíticas a un nivel preparativo (ver sección 5.6.3.2). Se realizó el corte del núcleo del pico mayoritario, con tiempo de retención $t_R = 24.70$ min., y se procedió a su purificación mediante reinyección de la muestra, utilizando el modo de reciclaje del sistema cromatográfico para garantizar una pureza mayor al 99.9%. En la figura 11 se muestra el resultado de este procedimiento.

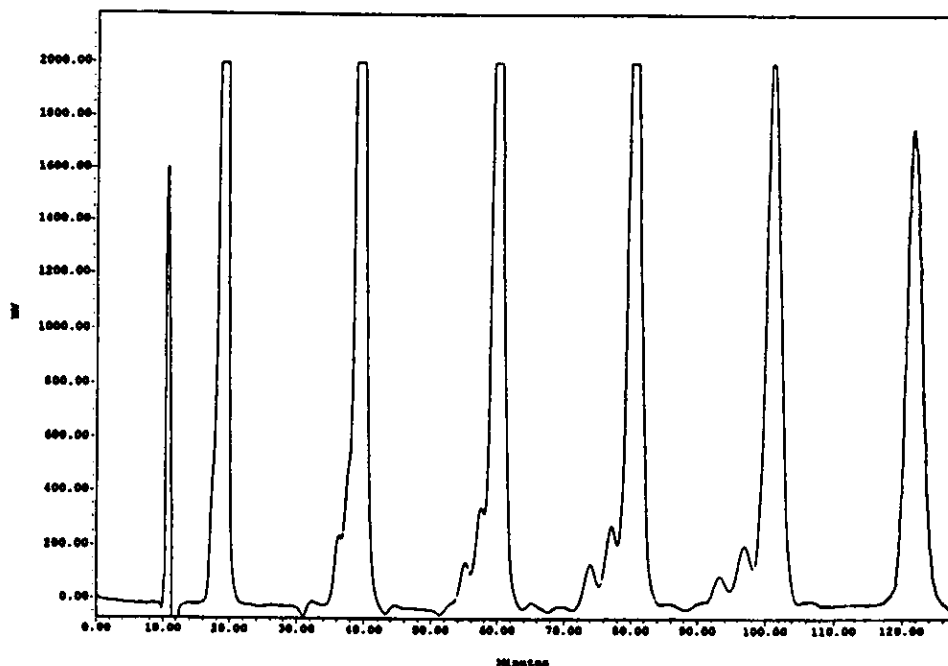


Figura 11. Empleo de la técnica de reciclaje de la muestra para la purificación del compuesto 1. **Condiciones de análisis:** Equipo, Waters; Detector, índice de refracción (Waters 410 Differential Refractometer, 64 RIU); Columna, NH₂ (μBondapak, 15.0 x 1.9 cm d.i., 125 Å, 10 μm); sistema de elución, 20% de H₂O en CH₃CN; flujo, 4.5 mL/min; concentración de la muestra, 48 mg/mL.

6.3 Purificación del derivado peracetilado (2) mediante HPLC.

En este caso, tanto la elección de la fase móvil como de la fase estacionaria obedecen a un intento de evaluar si las condiciones de purificación obtenidas por CCF son efectivas para una separación por HPLC. En la figura 12 se muestra la placa cromatográfica del R_f (0.29) desarrollado por el compuesto peracetilado en un sistema de elución $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ (9:1).

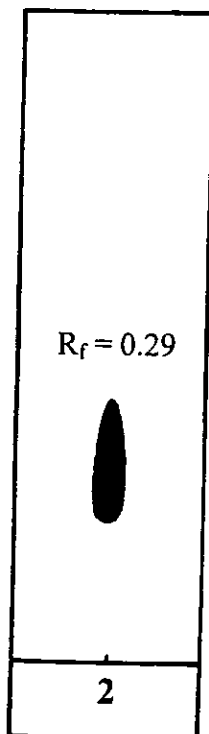


Figura 12. Placa cromatográfica que muestra el R_f desarrollado por el compuesto peracetilado (2) con una fase móvil constituida por $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ (9:1) y en una placa de gel de sílice.

Se observa que con esta fase móvil el compuesto eluye poco menos de una tercera parte de la placa, por lo que al realizar la purificación por HPLC, se decidió utilizar una fase móvil de mayor polaridad constituida por $\text{CHCl}_3\text{-Me}_2\text{CO}$ (8:2) y la fase estacionaria de gel de sílice. La separación analítica se llevó a cabo bajo las condiciones instrumentales enlistadas en la sección 5.6.4.1, en la figura 13 se muestra el resultado de esta purificación donde se obtuvo un pico con un tiempo de retención de 13.8 min.

Estas condiciones de separación analítica se escalaron a nivel preparativo siguiendo los procedimientos utilizados para el escalamiento de las condiciones para la purificación del compuesto 1. La cantidad de muestra a purificar fue de 98.5 mg con un flujo de la fase móvil de 12.3 mL/min; al igual que para el compuesto 1, se tuvo que reducir la velocidad de flujo a 5 mL/min y la cantidad de muestra a purificar también se disminuyó para no sobrecargar la columna. Con las condiciones instrumentales a nivel preparativo descritas en la sección 5.6.4.2 se obtuvo el cromatograma de la figura 14.

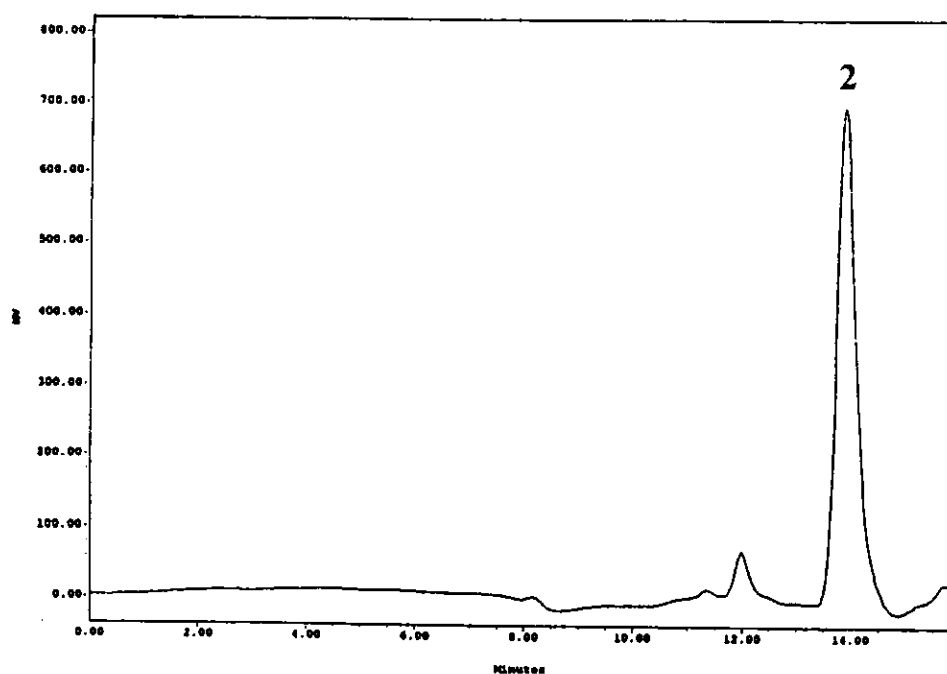


Figura 13. Cromatograma que muestra la separación a nivel analítico del compuesto 2. **Condiciones de análisis:** Equipo, Waters; Detector, índice de refracción (Waters 410 Differential Refractometer, 64 RIU); Columna, gel de sílice (μ porosil, 30.0 x 0.39 cm d.i., 125 Å, 10 μ m); sistema de elución, CHCl_3 - Me_2CO (4:1); flujo, 0.5 mL/min; concentración de la muestra, 20 mg/mL.

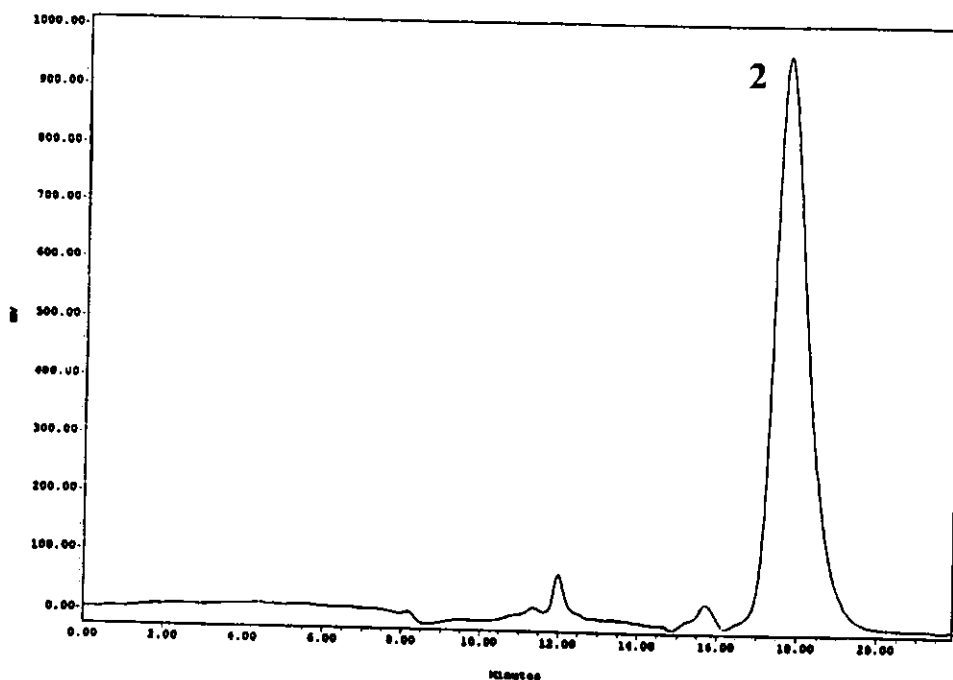


Figura 14. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo generado durante la purificación del compuesto 2. **Condiciones de análisis:** Equipo, Waters; Detector, índice de refracción (Waters 410 Differential Refractometer, 64 RIU); Columna, gel de sílice (ISCO, 25.0 x 2.12 cm d.i., 125 Å, 10 µm); sistema de elución, CHCl₃-Me₂CO (4:1); flujo, 5 mL/min; concentración de la muestra, 42 mg/mL.

6.4 Caracterización de los productos de hidrólisis ácida del compuesto 1.

6.4.1 Caracterización de la aglicona.

Una vez realizada la hidrólisis ácida del compuesto 1, se obtuvieron 7.3 mg de la aglicona metilada purificada por CCF. Este derivado presento un punto de fusión de 27.0 - 29.0° C y su rotación óptica fue dextrógira, $\{\alpha\}_D^{20} = +1.5^\circ$.

También se llevó a cabo la reacción de sililación de la aglicona y el análisis de ésta por CG-EM (IE). Esta herramienta de análisis permitió determinar el tamaño del ácido graso saturado y la posición del grupo hidroxilo sobre esta cadena (Bah, 1997). Se estableció que el ión molecular del éter de trimetilsilicio era de 330 Da lo que corresponde a una fórmula molecular de C₁₈O₃SiH₃₈. El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas estableció que la aglicona correspondía al éster metílico del ácido 11-hidroxitetradecanóico. En la figura 15 se muestra el espectro de

masas correspondiente a este derivado y se indican los fragmentos que se producen mediante rupturas α al heteroátomo y que permiten ubicar la posición del grupo hidroxilo en la cadena hidrocarbonada de la aglicona.

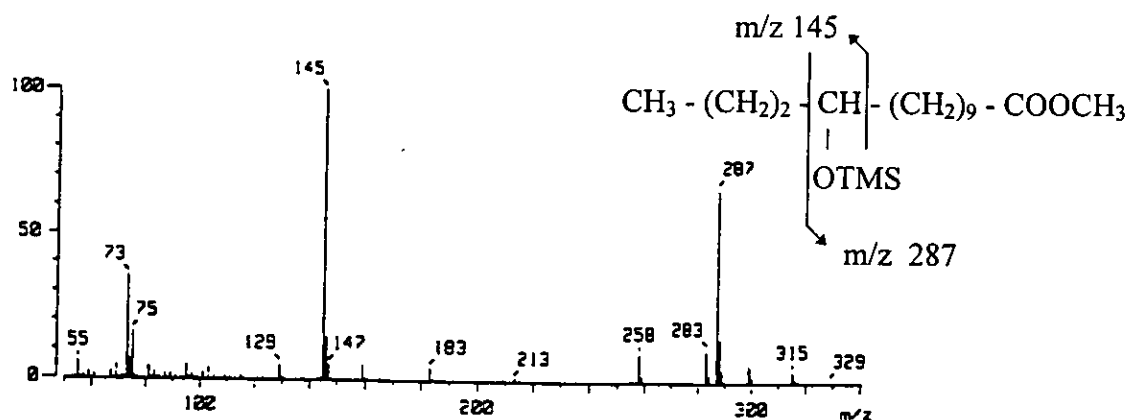


Figura 15. Espectro de masas y patrón de fragmentación observado para el derivado sililado del convolvulinato de metilo.

6.4.2 Caracterización de los carbohidratos.

El análisis de la mezcla de carbohidratos obtenidos de la hidrólisis ácida del compuesto 1 se realizó mediante HPLC con las condiciones descritas en la sección 5.5.4.3. Estas condiciones fueron descritas con anterioridad por Shaw (1988) y en ellas se utilizó una velocidad del eluyente de 3.0 mL/min. Debido a que este flujo impone un incremento en la presión del sistema cromatográfico, se valoraron los tiempos de retención de las muestras auténticas de carbohidratos utilizados como controles a un flujo de 0.5 y 1.0 mL/min. Se observó que con el empleo de este último, el tiempo de análisis se reducía a la mitad (14 min.) en relación al producido con un flujo de 0.5 mL/min. Posteriormente, se realizó la inyección de la muestra problema bajo esta última condición y se observaron los tiempos de retención (t_{R3}) registrados en el cuadro 7. En la muestra problema se identificó la presencia de la D-quinovosa, la L-ramnosa, la D-fucosa y la D-glucosa por medio de la comparación de sus tiempos de retención con los generados por los estándares (t_{R2}). La figura 16 ilustra el resultado de la separación de la mezcla de carbohidratos bajo condiciones instrumentales señaladas en sección 5.5.4.3.

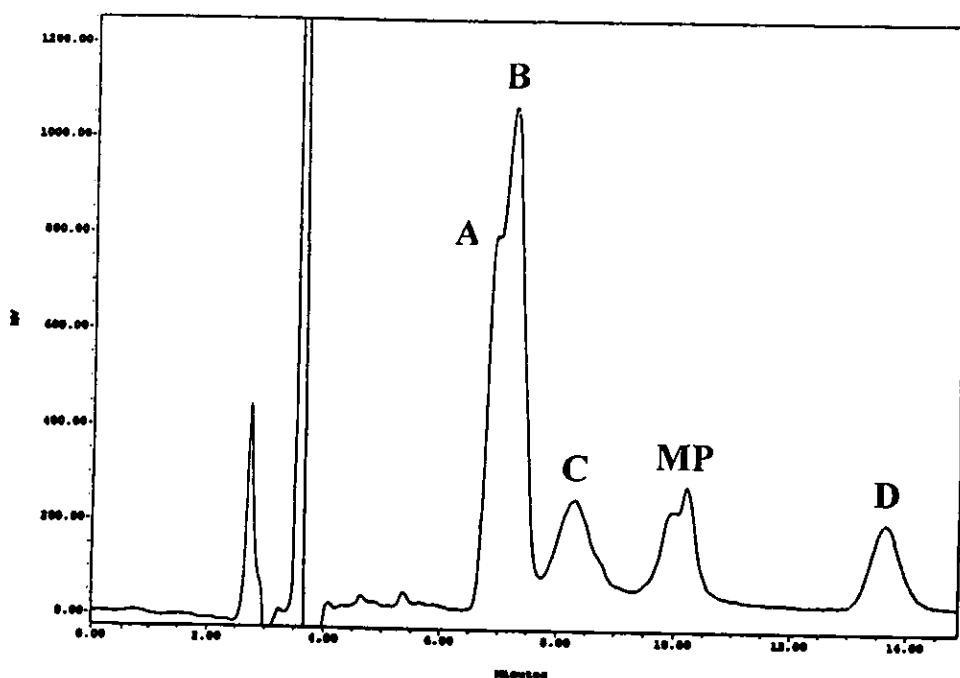


Figura 16. Cromatograma de líquidos de la mezcla de monosacáridos obtenida durante la hidrólisis ácida del compuesto 1 (tiempo de reacción: 5 h). Asignación de picos: A, $t_R = 6.8$ min., L-ramnosa; B, $t_R = 7.2$ min., D-quinovosa; C, $t_R = 8.3$ min., D-fucosa; D, $t_R = 13.6$ min., D-glucosa; MP, productos de hidrólisis parcial de la materia prima, $t_R = 9.9$ y 10.2 min. **Condiciones de análisis:** Equipo, Waters; Detector, índice de refracción (Waters 410 Differential Refractometer, 64 RIU); Columna, Waters-análisis de carbohidratos (30.0 x 0.39 cm d.i., 125 Å, 10 µm); sistema de elución, 15% de H₂O en CH₃CN; flujo, 1.0 mL/min; concentración de la muestra, 15 mg/mL.

El siguiente paso en la determinación cualitativa de los carbohidratos fue la realización de los experimentos de coelución con muestras auténticas de monosacáridos. La primera coelución se hizo con ramnosa, fucosa y glucosa (cuadro 8, figura 17). En tanto que la segunda se realizó con quinovosa (cuadro 9, figura 18). Estos experimentos se efectuaron adicionando diferentes alícuotas del estándar a una concentración de 5 mg/mL, con el propósito de lograr que el área de cada pico aumentara al doble.

t_R (min)	% de área	μ L de estándar adicionados	Estándar que se adicionó	% de área de la coelución	Relación de áreas
6.8	12.5	22.8	L-ramnosa	25.3	2.0
7.2	47.7	-	-	19.8	0.4
8.3	21.0	11.6	D-fucosa	27.3	1.3
13.6	18.8	7.7	D-glucosa	27.5	1.5

Cuadro 8. Coelución de la mezcla de carbohidratos, a una concentración de 8.5 mg/mL, con los estándares L-ramnosa, D-fucosa y D-glucosa.

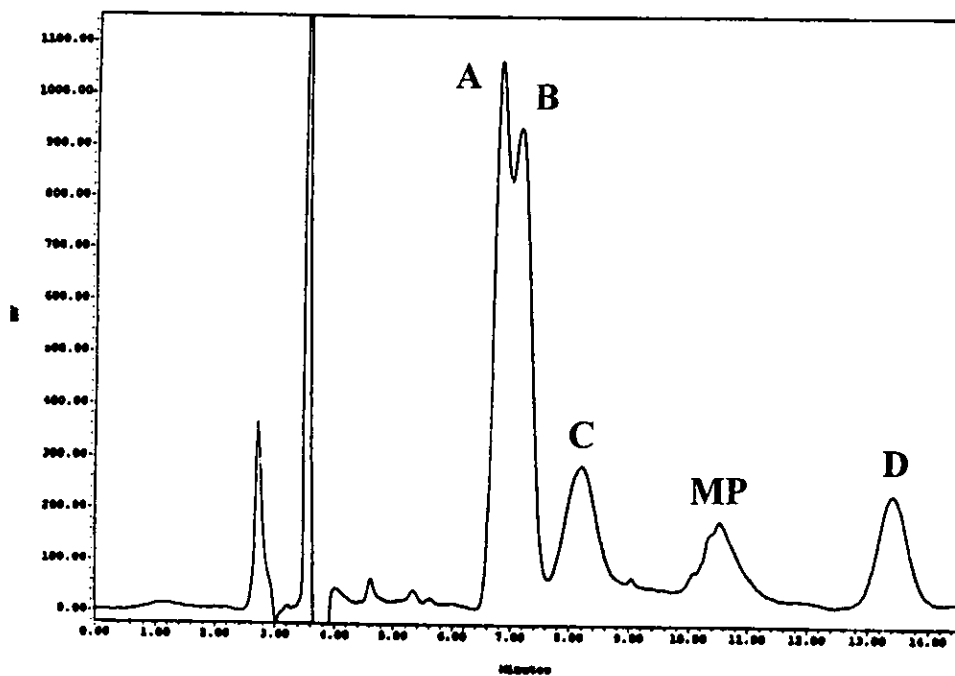


Figura 17. Coelución de la mezcla de carbohidratos con los estándares L-ramnosa, D-fucosa y D-glucosa (tiempo de reacción: 5 h). Asignación de picos: A, $t_R = 6.8$ min., L-ramnosa; B, $t_R = 7.2$ min., D-quinovosa; C, $t_R = 8.3$ min., D-fucosa; D, $t_R = 13.6$ min., D-glucosa; MP, productos de hidrólisis parcial de la materia prima, $t_R = 10.0$ y 10.4 min. Las condiciones instrumentales son idénticas a las descritas en la Figura 15.

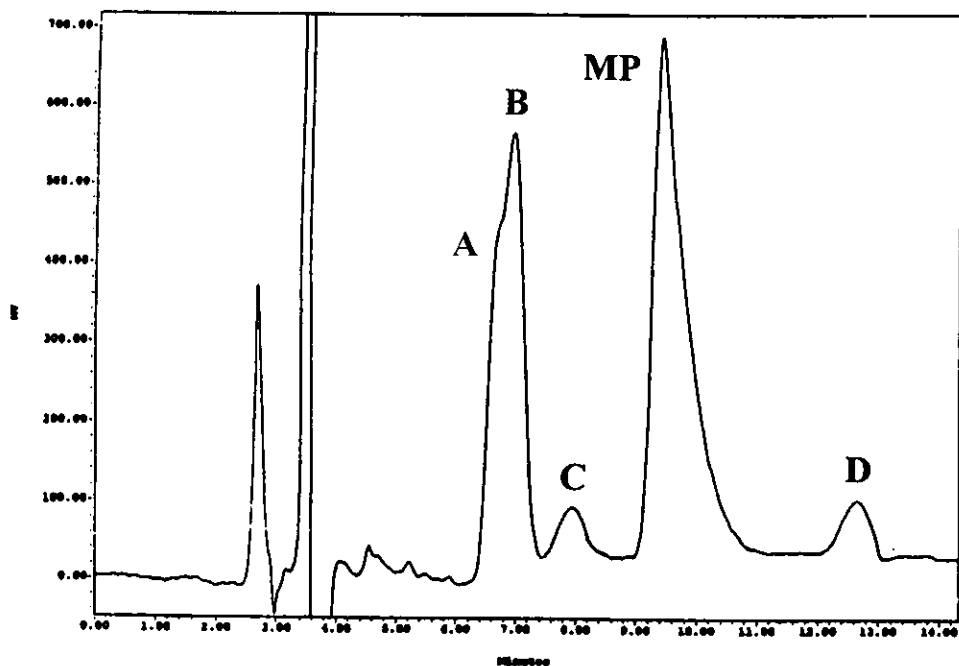


Figura 18. Coelución de la mezcla de carbohidratos con el estándar D-quinovosa (tiempo de reacción: 2 h). Asignación de los picos: A, $t_R = 6.6$ min., L-ramnosa; B, $t_R = 7.0$ min., D-quinovosa; C, $t_R = 7.9$ min., D-fucosa; D, $t_R = 12.7$ min., D-glucosa; MP, productos de hidrólisis parcial de la materia prima, $t_R = 9.6$ min. Las condiciones instrumentales son idénticas a las descritas en la Figura 15.

t_R (min)	% de área	μL de estándar adicionados	Estándar que se adicionó	% de área de la coelución	Relación de áreas
6.6	15.0	-	-	6.1	0.4
7.0	56.1	14.3	D-quinovosa	65.8	1.2
7.9	15.2	-	-	15.2	1.0
12.7	13.6	-	-	12.8	0.9

Cuadro 9. Coelución de la mezcla de monosacáridos, a una concentración de 7.5 mg/mL, con el estándar de D-quinovosa.

Con estos experimentos se confirmó la presencia de los cuatro monosacáridos identificados inicialmente (quinovosa, ramnosa, fucosa y glucosa), ya que al adicionar cantidades conocidas de cada uno de estos estándares, se observó un incremento en el área del pico proporcional a la concentración de la muestra inyectada y que correspondía al experimento de coelución en cuestión.

6.5 Caracterización espectrométrica y espectroscópica del compuesto 1.

Por medio de las reacciones de hidrólisis básica y ácida se demostró que el ácido glicosídico mayoritario y constitutivo de las resinas de *Ipomoea purga* respresenta un lipooligosacárido del ácido convolvulínico. De acuerdo a la espectrometría de masas (FAB-negativo), este compuesto mostró un ión molecular de 1165 [M-H]⁻ y, por lo tanto, la fórmula molecular (C₅₁O₂₉H₉₀) correspondía al éster metílico del ácido convolvulínico unido a una porción oligosacárida constituida por 4 metilpentosas (quinovosa, ramnosa y fucosa) y 2 hexosas (glucosa). La figura 19 ilustra el espectro de masas FAB-negativo del compuesto 1 y el patrón de fragmentación del núcleo oligosacárido que permite establecer de manera preliminar la secuencia de unión de los monosacáridos.

Al analizar los espectros de RMN H¹ del compuesto 1, se identificaron las señales dobles asignables a los protones anoméricos (4.3-5.9 ppm) y las correspondientes a los grupos metilo de las 4 metilpentosas (1.2-1.4 ppm). De la misma manera, se identificaron fácilmente las señales anoméricas en el espectro de RMN C¹³ (90-112 ppm). El cuadro 9 enlista los desplazamientos en ppm para cada una de estas señales diagnósticas. Estos desplazamientos químicos observados fueron similares a los previamente descritos en la literatura para diversos oligosacáridos naturales (Bah, 1997).

La identificación de las señales anoméricas permite mediante el análisis de las conectividades observadas, establecer cada uno de los sistemas de espines que constituyen a las unidades monosacáridas (Bah, 1997). Sin embargo, el espectro de RMN ¹H del compuesto 1 presentó una sobreposición de señales en la región comprendida entre 3.0 y 4.5 ppm, por lo que se dificultó la asignación inequívoca de éstas.

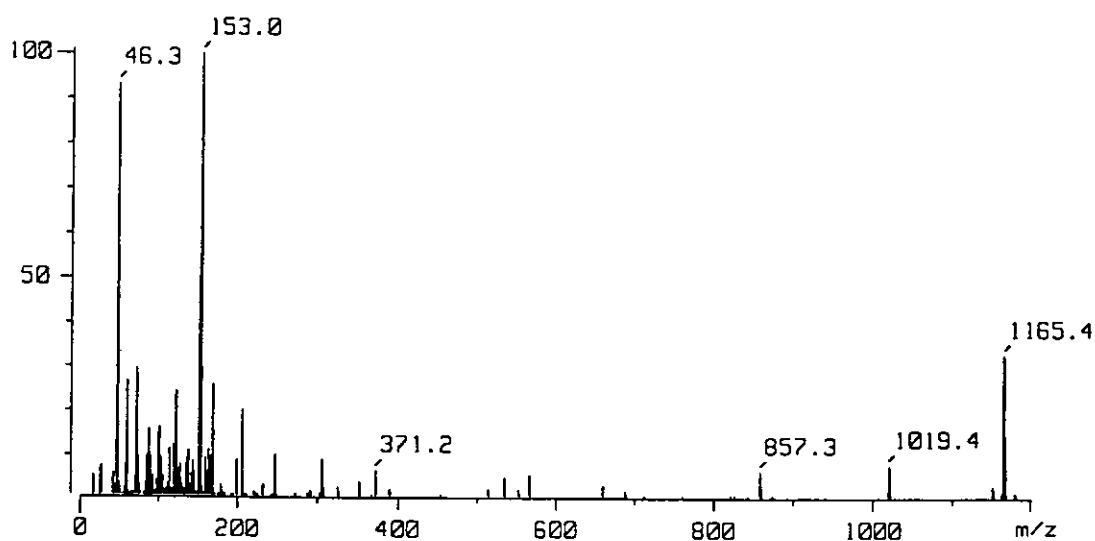
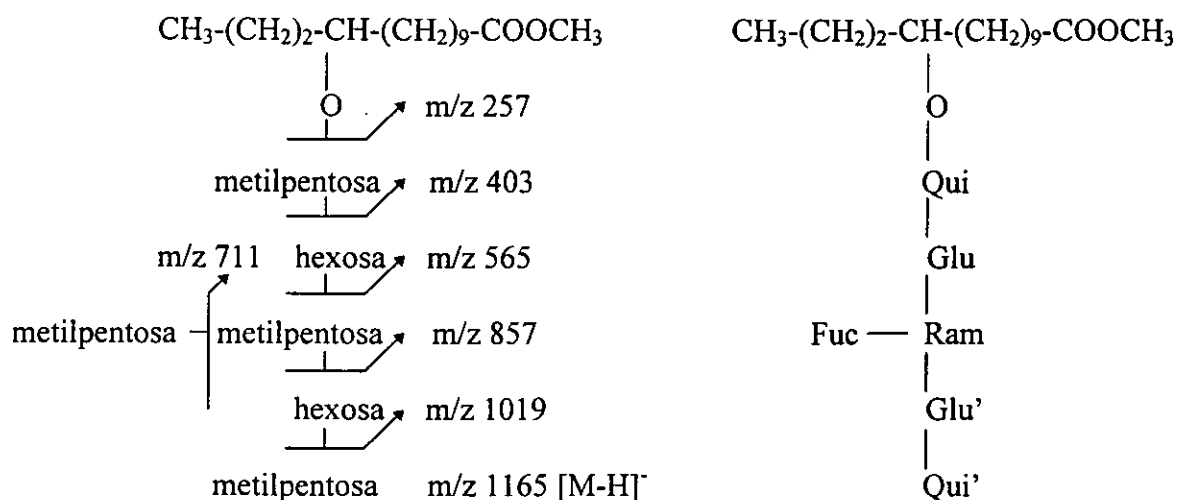


Figura 19. Espectro de masas FAB-negativo del compuesto 1. La figura superior ilustra la secuencia de glicosidación deducida a partir del patrón de fragmentación.

Por este motivo, se recurrió al análisis del espectro de RMN de H^1 del derivado peracetilado del compuesto 1 y, de esta manera, se logró una máxima dispersión de las señales, misma que permitió la identificación de las unidades monosacáridas que integraban al oligosacárido en estudio.

Al igual que para el compuesto 1, en estos espectros del derivado peracetilado se realizó, en primera instancia, la asignación de las señales anoméricas y las correspondientes a los metilos de las unidades de las 6-desoxihexosas. Realizando el análisis de las conectividades totales, se asignó cada una de las cadenas de espines

acoplada a lo largo de los núcleos hexapiranosidos. La identificación inequívoca de cada uno de los desplazamientos químicos en los espectros de RMN ^1H permitió la asignación de las señales del espectro de RMN ^{13}C a través de la conectividad a un enlace ^1H - ^{13}C (Cuadro 10 y 11).

Monosacárido	H ₁ (ppm), J (Hz)	C ₁ (ppm)	H ₆ (ppm)
Quinovosa	4.76 (7.5)	102.15	1.44
Quinovosa'	5.09 (8.0)	104.76	1.66
Ramnosa	6.44 (2.0)	100.14	1.94
Fucosa	5.77 (7.5)	102.92	1.53
Glucosa	5.74 (7.5)	102.40	
Glucosa'	6.23 (7.5)	100.57	

Cuadro 10. Señales diagnósticas detectadas en la RMN ^1H y ^{13}C para el núcleo oligosacárido del compuesto 1.

Monosacárido	H ₁ (ppm), J (Hz)	C ₁ (ppm)	H ₆ (ppm)
Quinovosa	4.65 (7.5)	100.93	1.27
Quinovosa'	5.18 (8.3)	101.73	1.38
Ramnosa	5.40	97.41	1.78
Fucosa	5.53 (7.1)	101.11	1.25
Glucosa	5.06 (8.0)	101.33	
Glucosa'	5.41 - 5.40	102.50	

Cuadro 11. Señales diagnósticas detectadas en la RMN ^1H y ^{13}C para el núcleo oligosacárido del derivado peracetilado del compuesto 1.

La secuencia de glicosidación se estableció de manera definitiva mediante las correlaciones de acoplamiento ^{13}C - ^1H a larga distancia (Bah, 1997). El cuadro 12 resume las principales conectividades heteronucleares a tres ligaduras observadas para el núcleo oligosacárido del compuesto 1 y en la figura 20 se ilustran estas interacciones.

Conectividad $^3J_{1H}$ (ppm) - ^{13}C (ppm)	Conectividad $^3J_{13C}$ (ppm) - 1H (ppm)
Qui H ₁ (4.76) - C ₁₁ (80.10)	-
Glu H ₁ (5.74) - Qui C ₂ (80.85)	-
Ram H ₁ (6.44) - Glu C ₂ (77.83)	-
Glu' H ₁ (6.23) - Ram C ₃ (78.18)	Glu' C ₁ (100.57) - Ram H ₃ (5.30)
Fuc H ₁ (5.77) - Ram C ₄ (78.91)	Fuc C ₁ (102.92) - Ram H ₄ (4.88)
Qui' H ₁ (5.09) - Glu' C ₂ (84.72)	-

Cuadro 12. Conectividades heteronuclares $^3J_{13C-1H}$ observadas en la resonancia magnética nuclear bidimensional heteronuclear (HMBC).

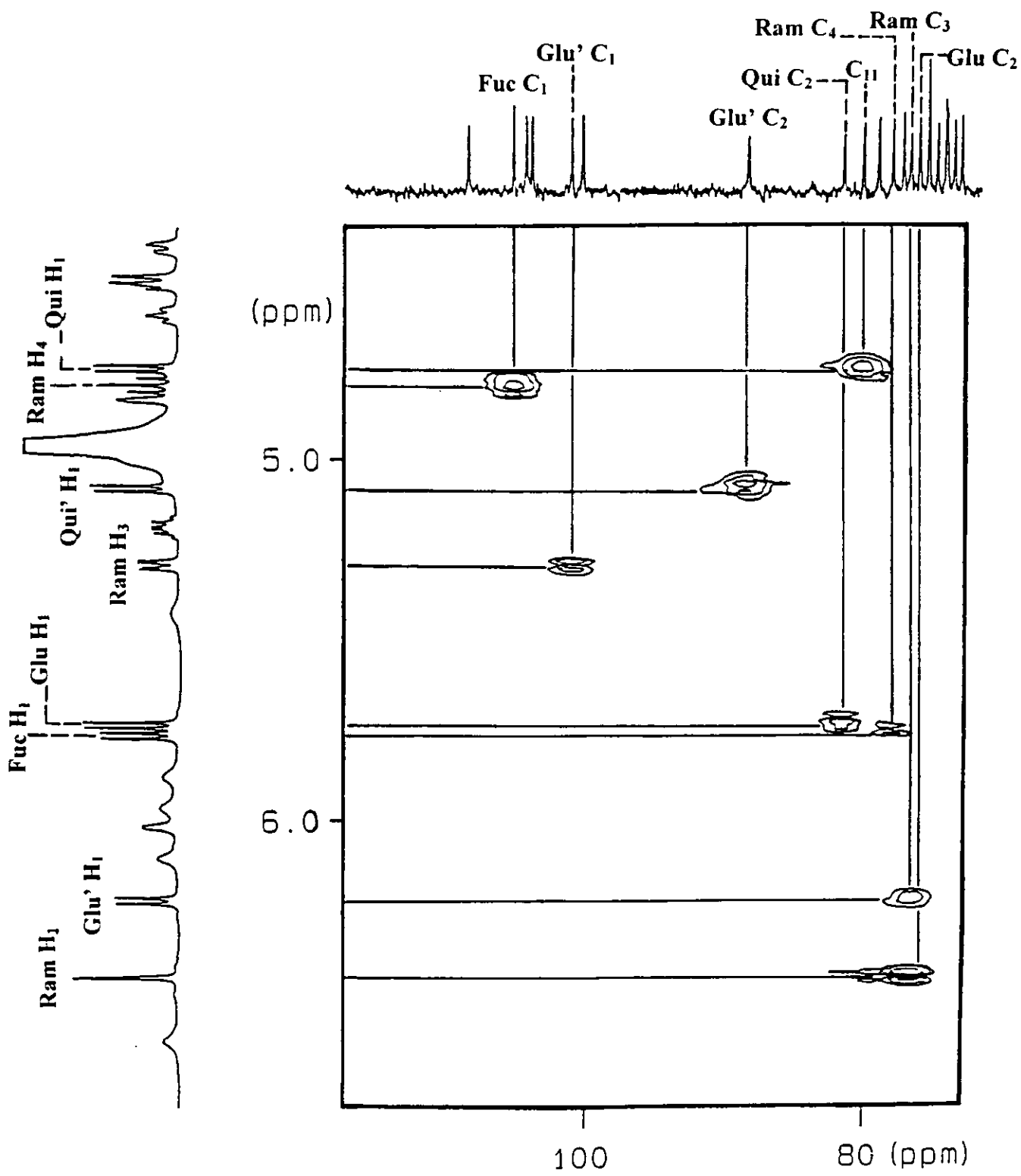
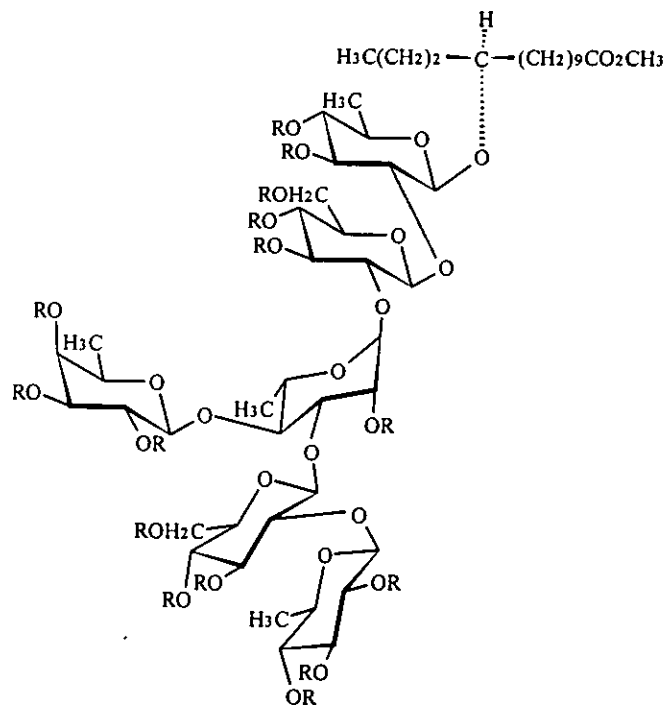


Figura 20. Espectro de correlación bidimensional heteronuclear HMBC del compuesto 1. Se ilustran las interacciones $^3J_{CH}$ para los centros anómicos.

Por medio de este análisis fue posible determinar los sitios de glicosidación del oligosacárido y establecer así la estructura del compuesto 1 y la de su derivado peracetilado 2, de acuerdo con la representación ilustrada en la figura 21.



1: R = H
2: R = Ac

Figura 21. Estructura del ácido glicosídico constitutivo del núcleo oligosacárido de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga* en forma de éster metílico (1) y su correspondiente derivado peracetilado (2).

7. CONCLUSIONES.

1.- El estudio fitoquímico de la convolvulina de la raíz de *Ipomoea purga*, un poderoso agente catártico utilizado en la medicina tradicional mexicana, reveló la presencia de un alto contenido de resinas glicosídicas. Estos principios representan la característica quimiotaxonómica de todos los miembros de la familia de las convolvuláceas y son los responsables de sus propiedades purgantes.

2.- La saponificación del crudo resinoso total proporcionó una mezcla constituida por cinco ácidos glicosídicos. La meta propuesta para el presente trabajo comprendió el aislamiento del constituyente mayoritario. El empleo de reacciones degradativas (hidrólisis básica y ácida) permitió establecer que la estructura del principal núcleo oligosacárido de las resinas de *Ipomoea purga* se encuentra constituida por 2 moles de D-quinovosa, 2 moles de D-glucosa, 1 mol de D-fucosa y 1 mol de L-ramnosa. Así mismo, se confirmó que la aglicona correspondía al ácido 11-S-hidroxitradecanóico.

3.- El empleo de las técnicas de Resonancia Magnética Nuclear (^1H y ^{13}C) y la espectrometría de masas (FAB-negativo) permitió establecer que la estructura del ácido glicosídico mayoritario presente en *Ipomoea purga* correspondía al 11-O- β -D-quinopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-[β -D-fucopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-quinovopiranosido del ácido (11S)-11-tetrahydroxidecanóico.

8. BIBLIOGRAFIA.

Bah, M. (1997). Aplicación de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (FAB) de alta resolución en la elucidación estructural de las tricolorinas A-J, oligosacáridos aislados de las resinas de *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). Tesis Doctoral. Facultad de Química, UNAM, México, 292 pp.

Bah, M. y 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* **52**, 13063-13080.

Bah, M. y Pereda-Miranda, R. (1997) Isolation and Structural Characterization of New Glycolipid Ester Type Dimers from the Resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *TETRAHEDRON* **53**, 9007-9022.

Barton, A. (1959) The Classification of flowering plants, dicotyledons. Cambridge at the University press. Vol. II, págs. 485-487.

Bieber, L.W., Da Silva Filho, A.A., Lima, R.M., Chiappeta, A.A., Do Nascimento, S. C., De Souza, I.A., De Mello, J.F. y Veith, H.J. (1986) Anticancer and antimicrobial glycosides from *Ipomoea bahiensis*. *PHYTOCHEMISTRY* **25**, 1077-1081.

Cox, P.A. y Balick, M.J. (1994) The Ethnobotanical Approach to Drug Discovery. *SCIENTIFIC AMERICAN*, 82-87.

Duke. J.A. (1988) Handbook of Medicinal Herbs. CRC Press. EE.UU. pág 249.

Farnsworth, N.R. (1994) Ethnopharmacology and drug development. En Ethnobotany and the search for new drugs. Wiley, England (Ciba Foundation Symposium 185) p. 46-59.

Kitagawa, I., Baek N.I., Kawashima, K., Yokokawa, Y., Yoshikawa, M., Ohashi, K. y Shibuya, H. (1996) Indonesian Medicinal Plants. XV. Chemical Structures of Five New Resin Glycosides, Merremosides a, b, c, d and e, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **44**, 1680-1692.

Kitagawa, I., Baek N.I., Yokokawa, Y., Yoshikawa, M., Ohashi, K. y Shibuya, H. (1996) Indonesian Medicinal Plants. XVI. Chemical Structures of Four New Resin-Glycosides, Merremosides f, g, h₁ y h₂, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **44**, 1693-1699.

Kitagawa, I., Ohashi, K., Baek N.I., Sakagami, M., Yoshikawa, M., y Shibuya, H. (1997) Indonesian Medicinal Plants. XIX. Chemical Structures of Four Additional Resin-Glycosides, Mammosides A, B, H₁ y H₂, from Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **45**, 786-794.

Kogetsu, H., Noda, N., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1991) Scammonin III-VI, Resin Glycosides of *Convolvulus scammonia*. *PHYTOCHEMISTRY* **30**, 957-963.

Linajes, A., Rico-Gray, V. y Carrión, G. (1993) Tradicional production System of the Root of Jalapa, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, México. *ECONOMIC BOTANY* **48**, 84-89.

Mannich, C. y Schumann, P. (1938) Jalap resin and its principal constituent, convolvulin. *ARCHIV DER PHARMAZIE* **276**, 211-226.

Martínez, M. (1959) Plantas útiles de la flora mexicana. Botas-México, pp. 276-279.

Noda, N., Kogetsu, H., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990) Scammonins I y II, The Resin Glycosides of Radix Scammoniae from *Convolvulus scammonia*. *PHYTOCHEMISTRY* **29**, 3565-3569.

Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. y Okabe, M. (1987) Isolation and structure elucidation of orizabin-I, II, III y IV, genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *TETRAHEDRON* **43**, 3889-3902.

Noda, N., Tsuji, K., Kawasaki, T., Miyahara, K. y Hanazono, H. (1995) A novel resin glycoside, Merremmin (Teguajalapin X Dimer), from *Merremia hungaiensis*. *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **43**, 1061-1063.

Noda, N., Tsuji, K., Miyahara, K. y Yang, C. (1994) Resin Glycosides. XXI. Teguajalapins I-X, the Resin Glycosides Having Long-Chain Fatty Acid Groups from the Root of *Merremia hungaiensis*. *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **42**, 2011-2016.

Pereda-Miranda, R. (1995) Bioactive Natural Products from traditionally used Mexican Plants. En J.T. Arnason (ed.). *PHYTOCHEMISTRY OF MEDICINAL PLANTS*. Plenum press, New York, pp. 83-112.

Ono, M., Kuwabata, K., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides. XIV. Quamoclins I-IV, New Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the Seeds of *Quamoclit pennata*. *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **40**, 2674-2680.

Ono, M., Noda, N., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1990) Resin Glycosides. VII. Reinvestigation of the Component Organic and Glycosidic Acids of Pharbitin, the Crude Ether-Insoluble Resin Glycoside ("Convolvulin") of Pharbitidis Semen (Seeds of *Pharbitis nil*). *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **38**, 1892-1897.

Ono, M., Ueguchi, T., Murata, H., Kawasaki, T. y Miyahara, K. (1992) Resin Glycosides. XVI. Marubajalapins I-VII, New Ether-Soluble Resin Glycosides from *Pharbitis purpurea*. *CHEMICAL PHARMACEUTICAL BULLETIN* **40**, 3169-3173.

Robbers, J.E., Speedie, M.K., Tyler, V.E. (1996) Pharmacognosy and pharmacobiotechnology. Williams and Wilkins. Pennsylvania, pp. 2-8.

Singh, S. y Stacey, B.E. (1973) A new β -D-quinovoside from commercial *Ipomoea purga*. *PHYTOCHEMISTRY* **12**, 1701-1705.

Sosa-Vasquez, F. (1993). Estudio Fitoquímico preliminar de la raíz de Jalapa (*Ipomoea purga*). Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma "Benito Juárez" de Oaxaca. 56 pp.

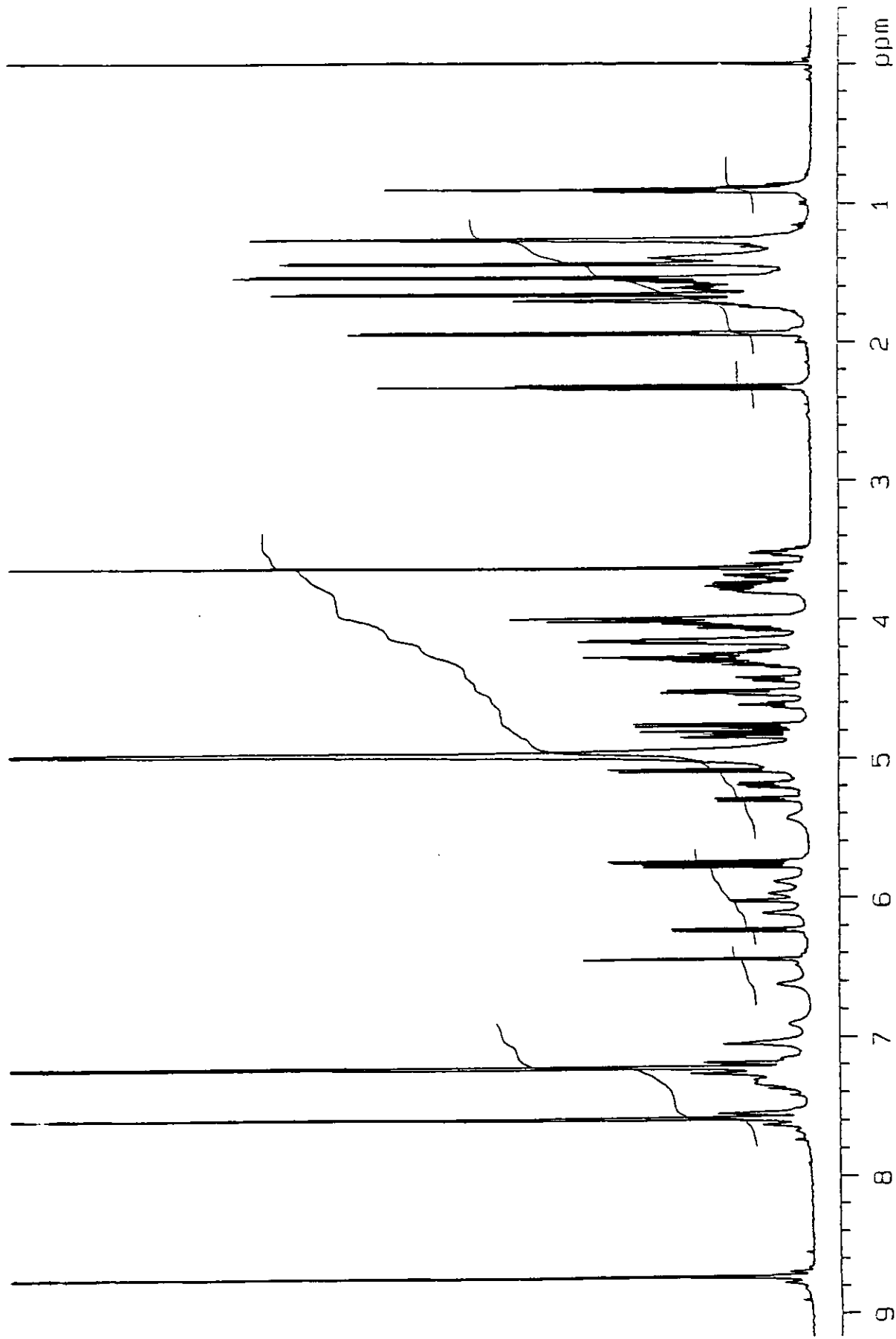
Trease, G.E. y Evans, W.C. (1995) *Farmacognosia* 9a ed. Editorial Interamericana, México, 846 pp.

Wagner, H. (1973) The Chemistry of resin glycosides of the Convolvulaceae family. *NOVEL SYMPOSIUM* **25**, 235-240.

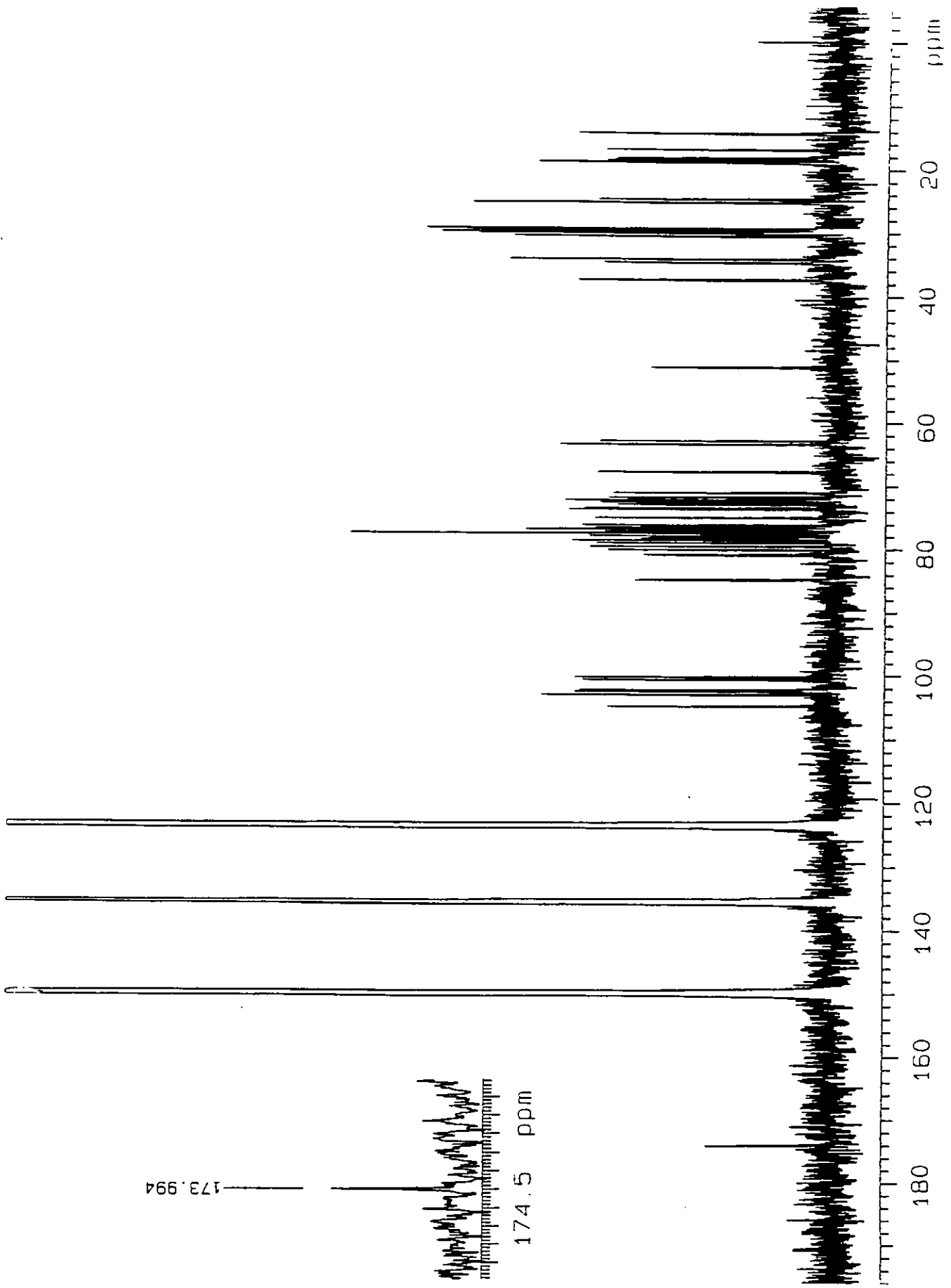
Wallis, T.E. (1966) Manual de Farmacología. C.E.C.S.A. México, pp. 477-481.

Young-Ken. (1956) Tratado de Farmacognosia. Atlanta, México, pp. 901-911.

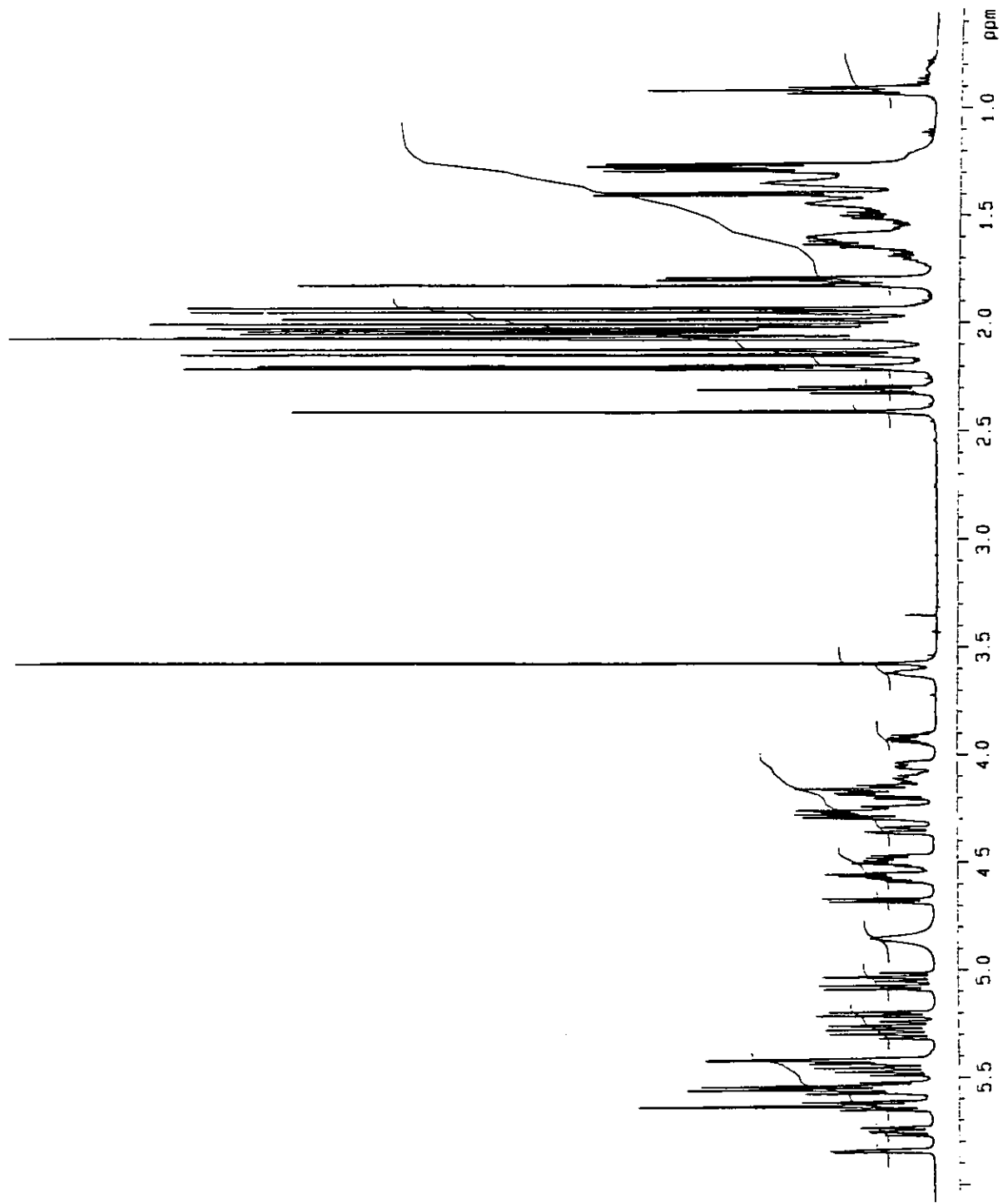
9. ESPECTROS



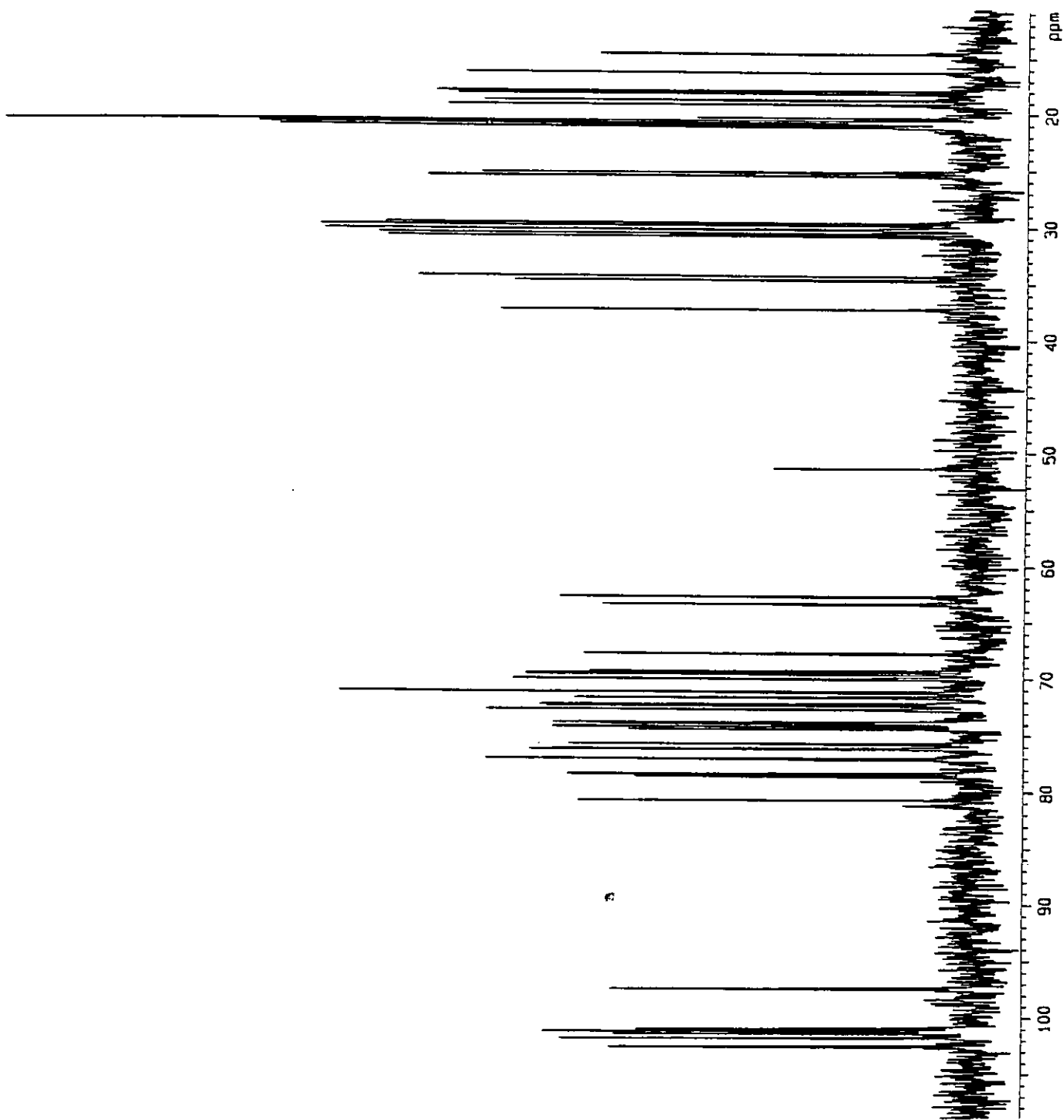
Espectro No. 1. RMN ¹H del compuesto 1.



Espectro No. 2. RMN ^{13}C del compuesto I.

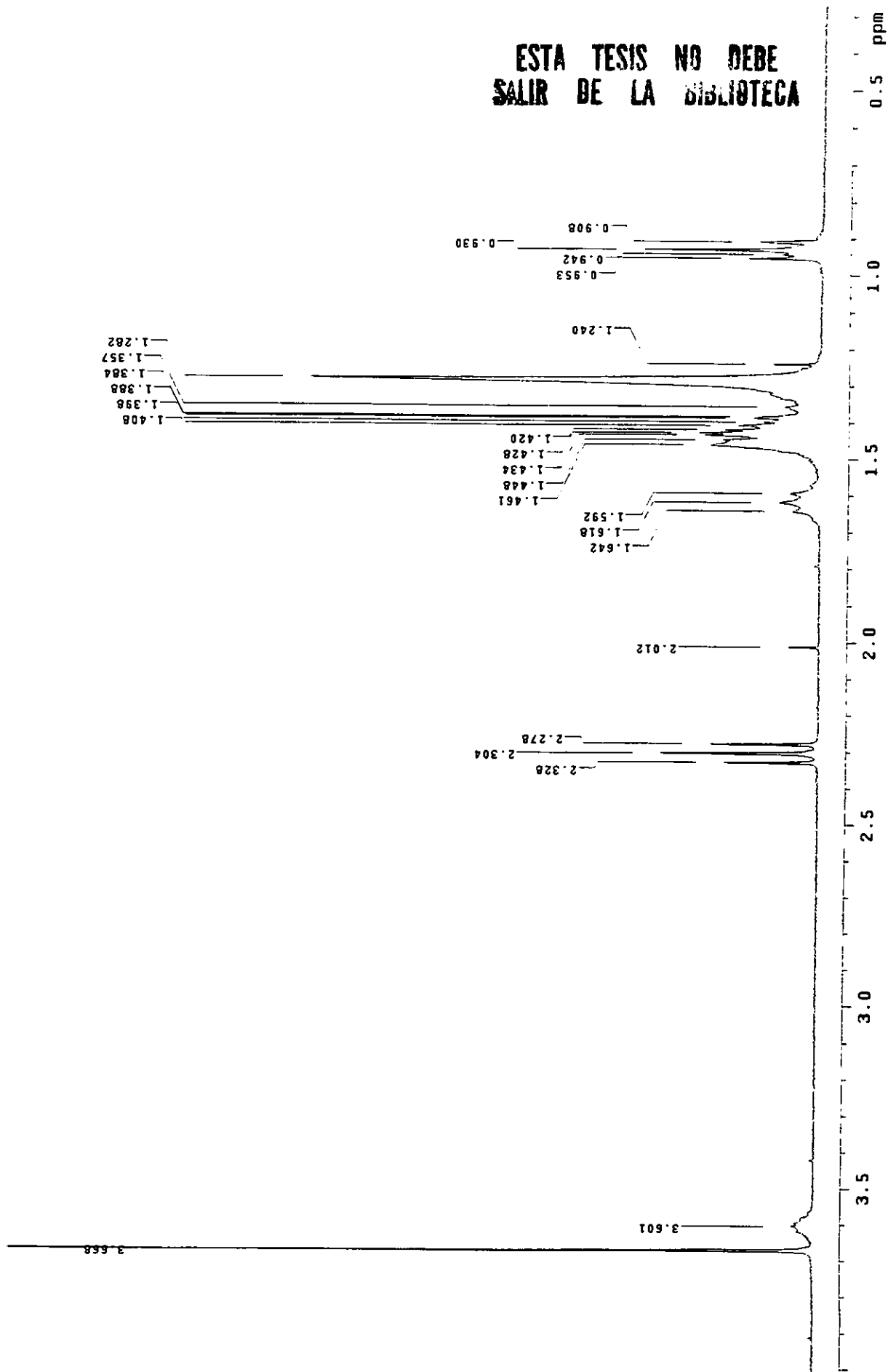


Espectro No. 3. RMN ¹H del compuesto 2.

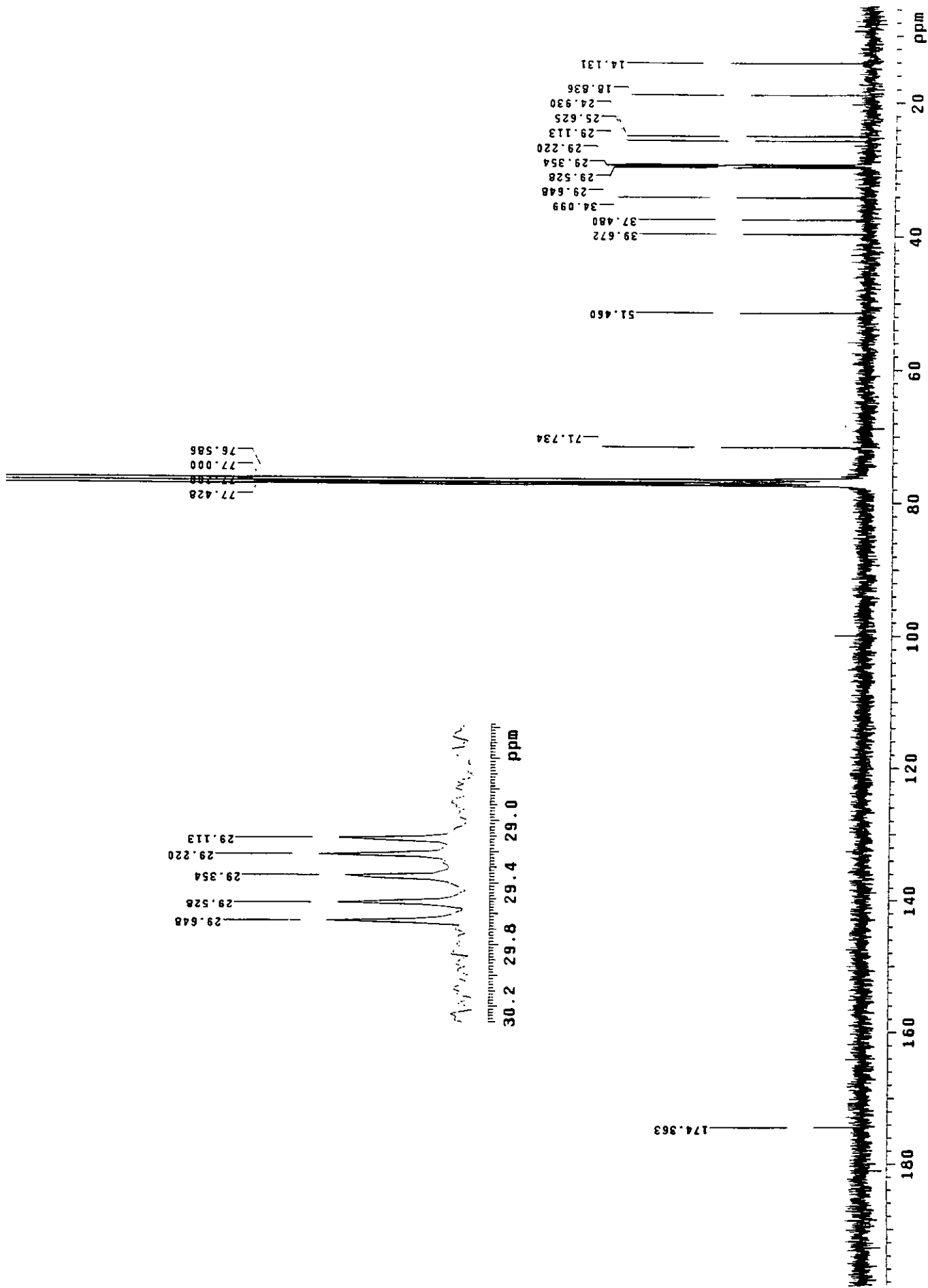


Espectro No. 4. RMN ^{13}C del compuesto 2.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Espectro No. 5. RMN ¹H del convulxinolato de metilo.



Espectro No. 6. RMN ¹³C del convulxinato de metilo.