



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

**“AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE UN
GLICOLÍPIDO MAYORITARIO DE LAS HOJAS DE
IPOMOEA MURUCOIDES”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA.

PRESENTA:

BERENICE CORONA CASTAÑEDA.



MÉXICO, D.F.

2007.



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.

Agradezco el apoyo brindado por las siguientes personas e instituciones:

- Universidad Nacional Autónoma de México por permitir mi formación académica.
- Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada durante el período de Abril – Septiembre de 2006 a través del proyecto 45861-Q.
- M. en C. Atilano Gutiérrez de la Universidad Autónoma Metropolitana por la determinación de los espectros de RMN.
- M. en C. Georgina Duarte de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de los espectros de masas.
- Q.F.B. Marisela Gutiérrez de la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación de la Facultad de Química por el registro de las rotaciones ópticas.
- Miembros del jurado por sus observaciones que me permitieron la corrección del presente manuscrito.
- Dr. Rogelio Pereda Miranda y la Dra. Mabel Fragoso Serrano por sus atenciones, tiempo, dedicación y paciencia en la dirección de la presente tesis y por todo lo que de ellos he aprendido.
- Todos mis compañeros del laboratorio 123 del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, en especial a la Dra. Nadia Jacobo y a la M. en C. Lilia Chérigo por el apoyo, ejemplo y atenciones que recibí.

ÍNDICE.

1. Introducción.....	1
2. Hipótesis.....	4
3. Objetivos.....	4
3.1. Objetivo general.....	4
3.2. Objetivos específicos.....	4
4. Antecedentes.....	5
4.1. La familia Convolvulaceae.....	5
4.2. El género Ipomoea.....	6
4.3. Las resinas glicosídicas en la familia Convolvulaceae.....	7
4.4. Estudios químicos y farmacológicos de las glicorresinas.....	10
4.5. Antecedentes botánicos y etnobotánicos.....	12
4.6. Estudios químicos.....	14
5. Parte experimental.....	17
5.1. Determinación de las constantes físicas.....	17
5.2. Métodos cromatográficos.....	17
5.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF).....	17
5.2.2. Cromatografía en Columna.....	18
5.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	18

5.3.	Recolecta del material vegetal.....	18
5.4.	Preparación del extracto clorofórmico.....	18
5.5.	Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.....	19
5.6.	Fraccionamiento secundario de la reunión IV.....	19
5.7.	Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.....	19
5.7.1.	Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel analítico.....	19
5.7.2.	Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo.....	20
5.8.	Obtención de la murucoidina XII.....	20
6.	Resultados y discusión.....	22
6.1.	Estudio químico de las hojas.....	22
6.2.	Extracción y fraccionamiento.....	22
6.3.	Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.....	25
6.4.	Caracterización de la murucoidina XII.....	28
6.4.1.	Asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C	28
6.4.2.	Secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación.....	33
6.4.3.	Espectrometría de masas.....	36
7.	Conclusiones.....	39
8.	Bibliografía.....	40

LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1. Estudios químicos y ejemplos de actividades farmacológicas.	11
Cuadro 2. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.	23
Cuadro 3. Fraccionamiento secundario de la reunión IV.	24
Cuadro 4. Investigaciones en las que se utilizó la técnica de corte de núcleo y reciclaje.	26
Cuadro 5. Desplazamientos químicos en la RMN ^1H y ^{13}C . Principales interacciones $^3J_{\text{C-H}}$ (HMBC) para las unidades sacáridas de la murucoidina XII.	34
Cuadro 6. Desplazamientos químicos selectos en la RMN ^1H y RMN ^{13}C para los ácidos de la murucoidina XII.	35

LISTA DE FIGURAS.

Figura 1. Nuevas entidades químicas. Período 1981–2002.	2
Figura 2. Ejemplos de productos naturales de origen vegetal con actividad biológica.	3
Figura 3. Morfología general de las Convolvuláceas.	5
Figura 4. Distribución del género <i>Ipomoea</i> en México.	6
Figura 5. Ejemplos de ácidos glicosídicos de las resinas en la familia <i>Convolvulaceae</i>	9
Figura 6. Árbol de <i>Ipomoea murucoides</i>	12
Figura 7. Flores y semillas de <i>Ipomoea murucoides</i>	13
Figura 8. Murucoidinas I–V.	14
Figura 9. Murucoidina V y Estoloniferina I.	15
Figura 10. Murucinas I–V.	16

Figura 11. Cromatografía en capa fina de los eluatos obtenidos de fraccionamiento primario.....	23
Figura 12. Cromatograma en capa fina de las reuniones realizadas del fraccionamiento secundario de la reunión IV.....	24
Figura 13. Perfil cromatográfico (HPLC a nivel preparativo) de la reunión R2.....	27
Figura 14. Purificación de la subfracción F utilizando la técnica de reciclaje.....	28
Figura 15. Espectro de RMN ^1H	29
Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C	29
Figura 17. Espectro heteronuclear HSQC.....	30
Figura 18. Espectro homonuclear COSY.....	31
Figura 19. Espectro homonuclear TOCSY.....	32
Figura 20. Ampliación del espectro heteronuclear HMBC.....	33
Figura 21. Espectro de masas.....	37
Figura 22. Estructura molecular de la murucoidina XII.....	38

LISTA DE ABREVIATURAS

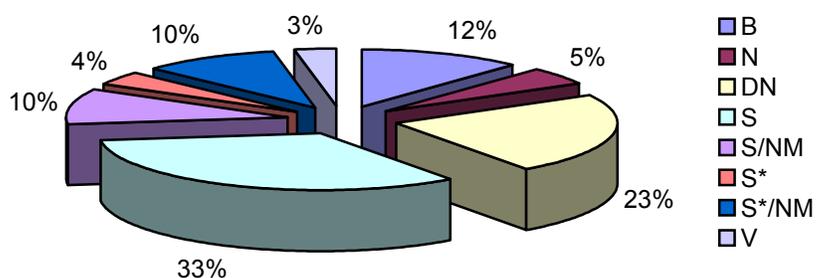
Abreviatura	Significado
α	Rotación observada en el polarímetro.
δ	Desplazamiento químico.
COSY	Correlation Spectroscopy.
CHCl ₃	Cloroformo.
CHCN ₃	Acetonitrilo.
d	Doblete.
dd	Doble de doble.
ddd	Doble de doble de doble.
FAB	Fast Atom Bombardment.
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation.
HPLC	High Performance Liquid Chromatography.
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Correlation Spectroscopy.
Hz	Hertz.
<i>J</i>	Constante de acoplamiento.
<i>m/z</i>	Relación masa carga.
MeOH	Metanol.
p.f.	Punto de fusión.
ppm	Partes por millón.
Q.P.	Químicamente puro.
R.A.	Reactivo analítico.
RMN	Resonancia Magnética Nuclear.
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica.
t	Triplete.
TOCSY	Total Correlated Spectroscopy.

1. Introducción.

La medicina tradicional se remonta a los inicios de la civilización humana. Culturas como la egipcia, china, japonesa y griega, entre otras, cuentan con evidencias sobre el uso de este recurso para tratar diversos problemas de salud (Gilani y Rahman, 2005). De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS), cerca de tres cuartos de la población mundial recurre a la medicina tradicional. Esta medicina permea a diferentes sectores de la población, aquellos que no tienen acceso a los sistemas oficiales de salud y aquellos que en mayor o menor proporción recurren a ella en forma paralela a la medicina alopática (Argueta, 1994). En 1975 se fundó en México el Instituto Mexicano para el Estudio de las Plantas Medicinales (IMEPLAM), donde se realizan estudios fitoquímicos sobre las plantas medicinales antes que se pierdan sus referencias populares. Actualmente el IMEPLAM está adscrito al Instituto Mexicano del Seguro Social, el cual incorporó en 1980 a sus líneas de investigación el estudio de la medicina tradicional, con lo cual, México se distinguió por ser el primer país latinoamericano en el que una institución del sector salud reconoció la trascendencia del conocimiento proveniente de los valores culturales nacionales. En el herbario de dicha institución, se encuentran registradas aproximadamente 5000 especies con propiedades medicinales utilizadas en el país.

Las plantas representan un recurso extenso en productos naturales con actividad biológica, éstas pueden ser comercialmente útiles por sí mismas o pueden servir como fuente natural de prototipos químicos para desarrollar derivados modificados con mayor actividad y/o

menor toxicidad. En el planeta existen aproximadamente 250,000 especies vegetales de las cuales, cerca del 15% ha sido investigado químicamente y sólo al 6% se ha investigado su potencial biológico. El 81% de las formas farmacéuticas desarrolladas en el período de 1981 a 2002 contienen productos de origen natural o derivados de la síntesis total o parcial basada en productos naturales (**Figura 1**).



- B Biológico. (Usualmente mayor a 45 residuos) péptidos o proteínas aislados de organismos o líneas celulares o producidos por métodos biotecnológicos.
- N Producto natural.
- DN Derivado de un producto natural. Usualmente se hace una modificación semisintética.
- S Síntesis total. Obtenido por modificación de una molécula.
- S* Síntesis total en la que el farmacóforo no es un producto natural.
- V Vacuna.
- NM Parecido a un producto natural.

Figura 1. Nuevas entidades químicas. Período 1981–2002. De una población (N=1031). Tomada de Newman *et al.*, 2003.

Se estima que el 60% de los medicamentos anticancerígenos disponibles en el mercado son de origen natural (Newman *et al.*, 2003), por ejemplo, los alcaloides antitumorales, la vincristina y la vinblastina, aislados de *Catharantus roseus* (van Der Heijden *et al.*, 2004). La **Figura 2** muestra algunos ejemplos de productos naturales que poseen actividad biológica.

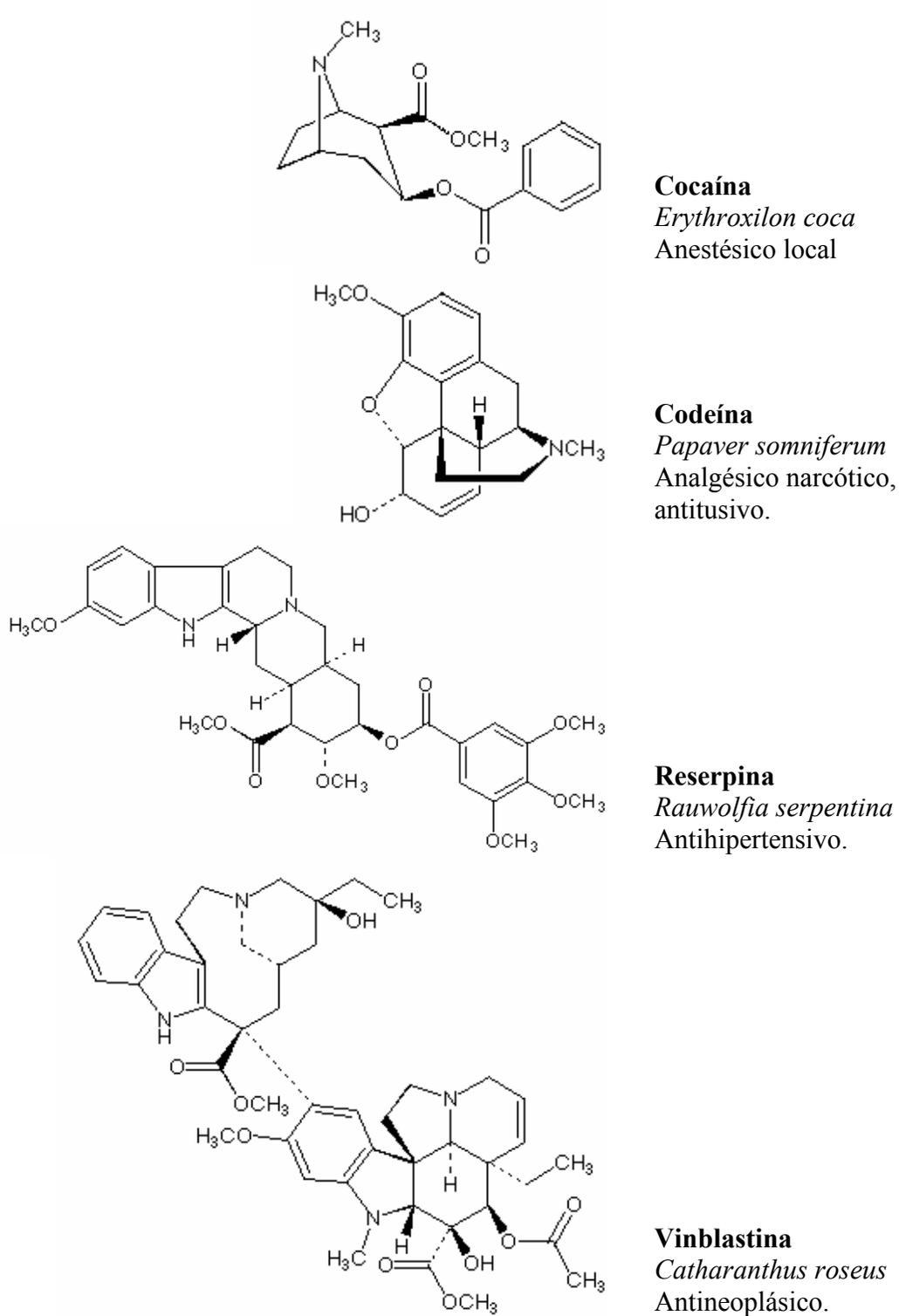


Figura 2. Ejemplos de productos naturales de origen vegetal con actividad biológica.

2. Hipótesis.

El empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia permitirá el aislamiento y la purificación de los glicolípidos mayoritarios constitutivos de la mezcla de resinas glicosídicas presentes en el extracto clorofórmico de las hojas de *Ipomoea murucoides*.

3. Objetivos.

3.1. Objetivo general.

Aislar y purificar mediante la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) uno de los glicolípidos mayoritarios constitutivo de la mezcla de resinas glicosídicas presentes en el extracto de las hojas de *Ipomoea murucoides*.

3.2. Objetivos específicos.

- Establecer las condiciones instrumentales de la cromatografía líquida de alta eficiencia para aislar los constituyentes individuales mayoritarios presentes en la jalapina (resinas lipofílicas solubles en cloroformo).
- Caracterizar la estructura del constituyente mayoritario mediante técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB).

4. Antecedentes.

4.1. La familia *Convolvulaceae*.

La familia de las convolvuláceas se encuentra ampliamente distribuida en las regiones tropicales, subtropicales y templadas de ambos hemisferios. Se estima que a nivel mundial existen 55 géneros y 1650 especies, los géneros más representativos son *Ipomoea* (500 especies), *Convolvulus* (250 especies) y *Cuscuta* (170 especies) (Trease y Evans, 2002). Los géneros de esta familia poseen una morfología muy parecida (**Figura 3**), la mayoría son enredaderas con hojas alternas y simples (1); tallos generalmente trepadores (2); flores muy grandes y vistosas, su cáliz constituido por cinco sépalos libres (3) y una corola con cinco pétalos fusionados formando un claro embudo (4) (Alcántara, 1980).

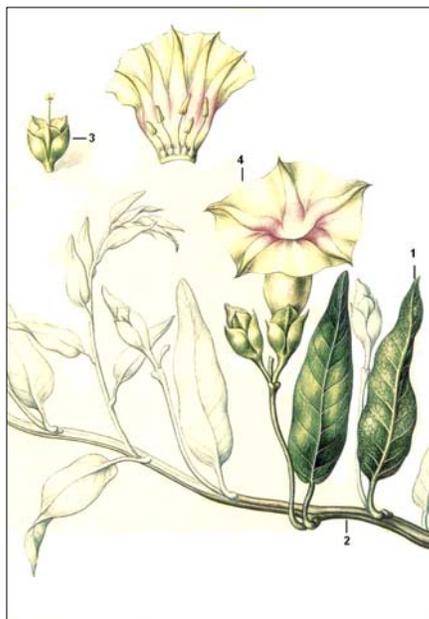


Figura 3. Morfología general de las Convolvuláceas.

El nombre de esta familia proviene del vocablo latino *convolvere* que significa entrelazarse y se refiere a su modo de crecimiento. Una de las características anatómicas más notables, es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas tanto en el tejido foliar como en sus raíces. Estas resinas constituyen uno de los aspectos quimiotaxonómicos de esta familia y se les atribuyen propiedades purgantes y citotóxicas (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

4.2. El género *Ipomoea*.

El género *Ipomoea* es uno de los mayoritarios dentro de la familia *Convolvulaceae* con un grado de endemismo de aproximadamente 65%, esto se refiere a la relación entre el número de especies presentes en México y el número aproximado de especies en el género (McDonald, 1991). La distribución de estas especies en el país se ilustra en la **Figura 4**, de la cual se deduce que el endemismo de *Ipomoea* está concentrado en las regiones subtropicales de la costa del Pacífico.

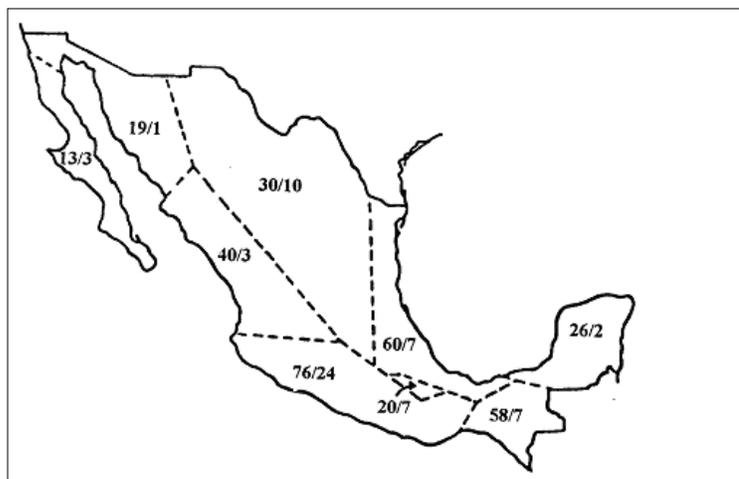


Figura 4. Distribución del género *Ipomoea* en México.

En la **Figura 4**, el primer número representa el número de especies que existen en cada región y el segundo el número de especies endémicas en la misma.

Las plantas del género *Ipomoea* no tienen gran variedad en su morfología, la mayoría son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros de altura. Algunas especies como *Ipomoea phillomega* e *Ipomoea santillanii* se presentan como lianas tropicales y alcanzan alturas de hasta 15 metros. *Ipomoea imperata* e *Ipomoea pescaprae* crecen a iguales longitudes pero han perdido su capacidad de enroscarse y crecen de forma tendida formando extensas cubiertas sobre arenas costeras. Especies de zonas áridas como *Ipomoea stans*, *Ipomoea duranguensis* e *Ipomoea sescossiana* son arbustos perenes leñosos y herbáceos, que crecen hasta 1 metro. Otras especies de *Ipomoea* de la serie Arborescentes crecen en forma de árboles de madera suave y alcanzan de 3 a 9 metros de altura (Alcántara, 1980).

La importancia económica de éste género reside en su uso alimenticio (*Ipomoea batatas*), ornamental (*Ipomoea alba*) y medicinal (*Ipomoea purga* e *Ipomoea stans*). El principal uso medicinal de éste género es purgante (Pereda-Miranda y Bah, 2003) siendo el principal exponente *Ipomoea purga*.

4.3. Las resinas glicosídicas en la familia *Convolvulaceae*.

Las resinas glicosídicas están constituidas por ácidos grasos volátiles, no volátiles y carbohidratos. Los residuos volátiles identificados con mayor frecuencia incluyen a los ácidos tíglico, isobutírico, metilbutírico (MacLeod y Ward, 1997), nílico (Hernández-

Carlos *et al.*, 1999) y cinámico (Noda *et al.*, 1992). Los ácidos grasos de alto peso molecular caracterizados en las especies del género *Ipomoea* incluyen a los ácidos hexanóico, octanóico, decanóico y dodecanóico (Pereda-Miranda *et al.*, 2005; Chérigo y Pereda-Miranda, 2006). El ácido hexadecanóico hidroxilado en la posición C11, conocido con el nombre de ácido jalapinólico, representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas del género *Ipomoea*. Por otra parte, los carbohidratos incluyen a la D-glucosa, la D-fucosa, la D-quinovosa y la L-ramnosa (Fürstner y Müller, 1999).

La complejidad de estas resinas se debe a la semejanza estructural de los constituyentes individuales pues representan principalmente mezcla de isómeros que involucran diferentes sitios de esterificación del núcleo oligosacárido. Esta complejidad constituye la mayor dificultad para su completa purificación y caracterización. Mediante el empleo de un tratamiento alcalino, los glicolípidos liberan ácidos volátiles de cadena corta y el respectivo ácido glicosídico, el cual al ser sometido a tratamiento ácido, produce una mezcla de monosacáridos y la aglicona. Estos métodos de degradación han constituido una de las formas para lograr la identificación estructural de las resinas en conjunto con el análisis espectroscópico (RMN, 500 MHz) y espectrométrico (EM-FAB) de alta resolución de los oligosacáridos inalterados (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

A continuación se ilustran algunos ejemplos de los ácidos glicosídicos que forman parte del núcleo oligosacárido de las resinas en la familia *Convolvulaceae* (**Figura 5**)

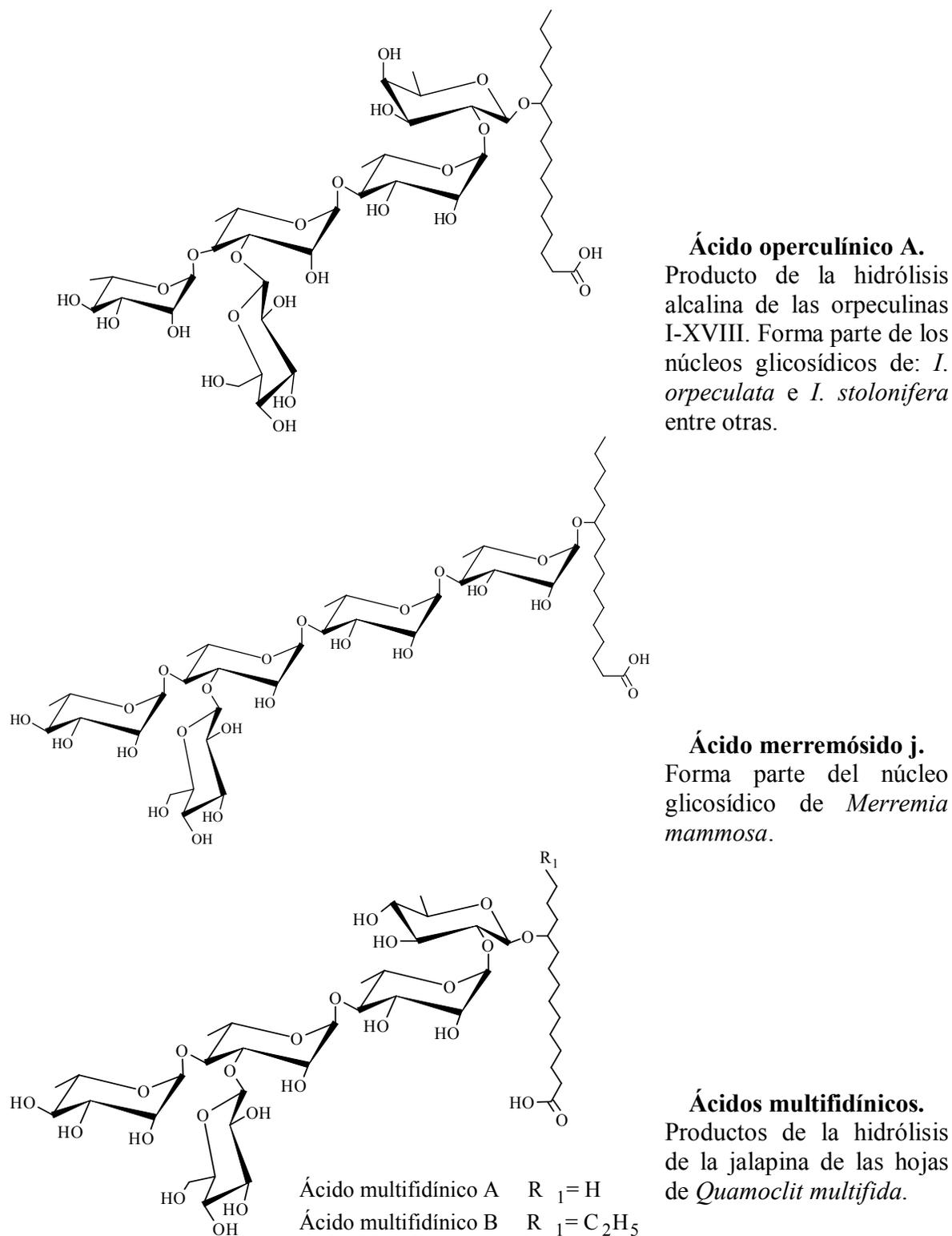


Figura 5. Ejemplos de ácidos glicosídicos de las resinas en la familia *Convolvulaceae*.

Los primeros glicolípidos caracterizados íntegramente fueron las orizabinas I–IV por Noda y colaboradores (1987) y se reportó que los constituyentes de las resinas glicosídicas son liposacáridos cuyas agliconas son los ácidos grasos 11-hidroxiados convolvulínico (C₁₄) o jalapínico (C₁₆).

Se ha encontrado que las resinas glicosídicas presentes en el género *Ipomoea* poseen como característica estructural común el núcleo oligosacárido, que en la mayoría de los casos se encuentra acilado, combinado con el grupo carboxilo de la aglicona para formar un éster macrocíclico (Pereda-Miranda y Bah, 2003). En los estudios de actividad biológica se encontró que la lactona macrocíclica constituye una característica estructural importante para la actividad de estos compuestos, ya que cuando se hidroliza el enlace éster disminuye o desaparece la actividad (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

El aislamiento del glicolípidos llamado “Ipolearósido” de *Ipomoea leari* constituye uno de los primeros estudios en donde se pretendía relacionar a los glicolípidos con una posible actividad anticancerígena de aplicación terapéutica (Sarin *et al.*, 1973).

4.4. Estudios químicos y farmacológicos de las glicorresinas.

Los resultados de los primeros estudios químicos generaron las definiciones de “jalapina” para describir la fracción de la resina soluble en éter o cloroformo y de “convolvulina” para la porción insoluble en estos disolventes lipofílicos (Ono *et al.*, 1989).

Los estudios químicos se enfocaron principalmente a la caracterización de los productos de hidrólisis ácida y básica con ayuda de las técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas (EM) en su modalidad de impacto electrónico para derivados peracetilados. La cromatografía de gases aplicada a la espectrometría de masas constituye la herramienta de mayor uso para la identificación de los derivados volátiles (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) es la técnica que ha permitido el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales de las resinas de las convolvuláceas. Actualmente, el empleo de la técnica de reciclaje de muestra permite la separación de los componentes de las mezclas de manera eficiente consiguiendo alta pureza (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002; Pereda-Miranda y Bah, 2003).

A continuación se describen los resultados de algunos estudios químicos y farmacológicos de las resinas glicosídicas del género *Ipomoea* (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Estudios químicos y ejemplos de actividades farmacológicas.

Especie	Glicolípido	Actividad	Referencia
<i>Ipomoea tricolor</i>	Tricolorina A	Antimicrobiana Citotóxica Fitoinhibidora	Pereda-Miranda <i>et al.</i> , 1993.
<i>Ipomoea muricata</i>	Muricatinas A y B	Laxante carminativo	Noda <i>et al.</i> , 1988
<i>Ipomoea batatas</i>	Simoninas I–V	En el tratamiento de: Leucemia Anemia Hipertensión Diabetes	Noda <i>et al.</i> , 1992.

4.5. Antecedentes botánicos y etnobotánicos.

Ipomoea murucoides es una planta originaria de México que crece en climas semicálido, semiseco y templado, desde los 600 a los 2600 m sobre el nivel del mar. Es un árbol de 5 a 9 m de altura con ramas densas y su madera es blanca y pulida (**Figura 6**). Las hojas son alargadas. Presenta grupos de flores blancas que son muy vistosas. Los frutos ovoidales y lisos. Las semillas están cubiertas con pelos blancos y suaves (**Figura 7**) (Alcántara, 1980).



Figura 6. Árbol de *Ipomoea murucoides*.



Figura 7. Flores y semillas de *Ipomoea murucoides*.

Entre los nombres comunes que recibe *Ipomoea murucoides* se conocen los siguientes: cazahuate blanco, cazahuate liso, cazahuate manso, ozote, palo blanco, palo bobo, palo del muerto, siete camisas, tonche. Morelos: *cazahuatl*, *micaquahutl* (náhuatl). Oaxaca: *yag banuun* (Argueta, 1994). La especie se encuentra distribuida en: Guerrero, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, Estado de México, Querétaro, Puebla y Morelos.

La flor del cazahuate se utiliza para detener las hemorragias. Su corteza se emplea como antídoto en la picadura de alacranes y mordedura de serpientes; su látex se aplica sobre heridas y llagas. Por otra parte, la corteza del cazahuate se combina con otras plantas para tratar la inflamación estomacal. Además, el cazahuate se utiliza contra la hidropesía y la parálisis y su cáscara hervida para evitar la caída del cabello refregándolo después de haberlo lavado (Monroy, 2000). *Ipomoea murucoides* forma parte de la lista de plantas

medicinales y aromáticas de procedencia nacional con mayor demanda comercial en México (<http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota65-1.htm>).

4.6. Estudios químicos.

Una de las primeras investigaciones químicas del contenido de oligosacáridos de las resinas glicosídicas presentes en las flores de *Ipomoea murucoides* reportó el aislamiento e identificación de dos núcleos pentasacáridos constitutivos de la especie: ácido simónico B y ácido orpeculínico A. Se obtuvieron seis glicolípidos: cinco son novedosos, las murucoidinas I–V y la estoloniferina I (**Figuras 8 y 9**) (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006).

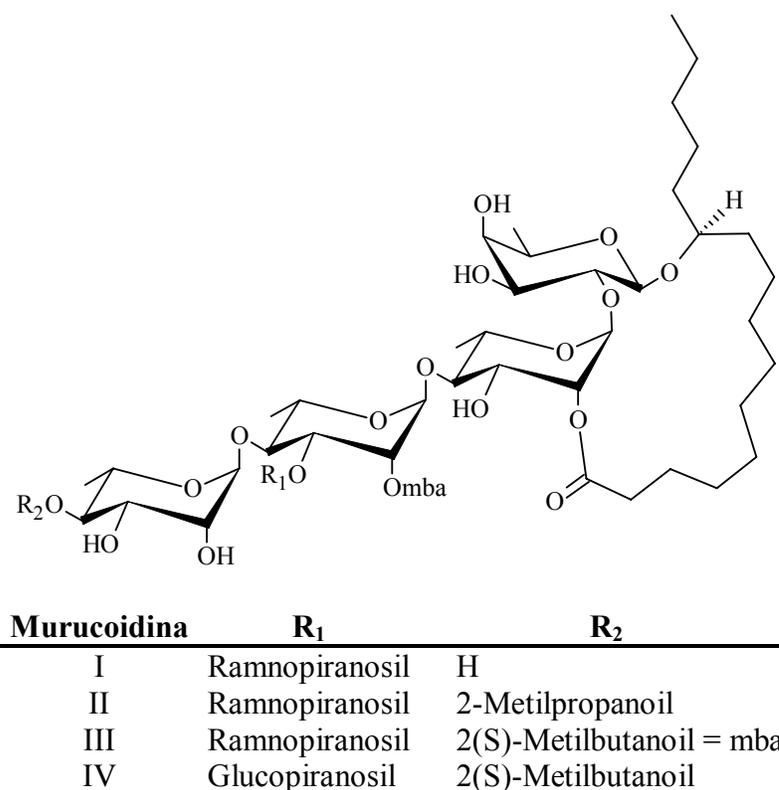


Figura 8. Murucoidinas I–V (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006).

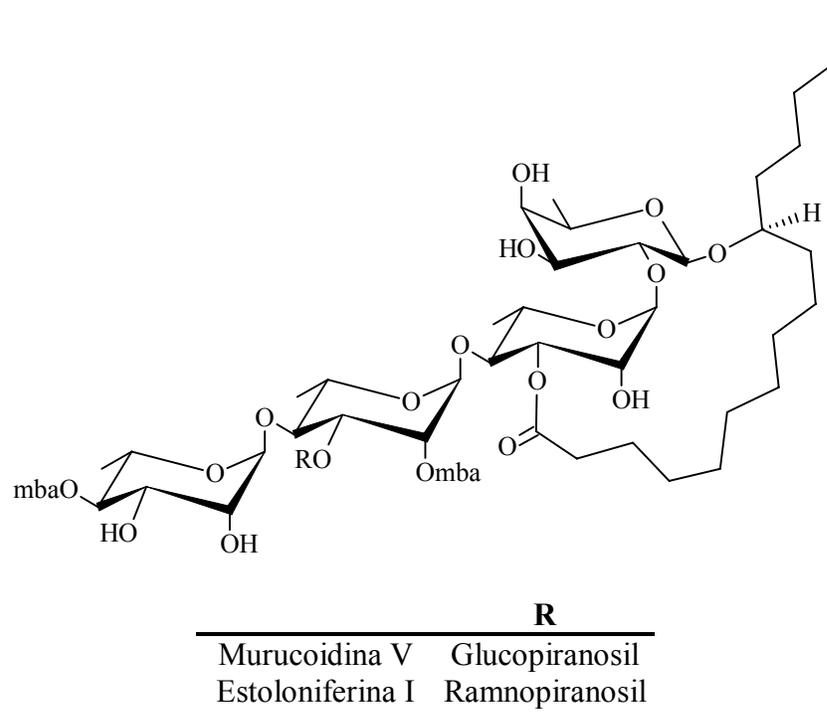
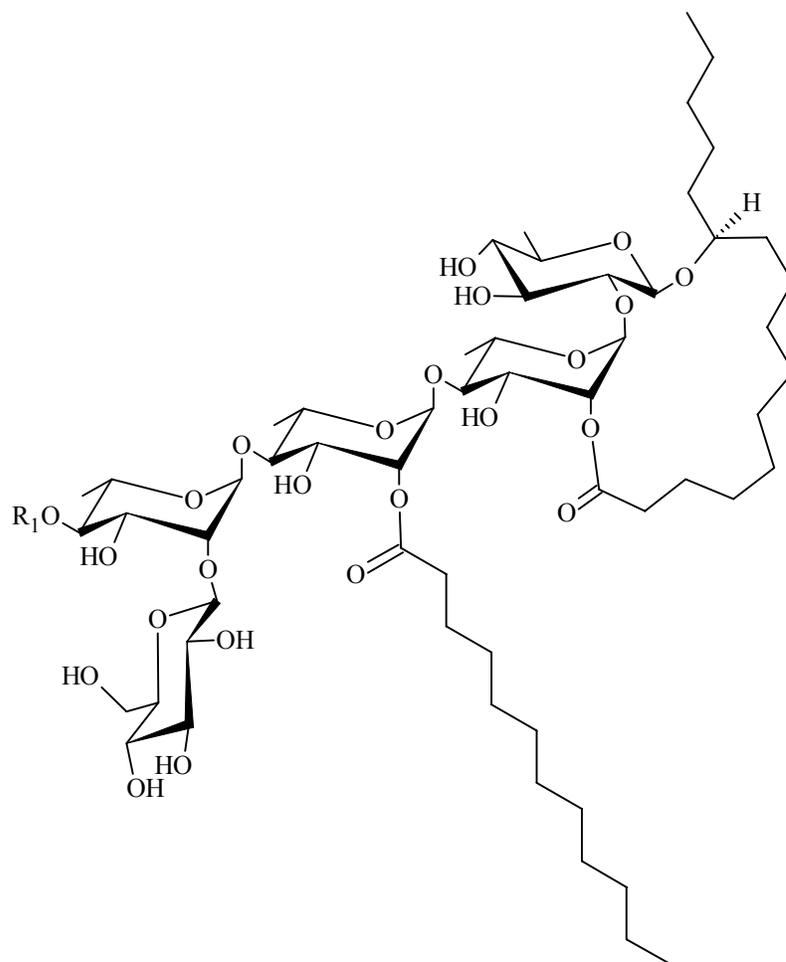


Figura 9. Murucoidina V y Estoloniferina I (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006).

Otro grupo de glicolípidos conocido como las murucinas I–V (**Figura 10**) se aislaron de las raíces de *Ipomoea murucoides* y se evaluó su actividad citotóxica (León *et al.*, 2005).



R₁	
I	Acetil
II	Propanoil
III	<i>n</i> -Butanoil
IV	2-Metilbutanoil
V	3-Hidroxi-2-metilbutanoil

Figura 10. Murucinas I-V (León *et al.*, 2005).

5. Parte experimental.

5.1. Determinación de las constantes físicas.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de hidrógeno (^1H) y de carbono-13 (^{13}C) se generaron en los equipos Varian VXL-500 y Bruker AMX-500, operando a una frecuencia de 500 MHz en ^1H y 125 MHz en ^{13}C . Se utilizó piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm utilizando como referencia interna el tetrametilsilano (TMS). La rotación óptica se determinó en un polarímetro Perkin-Elmer 241 utilizando metanol como disolvente. El espectro de masas fue registrado en un espectrómetro JEOL SX-102A, utilizando como método de ionización el bombardeo rápido de átomos (EM-FAB) en el modo positivo y a la trietanolamina como matriz. El punto de fusión se determinó en un aparato Fisher-Johns y no está corregido.

5.2. Métodos cromatográficos.

5.2.1. Cromatografía en capa fina (CCF)

El análisis en CCF se efectuó en cromatoplasmas cubiertas de gel de sílice 60 F₂₅₄ Merck. El desarrollo del cromatograma se realizó dentro de una cámara de elución cuyo sistema consistió en cloroformo-metanol (4:1); posteriormente, se humedecieron con un agente cromógeno (mezcla H_2SO_4 – sulfato cérico) y se revelaron por calentamiento.

5.2.2. Cromatografía en Columna.

La cromatografía en columna abierta se realizó sobre gel de sílice 60 Merck, con gránulos de 0.063 – 0.200 mm.

5.2.3. Cromatografía de líquidos de alta resolución.

El análisis y la separación en cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) se realizó en un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography División, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de distribución de disolvente y un refractómetro diferencial Waters 410 integrado a un equipo de computo (OptiPlex GX280, Dell). El control del equipo, adquisición de datos y procesamiento de la información cromatográfica se realizó a través del programa Empower 2 (Waters).

5.3. Recolecta del material vegetal.

El material vegetal analizado consistió en hojas de *Ipomoea murucoides* (349.7 g), colectadas en la Autopista Cuernavaca-Xochitepec, México en 1997. La identificación del material vegetal fue realizada por el Dr. Rogelio Pereda Miranda.

5.4. Preparación del extracto clorofórmico.

El material vegetal seco y pulverizado se sometió a extracciones sucesivas con cloroformo (Q.P.) mediante un proceso de maceración exhaustiva en seis períodos de tres días. Posteriormente, se filtró el disolvente y se concentró a presión reducida. Se obtuvo un

rendimiento del 4.9 % (17.3 g) determinado respecto al peso del material vegetal seco inicial.

5.5. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.

El fraccionamiento primario del extracto clorofórmico se realizó mediante cromatografía en columna abierta empacada con 592 g de sílica gel utilizando como sistema de elución cloroformo-metanol (grado Q.P.) y aumentando la polaridad en 10% de metanol. Se recolectaron 43 eluatos de un litro.

5.6. Fraccionamiento secundario de la reunión IV.

El fraccionamiento secundario de la reunión IV se realizó mediante cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice utilizando como sistema de elución cloroformo-metanol y aumentando la polaridad con metanol. Se recolectaron 112 eluatos de 400 mL.

5.7. Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.

5.7.1. Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel analítico.

Un análisis preliminar para lograr la separación y la purificación de los principios presentes en la reunión R2 permitió establecer las siguientes condiciones instrumentales:

- Columna: Columna de fase reversa C-18 Symmetry Waters (4.6 x 300mm, 5 µm)
- Flujo: 0.7 mL/min

- Fase móvil: MeOH – CH₃CN (6:4) (grado R.A.)
- Tipo de elución: isocrático
- Detectores: UV (280 nm), índice de refracción.
- Volumen de inyección: 10 µL
- Concentración de la muestra: 1 mg/100 µL

5.7.2. Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo.

Las condiciones instrumentales a nivel preparativo fueron las siguientes:

- Columna: Columna C-18 preparativa Symmetry Waters (19 x 300mm, 7 µm)
- Flujo: 9.0 mL/min
- Fase móvil: MeOH – CH₃CN (6:4)
- Tipo de elución: isocrático
- Detector: UV (280 nm)
- Volumen de inyección: 500 µL
- Concentración de la muestra: 1 mg/100 µL

5.8. Obtención de la murucoidina XII.

Se utilizaron 1.3848 g de la reunión R2 obteniendo la subfracción F ($t_R = 36.467$ min). La cual fue reinyectada en la columna C-18 Symmetry con el sistema de elución MeOH – CH₃CN (6:4); flujo: 9.0 mL/min; volumen de inyección 500 µL. Se aplicó la técnica de reciclaje de la muestra, utilizándose de 6 a 8 ciclos para asegurar una pureza mayor al 99%

del constituyente presente en esta subfracción (F2) que se denominó con el nombre de murucoidina XII (7.5 mg).

Murucoidina XII. Sólido blanco; **p.f.** 140-143° C; **[α]_D** -19 (c 0.13, MeOH); **EM-FAB (modo positivo) m/z :** 1434 $[M+Na]^+$; **RMN 1H y RMN ^{13}C** (ver Cuadros 5 y 6)

6. Resultados y discusión.

6.1. Estudio químico de las hojas.

Del estudio químico de las flores de *Ipomoea murucoides* (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006) se aislaron e identificaron dos núcleos pentasacáridos constitutivos de la especie: ácido simónico B y ácido orpeculínico A. Se obtuvieron seis glicolípidos: las murucoidinas I – V y la estoloniferina I (**Figuras 8 y 9**). Mientras que del estudio de las raíces de la misma especie (León *et al.*, 2005) se obtuvieron cinco glicolípidos: las murucinas I – V (**Figura 10**). El presente estudio químico de las hojas de *Ipomoea murucoides* se enfocó a la separación de los glicolípidos presentes en la mezcla de resinas glicosídicas que constituyen la jalapina de las partes aéreas. La elucidación estructural se realizó por análisis espectroscópico (RMN) y espectrométrico (EM – FAB).

6.2. Extracción y fraccionamiento.

La preparación del extracto clorofórmico de las flores de *Ipomoea murucoides* permitió la obtención de 17.3 g de jalapina. El total de la jalapina se sometió a un fraccionamiento en columna abierta para lograr una separación preliminar de los constituyentes presentes en el extracto de acuerdo a su polaridad. La elución se realizó con el sistema cloroformo-metanol y aumentando la polaridad en 10% de metanol. Los sistemas de elución empleados en el fraccionamiento, las fracciones obtenidas y reunidas se describen en el **Cuadro 2**.

Cuadro 2. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.

Sistema de elución	Fracciones Primarias	Reuniones
CHCl ₃ (100%)	1 – 10	I
	11 – 12	II
	13 – 14	III
	15 – 18	IV
CHCl ₃ - MeOH (9:1)	19 – 26	
CHCl ₃ - MeOH (8:2)	27 – 35	V
CHCl ₃ - MeOH (7:3)	36 – 44	

Las fracciones primarias fueron reunidas en cinco grupos de acuerdo con su perfil cromatográfico en capa fina (**Figura 11**).

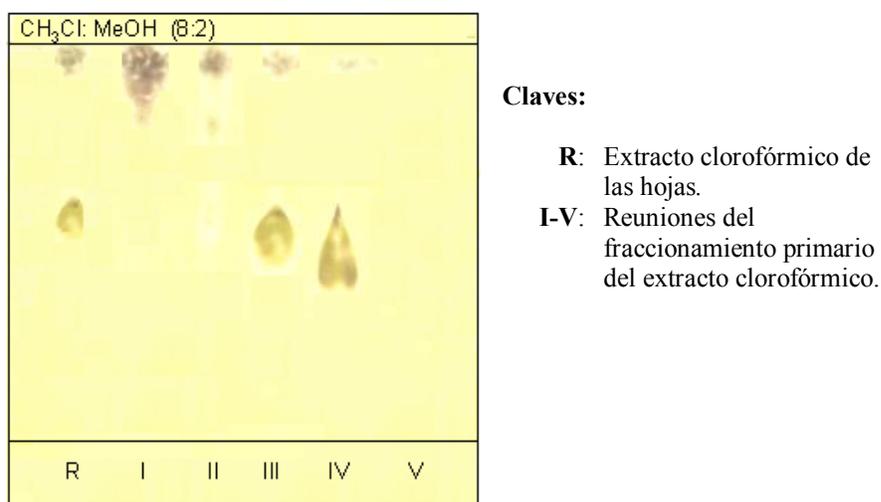


Figura 11. Cromatografía en capa fina de los eluatos obtenidos de fraccionamiento primario.

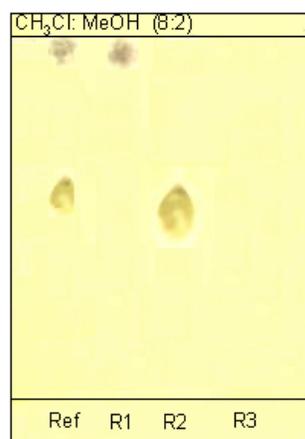
La reunión IV, que contenía en mayor proporción las resinas glicosídicas, fue sometida a un fraccionamiento secundario en columna abierta con el fin de separar las resinas glicosídicas de los pigmentos presentes en esta reunión de fracciones. La elución se llevó a cabo con el sistema cloroformo-metanol y aumentando la polaridad con metanol para favorecer dicha

separación. Los sistemas de elución empleados en el fraccionamiento, las fracciones obtenidas y reunidas se describen en el **Cuadro 3**.

Cuadro 3. Fraccionamiento secundario de la reunión IV.

Sistema de elución	Fracciones primarias	Reuniones
CHCl ₃ (100%)	1 – 18	R1
CHCl ₃ - MeOH (99:1)	19 – 36	
CHCl ₃ - MeOH (98:2)	37 – 45	
CHCl ₃ - MeOH (97:3)	46 – 56	
CHCl ₃ - MeOH (96:4)	57 – 69	
CHCl ₃ - MeOH (95:5)	70 – 86	R2
CHCl ₃ - MeOH (9:1)	87 - 101	
CHCl ₃ - MeOH (8:2)	102 - 112	R3

Las fracciones fueron reunidas en tres grupos de acuerdo a su perfil cromatográfico en capa fina (**Figura 12**). La separación y purificación de los glicolípidos se efectuó a partir de la reunión R2.



Claves:

- Ref:** Extracto clorofórmico de las hojas.
- R1 –R3:** Reuniones del fraccionamiento secundario.

Figura 12. Cromatograma en capa fina de las reuniones realizadas del fraccionamiento secundario de la reunión IV.

6.3. Separación y purificación de los glicolípidos mediante HPLC.

La similitud estructural y, por lo tanto, el comportamiento cromatográfico de los constituyentes individuales de las mezclas de resinas glicosídicas representan los principales impedimentos para la purificación mediante el uso de técnicas cromatográficas convencionales (por ejemplo, la cromatografía en columna sobre gel de sílice o el empleo de sephadex), ya que la aplicación de éstas únicamente permite la purificación parcial de las mezclas de oligosacáridos. La purificación total de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas se ha logrado mediante el empleo de la cromatografía de líquidos (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Se realizaron pruebas preliminares a nivel analítico para efectuar la separación de los constituyentes presentes en la reunión R2 en un sistema cromatográfico con detectores de índice de refracción y UV. Se utilizó la columna analítica de fase reversa enlazada con dimetiloctadecilsilano (C-18), ya que el uso de estas columnas se ha descrito para la purificación de los productos naturales presentes en las glicorresinas (Pereda-Miranda y Bah, 2003). El **Cuadro 4** describe algunas investigaciones en las cuales se utilizó la técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra para aislar glicolípidos:

Cuadro 4. Investigaciones en las que se utilizó la técnica de corte de núcleo y reciclaje.

Especie	Glicolípido	Referencia
<i>Ipomoea tricolor</i>	Tricolorinas A-E	Bah y Pereda-Miranda, (1996).
<i>Ipomoea tricolor</i>	Tricolorinas F-J	Bah y Pereda-Miranda, (1997).
<i>Ipomoea orizabensis</i>	Escamoninas I y II Orizabinas V-VIII	Hernández-Carlos <i>et al.</i> , (1999).
<i>Ipomoea orizabensis</i>	Orizabinas IX-XXI	Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, (2002).
<i>Ipomoea pes-caprae</i>	Pescaprosido A Pescapereínas I-IV Estoloniferina III	Pereda-Miranda <i>et al.</i> , (2005).
<i>Ipomoea murucoides</i>	Murucoïdinas I-V Estoloniferina I	Chérigo y Pereda-Miranda, (2006).

Posterior a la determinación de las condiciones instrumentales más adecuadas a nivel analítico, se realizó su escalamiento a un nivel preparativo (parte experimental, secciones 5.7.1 y 5.7.2). El fraccionamiento de 1.4 g de la reunión R2 a nivel preparativo se efectuó en forma consecutiva (30 ocasiones), y se obtuvieron 8 subfracciones (A-H). La **Figura 13** ilustra el cromatograma obtenido a nivel preparativo.

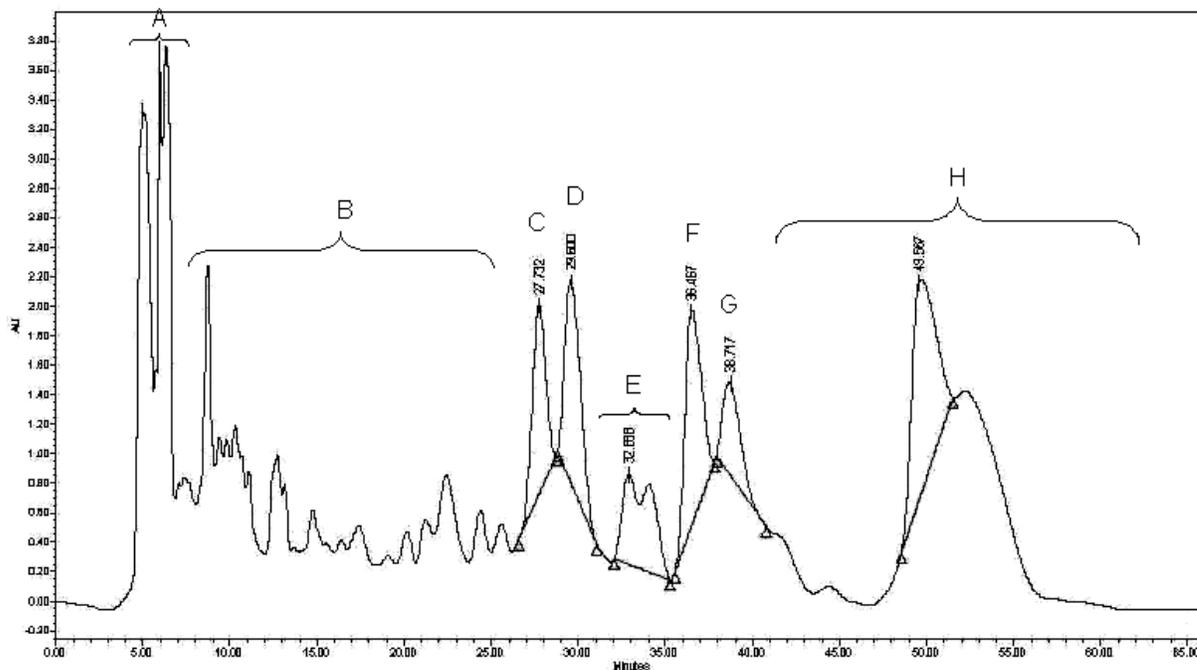


Figura 13. Perfil cromatográfico (HPLC a nivel preparativo) de la reunión R2.

La subfracción F ($t_R = 36.467$ min, 124 mg) fue seleccionada para su purificación debido a su rendimiento y a su buena afinidad a la columna de fase reversa. Estas características permitirían su reciclaje. La muestra se reinyectó independientemente para utilizar la técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra (**Figura 14**) y lograr la purificación de su constituyente mayoritario (Kubo y Nakatsu, 1990).

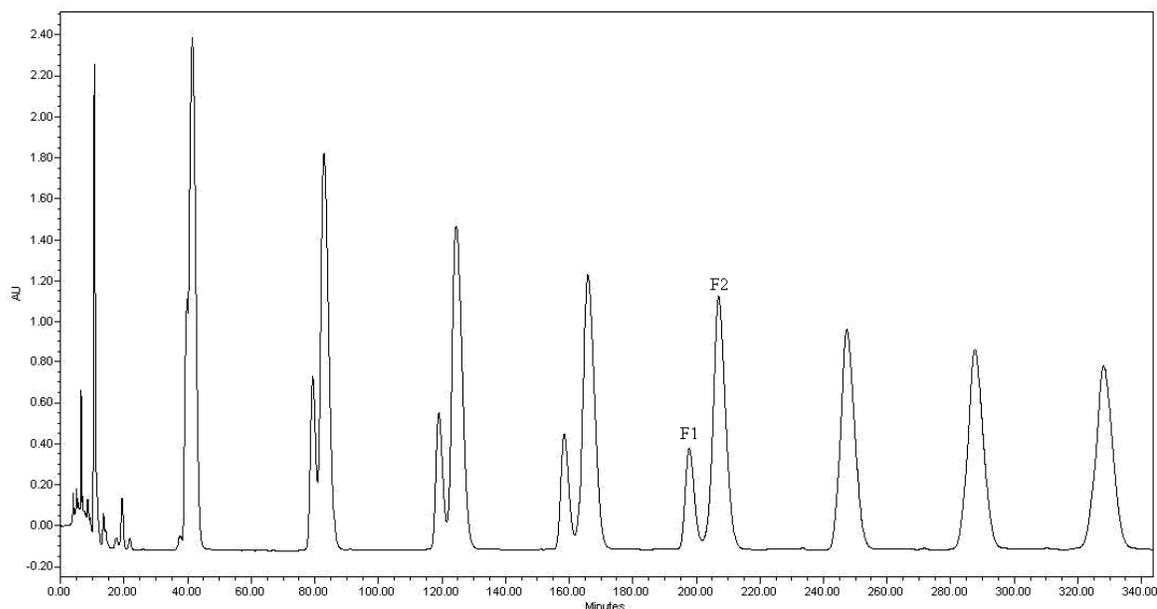


Figura 14. Purificación de la subfracción F utilizando la técnica de reciclaje.

6.4. Caracterización de la muruoidina XII.

6.4.1. Asignación de las señales de RMN ^1H y ^{13}C .

La asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C (**Cuadro 5**) en la muruoidina XII se realizó a través de los espectros unidimensionales de ^1H (**Figura 15**) y ^{13}C (**Figura 16**) y bidimensionales: homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HSQC) (Duus *et al.*, 2000).

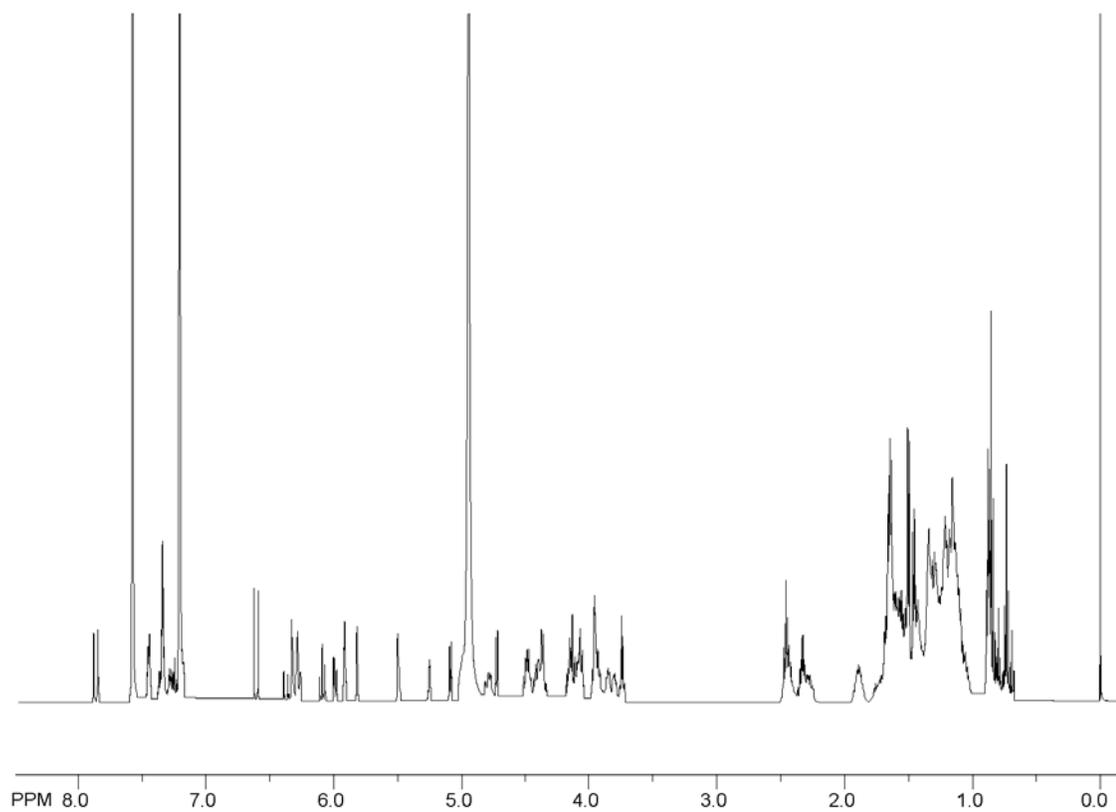


Figura 15. Espectro de RMN ^1H .

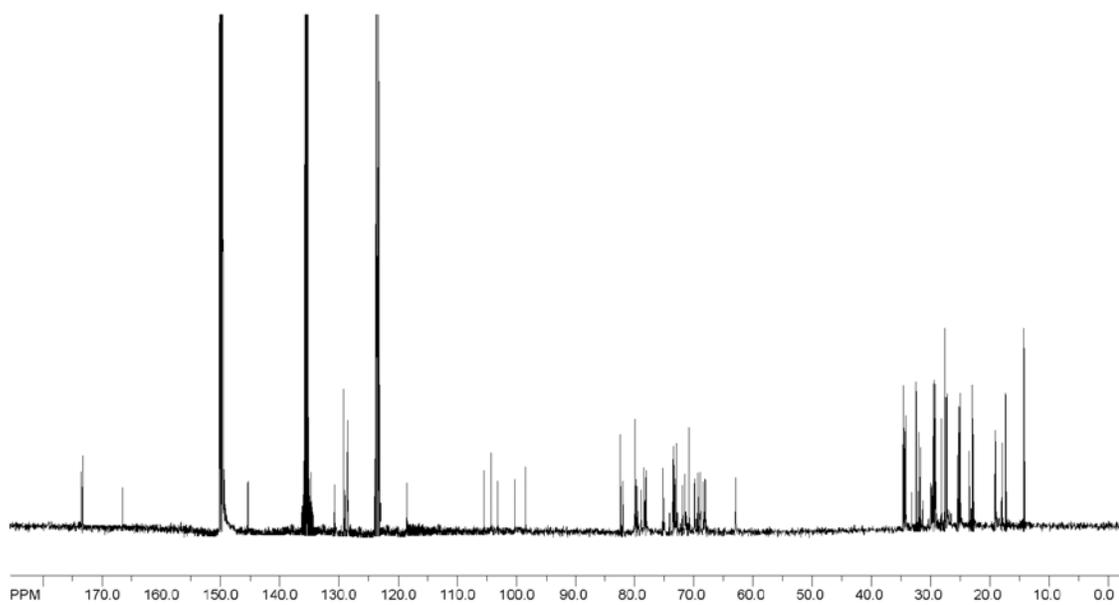


Figura 16. Espectro de RMN ^{13}C .

El primer paso para asignar las señales del compuesto consistió en localizar en el espectro heteronuclear HSQC los carbonos anoméricos caracterizados por tener desplazamientos químicos entre 98 – 105 ppm y sus respectivos protones cuyos desplazamientos químicos se observan entre 4.5 – 6.5 ppm (Agrawal, 1992; Pereda-Miranda y Bah, 2003). El número de carbonos y protones anoméricos permitió establecer la naturaleza pentasacárida del núcleo glicosídico del compuesto F2 (**Figura 17**). Una señal característica en el espectro de ^{13}C que aparece alrededor de 62.9 ppm indica la presencia del grupo hidroximetileno no sustituido correspondiente a la glucosa.

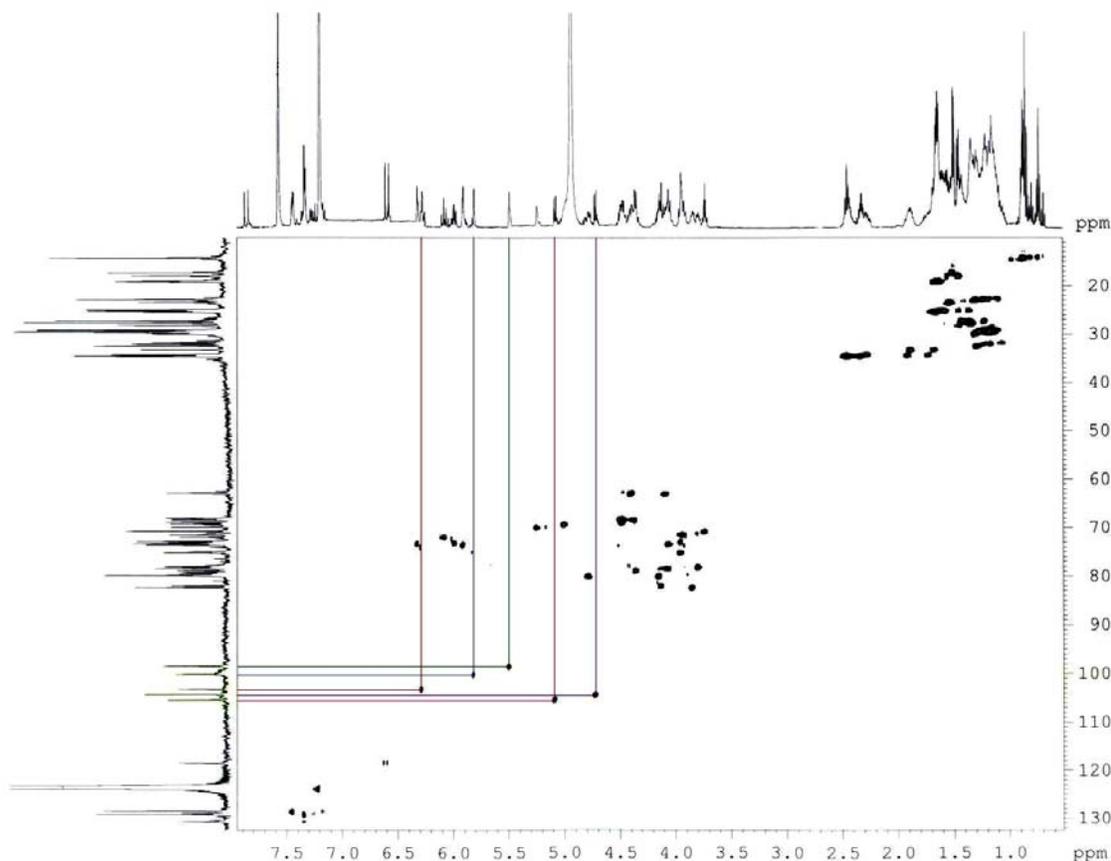


Figura 17. Espectro heteronuclear HSQC.

Posteriormente, se asignaron las señales protónicas para cada unidad sacárida del núcleo a partir de los espectros homonucleares COSY y TOCSY. En el espectro COSY se realizaron cuadros de conectividad para establecer la secuencia J_{H-H} para cada unidad sacárida (**Figura 18**). Los dobletes entre 1.4-1.6 ppm en el espectro de RMN ^1H son característicos de grupos metilos de 6-desoxihexosas, que confirman la presencia de cuatro metilpentosas: Fucosa (Fuc) y ramnosa (Ram, Ram' y Ram'').

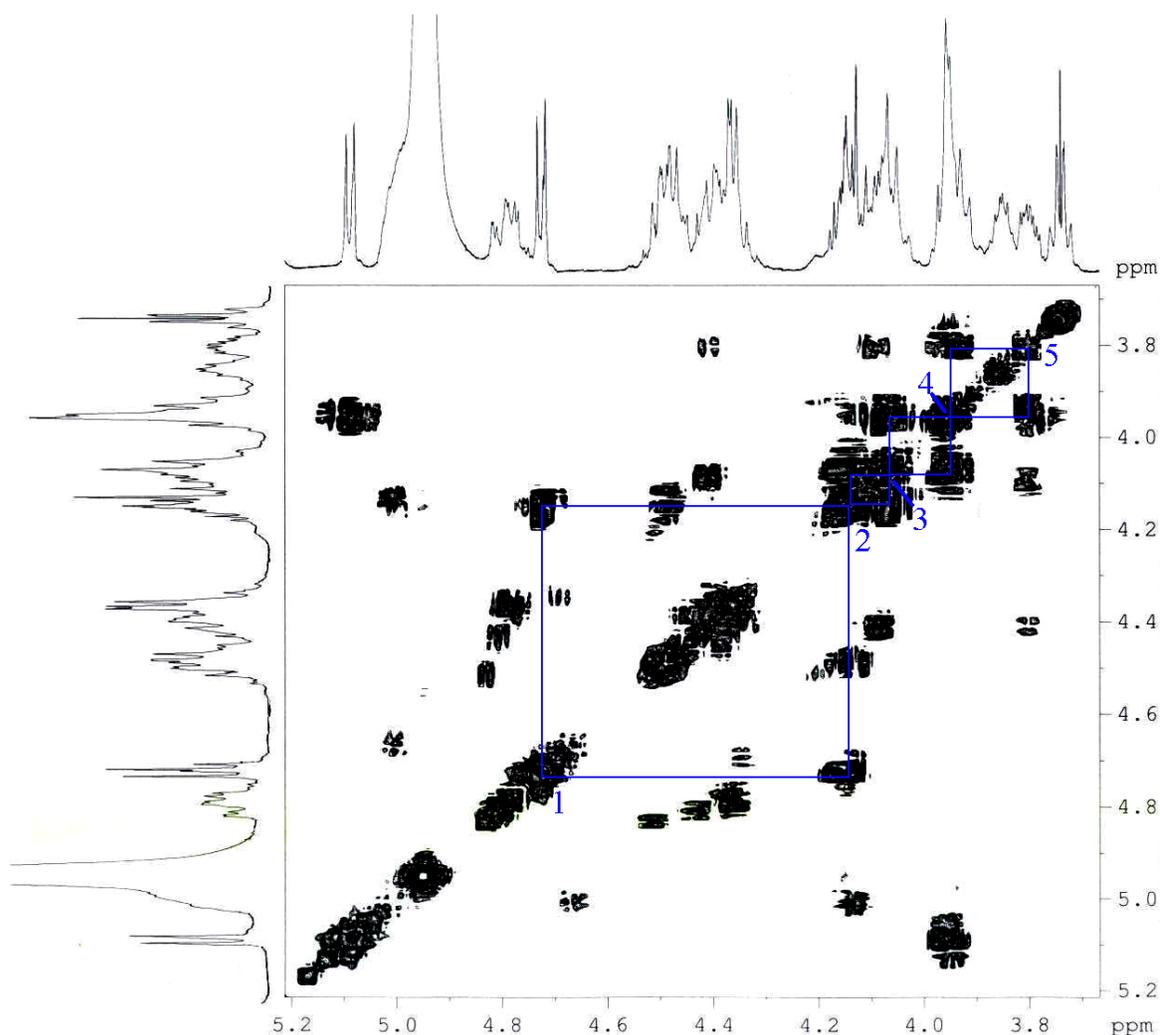


Figura 18. Espectro homonuclear COSY.

El experimento TOCSY permite establecer la correlación a lo largo de un mismo sistema de espines. Este espectro (**Figura 19**) permitió corroborar la asignación inequívoca de cada una de las señales pertenecientes a las unidades monosacáridos individuales del núcleo oligosacárido.

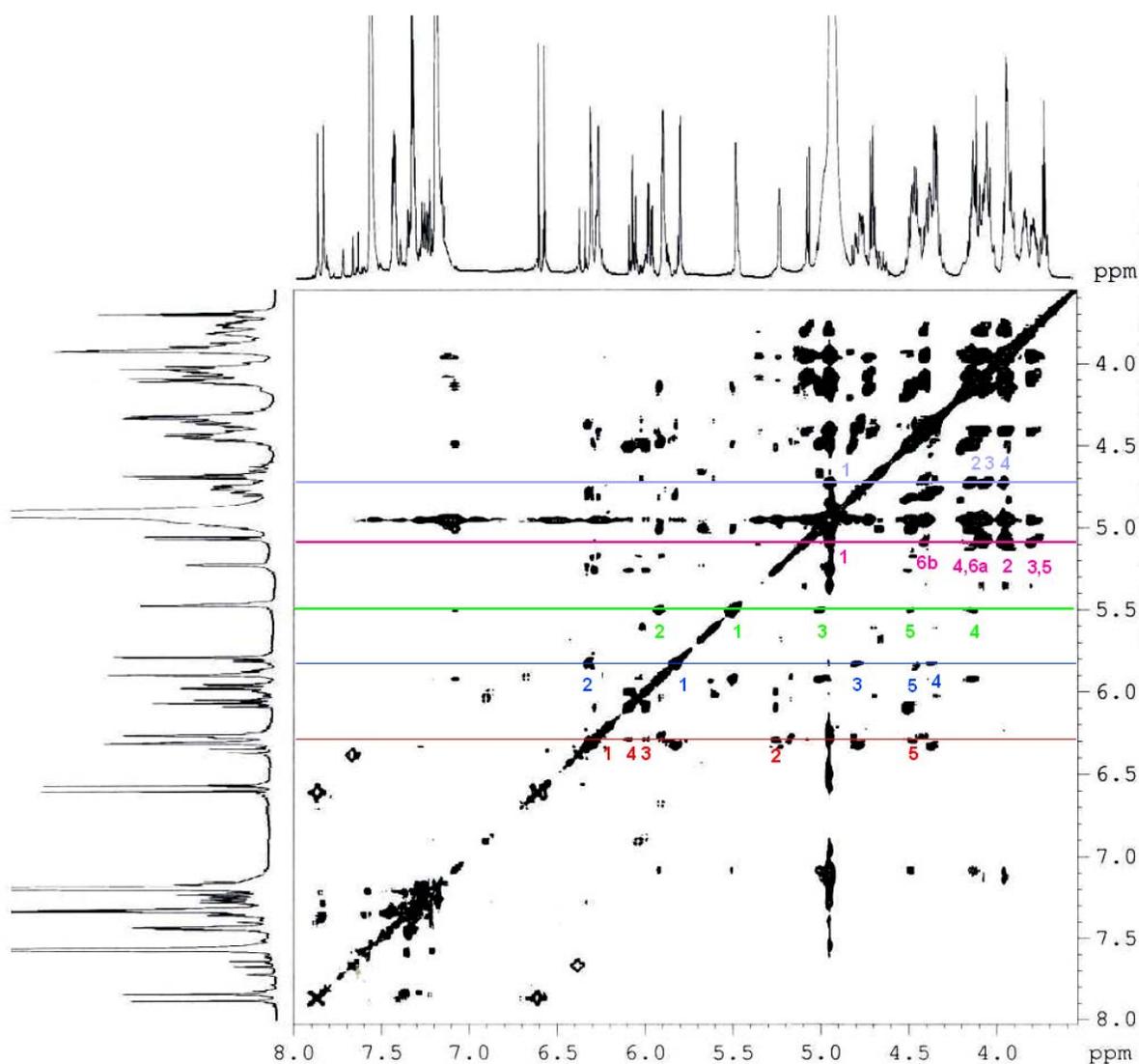


Figura 19. Espectro homonuclear TOCSY.

Una vez identificados las señales aportadas por los experimentos COSY y TOCSY se procedió a asignar las señales de RMN ^{13}C para cada unidad sacárida mediante la técnica HSQC (Duus *et al.*, 2000).

6.4.2. Secuencia de glicosidación y posiciones de esterificación.

La confirmación de los sitios de esterificación en el núcleo oligosacárido, que incluyen las posiciones para el establecimiento de la lactonización con la aglicona y la localización de las tres posiciones de acilación, se realizó mediante la secuencia de pulsos HMBC (**Figura 20**) que permite detectar las conectividades $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ a dos y tres enlaces ($^{2,3}J_{\text{C-H}}$) (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

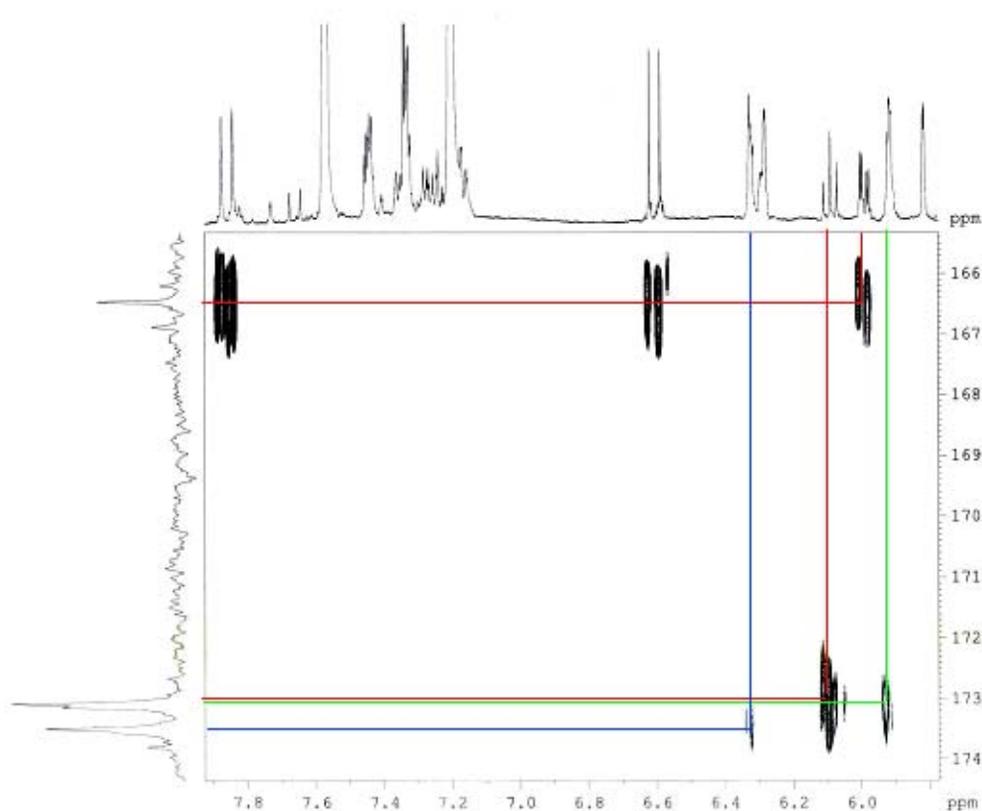


Figura 20. Ampliación del espectro heteronuclear HMBC.

Los **Cuadros 5 y 6** resumen las principales interacciones $^3J_{C-H}$ observadas en el espectro HMBC de la murucoidina XII.

Cuadro 5. Desplazamientos químicos en la RMN 1H y ^{13}C . Principales interacciones $^3J_{C-H}$ (HMBC) para las unidades sacáridas de la murucoidina XII.

Azúcar		1H		^{13}C	HMBC	
FUCOSA	1	4.72	(7.5)	d	104.3	82.4 (Jal – C11)
	2	4.15	(7.5; 9.5)	dd	79.9	
	3	4.05 – 4.10*	-	-	73.4	
	4	3.95	(3.5)	d	72.9	
	5	3.74	(1.0; 6.5)	dq	70.8	
	6	1.50	(6.5)	d	17.3	
RAMNOSA	1	5.49	(1.5)	d	98.5	79.9 (Fuc – C2)
	2	5.92	(1.5; 3.5)	dd	73.6	173.1 (Jal - C1)
	3	4.99		sa	69.3	
	4	4.13	(9.5; 9.5)	dd	81.9	
	5	4.48	(9.0; 6.0)	dq	68.9	
	6	1.64	(6.0)	d	19.1	
RAMNOSA'	1	5.82	(1.5)	d	100.2	81.9 (Ram – C4)
	2	6.32	(1.5; 3.5)	dd	73.4	173.5 (CL2 – C1)
	3	4.78	(3.5; 9.0)	dd	79.9	
	4	4.37	(8.0; 8.0)	dd	78.9	
	5	4.47	(8.0; 6.0)	dq	68.1	
	6	1.65	(6.0)	d	18.9	
RAMNOSA''	1	6.28	(2.0)	d	103.3	78.9 (Ram' – C4)
	2	5.25		sa	69.9	
	3	5.98	(3.0; 9.0)	dd	73.1	166.5 (Cna – C1)
	4	6.09	(9.5; 9.5)	t	71.9	173.1 (CL1 – C1)
	5	4.40	(9.0; 7.0)	dq	68.1	
	6	1.46	(6.5)	d	17.9	
GLUCOSA	1	5.08	(8.0)	d	105.5	79.9 (Ram' – C3)
	2	3.94	(8.0; 9.0)	dd	75.2	
	3	4.05 – 4.10*		-	78.9	
	4	3.92	(8.5; 10)	dd	71.5	
	5	3.80	(3.5; 6.0; 8.5)	ddd	78.4	
	6 a	4.05 – 4.10*		-	62.9	
6 b	4.40	(2.5; 12.5)	dd	62.9		

* Señales sobrepuestas.

CL-1: Hexanóico

CL-2: Dodecanóico

Cna: Cinámico

Entre paréntesis las constantes de acoplamiento en Hz.

Cuadro 6. Desplazamientos químicos selectos en la RMN ^1H y RMN ^{13}C para los ácidos de la mururoidina XII.

Ácido		^1H		^{13}C	
Jalapinónico	1			173.1	
	2a	2.27	(3.5; 8.0; 2.5)	ddd	34.2
	2b	2.40	(4.0; 7.0; 2.5)		
	11	3.86		m	82.4
	16	0.85	(7.0)	t	14.3
Cinámico	2	6.59	(16.0)	d	
	3	7.85	(16.0)	d	
	7				118.5
	8				128.6
					129.2
					130.7
					134.7
					145.4
	9				166.5
CL-1	1	-	-		173.1
	2	2.33	(4.3; 7.8)	dt	34.6
		0.74	(7.0)	t	14.3
CL-2	1	-	-		173.5
	2	2.46	(7.5; 7.0)	t	34.6
		0.88	(6.8)	t	14.3

CL-1: Hexanónico

CL-2: Dodecanónico

Cna: Cinámico

A continuación se presentan los resultados del análisis de los espectros homonucleares y heteronucleares para la mururoidina XII:

Las constantes de acoplamiento ($^3J_{\text{H-H}}$) registradas para la mururoidina XII en las regiones de los protones anoméricos muestra dos valores grandes ($J \sim 7.5$ Hz) y tres pequeños ($J \sim 1.5$ Hz) estos valores indicaron que se trata del núcleo oligosacárido del ácido operculínico A (Ono *et al.*, 1989). Se observó la desprotección de las señales para los metinos en la posición C-2 de la Ram y Ram' y en las posiciones C-3 y C-4 de la ramnosa Ram'''. Por lo

que los hidroxilos de estas posiciones deben encontrarse acilados. Se observaron las señales que demuestran la presencia del residuo de los ácidos hexanóico y dodecanóico, en especial los protones H-2 en δ 2.38 ppm como un multiplete y H-2 en δ 2.35 ppm como un triplete, respectivamente. Este análisis permitió descartar la presencia de otros residuos esterificantes como los ácidos isobutílico (sextuplete), metilbutílico (triplete cuarteteado) y nílico (doblete cuarteteado). En las resinas glicosídicas, no se había reportado la esterificación en la posición C-3 de la ramnosa'' por un residuo del ácido cinámico.

6.4.3. Espectrometría de masas.

La espectrometría de masas en su modalidad de bombardeo rápido de átomos (FAB) representa una técnica analítica esencial en la elucidación estructural de los glicolípidos naturales de las convolvuláceas y de sus correspondientes ácidos glicosídicos ya que permite la detección de iones quasi-molecular, tanto en su modalidad positiva $[M + H]^+$ y/o $[M + Na/K]^+$ como negativa $[M - H]^-$, de utilidad para el establecimiento de la fórmula molecular (Pereda-Miranda y Bah, 2003). El espectro de masas FAB (modo positivo) de baja resolución de la murucoidina XII permitió calcular la fórmula molecular de este glicolípido ($C_{73}H_{118}O_{26}$), ya que mostró un ion quasi-molecular $[M + Na]^+$ de m/z 1433.7809 (**Figura 21**).

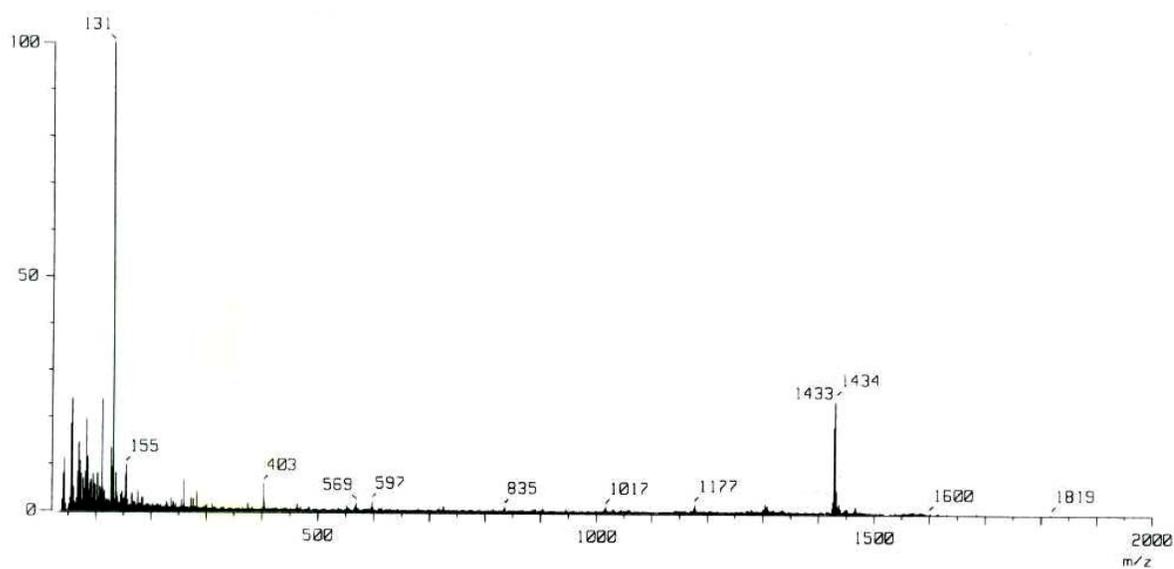


Figura 21. Espectro de masas FAB positivo de la Murucoidina XII. El pico de de m/z 1433.7809 representa la molécula cationizada $[M+Na]^+$.

Con base a la multiplicidad se asignaron como residuos los ácidos hexanóico, dodecanóico y cinámico. Lo cual fue confirmado con el ion quasi-molecular $[M+Na]^+$.

En la **Figura 22** se ilustra la estructura molecular propuesta para la Muruoidina XII, obtenida de la reunión R2 de las hojas de *Ipomoea murucoides*.

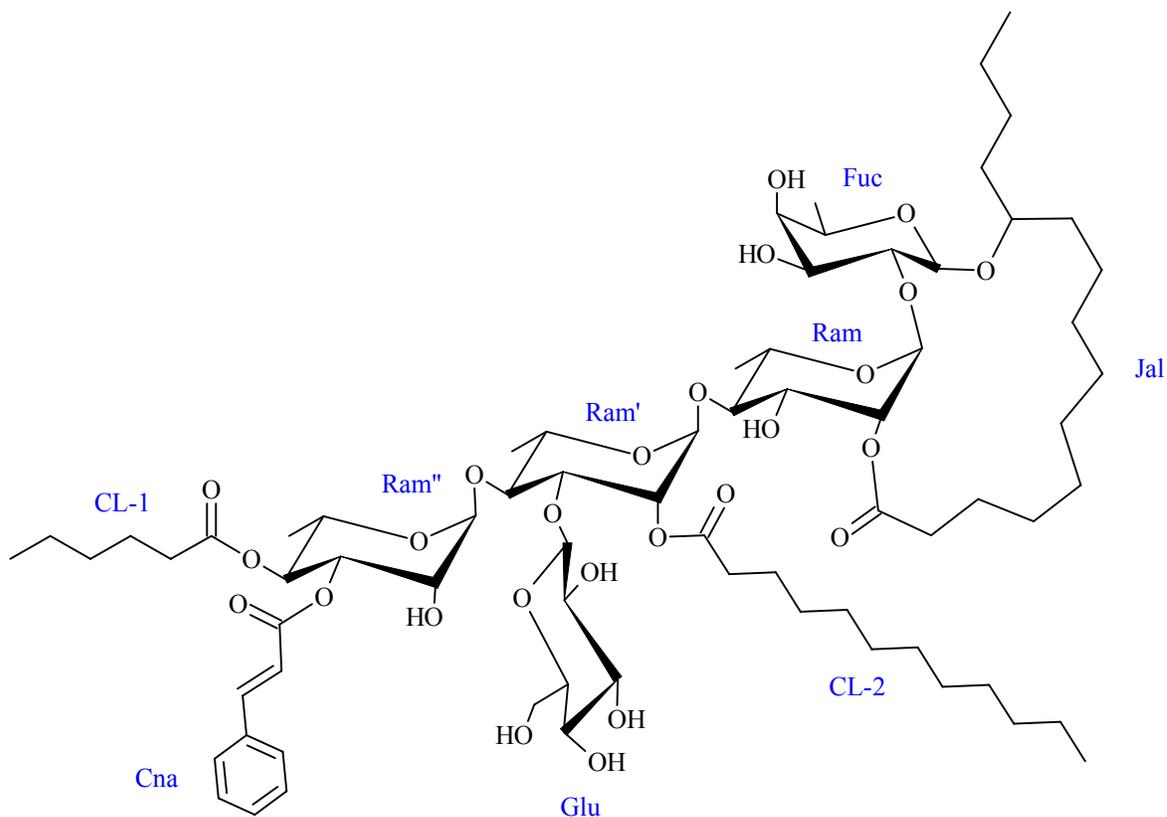


Figura 22. Estructura molecular de la muruoidina XII.

7. Conclusiones.

- Del trabajo experimental realizado se logró aislar y purificar mediante la aplicación de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) la muruoidina XII, un glicolípido novedoso presente en la jalapina de las hojas de *Ipomoea murucoides*.
- Se aisló e identificó el núcleo pentasacárido constitutivo de la muruoidina XII, el cual se caracterizó mediante técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM-FAB) como el ácido operculínico A: 11-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-[O-β-D-ramnopiranosil-(1→4)]β-D-ramnopiranosil-(1→4)-O-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-O-β-D-fucopiranosido del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanóico.
- La muruoidina XII varía en su sitio de lactonización respecto a la muruoidina V y a la estoloniferina I (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006) que se localiza en la posición C-3 de la primera unidad de ramnosa. El sitio de lactonización en la posición C-2 es el mismo que para las muruoidinas I-IV (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006) y las murucinas I-V (León *et al.*, 2005).
- La muruoidina XII representa el primer pentasacárido sustituido por un residuo del ácido cinámico y, por lo tanto, el empleo de su absorción en el ultravioleta (280 nm) facilitó su separación en la cromatografía de líquidos.

8. Bibliografía.

- Agrawal, P. (1992). NMR Spectroscopy in the Structural Elucidation of Oligosaccharides and Glycosides. *Phytochemistry* **31**, 3307 – 3330.
- Alcántara Ramírez, S. (1980). Contenido de ácidos grasos entre semillas de *Ipomoea murucoides* (Familia Convolvulaceae) de diferentes localidades en la República Mexicana. Tesis de Grado, Facultad de Ciencias, UNAM, México.
- Argueta, A. (1994). *Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana*. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México, p. 351.
- Bah, M. (1997). Aplicación de la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas (FAB) de alta resolución en la elucidación 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.
- Bah, M.; 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* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* **52**, 13063-13080.
- Bah, M.; 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.
- Chérigo Rodríguez, L. (2004). Caracterización estructural de los lipopentasacáridos mayoritarios de *Ipomoea murucoides*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.

- Chérigo, L., Pereda-Miranda R. (2006). Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **69**, 595-599.
- Duus, J. O.; Gotfredsen, C. H.; Bock, K. (2000). Carbohydrate Structural Determination by NMR Spectroscopy: Modern Methods and Limitations. *Chem. Rev.* **100**, 4589 – 4614.
- Fürstner, A., Müller, T. (1999). Efficient total syntheses of resin glycosides and analogues by ring-closing olefin metathesis. *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7814-7821.
- Gilani, A, Rahman, A. (2005). Trends in ethnopharmacology. *J. Ethnopharm.* **22**, 43-49.
- Hernández-Carlos, B. Bye, R.; Pereda-Miranda, R. (1999). Orizabins V-VIII, Tetrasaccharide Glycolipids from the Mexican Scammony Root (*Ipomoea orizabensis*). *J. Nat. Prod.* **62**, 1096-1100.
- Kubo, Y., Nakatsu, T. (1990). Recent examples of preparative scale recycling high performance liquid chromatography in natural products chemistry. *LC-GC.* **8**, 933-939.
- León, I., Enríquez, R., Nieto, D., Alonso, D., Reynolds, W., Aranda, E. y Villa J. (2005). Pentasaccharide glycosides from the roots of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* **68**, 1141-1146.
- McDonald, A. (1991). Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales Inst. Biol. Univ. Autón. México, Sec. Bot.* **62**, 65-82.
- MacLeod, J., Ward, A. (1997). Structural Investigation of Resin Glycosides from *Ipomoea lonchophylla*. *J. Nat. Prod.* **60**, 467-471.

- Monroy-Ortíz, C, Castillo España, P. (2000). *Plantas Medicinales Utilizadas en el Estado de Morelos*, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México, 104-105.
- Newman, D., Cragg, G. y Snader, K. (2003). Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981 – 2002. *J. Nat. Prod.* **66**, 1022 – 1037.
- Noda, N., Kobayashi, M., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988). Resin glycosides II. Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the crude resin glycoside from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 627-633.
- Noda, N., Kobayashi, M., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988). Resin glycosides III. Isolation and structural study of the genuine resin glycosides, muricatins I-VI, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 920-929.
- Noda, N., Nishi, M., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1988). Resin glycosides IV. Two new resin glycosides, muricatins VII and VIII, from the seeds of *Ipomoea muricata*. *Chem. Pharm. Bull.* **36**, 1707-1713.
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K. y Kawasaki, T. (1987). Resin glycosides I. Isolation and structure elucidation of orizabin I, II, III and IV , genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea muricata*. *Tetrahedron* **43**, 3889-3902.
- Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992). Resin glycosides XV. Simonins I-V, ether-soluble resin glycosides (Jalapins) from the roots of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chem. Pharm. Bull.* **40**, 3163-3168.

-
- Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1989). Resin Glycosides V. Identification and characterization of the component organic and glycoside acids of the ether-soluble crude resin glycosides (“jalapín”) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 3209-3213.
 - Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1989). Operculin I and II, new ether soluble resin glycosides (“jalapín”) with fatty acid ester groups from *Rhizoma jalapae braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* **37**, 241-244.
 - Pereda-Miranda, R., Bah, M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr. Top. Med. Chem.* **3**, 111-131.
 - Pereda-Miranda, R., Escalante-Sánchez, E., Escobedo-Martínez, C. (2005). Characterization of Lipophilic Pentasaccharides from Beach Morning Glory (*Ipomoea pes-caprae*). *J. Nat. Prod.* **68**, 226 –230.
 - Pereda-Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC Isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* **58**, 3145-3154.
 - Pereda-Miranda, R., Mata, R., Anaya, A. L., Winckramaratne, D. B.M., Pezuto, J. M., Kinghorn, A. D. (1993). Tricolorin A, major phytochemical inhibitor from *Ipomoea tricolor*. *J. Nat. Prod.* **56**, 571-582.
 - Programa Panamericano de Defensa y Desarrollo de la Diversidad biológica, cultural y social (Prodiversitas). <http://www.prodiversitas.bioetica.org/nota65-1.htm>.

- Sarin, J, Hari, G., Nandu, K., Dhar, M. (1973). Ipolearósido: A new glycoside from *Ipomoea leari*, with anti-cancer activity. *Phytochemistry* **12**, 2461-2468.
- Trease, G.E., Evans, W.C. (2002). *Pharmacognosy*. 15a. ed. WB Saunders, Edinburgo, p. 288.
- van Der Heijden, R., Jacobs, D., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R. (2004). The Catharanthus alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Curr. Med. Chem.* **11**, 607-628.