



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**“RESOLUCIÓN MEDIANTE HPLC DE LA RESINA COMERCIAL DE ESCAMONEA
E IDENTIFICACIÓN ESTRUCTURAL DEL ÁCIDO PÚRGICO C”**

TESIS

PARA OPTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

LUIS ANGEL RUEDA SANTOS

TUTOR: Dr. Rogelio Pereda Miranda

MÉXICO D.F. 2015



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: RACHEL MATA ESSAYAG.

Vocal: ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA.

Secretario: ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ.

1er. Suplente: MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO.

2° Suplente: MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR.

Sitio donde se desarrollo el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123.

Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor:



Dr. Rogelio Pereda Miranda.

Supervisor Técnico:

Dr. Francisco Elihú Bautista Redonda.

Sustentante:

Luis Angel Rueda Santos.

Agradecimientos.

Agradezco el apoyo brindado a las siguientes instituciones y personas:

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN212813) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 220535) por el financiamiento parcial de la investigación. Al Sistema Nacional de Investigadores por la beca concedida.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por su paciencia y su guía.

Al Dr. Elihú Bautista Redonda por haberme asesorado, apoyado, por su enseñanza y conocimientos que me compartió para la realización de esta tesis

A la Dr. Mabel Fragosó Serrano por brindarme su tiempo y apoyo.

Miembros de jurado, por sus correcciones y observaciones que permitieron la modificación y rectificación de este texto.

A la Facultad de Química, por contar con excelentes servicios e instalaciones, y gracias por brindarme una gran formación profesional.

A todos mis compañeros de laboratorio por el apoyo que me brindaron.

DEDICATORIAS

A dios:

Por haberme permitido alcanzar un logro más en mi vida y brindarme a la familia que me dio.

A mis padres:

Por todo el amor, cuidado, consejos y ayuda que me han brindado en todos los momentos de mi vida y porque gracias a ustedes soy feliz por lo que soy. Espero darles mucho más que esto. Los quiero mucho.

A mis hermanos:

Por cada una de las admirables virtudes que poseen. Ojala sigamos unidos como hasta hora.

A mi familia:

Por todo su apoyo y amor.

ÍNDICE

Lista de Tablas y Cuadros.....	VII
Lista de Figuras	VIII
Lista de Abreviaturas.....	IX
1. Introducción.....	1
2. Antecedentes.....	2
2.1 Familia <i>Convolvulaceae</i>	2
2.2 Género <i>Ipomoea</i>	2
2.3 <i>Ipomoea orizabensis</i>	3
2.4 Resinas Glicosídicas.....	4
2.5 Método de separación de resinas glicosídicas.....	7
2.6 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas.....	8
2.7 Química de <i>Ipomoea orizabensis</i>	9
2.8 Química de <i>Ipomoea purga</i>	9
3. Justificación.....	12
4. Objetivos.....	12
4.1 Objetivos Generales.....	12
4.2 Objetivos Específicos.....	12
5. Parte experimental.....	13
5.1 Procedimientos Generales.....	13
5.1.1 Material vegetal.....	13
5.1.2 Preparación del extracto orgánico.....	13
5.2 Cromatografía de líquidos de alta resolución.....	13
5.2.1 Instrumentación.....	13
5.3 Procedimiento de preparación de la muestra.....	13

5.3.1 Cromatografía de líquidos a nivel analítico.....	13
5.3.2 Cromatografía de líquidos a nivel preparativo.....	14
5.4 Preparación de los derivados.....	15
5.4.1 Separación de los ácidos glicosídicos mediante HPLC.....	15
5.5 Saponificación del compuesto IOFNMA-4.....	16
5.6 Resolución del extracto de metanol de la resina comercial de la escamonea.....	18
5.6.1 Reacción de Bencilación.....	18
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	18
6.1 Análisis mediante HPLC del extracto de metanol.....	18
6.1.1 Purificación de la fracción L9.....	20
6.1.1.1 Purificación de la muestra L9 bencilada.....	22
6.2 Purificación del ácido púrgico C.....	23
6.2.1 Caracterización estructural del ácido púrgico C.....	24
7. CONCLUSIONES.....	30
8. ANEXOS.....	31
9. BIBLIOGRAFÍA.....	35

Lista de Tablas y Cuadros.

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas en HPLC para el análisis del extracto crudo a nivel analítico	14
Cuadro 2. Condiciones cromatográficas en HPLC a nivel preparativo.....	15
Cuadro 3. Rendimiento, tiempos de retención (nivel preparativo) y puntos de fusión de los ácidos glicosídeos constitutivos de la resina comercial escamonea (Laboratorios Mixim, S.A. de C.V.).....	16
Cuadro 4. Rendimientos obtenidos para cada fracción primaria.....	20
Cuadro 5. Desplazamientos químicos de RMN ¹ H y ¹³ C para el ácido púrgico C.....	27

Lista de Figuras.

Figura 1. Ilustración de la raíz de jalapa en el manuscrito Badiano (1552).....	1
Figura 2. <i>I. orizabensis</i> var. <i>orizabensis</i>	4
Figura 3. Principales unidades monosacáridas identificadas en las resinas glicosídicas.....	5
Figura 4. Orizabinas I-V aisladas de <i>Ipomoea orizabensis</i>	6
Figura 5. Válvula de reciclaje (izquierda) y cromatograma generado mediante reciclaje (derecha) de una muestra conteniendo dos compuestos diastereoisoméricos ¹⁷ en HPLC.....	7
Figura 6. Estructura química de las orizabinas IX – XXI.....	10
Figura 7. Estructura química de la orizabina VIII.....	11
Figura 8. Estructura química del jalapínósido, bidesmósido del ácido ipurólico (C ₁₄).....	11
Figura 9. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N) del ácido púrgico C peracetilado.....	17
Figura 10. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N) del ácido púrgico C peracetilado.....	17
Figura 11. Perfil cromatográfico en HPLC (nivel analítico) del extracto comercial de la escamonea.....	19
Figura 12. Perfil cromatográfico en HPLC (nivel preparativo) del extracto comercial de la escamonea.....	20
Figura 13. Perfil cromatográfico en HPLC (nivel analítico) de la muestra L9.....	21
Figura 14. Perfil cromatográfico en HPLC (nivel analítico) de la fracción primaria L9 bencilada.....	22
Figura 15. Perfil cromatográfico en HPLC (nivel preparativo) de la muestra L9 bencilada.....	23
Figura 16. Cromatograma generado mediante reciclaje en HPLC de la muestra IOEMBFNMA4 conteniendo al ácido glicosídico C.....	24
Figura 17. Expansión de las señales correspondientes a los carbonos anoméricos del espectro de RMN ¹³ C en 95-110 ppm.....	25
Figura 18. Estructura química de los ácidos púrgicos A-D.....	26
Figura 19. Espectro de RMN ¹ H (400 MHz, C ₅ D ₅ N) del ácido púrgico C.....	28
Figura 20. Espectro de RMN ¹³ C (100 MHz, C ₅ D ₅ N) del ácido púrgico C.....	28
Figura 21. Espectro de masas (MS-EI, modo positivo) y patrón de fragmentación del ácido púrgico C.....	29

Lista de Abreviatura

AcOEt	Acetato de etilo
°C	Grados Celsius
MeCN	Acetonitrilo
C ₅ D ₅ N	Piridina deuterada
C ₅ H ₅ N	Piridina
(CH ₃ CO) ₂ O	Anhídrido acético
cm	Centímetros
COSY	Correlation Spectroscopy
δ	Desplazamiento Químico
DMF	Dimetil formamida
ESI	Método de ionización por electrospray
EM	Espectrometría de Masas
HCl	Ácido Clorhídrico
HPLC	Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia
Hz	Hertz
I.R.	Índice de Refracción
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
KOH	Hidróxido de Potasio
MeOH	Metanol
mg	Miligramos

MHz	Mega hertz
min	Minutos
mL	Mililitros
mm	Milímetros
μL	Microlitros
N ₂	Nitrogeno
n-BuOH	Butanol
p.f.	Punto de Fusión
ppm	Partes por millón
RIU	Refractive Index Unit
RMN	Resonancia Magnética Nuclear
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Protones
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
TOCSY	Total Correlation Spectroscopy
T _R	Tiempo de Retención

1. INTRODUCCIÓN.

Desde tiempos antiguos, la naturaleza ha sido una fuente de recursos valiosa que el ser humano ha tenido a su disposición y que le ha proporcionado no sólo alimento, sino que además le ha ayudado a recuperar o mantener su salud.¹ Durante el paso del tiempo, se han utilizado remedios herbolarios para la cura o prevención de enfermedades por lo que se ha acumulado un conjunto de conocimientos empíricos relativo a las propiedades curativas de las plantas. En este contexto, la herbolaria mexicana ha contribuido al conocimiento etnomédico a nivel mundial debido a su diversidad y riqueza en especies vegetales. Su uso data desde tiempos precolombinos en las sociedades mesoamericanas y, en la actualidad, constituye parte de la herencia cultural a la sociedad moderna debido a su amplio y continuo uso alternativo.²

Los antiguos curanderos mexicanos compartían la creencia de que era posible alcanzar la purificación del cuerpo a través del consumo de sustancias purgantes ya que de este modo se eliminaban del organismo las causas de diversos trastornos digestivos, renales e incluso de tipo nervioso. Los remedios herbolarios purgantes más utilizados en las épocas prehispánicas incluían a varios miembros de la familia de las convolvuláceas y que desde la colonia se conocen con el nombre de “jalapas”. La raíz de jalapa es un complejo de plantas medicinales del género *Ipomea*, usadas en la medicina tradicional mexicana para tratar diversos desórdenes gastrointestinales y constituyen la droga cruda purgante que se comercializó con mayor frecuencia entre América y el viejo mundo. Las especies pertenecientes al complejo conocido como jalapa incluyen: *I. purga*, *I. orizabensis*, *I. simulans*, *I. stans*, e *I. batatas*; siendo la primera de éstas la más importante, también conocida como “raíz de Michoacán” y que estudios recientes de la herbolaria prehispánica sugieren que corresponde a la ilustración y la descripción del uso medicinal purgante de la planta “*huelicpahtli*” (náhuatl) en el Códice De la Cruz-Badiano ² (Figura 1).



Figura 1. Ilustración de la raíz de jalapa en el manuscrito Badiano (1552). Folio 32v. *Huelicpahtli*. Purga el vientre. Cuando hay pus en el vientre, harás que el pus sea desechado si el enfermo bebe en agua caliente, antes de la comida, una poción hecha con la raíz molida del “*huelicpahtli*”.

Los estudios fitoquímicos de estas especies han conducido al aislamiento de alcaloides del ergot y glicolípidos conocidos como resinas glicosídicas, siendo este último tipo de componentes los principios activos responsables de las propiedades purgantes atribuidas a las jalapas.³ En estudios más recientes, se han descrito las actividades antibacteriana, citotóxica, herbicida y moduladora de la multirresistencia a fármacos en bacterias y células cancerosas de mamíferos.

Así, la presente disertación describe la resolución mediante HPLC de la resina comercial de escamonea, el aislamiento y la elucidación estructural del ácido púrgico C presente en la convolvulina o fracción de la resina soluble en metanol.

2. ANTECEDENTES.

2.1 Familia *Convolvulaceae*.

Las especies pertenecientes a la familia *Convolvulaceae* incluyen cinco géneros representativos por sus usos medicinales: *Ipomoea*, *Merremia*, *Convolvulus*, *Operculina*, y *Calystegia*. Esta familia pertenece al grupo de las angiospermas y posee alrededor de 55 géneros y 1650 especies con distribución cosmopolita, especialmente en las regiones de clima tropical y subtropical de Asia y América. La familia incluye a especies herbáceas trepadoras, arbustivas y arbóreas bajas con látex, que presentan hojas simples, alternas y enteras; flores grandes con pétalos fusionados (simpétalas) en forma de embudo radial y simétrico (de ahí su nombre vulgar de campanitas), solitarias o en inflorescencias en forma de cimas, racimos o panículas; y frutos capsulares con semillas cubiertas por vellosidades. El vástago de estas plantas generalmente está enrollado, de ahí su nombre latino que deriva de la palabra *convolvere* (convolvere = enrollar) que significa entrelazado y se refiere al crecimiento en forma de enredaderas, entrelazadas que se sujetan alrededor de un soporte. Dentro del reino vegetal, esta familia es la que mejor representa las propiedades medicinales purgantes y alucinógenas.^{4,5}

2.2 Género *Ipomoea*.

El género *Ipomoea* es el más grande de la familia, con 500 a 700 especies a nivel mundial, con su mayor diversidad en los trópicos. La distribución del género *Ipomoea* en México es de aproximadamente 160 especies de las cuales 65% se consideran endémicas (104 especies) y se distinguen por sus propiedades nutricionales (*Ipomoea batatas*, el camote), medicinales (*Ipomoea purga*), alucinógenas rituales o religiosas (*Ipomoea violacea*) y alelopáticas de importancia agrícolas (*Ipomoea tricolor*).⁵ El nombre de este género proviene de las raíces griegas “*Ips*” o “*Ipos*” que significa gusano o enredadera y “*homoios*” que significa similar o semejante y esto elude a la manera en la que crece la mayor parte de sus especies. La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* no presentan variabilidad importante en su morfología, siendo que la mayoría de estas son enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros. Las flores del grupo son típicamente conocidas por su aspecto tubular y sus colores brillantes.

La actividad alucinógena propia de algunas especies se debe a la presencia de alcaloides derivados del ácido lisérgico. La actividad purgante y citotóxica está asociada a la presencia de resinas glicosídicas de sus tejidos foliares y radiculares. Los estudios farmacológicos han confirmado algunos usos en la medicina tradicional. Por ejemplo, un estudio realizado en ratas con el extracto acuoso de las raíces de *Ipomoea stans* indicó la presencia de sustancias activas que pueden ejercer un efecto vasodilatador confirmando su uso popular como agente antiespasmódico.⁶

2.3 *Ipomoea orizabensis*.

Esta planta se conoce como manto de la virgen, escamonea mexicana, purga macho, jalapa fusiforme, jalapa ligera o jalapa luz. Planta muy común en las partes boscosas, principalmente en encinares y pinares, aunque también puede encontrarse en el bosque tropical caducifolio, pastizal y bosque mesófilo de montaña, así como en la vegetación secundaria derivada de estos tipos de vegetación. Es una especie común en zonas montañosas del Eje Neovolcánico y la Sierra Madre Occidental.⁷ En México, se encuentra distribuida en los estados de Chiapas, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luis Potosí, Sinaloa, Tamaulipas, Tlaxcala y Veracruz. Florece de julio a noviembre. Esta especie, generalmente identificada como *Ipomoea tyrianthina*, es muy polimorfa a lo largo de su área de distribución que comprende desde el norte de México hasta Guatemala, lo que dificulta su taxonomía y ha llevado a la identificación de cuatro variedades con base en diferencias anatómicas y en su distribución geográfica:⁸

Variedad con una corola blanca a rosada, planta de afinidad xerófila:

- *I. orizabensis* var. *collina*. Se distribuye en ambientes excepcionalmente secos de regiones semiáridas o subhúmedas; hojas por lo general digitiformes con 5 a 7 lóbulos.

Variedades con una corola con diferentes tonalidades purpúreas; plantas de lugares moderadamente húmedos; hojas enteras o 3(5) lobadas:

- *I. orizabensis* var. *novogaliciana*. 2 sépalos muy escariosos hacia el margen y con la parte central verde a negruzca, glabros a glabrescentes, ovados a ovado-elípticos, de 4 a 8(10) mm de largo, de 2 a 4 mm de ancho; corola de (4)5 a 6 cm de largo.

- *I. orizabensis* var. *orizabensis*. 2 sépalos no escariosos ni con la parte central verde o negruzca, sólo los interiores glabros, los exteriores glabrados o pubescentes, oblongo-lanceolados a ovado-elípticos, de (4)8 a 15 mm de largo, de (3)4 a 6 mm de ancho; corola de (4.5) 6 a 9 cm de largo (Figura 2).

- Ipomoea orizabensis* var. *austromexicana*. Se distribuye en Chiapas y Guatemala. 2 sépalos no escariosos, hojas enteras.



Figura 2. *I. orizabensis* var. *orizabensis*. Especie con una raíz purgante y restringida a las zonas tropicales del estado de Veracruz, "jalapa de orizaba", a menudo se ha utilizado como un sustituto o adulterante de la verdadera jalapa (*Ipomoea purga*). Incluso hoy en día, esta raíz se denomina como falsa jalapa o escamonea mexicana. Pocas colecciones se conocen de Veracruz y todas son del Pico de Orizaba.

La escamonea mexicana (*I. orizabensis*) ha sido considerada como un purgante menos potente que la jalapa, de ahí su nombre común "jalapa ligera" como un reemplazo para *I. purga*. Otros usos etnomédicos descritos para esta planta son el tratamiento de la fiebre abdominal, la disentería, la epilepsia, la hidrocefalia, la meningitis, los tumores y como antiparasitario.⁹ Los extractos solubles en metanol que derivan de sus raíces son ricos en resinas glicosídicas (10-18% en peso seco) y provocan movimientos peristálticos en el intestino delgado, inducen diarrea acuosa y su uso es de cuidado; no se debe utilizar sin el consejo de un médico tradicional o alópata competente. Los productos farmacéuticos se comercializan como extractos alcohólicos (elixir) de raíz o resinas, o en polvos que se consumen solos o en combinación con otros ingredientes para modificar el efecto terapéutico. La demanda de estas raíces disminuyó debido a la introducción de productos herbolarios de origen italiano y alemán preparados con otras plantas como la jalapa brasileña (*Ipomoea operculata*) y la jalapa de la India (*Ipomoea turpethum*).³

2.4 Resinas Glicosídicas.

Las resinas glicosídicas constituyen un conjunto de glicolípidos de elevado peso molecular que tienen la particularidad de ser moléculas anfipáticas por la presencia en su estructura de un oligosacárido hidrofílico y de una porción hidrofóbica constituida por la aglicona. Debido a esta característica estructural, se ha postulado que estos glicolípidos desempeñan un papel importante en la química de la familia *Convolvulaceae*¹⁰ y también se ha demostrado que esta propiedad fisicoquímica les confiere un buen efecto citotóxico, antimicrobiano y purgante.¹¹ Por lo que su estudio resulta de interés terapéutico en el desarrollo de nuevos agentes medicinales.¹² Estas complejas mezclas de glicolípidos presentan una distribución restringida únicamente a los miembros de la familia *Convolvulaceae*.^{5,11}

La porción hidrofílica está constituida de un núcleo oligosacárido y la porción hidrofóbica compuesta por una aglicona que está representada por un ácido graso mono o dihidroxilado de 16 ó 14 átomos de carbono unidos a través de un éster cíclico intramolecular. La mayoría de las veces, el núcleo oligosacárido se encuentra esterificado con ácidos grasos saturados de diferentes longitudes de cadena. Los residuos volátiles identificados con mayor frecuencia incluyen a los ácidos acético, cinámico, isobutírico, metilbutírico, nílico y tíglico.^{7,9,13} Los ácidos grasos de elevado peso molecular caracterizados en las especies del género *Ipomoea* incluyen a los ácidos hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico.¹⁴ El ácido hexadecanoico hidroxilado en la posición C-11 conocido con el nombre de ácido jalapínico representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas del género *Ipomoea*. Aunque también se han reportado los ácidos 11-hidroxitetradecanoico (ácido convolvulinólico) y el 3,11-dihidroxitetradecanoico (ácido ipurólico) como agliconas que forman un anillo macrocíclico intermolecular. Por otra parte, los carbohidratos que constituyen el núcleo oligosacárido incluyen a la D-glucosa, D-fucosa, D-quinovosa, D-xilosa y la L-ramnosa (Figura 3).^{5, 11}

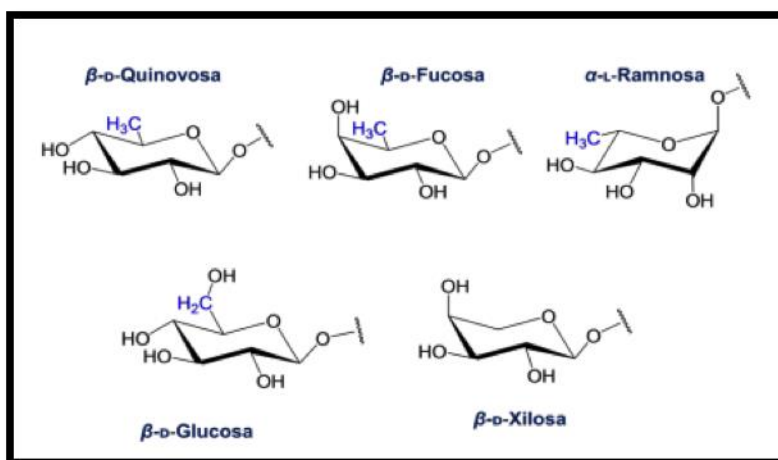


Figura 3. Principales unidades monosacáridas identificadas en las resinas glicosídicas del género *Ipomoea*.

Las resinas glicosídicas se clasifican en dos grupos; aquellas presentes en la fracción poco polar y soluble en cloroformo o éter denominada jalapina y la insoluble en estos disolventes llamada convolvulina de acuerdo a la clasificación de Mayer.¹⁵ El grupo de la jalapina comparten la estructura común de una macrolactona compuesta por un sólo ácido glicosídico esterificado. Miembros del grupo de la convolvulina poseen pesos moleculares mayores y son solubles en metanol, resultado de la formación de oligómeros de ácidos glicosídicos según la propuesta de Manich y Schuman.¹⁶

La diversidad estructural de las resinas glicosídicas surge de las variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas que componen el núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosidación, en la posición de lactonización y en el tipo, el número y la posición de los ácidos que se encuentran acilando al núcleo. Así, se han podido identificar desde disacáridos hasta heptasacáridos: disacáridos como el resinósido cuscútico A de *Cuscuta chinensis* o la muricatina B

de *I. muricata*, trisacáridos como los ácidos cuscúticos A₁-A₃ o el ácido tricolorico C de *I. tricolor*, tetrasacáridos como los ácidos cuscúticos A-D, o el merremósido I de *Merremia mammosa*, pentasacáridos como el ácido arborecínico, de *I. arborescens*, hexasacáridos por ejemplo el ácido lonchofílico de *I. lonchopylla* y el ácido operculínico H de *I. operculata* y dímeros tipo éster constituidos por tres hasta cinco azúcares en cada unidad oligomérica como las batatinas I-IV de *I. batatas*, o la merremina de *Merremia hungaiensis*.⁵ Cabe mencionar que los constituyentes individuales que componen las resinas glicosídicas de una misma especie comparten, en la mayoría de los casos, un mismo núcleo oligosacárido.^{3,5} Por lo tanto, los núcleos oligosacáridos de las resinas glicosídicas pueden ser identificados a través de métodos de degradación (hidrólisis alcalina), permitiendo la obtención de los ácidos glicosídicos que son distintivos de las especies que los biosintetizan.^{3,5} En los estudios de actividad biológica de estas sustancias, se encontró que la lactona macrocíclica constituye una característica estructural importante para la actividad purgante y citotóxica de estos compuestos ya que cuando se hidroliza el enlace éster disminuye o desaparece la actividad biológica.¹¹ Los primeros glicolípidos aislados y caracterizados íntegramente fueron aquellos que constituyeron la serie de las orizabinas por el grupo de Noda y colaboradores.¹³ Quienes demostraron que los constituyentes de las resinas glicosídicas de una muestra comercial de la escamonea mexicana son tetrasacáridos macrocíclicos cuya aglicona es el ácido 11S-hidroxihexadecanoico (Figura 4).

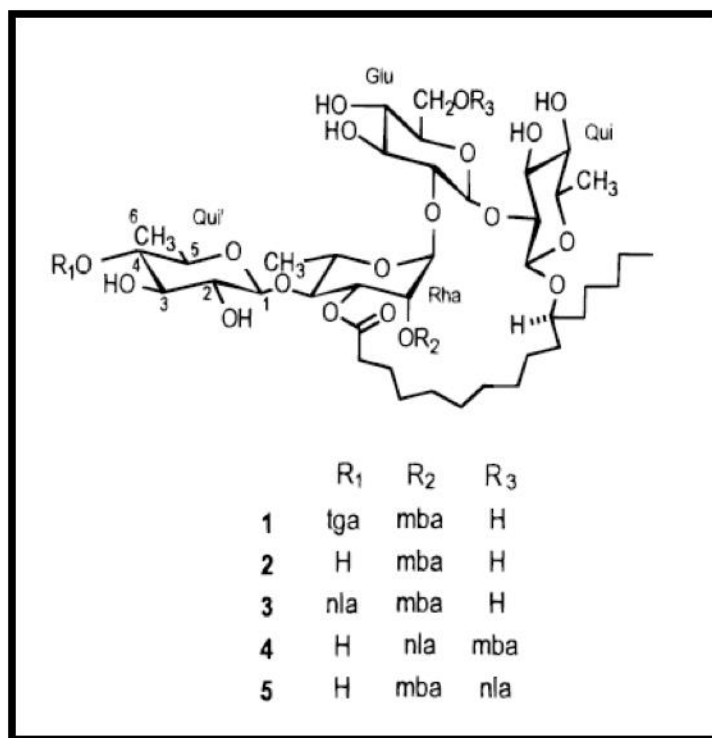


Figura 4. Orizabinas I-V aisladas de *Ipomoea orizabensis*. Abreviaturas: Glu = glucosa; Rha = ramnosa; Qui = quinovosa.

2.5 Método de separación de resinas glicosídicas.

Las resinas glicosídicas son compuestos anfipáticos debido a la presencia de largas cadenas alifáticas enlazadas a un extremo polar. Esta clase de moléculas no es fácil de aislar y purificar, ya que siempre se presentan como mezclas complejas de homólogos constituidas con el mismo núcleo oligosacárido pero con diferentes sustituyentes alquilo o arilo que difieren en la longitud de la cadena.¹⁷ En la década de 1980, la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) condujo al aislamiento de cuatro componentes naturales puros, por primera vez, a partir de una mezcla de resinas glicosídicas (Figura 4).¹³ En este contexto, la cromatografía de líquidos es la técnica que ha permitido el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales de las resinas de las convolvuláceas, separando los componentes de una mezcla con una resolución máxima en un tiempo corto a través de la disponibilidad de soportes con tamaño de partícula pequeño y de forma esférica o regular (C-18 o amino).⁵

La técnica de reciclaje de una muestra por HPLC permite la separación y la purificación de los componentes presentes de manera eficiente consiguiendo garantizar la pureza en los productos aislados. Esta técnica consiste en hacer pasar la muestra por la columna o fase estacionaria durante varios ciclos de manera manual o automática a través de una válvula de reciclaje.^{17, 18} El procedimiento finaliza hasta que se observa un pico de comportamiento gaussiano, sin la presencia de picos minoritarios como indicativos de impurezas en la muestra analizada (Figura 5).¹⁷

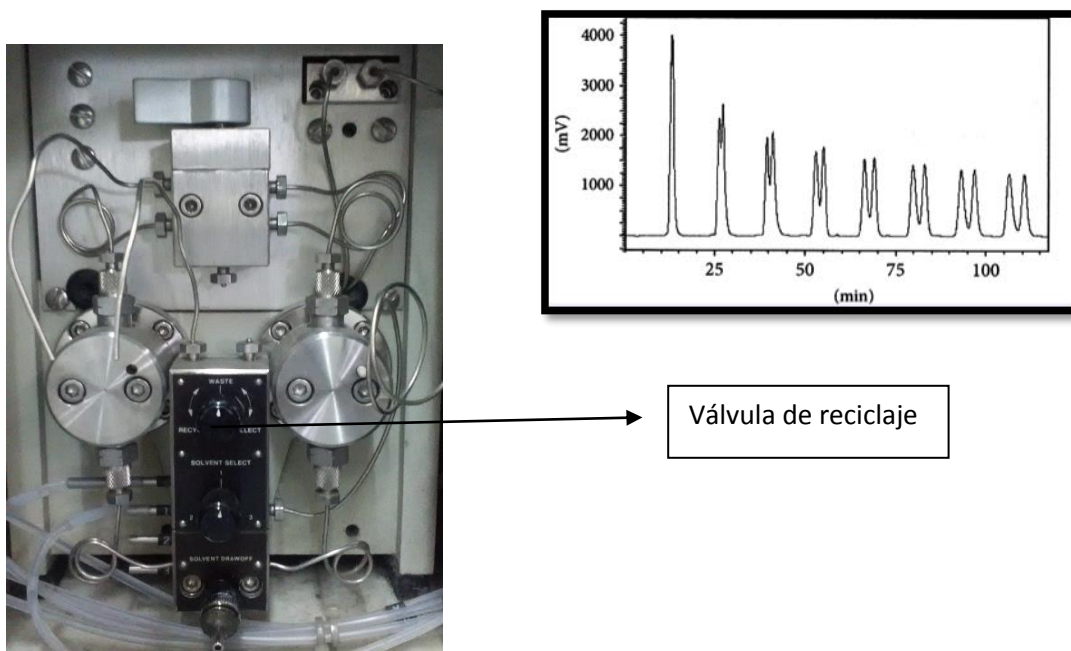


Figura 5. Válvula de reciclaje (izquierda) y cromatograma generado mediante reciclaje (derecha) de una muestra conteniendo dos compuestos diastereoisoméricos¹⁷ por HPLC.

2.6 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas.

Los principales métodos para la elucidación de la estructura de las resinas glicosídicas involucran el uso de reacciones químicas degradativas o la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución, que en combinación son el mejor camino para la caracterización completa de estas moléculas complejas:

- Métodos degradativos: consisten en romper la compleja estructura por medio de reacciones químicas simples y generar moléculas más pequeñas, para ello se utiliza la saponificación del material que libera a los ácidos grasos que esterifican los núcleos oligosacáridos. Los ácidos glicosídicos obtenidos se someten a una segunda reacción de hidrólisis en medio ácido para la liberación de los carbohidratos simples y la aglicona que forma la macrolactona. Los ácidos grasos libres o sus derivados metilados se analizan mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas. La longitud de la aglicona (ácidos grasos hidroxilados C₁₄ o C₁₆) que forma la macrolactona y su posición de hidroxilación se determinan mediante el análisis directo por espectrometría de masas por la técnica de impacto electrónico (EIMS) o por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-EIMS) de sus derivados metilados o sililados. Las unidades de azúcar se analizan mediante CG-EM a través de sus derivados volátiles por tratamiento con clorotrimetilsilano. Para evitar la anomerización de los monosacáridos se recomienda realizar la sililación de los grupos hidroxilo y la mercaptalación de la función aldehído.⁵

- Caracterización: El empleo de una combinación de técnicas espectroscópicas (RMN) y espectrométricas (EM) de alta resolución ha facilitado la elucidación de oligosacáridos y polisacáridos sin recurrir a métodos que destruyan o degraden los productos naturales. Las resinas glicosídicas son sólidos polares con puntos de fusión generalmente por encima de los 100 °C, por lo tanto, son poco volátiles en una fuente de ionización por impacto electrónico sin que se ocasione un daño térmico. Las técnicas de ionización suave, como la ionización por bombardeo acelerado de átomos (FAB) y la ionización por electrospray (ESI), han contribuido en forma importante al campo de la elucidación de esta clase de glicolípidos. La muestra se ioniza a especies moleculares protonadas (modo positivo) o desprotonadas (modo negativo). La principal ventaja en el análisis por FAB se debe al uso de una matriz líquida, la cual facilita la producción de iones moleculares del soluto, ayuda a mantener una emisión persistente de estos iones moleculares y permite la disipación de la energía de la fuente primaria. La ionización por electrospray también proporciona información valiosa sobre la composición, la secuencia y la ramificación de la cadena oligosacárida.^{18, 19}

Los espectros unidimensionales de resonancia magnética nuclear de protón (RMN ¹H) y de carbono (RMN ¹³C) proporcionan una información general acerca de la estructura química de los glicolípidos. Así, el análisis de los espectros por RMN ¹³C permite determinar el número de señales anoméricas en la región comprendida entre δ_c 95-110, que indican el número de monosacáridos que se encuentran constituyendo el núcleo oligosacárido en estas moléculas.

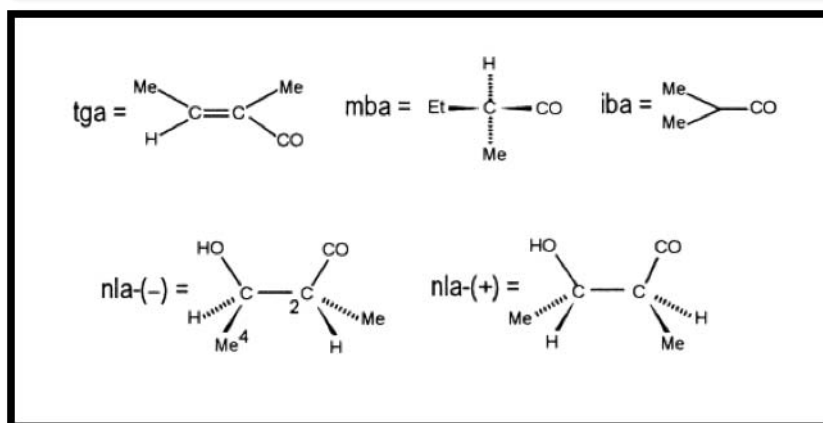
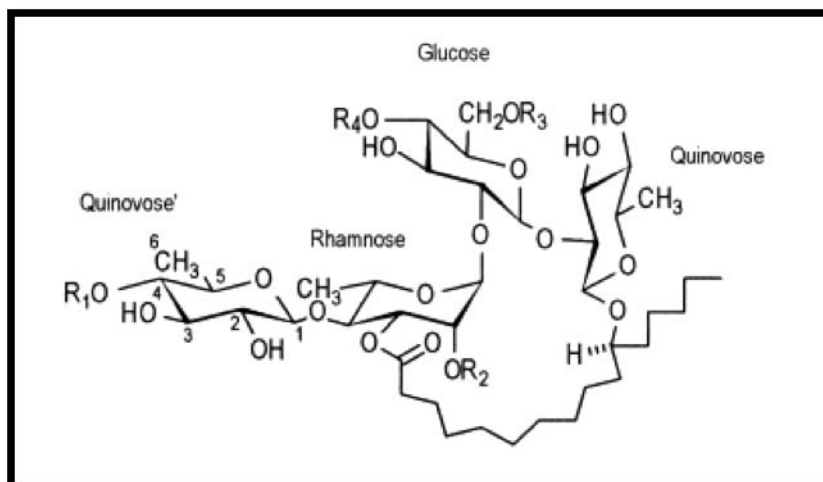
El empleo de las técnicas bidimensionales en la RMN (^1H - ^1H COSY y TOCSY) permite la asignación de las señales restantes de cada uno de los protones de tipo metino en cada monosacárido.

2.7 Química de *Ipomoea orizabensis*

Los estudios de la especie mexicana *Ipomoea orizabensis*^{9, 17} establecieron que el núcleo tetrasacárido de estos glicolípidos es el ácido escamónico A mediante el empleo de reacciones degradativas (saponificación del crudo resinoso) e interpretación de técnicas mono y bidimensionales en la RMN. Se reportó el aislamiento de 17 glicolípidos novedosos designados colectivamente como las orizabinas V-XXI. El núcleo tetrasacárido del ácido escamónico A presente en estos glicolípidos se encuentra esterificado principalmente por los residuos de los ácidos tíglico, nílico, isobutírico y 2-metilbutírico. Las orizabinas V-XXI presentan como núcleo oligosacárido al ácido (11S)-11-[O-6-desoxi- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi-L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-glucopiranosido]-hidroxihexadecanoico (Figura 6). La orizabina VIII tiene una característica estructural distintiva dentro de los compuestos que están constituidos por el núcleo tetrasacárido del ácido escamónico A, que radica en la posición de lactonización ya que se establece a través de un enlace éster formado entre el grupo carboxilato de residuo del ácido jalapínico y el radical hidroxilo en la posición C-3 del segundo residuo de glucosa de la cadena oligosacárida, el ácido escamónico A (Figura 7).⁹ Todas las orizabinas de la falsa jalapa son constituyentes solubles en cloroformo y ésta es la principal diferencia con la raíz de jalapa auténtica (*Ipomoea purga*), rica en resinas glicosídicas solubles en metanol.³

2.8 Química de *Ipomoea purga*

De la saponificación del extracto de metanol de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*) se han aislado los ácidos púrgicos A y B,³ así como el jalapínosido¹² que representa el primer oligosacárido macrocíclico intacto caracterizado a partir de las fracciones ricas en resinas glicosídicas insolubles en CHCl_3 . Los ácidos púrgicos son heterohexasacáridos no lineales y se componen de dos unidades de D-glucosa, dos de D-quinovosa, una de D-fucosa y una de L-ramnosa.³ Estos dos ácidos se diferencian en el tipo de aglicona que se encuentra unida al núcleo oligosacárido, identificándose al ácido (11S)-hidroxitetradecanoico en el ácido púrgico A y el ácido (11S)-hidroxihexadecanoico en el ácido púrgico B. El ácido púrgico A (1) se caracterizó como el ácido (11S)-11-[O- β -D-quinovopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-[β -D-fuco-piranosil-(1 \rightarrow 4)]-O- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 2)-O- β -D-quinovopiranosido]-hidroxitetradecanoico; así que el ácido púrgico B (2) representó al homólogo que presenta al ácido (11S)-hidroxihexadecanoico como la aglicona pero que contiene la misma secuencia de glicosidación en el núcleo oligosacárido.³ La estructura química del jalapínosido corresponde a un bidesmósido del ácido ipurólico (ácido 3S,11S-dihidroxitetradecanoico) donde un residuo monosacárido se une en la posición C-3 y el mismo hexasacárido de los ácidos púrgicos en la posición C-11 (Figura 8).¹²



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
IX	tga	mba	H	nla(-)
X	tga	nla(-)	iba	H
XI	tga	nla(+)	iba	H
XII	tga	iba	nla(-)	H
XIII	tga	iba	nla(+)	H
XIV	tga	nla(-)	mba	H
XV	tga	nla(+)	mba	H
XVI	tga	mba	nla(-)	H
XVII	tga	mba	nla(+)	H
XVIII	mba	nla(-)	mba	H
XIX	mba	nla(+)	mba	H
XX	mba	mba	nla(-)	H
XXI	mba	mba	nla(+)	H

Figura 6. Estructura química de las orizabinas IX – XXI.

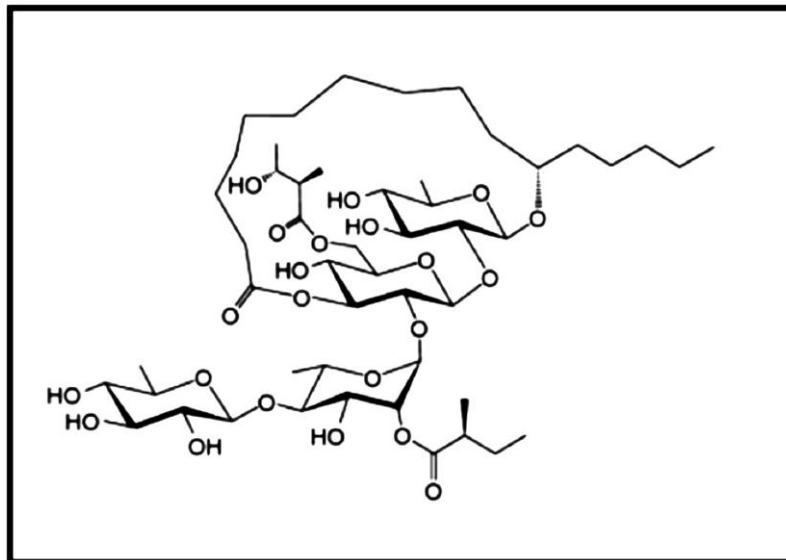


Figura 7. Estructura química de la orizabina VIII.

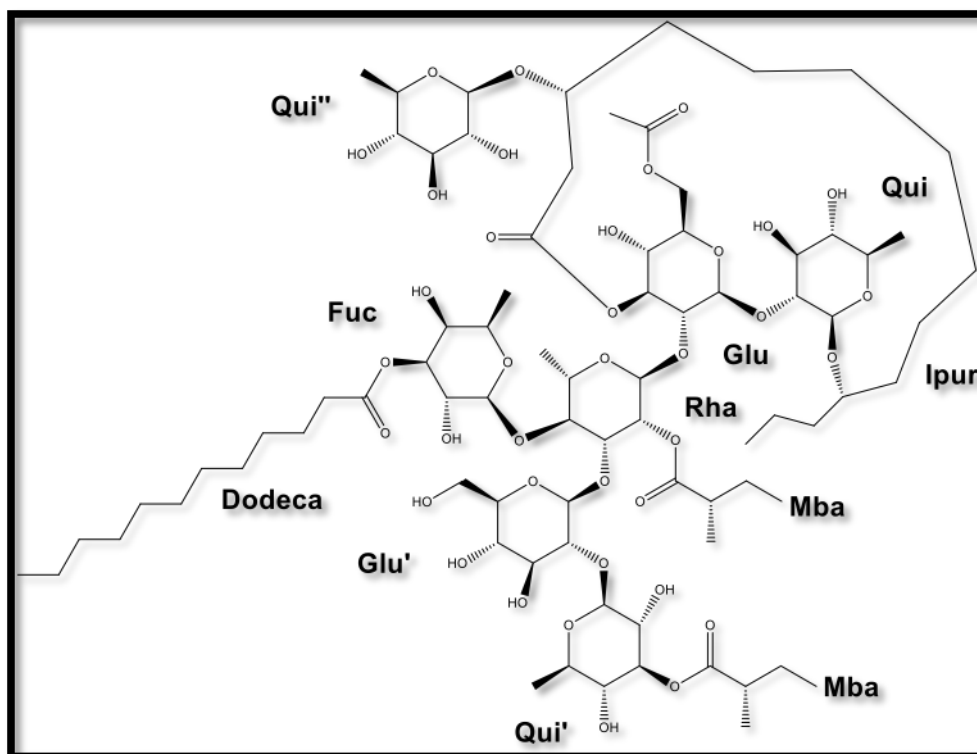


Figura 8. Estructura química del jalapinosido, bidesmósido del ácido ipurórico (C₁₄) donde un residuo monosacárido se une en la posición C-3 y el hexasacárido en la posición C-11. Abreviaturas: Qui = quinovosa; Glu = glucosa; Fuc = fucosa; Rha = ramnosa; Ipur = ac. Ipurórico; Dodeca = dodecanoilo; Mba = metilbutirolilo.

3. JUSTIFICACIÓN.

Debido a la falta de estudios químicos sobre la composición de la resina de escamonea comercial es necesario desarrollar un método analítico en la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la separación de las resinas glicosídicas presentes en esta droga cruda, las cuales son los principios responsables de la actividad purgante.

En el presente estudio se ensayaron diversas condiciones analíticas en HPLC para seleccionar aquellas que permitieran el mejor escalamiento a nivel semipreparativo para la separación de las resinas glicosídicas presentes en la muestra comercial en estudio.

4. OBJETIVOS.

4.1 Objetivos Generales.

Implementar condiciones instrumentales en HPLC para desarrollar una metodología que permita la resolución de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas solubles en metanol de una muestra comercial de escamonea; así como la purificación mediante HPLC y la elucidación estructural mediante técnicas espectrométricas y espectroscópicas de uno de sus ácidos glicosídicos mayoritarios.

4.2 Objetivos Específicos.

Llevar a cabo el fraccionamiento del extracto de metanol de una muestra comercial de la escamonea para el aislamiento de las resinas glicosídicas de mayor polaridad insolubles en agua.

Establecer las condiciones instrumentales de análisis por cromatografía líquida de alta resolución a nivel analítico, para lograr la máxima resolución de la compleja mezcla de resinas presentes en la fracción insoluble en agua.

Escalar las condiciones analíticas instrumentales a un nivel preparativo en la cromatografía de líquidos de alta resolución para lograr la separación de los constituyentes individuales presentes en las resinas glicosídicas de la escamonea comercial en cantidades adecuadas.

Realizar la purificación de uno de los ácidos glicosídicos mayoritarios de la resina glicosídica analizada así como, la elucidación estructural mediante métodos espectroscópicos y espectrométricos.

5. PARTE EXPERIMENTAL.

5.1 Procedimientos Generales.

5.1.1 Material vegetal.

La muestra consistió de 630.4 g de la resina comercial de escamonea adquirida en los Laboratorios Mixim S.A. de C.V.

5.1.2 Preparación del extracto orgánico.

El material seco y pulverizado se sometió a una extracción con metanol. Una vez concluido el tiempo de maceración, se filtró el extracto y se concentró a sequedad a presión reducida obteniéndose 63.04 g de muestra. El extracto se pulverizó y se realizaron tres lavados sucesivos con agua desionizada utilizando un sonicador Fisher Scientific FS1104 para mejorar la eficiencia de cada lavado. Este procedimiento ayudo a eliminar los compuestos más polares como azúcares, proteínas y sales. Posteriormente, se procedió a concentrar a sequedad el extracto y pesarlo en su respectivo contenedor, obteniéndose 60.23 g de extracto libre de la porción soluble en agua.

5.2 Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución.

5.2.1 Instrumentación.

Se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alta eficiencia (HPLC) para la separación de los glicolípidos marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) compuesto de un sistema de liberación de disolventes 600 E equipado con un detector de índice de refracción modelo 414. También, el equipo cuenta con una válvula de reciclaje tanto de la muestra como del disolvente en línea. El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de la información se realizaron por medio del software Empower 2 Pro (Waters). Durante el estudio se probaron diferentes fases estacionarias:

- Columna Fase reversa C₁₈, Symmetry Silica octadecilo (4.6 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud, 5 µm tamaño de partícula, Waters)
- Columna Aminopropilmetilo (NH₂), Columna YMC (10 mm de diámetro interno × 150 mm de longitud, 5 µm tamaño de partícula, Waters)
- Columna Aminopropilmetilo (NH₂), Columna µBondapak (7.8 mm de diámetro × 300 mm de longitud, 10 µm tamaño de partícula, Waters)

5.3 Procedimiento de preparación de la muestra.

5.3.1 Cromatografía de líquidos a nivel analítico.

Las condiciones a nivel analítico (Cuadro 1) se realizaron para obtener la mejor resolución de los picos de interés, así se emplearon diferentes soportes de fase reserva: octadecilsilano (C₁₈) y aminopropilmetilo (NH₂). Así como distintas fases móviles: acetonitrilo-agua y metanol-agua en diferentes proporciones. La separación se realizó de manera isocrática.

Cuadro 1. Condiciones cromatográficas para el análisis del extracto orgánico a nivel analítico mediante HPLC.

Fase estacionaria	Fase Móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la Muestra	Volumen de Inyección	Detector
Octadecilsilano (C ₁₈)	MeCN/H ₂ O (3:1)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeCN/H ₂ O (3:2)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeCN/H ₂ O (1:1)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeCN/H ₂ O (3:7)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 g/10µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeCN/H ₂ O (1:3)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeOH/H ₂ O (3:1)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeOH/H ₂ O (1:1)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeOH/H ₂ O (1:3)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
Aminopropilmetilo (NH ₂)	MeCN/H ₂ O (1:1)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
NH ₂	MeCN/H ₂ O (3:7)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
NH ₂	MeOH/H ₂ O (1:1)	0.4 mL/min 512 RIU	0.5 mg/10µL	10 µL	IR

5.3.2 Cromatografía de líquidos a nivel preparativo.

Encontradas las condiciones analíticas para la resolución de la muestra, éstas se escalaron para el análisis a nivel preparativo (Cuadro 2) con la finalidad de lograr cantidades suficientes de los constituyentes individuales para su caracterización. Para realizar el escalamiento de flujo a nivel preparativo se utilizó la siguiente fórmula:

$$F_p = F_a \left(\frac{L_p}{L_a} \right) \left(\frac{d_p^2}{d_a^2} \right)$$

F_p= Flujo a nivel preparativo

F_a= Flujo a nivel analítico

L_p= Longitud de la columna preparativa

d_p = Diámetro interno de la columna preparativa

d_a = Diámetro interno de la columna analítica

L_a = Longitud de la columna analítica

Cuadro 2. Condiciones cromatográficas en HPLC a nivel preparativo.

Tipo de Columna	Fase Móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de Inyección	Detector
Octadecilsilano (C ₁₈) Preparativa	MeCN/H ₂ O (3:1)	4.1 mL/min 512 RIU	200 mg/mL	500 µL	IR

Condiciones a nivel analítico:

Columna: Fase reversa C₁₈, Symmetry sílica octadecilsilano (4.6 mm de diámetro interno × 250 mm de longitud, 5 µm tamaño de partícula, Waters)

Fase móvil: MeCN-H₂O (3:1)

Flujo: 0.4 mL/min

Detector: Índice de refracción

Sensibilidad: 512 RIU

Concentración de la muestra: 4 mg/mL

Disolvente: MeOH

Volumen de inyección: 10 µL

Tipo de elución: Isocrática

Condiciones a nivel preparativo:

Columna: Fase reversa C₁₈, Symmetry sílica octadecilo preparativa (19 mm de diámetro interno × 150 mm de longitud, 7 µm tamaño de partícula, Waters)

Fase móvil: MeCN-H₂O (3:1)

Flujo: 4.1 mL/min

Detector: Índice de refracción

Sensibilidad: 512 RIU

Concentración de la muestra: 200 mg/mL

Disolvente: MeOH

Volumen de inyección: 500 µL

Tipo de elución: Isocrática

5.4 Preparación de los derivados.

5.4.1 Separación de los ácidos glicosídicos mediante HPLC.

La mezcla del extracto de metanol se analizó bajo las condiciones establecidas en el (Cuadro 1), sin éxito en la separación. En seguida la fracción insoluble en agua del extracto de MeOH, se saponificó (30 mL de una solución de KOH 5%) y se analizó mediante HPLC, empleando las fases estacionarias y sistemas de elución indicados en el (Cuadro 1) sin lograr la resolución de la mezcla. Por otra parte el producto de la reacción de saponificación se peracetiló con (CH₃CO)₂O/C₅H₅N y se volvieron a probar diferentes sistemas de elución (Cuadro 2). Se logró una completa separación de los productos utilizando la columna aminopropilmetilo en el sistema MeCN-H₂O (3:1). Para lograr la purificación de los compuestos, se realizaron varias inyecciones a

nivel preparativo, sólo que en esta ocasión se utilizó la técnica de corte de núcleo de la muestra para lograr una máxima separación y pureza. Se inyectaron 20 mg en volúmenes de 200 µL de la mezcla. La fase móvil utilizada fue una mezcla binaria de MeCN-H₂O (3:1), a un flujo de 1.4 mL/min. Estas condiciones permitieron la separación de 726.4 mg de muestra en cinco diferentes eluatos (Cuadro 3). La purificación de las distintas fracciones se realizó por la técnica de corte de núcleo por medio de la cromatografía de líquidos a nivel preparativo. Se evaporó el disolvente y determinó el punto de fusión de los productos en un aparato Fisher-Johns. Los datos que se obtuvieron se resumen en el Cuadro 3.

Por último, se registraron los espectros de RMN ¹H (Figura 9) y ¹³C (Figura 10) para establecer la pureza y, de esta manera, se seleccionó a la fracción IOEMBFNMA4 de la cual se obtuvo un buen rendimiento para realizar la purificación y la caracterización estructural. Para ello, se tomaron 150.0 mg y se sometieron a una segunda reacción de saponificación. El objetivo de esta segunda saponificación fue la generación del núcleo glicosídico mediante la remoción de los grupos acetatos ya que la mezcla de ácidos glicosídicos constitutivos no puede resolverse debido a su elevada polaridad. Al final, se obtuvo 28.5 mg de la muestra saponificada; la cual se dividió en dos partes para el registro de sus espectros de masas (2 mg) y RMN (23 mg). También, se registraron sus constantes físicas: punto de fusión y rotación óptica.

Cuadro 3. Rendimiento, tiempos de retención (nivel preparativo) y puntos de fusión de los ácidos glicosídicos constitutivos de la resina comercial escamonea (Laboratorios Mixim, S.A. de C.V.).

Número de eluato (<i>t_R</i>)	Clave de la muestra	Cantidad	Punto de Fusión
1 (5 min)	IOEMBFNMA1	0.0096 g	120-122 °C
2 (7.8 min)	IOEMBFNMA2	0.1061 g	114-116 °C
3 (11.5 min)	IOEMBFNMA3	0.0521 g	113-116 °C
4 (14.2 min)	IOEMBFNMA4	0.1797 g	92-95 °C
5 (40.5 min)	IOEMBFNMA5	0.1780 g	89-90 °C

5.5 Saponificación del producto IOFNMA-4.

La saponificación de la fracción IOFNMA-4 se realizó de la siguiente manera. En un matraz de bola de 25 mL se colocaron 150 mg de IOFNMA-4 y se adicionaron 10 mL de KOH acuosa al 5% m/v. La mezcla de reacción se sometió a reflujo (95 °C) durante 4 hrs. Posteriormente, la mezcla de reacción fue llevada a pH 5.0 con HCl 4N y en seguida se sometió a extracción con AcOEt (3 x 30 mL). La fase acuosa resultante fue extraída nuevamente con n-BuOH (3 x 30 mL). La fracción butanólica se llevó a sequedad obteniéndose un residuo de: 49.7 del compuesto IOFNMA-4S. Los espectros de RMN (¹H y ¹³C) indicaron la presencia de contaminantes de tipo ftalato. Para eliminar esta impureza cada una de las muestras (IOFNMA-4SA y IOFNMA-4SB) se sometió a una partición con 5 mL de una mezcla MeOH/H₂O 1:1 y extrayendo con una mezcla hexano/AcOEt 1:1 (5 mL x 3). Este procedimiento permitió obtener 30.7 mg del derivado IOFNMA-4.

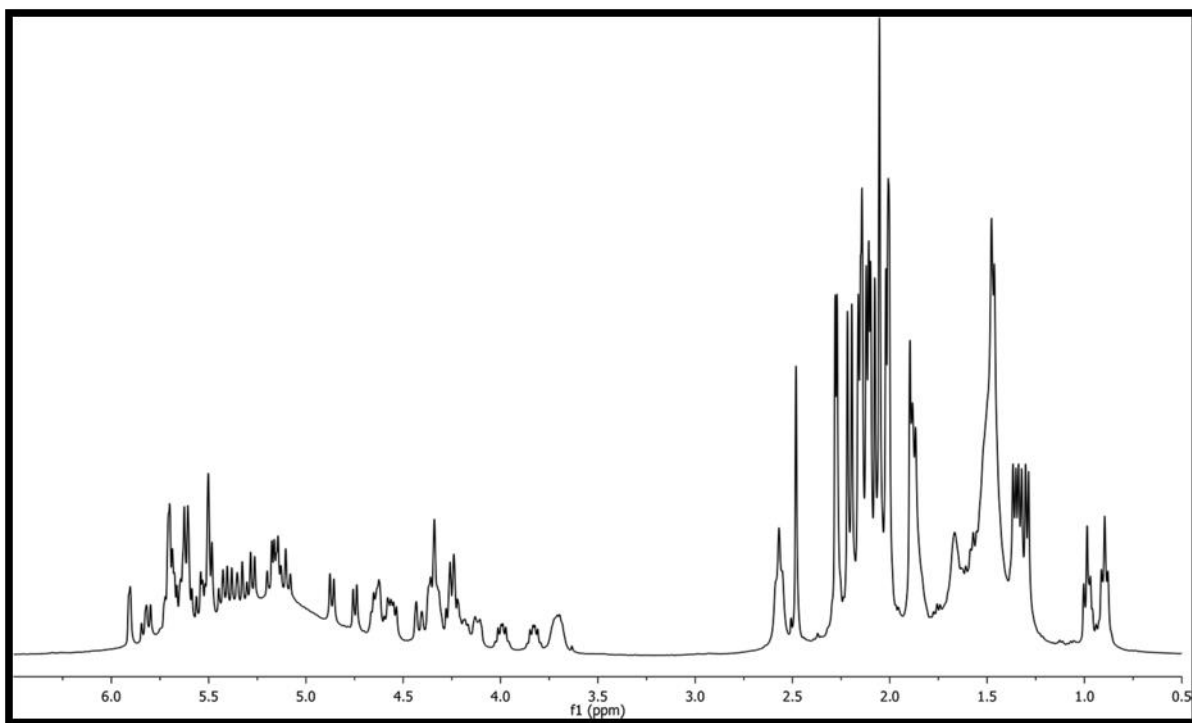


Figura 9. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, C₅D₅N) del derivado peracetilado IOFNMA-4.

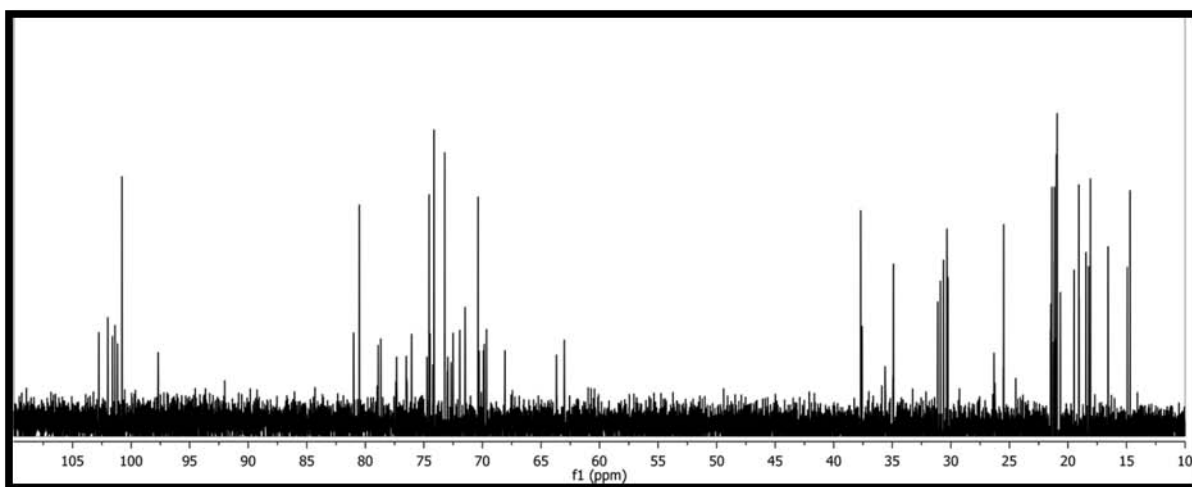


Figura 10. Espectro de RMN ¹³C (100 MHz, C₅D₅N) del derivado peracetilado IOFNMA-4.

5.6 Resolución del extracto de metanol de la resina comercial de la escamonea.

El fraccionamiento del extracto de metanol se realizó mediante HPLC utilizando la técnica de corte de núcleo a nivel preparativo. Se inyectaron repetidamente 100 mg de extracto en 500 μ L de MeOH utilizando una columna de fase reversa C₁₈ y las condiciones instrumentales descritas en el (Cuadro 2). Las muestras se filtraron a través de acrodiscos GPH, provistos de una membrana de nylon de 0.45 μ m (PALL Gelman Laboratory). Estas condiciones permitieron el fraccionamiento de 14.55 g de extracto en 9 diferentes fracciones primarias.

5.6.1 Reacción de bencilación.

En un matraz bola de 5 mL se colocaron 12 mg de la fracción L9 ($T_R = 33.36$ min) y se adicionaron 199.7 mg de carbonato de potasio (previamente seco) como un agente higroscópico suave, se tapó el matraz con un tapón septum y se selló con parafilm. Se eliminó la humedad con ayuda de una atmosfera de N₂; posteriormente, se agregaron 0.5 mL de DMF y se mantuvo con agitación constante durante 15 minutos y se colocó el matraz a un baño de hielo. Se adicionaron 0.25 mL de bromuro de bencilo, poco a poco con agitación constante. Después de 10 hrs de agitación constante a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se diluyó con 4 mL de agua y se extrajo con tres porciones de diez mL cada una de éter. EL residuo orgánico se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. Posteriormente, se realizó la misma reacción con 50 mg adicionales de la muestra L9 ($T_R = 33.36$ min) por lo que se ajustaron las cantidades de los reactivos para utilizar el mismo procedimiento descrito.

6. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Análisis mediante HPLC del extracto de metanol.

El extracto de metanol de la resina de escamonea, libre de la fracción soluble en agua (14.55 g), se fraccionó por medio de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia utilizando las condiciones a nivel preparativo descritas anteriormente en la parte experimental para obtener 9 fracciones primarias. La cromatografía líquida de alta eficiencia fue empleada para lograr la resolución parcial de los constituyentes individuales presentes en cada una de las fracciones primarias enriquecidas con resinas glicosídicas a través del empleo de la técnica de corte de núcleo.¹⁷

Se inició con el establecimiento de las condiciones a nivel analítico para elegir aquella que permitieran una mayor resolución de la muestra. Posteriormente, se realizó el escalamiento de las mejores condiciones analíticas instrumentales a nivel preparativo para separar cantidades suficientes de los constituyentes individuales mediante el empleo de la técnica de corte de núcleo. La separación se realizó de manera isocrática de acuerdo con los procedimientos descritos anteriormente en la parte experimental.

Para obtener las distintas fracciones ricas en resinas glicosídicas, se procedió a realizar las pruebas analíticas en fase reversa utilizando columnas C_{18} así como NH_2 y un detector de índice de refracción y diferentes fases móviles hasta encontrar las condiciones de elución adecuadas. Iniciando con una columna C_{18} y con una mezcla de fases binarias de MeCN- H_2O en diferentes proporciones (3:1, 3:2, 1:1, 3:7, 1:3) así como mezclas MeOH- H_2O (3:1, 1:1, 1:3). Posteriormente, se probó con una columna NH_2 con una mezcla de fases binarias de MeCN- H_2O en (1:1, 3:7) y una mezcla de MeOH- H_2O en proporción (1:1). El sistema de elución que permitió la mejor resolución fue la mezcla binaria de MeCN- H_2O en proporción (3:1) en una columna C_{18} donde se observó un conjunto de picos con tiempos de retención entre 7 min y 27 min. Así se detectaron nueve picos mayoritarios designados arbitrariamente como las fracciones: L1: t_R 7.88 min; L2: t_R 9.89 min; L3: t_R 11.63 min; L4: t_R 12.20 min; L5: t_R 13.79 min; L6: t_R 15.85 min; L7: t_R 17.38 min; L8: t_R 18.61 min, L9 t_R : 27.42 min (Figura 11). Una vez encontradas estas condiciones analíticas apropiadas para la separación, se procedió a realizar el escalamiento de las mismas a nivel preparativo, Utilizando una columna C_{18} , Symmetry sílica 19 mm de diámetro interno \times 150 mm de longitud, 7 μm tamaño de partícula; Fase móvil: MeCN- H_2O (3:1); Flujo: 4.1 mL/min; Detector de Índice de refracción; Concentración de la muestra: 100 mg/500 μL ; Volumen de inyección: 500 μL . En el análisis de la muestra por medio de HPLC se observa el mismo número de picos: L1: t_R : 7:87 min, L2: t_R : 9:71 min, L3: t_R : 10:40 min, L4: t_R : 12:15 min, L5: t_R : 15:27 min, L6: t_R : 17.99 min, L7: t_R : 24:67 min, L8: t_R : 28: 31 min, L9: t_R : 33:36 min (Figura 12, Cuadro 4). Una vez que fueron establecidas las condiciones de separación, se llevaron a cabo pruebas a nivel preparativo mediante inyecciones sucesivas a una concentración de 100 mg de muestra en 500 μL de metanol y utilizando la técnica de corte de núcleo¹⁷ hasta reunir cantidades suficientes de las fracciones primarias L1-L9. Las cantidades obtenidas para cada fracción se resumen en el Cuadro 6.

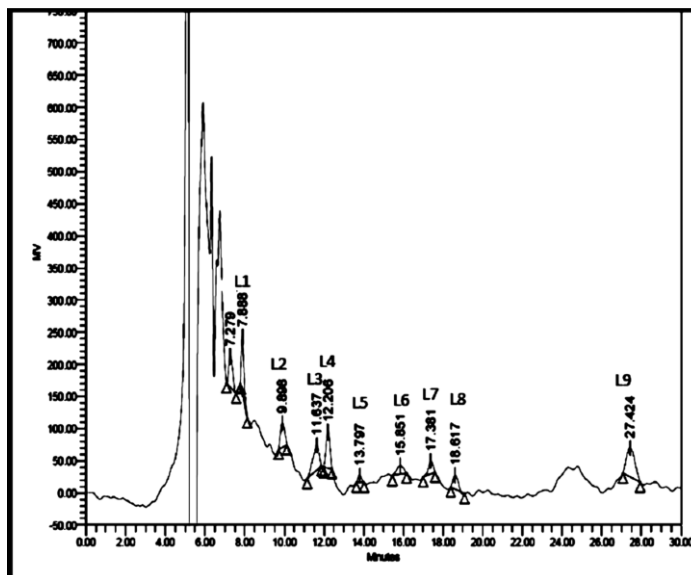


Figura 11. Perfil cromatográfico en HPLC (nivel analítico) del extracto de metanol de la escamonea. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (4.6 \times 250 mm, 5 μm); fase móvil: MeCN- H_2O (3:1), flujo de elución 0.4 mL/min; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 10 μL (4 mg/mL).

Cuadro 4. Cantidades obtenidas para cada fracción primaria.

Número de eluato (RMN ¹ H)	Tiempo de retención	Clave de la muestra	Cantidad (mg)
1 (Anexo 1)	7:87 min	L1	245 mg
2 (Anexo 2)	9:71 min	L2	265 mg
3 (Anexo 3)	10:40 min	L3	234 mg
4 (Anexo 4)	12:15 min	L4	270 mg
5 (Anexo 5)	15:27 min	L5	145 mg
6 (Anexo 6)	17:99 min	L6	284 mg
7 (anexo 7)	24:67 min	L7	331 mg
8 (Anexo 8)	28:31 min	L8	400 mg
9	33:36 min	L9	379 mg

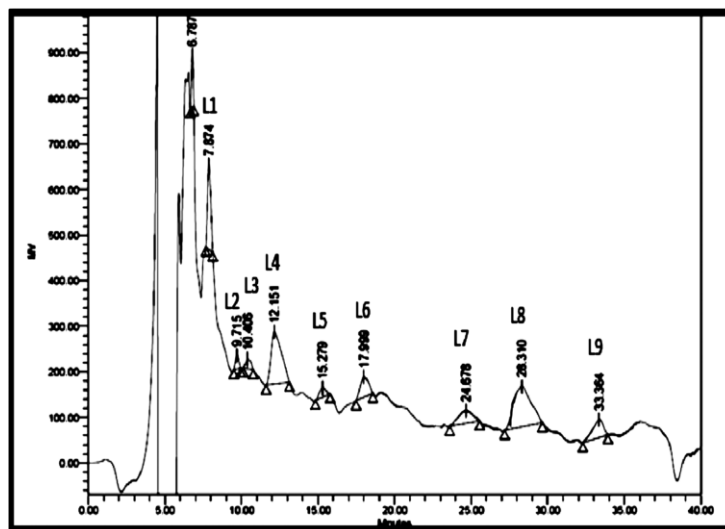


Figura 12. Perfil cromatográfico en HPLC (nivel preparativo) del extracto de metanol de la resina comercial de escamonea. Condiciones instrumentales: columna C₁₈ Preparativa (19 × 150 mm, 7 μm tamaño de partícula; fase móvil: MeCN-H₂O (3:1); flujo de elución: 4.1 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra 500 μL (100 mg/500 μL).

6.1.1 Purificación de la fracción L9.

Una vez realizado la técnica de corte del núcleo para cada uno de los eluatos, se sometieron a un análisis espectroscópico de RMN ¹H con el objetivo de establecer la presencia de resinas glicosídicas en cada una de las fracciones L1 a L9. Toda ellas contienen resinas glicosídicas y sus espectros se incluyen en el anexo al final de esta disertación. A continuación, se procedió con la separación de los compuestos presentes en la fracción L9 de la que se obtuvo un buen rendimiento y que al ser analizada mediante HPLC a nivel analítico solo se observa la presencia de un componente mayoritario, con una homogeneidad cromatográfica evidenciada a través del

pico gaussiano con un tiempo de retención de 23.16 min (Figura 13). El resultado de la técnica de corte del núcleo de la fracción L9 fue bueno, sin embargo, al someter la fracción a la purificación por medio de la técnica de reciclaje del pico a nivel preparativo, la muestra se degradó probablemente por un fenómeno de transesterificación intramolecular de los sustituyentes que esterifican al núcleo oligosacárido.²⁰ Estas purificaciones fueron infructuosas debido al desdoblamiento del pico durante la elución, resultando en la pérdida de muestra (62 mg).

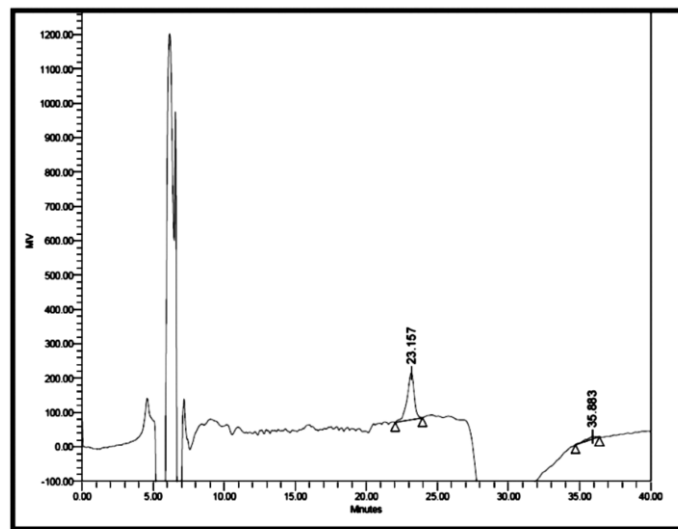


Figura 13. Perfil cromatográfico por HPLC (nivel analítico) de la fracción L9. Condiciones instrumentales: columna C₁₈ (4.6 × 250 mm, 5 μm); fase móvil: MeCN-H₂O (3:1); flujo 0.4 mL/min; detector IR; volumen de inyección de la muestra: 10 μL (4 mg/mL).

Por lo tanto, se optó por realizar una reacción de protección de los grupos con bromuro de bencilo²¹ y evitar la transesterificación de los ésteres en el núcleo oligosacárido, facilitando el proceso de purificación de esta muestra. La reacción de bencilación se realizó con 12 mg de la muestra obteniéndose un rendimiento del 44 % por lo que se repitió la reacción con 50 mg adicionales de la muestra ajustando las cantidades de los reactivos. Una vez realizada la reacción de bencilación se procedió a analizar nuevamente la muestra mediante HPLC a nivel analítico (Figura 14) observándose el pico de interés con un tiempo de retención de 13.71 minutos y otro pico mayoritario con un tiempo de retención de 7.56 min, correspondiente al alcohol bencilico residual, el cual fue identificado mediante coelución con una muestra auténtica de este subproducto de reacción proveniente de la hidrólisis de la materia prima (bromuro de bencilo).

6.1.1.1 Purificación de la muestra L9 bencilada.

Para lograr la purificación de la muestra bencilada L9 se utilizó de nueva cuenta HPLC mediante la técnica de corte del núcleo a nivel preparativo (Figura 15). Como resultado de la resolución de la muestra L9 se obtuvieron 27.5 mg del derivado bencilado, los cuales fueron analizados para caracterizar su estructura química mediante el empleo de diferentes técnicas espectroscópicas y espectrométricas.

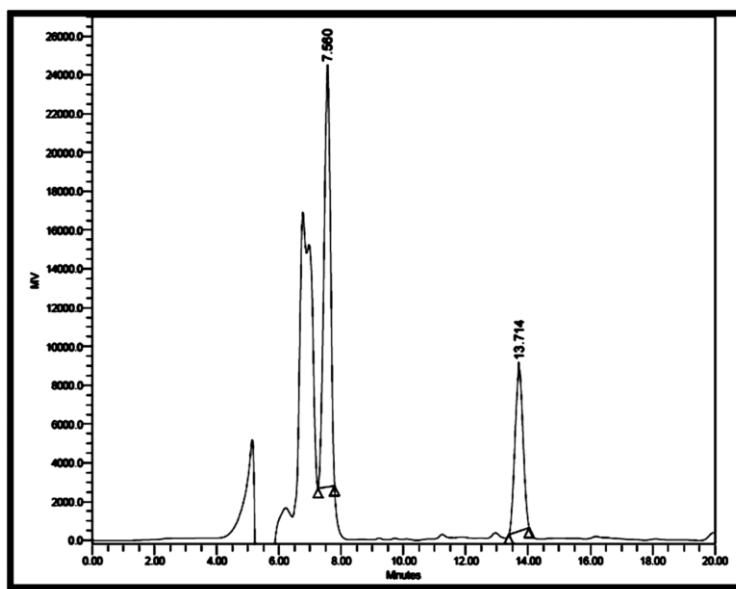


Figura 14. Perfil cromatográfico por HPLC (nivel analítico) de la fracción primaria L9 bencilada. Condiciones instrumentales: columna C_{18} (4.6×250 mm, $5 \mu\text{m}$); fase móvil: MeCN- H_2O (3:1), flujo: 0.4 mL/min; detector IR; volumen de inyección de la muestra: $10 \mu\text{L}$ (4 mg/mL).

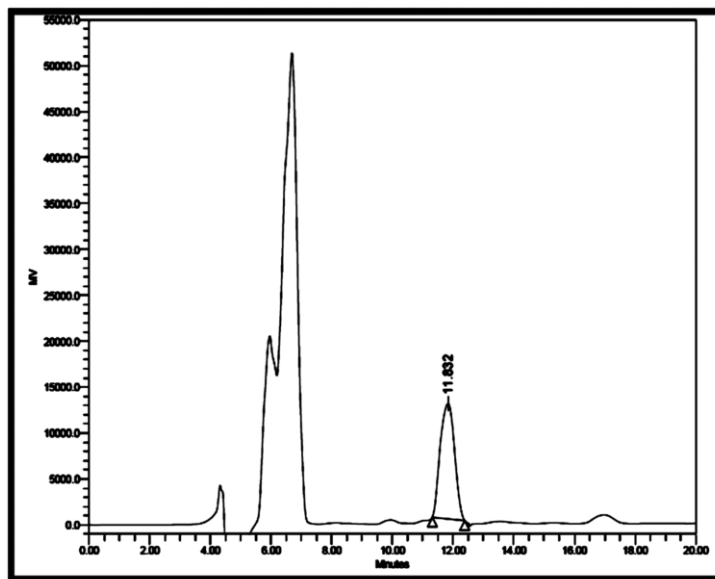


Figura 15. Perfil cromatográfico por HPLC (nivel preparativo) de la fracción L9 bencilada. Condiciones instrumentales: columna C₁₈ preparativa (19 × 150 mm, 7 μm); fase móvil: MeCN-H₂O (3:1), flujo: 4.1 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: 200 μL (10 mg/200 μL).

6.2 Purificación del ácido púrgico C.

Con el objetivo de realizar la purificación de la mezcla de ácidos glicosídicos presentes en la resina comercial de la escamonea, se llevó a cabo la derivatización del producto obtenido de la hidrólisis alcalina de la porción insoluble en agua del extracto de metanol. Así, se preparó el derivado peracetilado del ácido glicosídico utilizando anhídrido acético y piridina. Posteriormente, se requirió del empleo de la técnica de cromatografía líquida a nivel analítico y preparativo para su purificación: columna amino (YMC, waters); fase móvil, MeCN-H₂O (3:1), flujo de 1.4 mL/min (nivel analítico) y 2.6 mL/min para mantener la resolución de la muestra problema a nivel semipreparativo (concentración de la muestra: 20 mg/200 μL). Estas condiciones instrumentales permitieron determinar la complejidad de la muestra y los tiempos de retención correspondientes a los cinco productos presentes (Cuadro 3). El pico mayoritario **IOEMBFNMA4** con un tiempo de retención de 14.18 min fue purificado a través de las técnicas de sobrecarga de columna y corte de núcleo, en combinación con el rasurado y el reciclaje del pico durante 14 ciclos (Figura 16). Posteriormente, se llevó a cabo la caracterización estructural mediante el análisis espectral del producto utilizando las técnicas de espectrometría de masas y resonancia magnética nuclear.

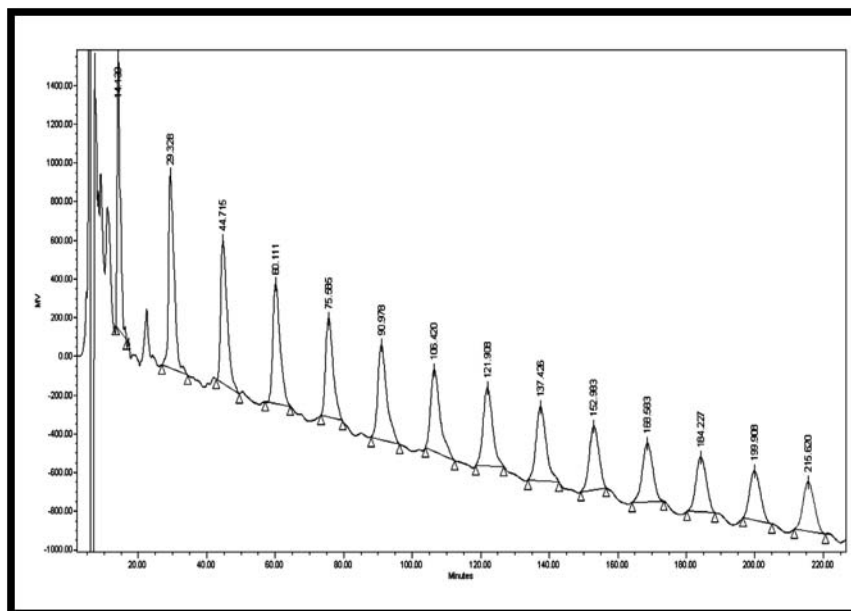


Figura 16. Cromatograma generado mediante la técnica de reciclaje en HPLC de la muestra **IOEMBFNMA4** conteniendo al ácido púrgico C.

6.2.1 Caracterización estructural del ácido púrgico C.

La resonancia magnética nuclear (RMN) de carbono (^{13}C) de los ácidos glicosídicos (productos de la saponificación de las resinas) genera datos que se han utilizado como “huellas digitales” para el reconocimiento del patrón oligosacárido constitutivo de cada especie de convolvulácea analizada.³ Las señales anoméricas alrededor de δ 98-110, fuera de la región de mayor sobreposición (δ 60-80), permiten una estimación inmediata del número de los diferentes residuos monosacáridos de cada ácido glicosídico y se pueden utilizar como señales estructurales “reporteras” para cada núcleo oligosacárido.

Así, para los cuatro ácidos glicosídicos mayoritarios de la resina en estudio (Cuadro 3) se pueden asignar las estructuras de los dos hexasacáridos, ácidos púrgicos A y B, caracterizados a partir de *I. purga*,³ para los picos con tiempos de retención de 7.8 min (IOEMBFNMA2) y 11.5 min (IOEMBFNMA3), respectivamente. Los picos con tiempos de retención de 14.2 min (IOEMBFNMA4) y 40.5 min (IOEMBFNMA5) corresponden a heptasacáridos. El compuesto de mayor tiempo de retención corresponde al ácido púrgico D y cuya estructura fue descrita recientemente.²² El compuesto con tiempo de retención de 14.2 min se denominó con el nombre de ácido púrgico C. La Figura 12 ilustra el patrón observado en la región anomérica alrededor de δ 98-110 para cada uno de estos ácidos. Esta comparación permitió una valoración inmediata del número de residuos monosacáridos en cada ácido glicosídico y permitió la asignación de las señales para la RMN H^1 y C^{13} del nuevo núcleo oligosacárido.

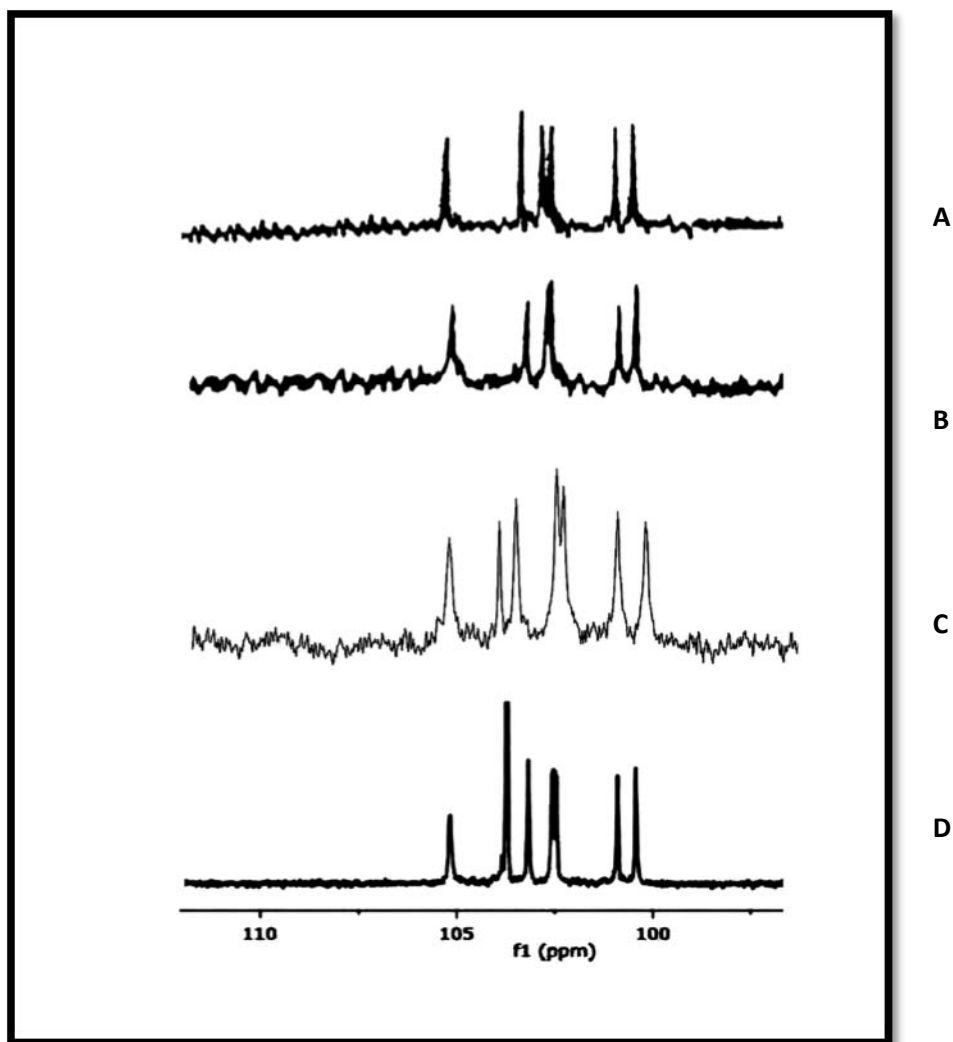
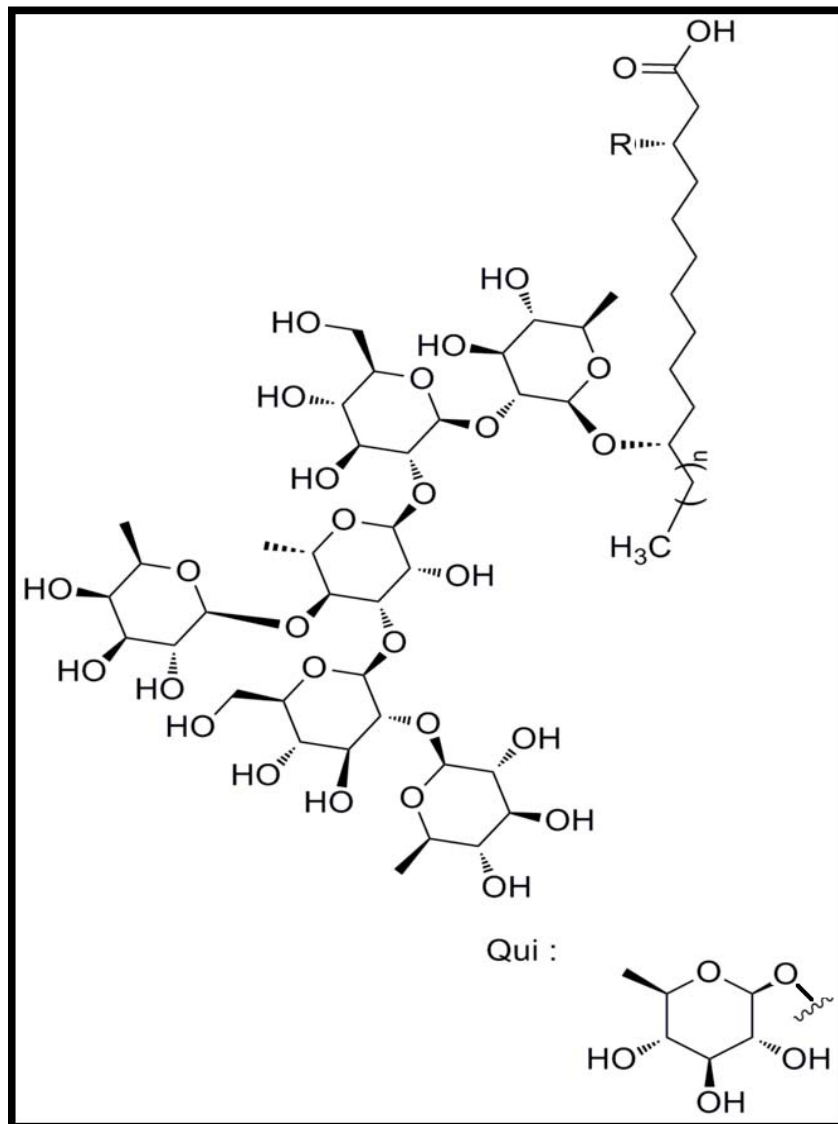


Figura 17. Expansión de las señales correspondientes a los carbonos anoméricos del espectro de RMN ^{13}C en δ_c 95-110 ppm. A) hexasacárido del ácido púrgico A; B) hexasacárido del ácido púrgico B; C) heptasacárido de la muestra IOEMBFNMA4, ácido púrgico C; D) heptasacárido del ácido púrgico D.

Los ácidos púrgicos A y B corresponden a monodesmósidos de los ácidos convolvulinólico (C_{14} , 11S-hidroxitetradecanoico) y jalapινόlico (C_{16} , 11S-hidroxihexadecanoico) donde la cadena hexasacárida se une en la posición C-11.³ En tanto que los ácidos púrgicos C y D corresponden a bidesmósidos de los ácidos ipurólico (C_{14} , 3S,11S-dihidroxitetradecanoico) e ipoleárico (C_{16} , 3S,11S-dihidroxihexadecanoico)²² donde un residuo monosacárido se une en la posición C-3 y el hexasacárido en la posición C-11 (Figura 18). El análisis del espectro de RMN- ^1H (Figura 19) permitió la identificación de siete señales dobles en la zona de 4.7 a 6.5 ppm correspondientes a los protones anoméricos de las unidades de monosacáridos en la molécula, en concordancia con el número de señales observadas para los carbonos anoméricos (Figura 17). Además se observan cinco señales dobles presentes en la zona 1.4 a 1.9 ppm características de los grupos metilo de 6-desoxihexosas, lo que indica que de los siete monosacáridos, cinco son metilpentosas. Por otra

parte el análisis de los espectros bidimensionales de RMN (COSY) permitió la asignación de cada uno de los protones vecinales de las unidades monosacáridas y, con ello, resolver la zona tan compleja producida por la sobre posición de los protones metinos (3.5-6.0 ppm). Esta asignación se realizó por comparación con los datos descritos para los ácidos púrgicos A y B (Cuadro 4).³



Ácido púrgico	R	n
A	H	2
B	H	4
C	Qui	2
D	Qui	4

Figura 18. Estructura química de los ácidos púrgicos A-D.

Cuadro 4. Desplazamientos químicos (δ_H y δ_C) en RMN 1H y ^{13}C para el ácido púrgico C.

Ácido púrgico C					
Posición	δ_H	δ_C	Posición	δ_H	δ_C
Qui-1	4.71 d (7.6)	102.7	Qui'-1	5.20 d (7.6)	105.0
2	4.17-4.10 ^a	80.1	2	4.08-4.01 ^a	77.4
3	4.43 dd (8.4, 8.3)	78.5	3	4.03-3.97 ^a	77.7
4	3.45 dd (9.0, 8.4)	76.6	4	3.63 dd (9.0, 8.8)	76.7
5	3.71-3.62 ^a	70.5	5	3.78-3.73 ^a	77.6
6	1.45 d (6.0)	18.3	6	1.64 d (5.4)	18.5
Glc-1	5.64 d (7.6)	103.6	Fuc-1	5.62 d (7.5)	102.8
2	4.29-4.22 ^a	74.8	2	4.15-4.05 ^a	73.1
3	4.21-4.10 ^a	77.4	3	4.10-4.04 ^a	75.7
4	4.07-4.01 ^a	71.0	4	4.05-3.97 ^a	71.0
5	3.81-3.75 ^a	77.6	5	3.76-3.72 ^a	71.2
6a	4.37 dd (9.1, 3.0)	62.2	6	1.59 d (6.3)	18.8
6b	4.36-4.29 ^a		Qui''-1	4.75 d (7.6)	104.0
Ram-1	6.28 br s	101.0	2	4.01-3.89 ^a	75.8
2	4.86 dd (3.0, 1.5) ^a	71.5	3	4.20-4.09 ^a	78.9
3	5.16 dd (9.1, 3.0)	78.7	4	3.66-3.62 ^a	72.2
4	4.86-4.76 ^a	79.3	5	3.73-3.68 ^a	77.3
5	5.06 dd (9.0, 6.0)	67.9	6	1.47 d (6.2)	16.9
6	1.83 d (6.0)	18.9	Ipur-1		180.7
Glc'-1	6.01 d (7.8)	101.6	2a	2.57-2.51 ^a	38.0
2	4.07-3.97 ^a	83.7	2b	2.51-2.46 ^a	
3	4.44 dd (9.0, 8.6) ^a	76.8	3	4.30-4.25 ^a	63.8
4	4.08-4.02 ^a	72.7	11	3.85 m	78.8
5	4.20-4.13 ^a	77.8	14	0.90 t (7.1)	14.2
6a	4.47-4.41 ^a	63.1			
6b	4.20-4.14 ^a				

^a Señales Sobrepuestas.

^a Datos registrados en C_5D_5N . Los desplazamientos químicos (δ) están en ppm en relación al TMS. Los acoplamientos ($^3J_{HH}$) se encuentran en paréntesis y se expresan en Hz.

^b Abreviaciones; sa= señal simple ancha, d= señal doble, t= señal triple, q=señal cuádruple, m = señal múltiple. Las asignaciones se basaron en los experimentos 1H - 1H , COSY, TOCSY, HSQC, HMBC. Abreviaciones: Qui = quinovosa, Glc = glucosa, Fuc = fucosa, Ram = ramnosa, Ipur = ácido ipurólico.

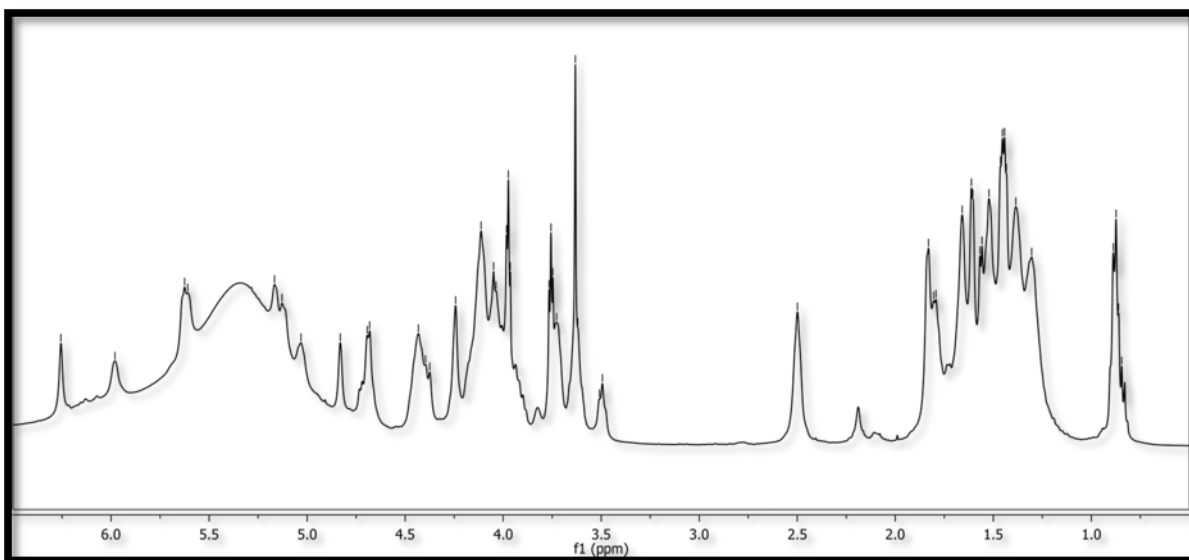


Figura 19. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del ácido púrgico C.

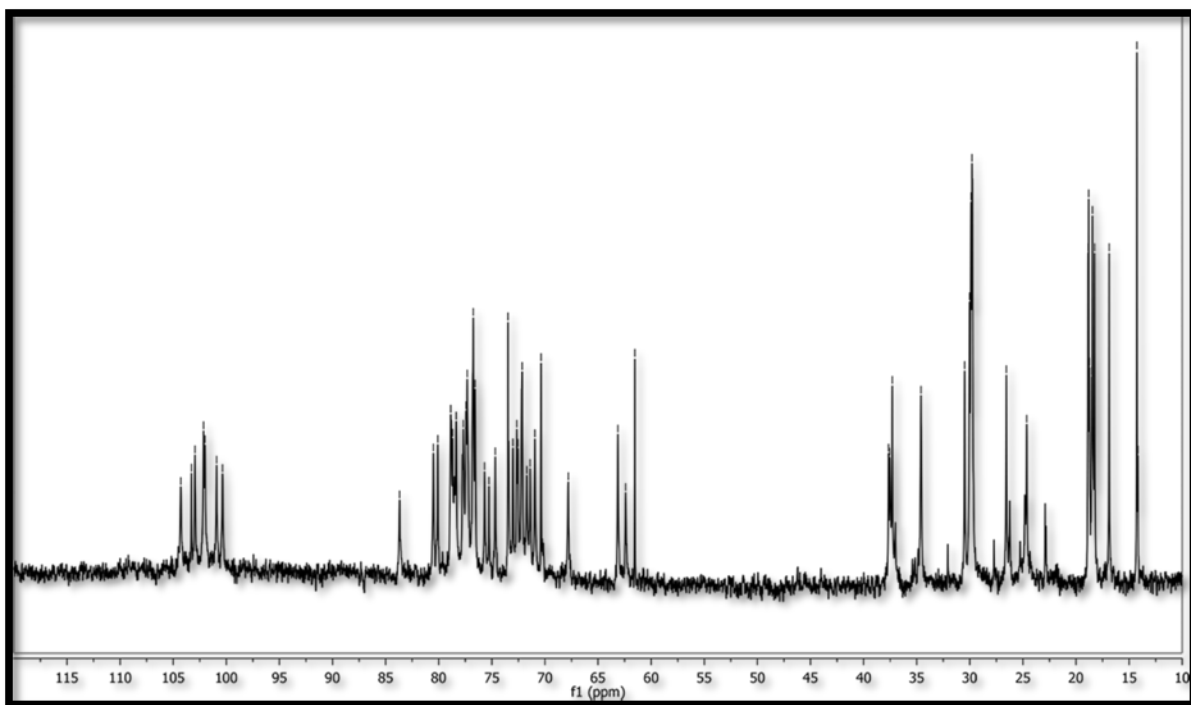


Figura 20. Espectro de RMN ^{13}C (100 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) del ácido púrgico C.

Un segundo grupo de señales características en el espectro de RMN ^{13}C (Figura 20) son las que se ubican entre 60-85 ppm que corresponden a los carbonos oxigenados. De estas señales destacan las dos señales para los hidroximetilenos de las unidades de glucosa centradas en 61 y 63 ppm. En el espectro ESI-MS se observaron los picos que se generan durante las fragmentaciones que provocan los enlaces glicosídicos (Figura 21).³ Los resultados de esta técnica espectrométrica permitieron calcular el peso molecular del ácido glicosídico C (IOEMBNMA4): 1314.5939 que corresponde con la fórmula $\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{O}_{34}$. El patrón de fragmentación evidenció la pérdida consecutiva de unidades de metilpentosa (1191 [M + Na - 146]⁺), metilpentosa (1045 [1191 - 146]⁺), hexosa (883 [1045 - 162]⁺), metilpentosa (737 [883 - 146]⁺), metilpentosa 591 [737 - 146]⁺. Este patrón de fragmentación es similar al registrado para el ácido púrgico D²² y confirma la presencia de cinco unidades de metilpentosa y dos unidades de hexosa. El espectro de masas generado por electrospray en el modo positivo para el ácido púrgico C se ilustra en la Figura 21. Los resultados anteriores permitieron establecer la estructura del ácido púrgico C (IOEMBFNMA4) como 11-O-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-O-β-D-glucopiranosil-(1→3)-O-[β-D-fucopiranosil-(1→4)]-O-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-O-β-D-glucopiranosil-(1→2)-O-β-D-quinovopiranosil-[3-O-β-D-quinovopiranosido] del ácido 3S,11S-dihidroxitetradecanóico.

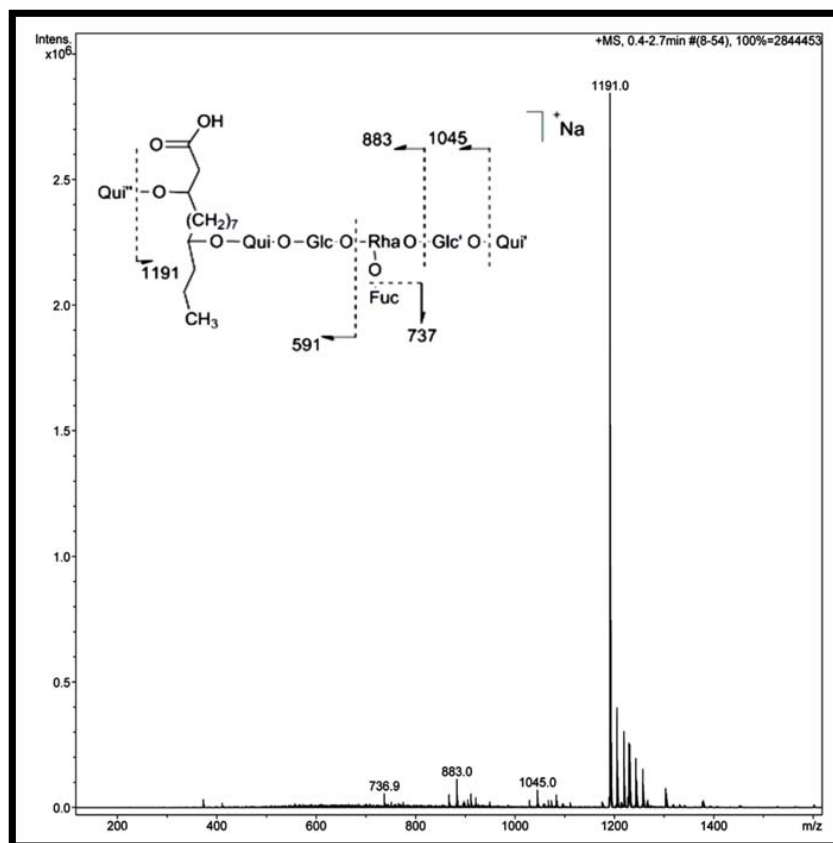


Figura 21. Espectro de masas (MS-EI, modo positivo) y patrón de fragmentación para el ácido púrgico C.

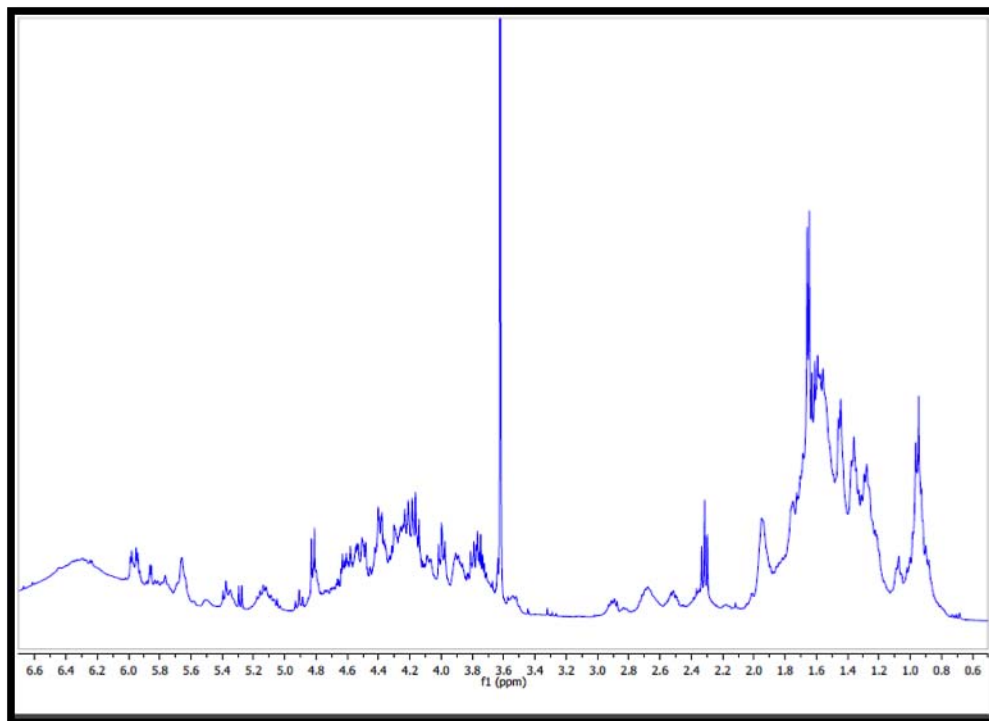
7. CONCLUSIONES

1.- Mediante el empleo de la técnica de corte de núcleo en la cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa [columna C₁₈; MeCN-H₂O, (3:1)], se realizó el fraccionamiento preliminar del extracto metanólico de la resina comercial de escamonea y se obtuvieron nueve fracciones a partir de la mezcla de resinas glicosídicas insolubles en agua. Mediante su análisis espectroscópico en la resonancia magnética nuclear se puede concluir que los componentes mayoritarios aislados corresponden a resinas glicosídicas.

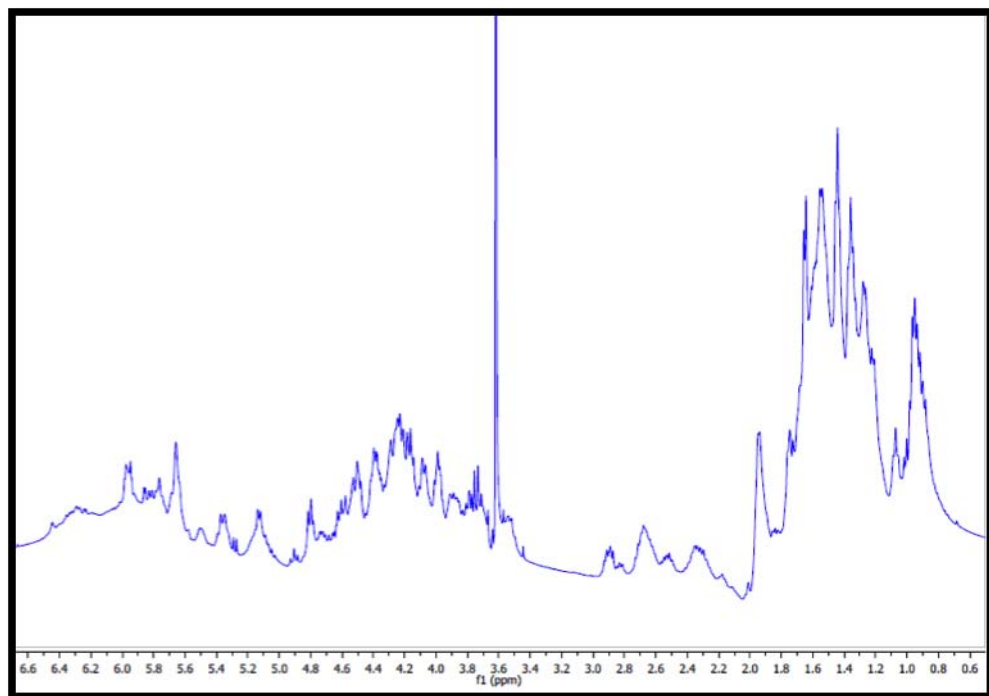
2.- Las técnicas analíticas desarrolladas para la purificación de los constituyentes individuales de las resinas glicosídicas de la escamonea podrán ser utilizadas como protocolos analíticos de utilidad en el desarrollo de técnicas instrumentales a nivel semipreparativo y preparativo para posteriores estudios conducentes al aislamiento y la purificación de esta clase de productos naturales de alta polaridad.

3.- El empleo de las técnicas analíticas como la resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas permitieron la caracterización estructural del ácido púrgico C que representa uno de los núcleos glicosídicos constitutivos de las resinas de la escamonea y cuyas propiedades físicas y espectroscópicas no se han descrito en la literatura. Sólo, se había indicado su existencia en forma indirecta a través de la caracterización estructural del jalapínosido, un bidesmósido del ácido ipurólico (ácido 3S, 11S-dihidroxitetradecanoico), ya que este producto natural se obtuvo en una cantidad insuficiente para realizar su saponificación.

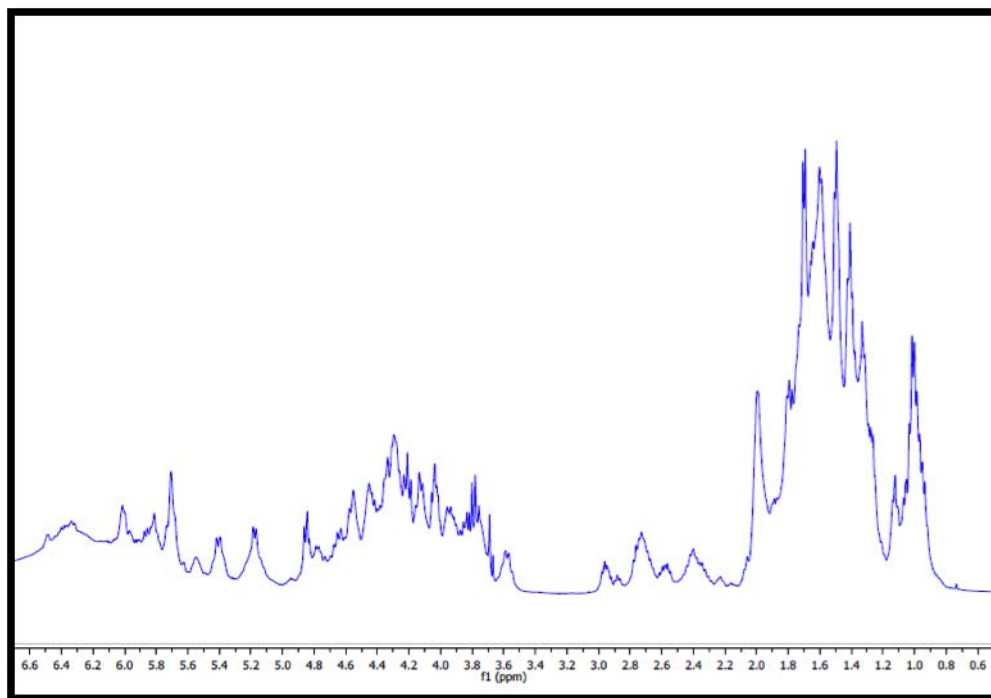
8. ANEXOS



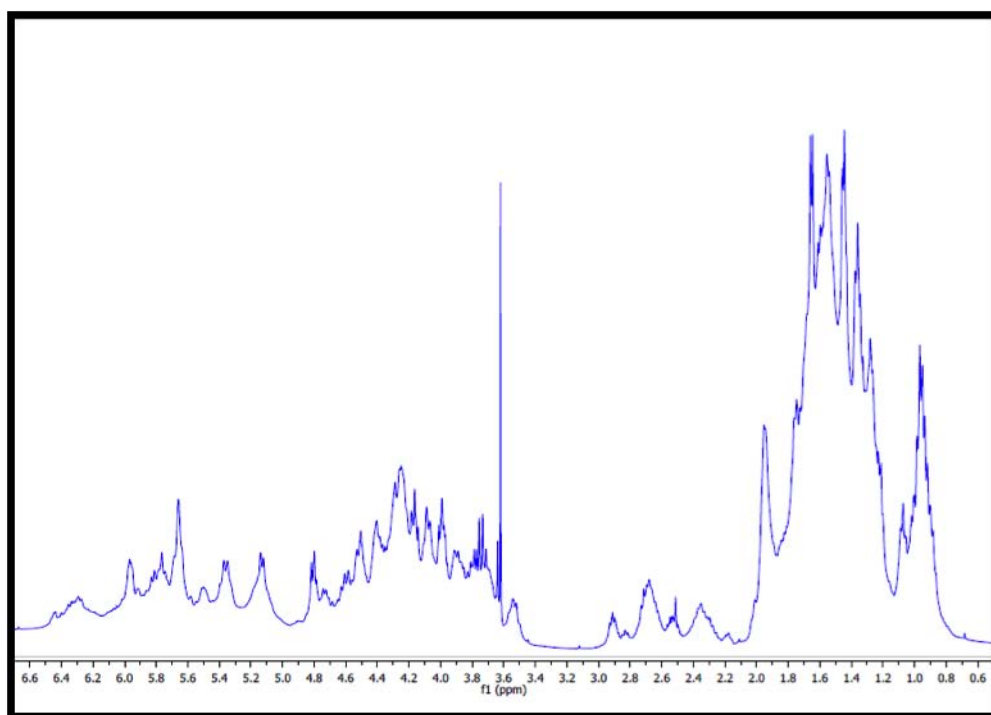
Anexo 1. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, C₅D₅N) de la fracción L1.



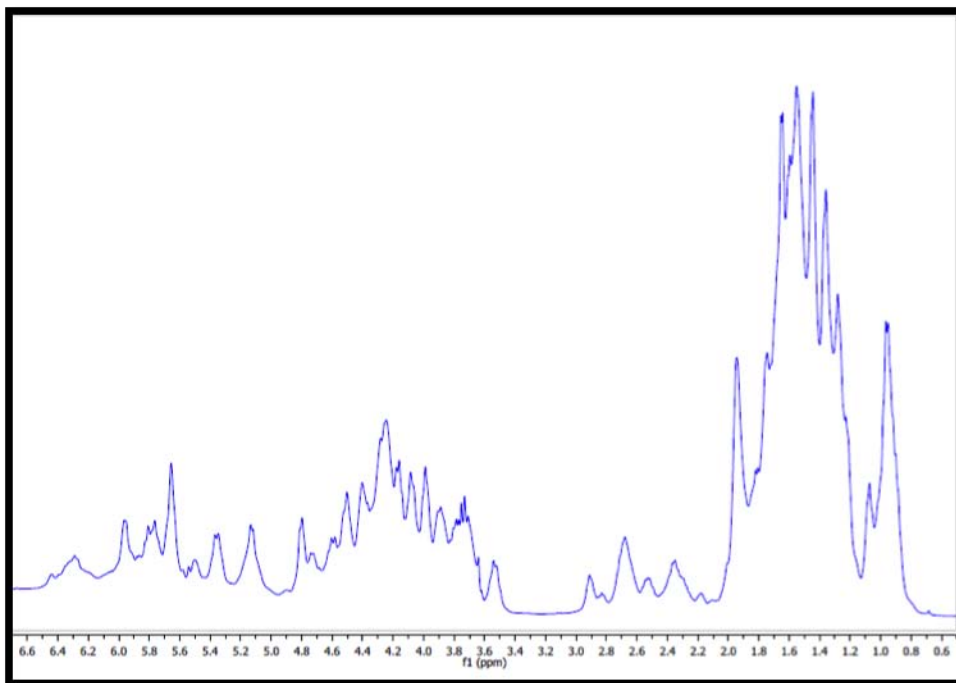
Anexo 2. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, C₅D₅N) de la fracción L2.



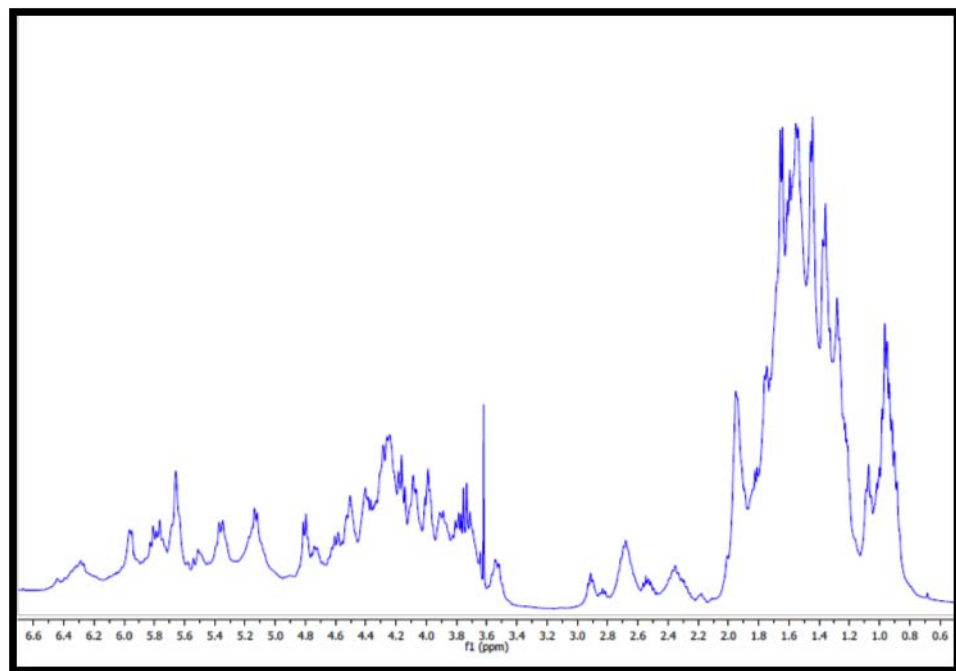
Anexo 3. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, C₅D₅N) de la fracción L3.



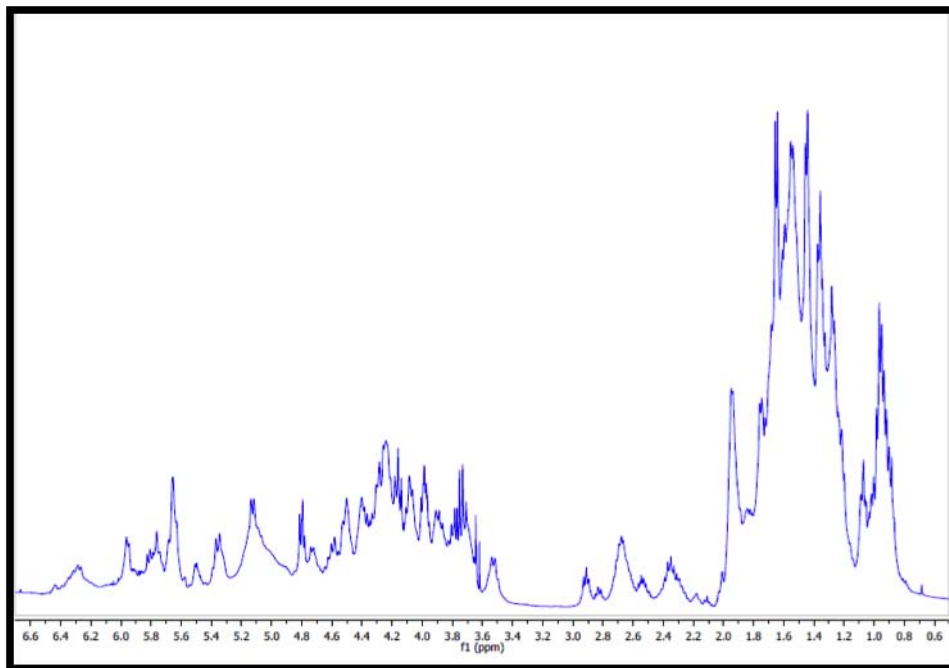
Anexo 4. Espectro de RMN ¹H (400 MHz, C₅D₅N) de la fracción L4.



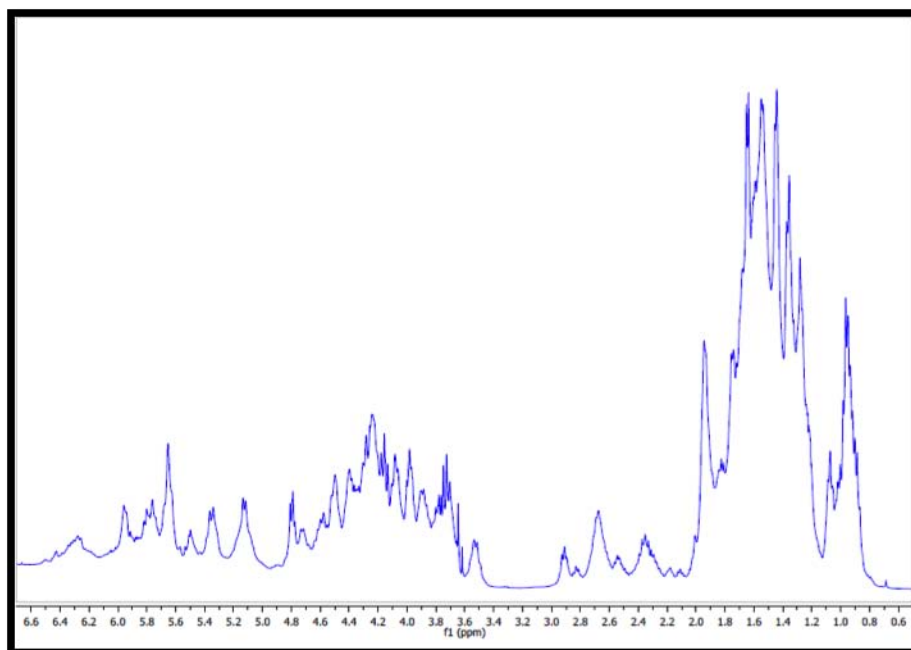
Anexo 5. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la fracción L5.



Anexo 6. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la fracción L6.



Anexo 7. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la fracción L7.



Anexo 8. Espectro de RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) de la fracción L8.

9. BIBLIOGRAFIA

- 1) Herbolaria mexicana <http://arantzamitesoro.blogspot.mx/2011/09/herbolaria-mexicana-fuente-natural-de.html> Consultado el 4 de febrero de 2015.
- 2) Estrada Lugo, E. Plantas medicinales: Un complemento vital para la salud de los mexicanos. (P.M. Pérez, Ed.) Revista Digital Universitaria, 10 (9).
- 3) Pereda-Miranda, R.; Fragoso-Serrano, M.; Escalante-Sánchez, E.; Hernández-Carlos, B.; Linares, E.; Bye, R. (2006) Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *Journal of Natural Products* 69, 1460-1466.
- 4) Eich, E. (2008). Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. *Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)*., 532 pp.
- 5) Pereda-Miranda, R.; Rosas-Ramírez, D.; Castañeda-Gómez, J. (2010) *Resin glycosides from the morning glory family*. En: Kinghorn, A.D. et. al. (eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* vol. 92. Springer Verlag: Viena, pp. 82-130.
- 6) Perusquia, M.; Mendoza, S.; Bye, R.; Linares, E.; Mata R. (1995) Vasoactive effects of aqueous extracts from five Mexican medicinal plants on isolated rat aorta. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 63-69.
- 7) Mc Donald A. (1994) Convolvulaceae II. Flora de Veracruz. Convolvulaceae II. Fascículo 77. Instituto de Ecología-University of California. México.
- 8) Carranza, E. (2007) Convolvulaceae (I). En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 151. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- 9) Hernandez-Carlos, B; Bye, R.; Pereda-Miranda R. (1999) Orizabinns V-VIII, Tetrasaccharide glicolipids from the Mexican scammony root (*Ipomoea orizabensis*). *Journal of Natural Products* 62, 1096-1100.
- 10) Bah, M.; Pereda-Miranda, R. (1997) Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type dimmers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* 53, 9007-9022.
- 11) Pereda-Miranda, R.; Bah, M. (2003) Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 111 -131.
- 12) Bautista, E.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R. (2015) Jalapinoside, macrocyclic bisdesmoside from the resin glycosides of *Ipomea purga*, as a Modulator of Multidrug Resistance in human cancer cells. *Journal of Natural Products* 78, 168-172.

- 13) Noda, N.; Yoda, S.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1987) Resin glycosides I. Isolation and structure elucidation of Orizabin I, II, III and IV. Genuine resin glycosides from the root of *Ipomoea orizabensis*. *Tetrahedron* 43, 3889-3902.
- 14) Chérigo, L.; Pereda-Miranda R. (2006) Resin glicosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *Journal of Natural Products* 69, 595-599.
- 15) Ono, M.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1989) Resin Glycosides V. Identification and Characterization of the Component Organic and Glicosidic Acid of the Ether – Soluble Crude Resin Glycosides (“Jalapin”) from Rhizoma Jalapae Braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical Pharmaceutical Bulletin* 37, 3209-3213.
- 16) Mannich C.; Shumann P. (1938) Über jalapenharz und dessen Hauptbestandteil, das Convolvulin. *Arch Pharm Ver Dtsch Pharm Ges* (276), 211-226
- 17) Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B. (2002) HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasacharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* 58, 3145-3154.
- 18) Sidana, J.; Joshi, L. K. (2013) Recycle HPLC: powerful tool for the purification of natural products. *Chromatography Research International*, ID 509812, 7 pages. doi:10.1155/2013/509812.
- 18) Escalante Sánchez, E. (2007) Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de tres remedios herbolarios purgantes del genero *IPOMOEA (CONVOLVULACEAE)*. Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- 19) Rosas Ramirez, D. G. (2012) Estudio de las resinas glicosídicas de tres variedades del camote (*IPOMOEA BATATAS*). Tesis doctoral. Posgrado en Ciencias Químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- 20) Tao, H.; Hao, X.; Liu, J.; Ding, J.; Fang, Y.; Gu, Q.; Zhu, W. (2008) Resin glycoside constituents of *Ipomoea pes-caprae* (Beach Morning Glory). *Journal of Natural Products* 71, 1998–2003.
- 21) Kocieski, P. J. (1994) Protecting Groups. University of Southampton. Thieme Foundations of Organic Chemistry Series. Georg Thieme Verlag Stuttgart . New York, pp. 46-52.
- 22) Serrato Araoz, P. (2015) Aislamiento por HPLC y elucidación estructural de los ácidos glicosídicos constitutivos de la resina comercial conocida como escamonea, un remedio purgante. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. Universidad Nacional Autónoma de México. México.