



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Purificación mediante HPLC y elucidación estructural de un pentasacárido del ácido 12-hidroxiocetadecanoico de la jalapa *brasileña* (*Ipomoea hamiltonii*)”

TESIS

Que para obtener el título de:
Química Farmacéutico Bióloga

PRESENTA:

LORENA GONZÁLEZ POZOS

DIRECTOR DE TESIS

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



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	María Isabel Aguilar Laurents
Primer Vocal	Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Secretario	Isabel del Carmen Rivero Cruz
Primer Suplente	Mabel Clara Fragoso Serrano
Segundo Suplente	Mario Alberto Figueroa Saldivar

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123, conjunto E. Facultad de Química.
Universidad Nacional Autónoma de México.

Asesor

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda

Supervisor técnico

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sustentante

Lorena González Pozos

AGRADECIMIENTOS

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN215016) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto CB220535) por el financiamiento de la investigación.

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE CUADROS	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	VIII
1. Introducción	1
2. Antecedentes	3
a. El Género <i>Ipomoea</i>	4
b. <i>Ipomoea purga</i> y sus congéneres sudamericanos	5
c. Historia de las especies de jalapas brasileñas	7
d. <i>Operculina hamiltonii</i>	8
e. Aplicaciones medicinales de la raíz de jalapa brasileña	11
<u>f.</u> Resinas glicosídicas metabolitos secundarios en la familia Convolvuláceae	12
g. Ácidos operculínicos	14
<u>h.</u> Métodos de separación	16
<u>i.</u> Elucidación estructural	19
3. JUSTIFICACIÓN	20
4. Objetivos.....	21
4.1 Objetivo general	21
4.2 Objetivos específicos.....	21
5. Parte experimental.....	22
5.1 Métodos cromatográficos	22
5.2 Material vegetal	22
5.3 Preparación del extracto orgánico.....	23
5.4 Hidrólisis alcalina del extracto orgánico	23
5.5 Reacción de acetilación del producto saponificado.	23
5.6 Cromatografía de líquidos a nivel analítico.....	25
5.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo.	27
6. Resultados y Discusión	27
6.1 Análisis por HPLC preparativo.....	27
6.2 Purificación del ácido glicosídico mayoritario presente en la Fracción 7.....	29
6.3 Interpretación del ácido graso que forma la aglicona para el compuesto mayoritario 1 de la fracción 7.	36
7. Conclusiones	38
Referencias.....	39

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Ilustración del Manuscrito Badiano (<i>Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis</i> , 1552) de la raíz de jalapa (<i>Ipomoea purga</i>), principal remedio purgante de la medicina prehispánica. Folio 32v. <i>Huelicpahtli</i> . 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 “ <i>huelicpahtli</i> ” (<i>Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis</i> , 1552).....	3
<i>Figura 2.</i> Morfología de la especie <i>Ipomoea purga</i> ; tallos y flores (izquierda), flor (centro) y raíces tuberosas características (derecha).....	5
<i>Figura 3.</i> Flor de <i>Operculina macrocarpa</i> (izquierda) y raíces de la jalapa de Brasil (batata de purga) derecha.....	6
<i>Figura 4.</i> Distribución de la raíz de jalapa brasileña, <i>Operculina macrocarpa</i>	7
<i>Figura 5.</i> Distribución geográfica de batata de purga, <i>Operculina hamiltonii</i>	8
<i>Figura 6.</i> Enredadera (izquierda) flores (centro) y semillas (derecha) de <i>Operculina hamiltonii</i> ...	9
<i>Figura 7.</i> Raíces tuberosas de <i>Operculina hamiltonii</i>	9
<i>Figura 8.</i> Droga cruda de la “batata de purga” considerada como purgante drástico (izquierda y centro); Tintura de jalapa SOBREAL de efecto laxante (derecha).....	11
<i>Figura 9.</i> Estructura general de una resina glicosídica macrocíclica anfipática. Debido a esta característica estructural, se ha postulado que estos glicolípidos desempeñan un papel importante en la química de la familia de las convolvuláceas, ya que un gran número de sus propiedades biológicas pueden explicarse como un resultado de su posible acción ionofórica.....	12
<i>Figura 10.</i> Carbohidratos presentes en las resinas glicosídicas.....	13
<i>Figura 11.</i> Estructura molecular del ácido operculínico A.....	15
<i>Figura 12.</i> Estructura molecular del ácido operculínico B.....	15

<i>Figura 13.</i> Válvula de reciclaje (izquierda) acoplada a una bomba cuaternaria Waters y cromatograma generado mediante la técnica de reciclaje (derecha) de una muestra con dos componentes diastereoisoméricos por HPLC.....	17
<i>Figura 14.</i> Raíces pulverizadas de la jalapa brasileña comercializadas como “pó de batatão” y jalapa en el Mercado 2000.....	22
<i>Figura 15.</i> Cromatografía en capa fina (CH ₂ Cl ₂ -MeOH, 95:5, Eluida tres veces) Q = muestra colectada en el quilombo de Varre-vento, Río Trombetas; H = muestra histórica de <i>Operculina macrocarpa</i> en depósito en la drogateca; S = Droga cruda utilizada por Industrias Sobral; Jal2000 = Muestra de la jalapa adquirida en mercado de Satarem, Pará, Brasil; Ru = colecta del Municipio de Rurópolis, Pará.....	24
<i>Figura 16.</i> Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados columna C-18 (19 × 300 mm, 7 μ); fase móvil: CH ₃ CN:H ₂ O (9:1), flujo: 8.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección: 500 μL (50 mg/500 μL).....	28
<i>Figura 17.</i> Cromatograma de las fracciones obtenidas a partir de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados, mediante el uso de la técnica de corte de núcleo.....	28
<i>Figura 18.</i> Purificación del ácido glicosídico peracetilado mayoritario presente en la fracción 7 (<i>t_R</i> = 31.5 min; cromatograma de la Figura 17).....	30
<i>Figura 19.</i> Espectro de masas de alta resolución (EM-ESI, modo positivo) del componente mayoritario purificado de la fracción 7.....	30
<i>Figura 20.</i> Espectro de RMN ¹ H para el compuesto mayoritario 1 aislado de la fracción 7 (400 MHz, piridina- <i>d</i> ₅).....	32
<i>Figura 21.</i> Espectro de RMN ¹³ C para el compuesto mayoritario 1 aislado de la fracción 7 (100 MHz, piridina- <i>d</i> ₅).....	32
<i>Figura 22.</i> Comparación de los espectros de RMN ¹ H (500 MHz, C ₆ D ₅ N) para los peracetatos del ácido operculínico A (Producto 2; A : con supresión de H ₂ O) y del producto mayoritario 1 de la fracción 7 (B).....	34

Figura 23. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) para los derivados peracetilados del ácido operculínico A (Producto 2; **A**), los ácido glicosídicos mayoritarios de los productos 3 (**B**) y 1(**C**) obtenidos de las fracciones F6 y F7 respectivamente..... 34

Figura 24. Comparación de las estructuras para los ácidos glicosídicos del producto mayoritario 3 (peracetato: $\text{C}_{71}\text{H}_{108}\text{O}_{36}$; aglicona ácido 12-hidroxiheptadecanoico, $n = 1$) y el producto mayoritario 1(peracetato: $\text{C}_{72}\text{H}_{110}\text{O}_{36}$, aglicona ácido 12-hidroxiocetadecanoico, $n = 2$)..... 35

Figura 25 Comparación de los espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) de la porción correspondiente a las agliconas (δ 14-36 ppm) de los ácidos operculínicos mayoritarios aislados de las fracciones 3 (ácido operculínico A: ácido 11-hidroxihexadecanoico, ácido jalapínico), 6 (Pico 6 mayoritario, ácido 12-hidroxiheptadecanoico) y 7 (Pico 7 mayoritario, ácido 12-hidroxiocetadecanoico). Se suprimió del espectro la porción centrada entre δ 5.5-22.5 ppm..... 37

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>Operculina hamiltonii</i>	10
Cuadro 2. Lista de sinonimias para <i>Operculina hamiltonii</i>	10
Cuadro 3. Principales productos de la degradación de las resinas glicosídicas.....	18
Cuadro 4. Procedimiento cromatográfico de la purificación de la mezcla de acetilación	25
Cuadro 5. Características de las fases estacionarias utilizadas para los análisis mediante HPLC a nivel analítico	26
Cuadro 6. Condiciones experimentales utilizadas en los distintos análisis cromatográficos a nivel analítico	26
Cuadro 7. Rendimientos del fraccionamiento por HPLC preparativo y análisis de masas mediante electrospray en modo positivo de las fracciones obtenidas.....	29
Cuadro 8. HPLC acoplado fuera de línea con EM-ESI	31
Cuadro 9. Asignaciones de los espectros de RMN para los productos aislados puros...	33
Cuadro 10. RMN ¹³ C para las agliconas de los productos aislados 2, 3 y 1 (provenientes de las fracciones F3, F6 y F7 respectivamente).....	36

LISTA DE ABREVIATURAS

cm	Centímetro
mm	Milímetro
μm	Micrómetro
μL	Microlitro
mg	Miligramo
g	Gramo
mL	Mililitro
CH_3CN	Acetonitrilo
min	Minuto
t_r	Tiempo de retención
RMN ^1H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ^{13}C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
MHz	Megahertz
δ	Desplazamiento químico
ppm	Partes por millón
MeOH	Metanol

1. Introducción

La medicina tradicional ha desempeñado un papel importante en el tratamiento de diversas patologías, fundamentalmente en los países en desarrollo. En estos, aproximadamente el 80% de la población recurre a este tipo de medicina para satisfacer las necesidades primarias de salud. Si bien los productos de origen vegetal, particularmente las drogas secas y los extractos, pasaron de ocupar un lugar preponderante a un segundo plano, en las últimas décadas han vuelto a alcanzar una presencia cada vez mayor en la medicina occidental.¹ Este retorno ha sido propiciado por el regreso hacia lo natural, pero también debido al desarrollo de los fitomedicamentos y al mayor conocimiento del riesgo-beneficio de los fármacos sintéticos.¹

Las plantas medicinales mexicanas han sido utilizadas de manera tradicional constituyendo una de las manifestaciones del acervo cultural legado por nuestros antepasados. La herbolaria, disciplina que se encarga de preservar y utilizar los componentes de origen vegetal para fines terapéuticos, ha sido practicada por integrantes de numerosos grupos indígenas en nuestro país, quienes han resguardado los métodos y tradiciones con el paso del tiempo y muchas de estas prácticas se han introducido a la vida contemporánea como se evidencia en el comercio de plantas medicinales en los mercados populares de las ciudades modernas.²

Este tipo de herbolaria nacional, utilizada principalmente para el alivio del dolor de muchas enfermedades, en la actualidad continúa en uso, y dado el resurgimiento de los fitofármacos, numerosas plantas constituyen una fuente de materias primas que, cuando se les ingiere en forma de infusiones o son aplicados tópicamente ejercen su acción terapéutica.²

El aislamiento y estudio de las sustancias naturales ha sido una preocupación central de las Ciencias Química y Biológicas por más de 200 años.¹ En el Diccionario de Productos Naturales³ se describen datos químicos, estructurales y bibliográficos para más de 165 000 productos naturales y sustancias relacionadas.¹

En específico, las resinas glicosídicas son parte de una extensa familia de metabolitos secundarios conocidos como glicolípidos, los cuales pertenecen a una clase de metabolitos de origen biosintético mixto, de alto peso molecular y con una elevada complejidad estructural, se presume son únicos de la familia de las convolvuláceas.² Esta familia se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, siendo especialmente abundante en las zonas tropicales de Asia y América, particularmente en regiones que presentan temporadas de estiaje. En el mundo se estiman alrededor de 55 géneros y 1650 especies, los géneros más representativos son *Convolvulus* (250 especies), *Ipomoea* (500 especies) y *Cuscuta* (170 especies). Dentro de las angiospermas, esta familia representa una de las más grandes y diversas de México, describiéndose 15 géneros y aproximadamente 217 especies, siendo el género *Ipomoea* uno de los más representativos con un grado de endemismo de aproximadamente el 65%, es decir, con 104 especies presentes en México de las 160 especies del género distribuidas en el territorio nacional.

Numerosas especies de convolvuláceas se utilizan como purgantes en la medicina tradicional alrededor del mundo.³ De acuerdo a los resultados de estudios farmacológicos de los extractos orgánicos de estas plantas, se han demostrado sus actividades analgésica, espasmolítica, antimicrobiana, hipotensiva y anticancerígena, por citar algunas.⁴ Cabe mencionar que los glicolípidos pertenecientes a este género constituyen una serie de compuestos (lipooligosacáridos) que tienen la particularidad de ser moléculas anfipáticas por la presencia simultánea en su estructura de un oligosacárido hidrofílico y una porción hidrofóbica constituida por la aglicona.

2. Antecedentes

La familia Convolvulácea.

La llegada de los españoles modificó radicalmente la medicina nativa y los usos de las plantas medicinales. Diversos documentos de los primeros años de la colonización así lo muestran. Uno de los primeros libros es el titulado *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis* o Códice Badiano, escrito en 1522 siendo el registro más antiguo sobre prácticas médicas de Mesoamérica en el que se estima la descripción de 500 plantas medicinales mexicanas, incluidas siete especies de convolvuláceas junto con sus respectivas propiedades terapéuticas. En el tratado se mencionan sus propiedades catárticas, antipiréticas y antiepilépticas, para el tratamiento de los trastornos renales y cardíacos así como también para curar ciertos padecimientos tales como la meningitis, la hidrocefalia, las infecciones gastrointestinales y parasitarias (Figura 1).



Figura 1. Ilustración del Manuscrito Badiano (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, 1552) de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*), principal remedio purgante de la medicina prehispánica. 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*” (*Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*, 1552).

La familia de las convolvuláceas pertenece al grupo de las angiospermas que posee alrededor de 55 géneros y 1650 especies en el mundo. Esta familia es la que mejor representa las propiedades medicinales purgativas y alucinógenas de los vegetales, dónde los géneros más significativos de esta familia son *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Exogonium* y *Operculina*. Se reconocen fácilmente por sus flores de forma de embudo radial, en las cuales el vástago generalmente está enrollado, de ahí que su nombre botánico Convolvulaceae derive del latín *convolvere* (entrelazarse).⁵

Una de las características más notables de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas en sus tejidos foliares y radiculares.⁷ Dado la complejidad estructural de este tipo de resinas, los estudios acerca de la naturaleza y composición de sus constituyentes es muy escaso. Estas resinas glicosídicas son los marcadores quimiotaxonómicos presentes en esta familia,⁸ las cuales ejercen su acción purgante de utilidad en la medicina tradicional de numerosos pueblos americanos y asiáticos.⁹

a. El Género *Ipomoea*

El nombre genérico de *Ipomoea* se deriva de las palabras griegas *ιπς* (*ips*) o *ιπος* (*ipos*) que significa “enroscarse” o “enredadera” y *ὅμοιος* (*homoios*) que significa “semejante a”. Así, este se refiere a la manera de crecimiento de la mayoría de sus especies, las cuales, se presentan como enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 m. Las flores presentan un aspecto tubular y de colores brillantes.¹⁰ *Ipomoea* es uno de los géneros más grandes de la familia Convolvulaceae, con 500 a 700 especies a nivel mundial, con su mayor diversidad en los trópicos y un gran número de especies ornamentales, medicinales y alimenticias en México.

La mayoría de los estudios, principalmente de tipo farmacológico y fitoquímico, sobre dicha familia se centran en este género.⁴ También, se han descrito especies arbóreas endémicas de México y Centroamérica. La actividad purgante y citotóxica de estas especies, está asociada a la presencia de resinas glicosídicas en las partes aéreas y raíces. La actividad alucinógena propia de algunas especies se debe a la presencia de alcaloides derivados del ácido lisérgico.⁹

b. *Ipomoea purga* y sus congéneres sudamericanos

En la medicina prehispánica, el uso de sustancias purgantes era una práctica común por la creencia de que era posible alcanzar la “purificación del cuerpo” a través de su consumo. En Mesoamérica, remedios purgativos, conocidos por los aztecas como “cacamotli tlanquiloni”, consistían en diversos tipos de raíces tuberosas, que variaban en sus características morfológicas, hábitat y potencia efectora. Investigaciones etnobotánicas recientes han identificado estas raíces como miembros pertenecientes al género *Ipomoea* de la familia Convolvulácea, las cuales se han conocido y comercializado como “jalapas” desde la época colonial.³



Figura 2. Morfología de la especie *Ipomoea purga*; tallos y flores (izquierda), flor (centro) y raíces tuberosas características (derecha).

El adjetivo latino “purga” fue usado para darle el nombre a la especie “*I. purga*” la cual se considera como la “raíz de jalapa oficial”, aunque, aparecen diferentes sinonimias para referirse a esta especie como *Exegonium purga*, *Convolvulus officinalis*, *Convolvulus jalapa*, *Convolvulus purga* e *Ipomoea jalapa*.^{10, 11} Esta especie también se conoce por sus nombres comunes de purga, raíz de jalapa, limoncillo, sombrilla, mechoacán negra y raíz de Michoacán. Sus tallos son ramificados y lisos que se enroscan para trepar, son verdes o púrpura y no presentan vellosidades. Sus hojas son alternas, ovaladas con tamaños de hasta 12.5 cm de largo y 7.7 cm de ancho, ligeramente puntiagudas con su base acorazonada. Los pecíolos se presentan lisos con tamaños de 6 cm de largo.

Las inflorescencias presentan de 1 a 2 flores sobre largos pedúnculos, sus flores presentan un cáliz de 5 sépalos; la corola es púrpura. Los frutos consisten de cápsulas cónicas de hasta 10 mm de largo y 8 mm de ancho, sin pelillos que al madurar se abren para liberar las semillas (Figura 2).

Desde la introducción de *Ipomoea purga* a Europa en el siglo XVI fue conocida con el nombre de ruibarbo de las indias siendo considerada la más importante dentro del tipo de remedios purgantes.¹¹ La gran demanda comercial de la raíz de jalapa hacia Europa y Estados Unidos ocasionó la adulteración de las drogas crudas y sus preparados con otras raíces adulterantes para mejorar o modificar su efecto terapéutico.¹¹ Sin embargo, en México, la demanda comercial de las raíces de jalapa ha disminuido debido al uso de otros laxantes derivados de frutas de psyllium (*Plantago spp.*, fibra natural laxante regulador de la motilidad intestinal), y hojas de cassia (*Senna spp.*, laxante que aumenta el movimiento peristáltico del intestino).¹² Durante la década de 1940, en la región de Xico Veracruz se cultivaba y exportaba cerca de 40 toneladas de raíz seca de *I. purga* a los Estados Unidos por año, manteniéndose hasta 1990. Posteriormente su exportación se redujo casi hasta cero¹³ debido a la dominación del mercado mundial de drogas herbolarias a través de distribuidores mayoristas italianos y alemanes que comercializan resinas de la jalapa brasileña (*Operculina macrocarpa*; Figura 3) y la jalapa de la India (*Operculina turpethum*).¹²



Figura 3. Flor de *Operculina macrocarpa* (izquierda) y raíces de la jalapa de Brasil (batata de purga) (derecha).

c. Historia de las especies de jalapas brasileñas

Los colonizadores portugueses introdujeron en sus colonias americanas la medicina galénica europea del siglo XVI en donde los remedios purgantes gozaban de gran importancia terapéutica y reconocieron las propiedades medicinales de estas enredaderas herbáceas perennes con raíces de sabor agrio y productoras de resinas con propiedades purgantes como sucedáneas de las especies originarias del mediterráneo oriental y el oriente próximo (e.g., *Convolvulus scammonia*) que fueron importantes para la medicina medieval europea.¹²

Las raíces purgativas originarias de Brasil conocidas comúnmente como “batata de purga o batatão” ganaron una amplia aceptación en las prácticas médicas del imperio colonial portugués.¹³ Siendo los colonizadores de Sudamérica quienes le otorgaron el nombre de “Jalapa de Brasil” en reconocimiento de sus beneficios terapéuticos y similares a los de la raíz de Jalapa (*I. purga*) originaria de México. La identificación precisa de la raíz purgante de “jalapa de Brasil” corresponde a *Operculina macrocarpa* (Figura 3) y cuya distribución se limita a los matorrales de la “mata” atlántica siendo introducida en las Antillas menores (Figura 4).¹⁴



Figura 4. Distribución de la raíz de jalapa brasileña, *Operculina macrocarpa*.

d. *Operculina hamiltonii*

El nombre popular de batata de purga también corresponde a otra especie, *Operculina hamiltonii*, común en el norte del territorio brasileño, y cuyas raíces tuberosas son motivo de un extenso comercio para fines medicinales. Esta especie florece en los meses de septiembre a diciembre y crece en matorrales en el norte y nordeste (Figura 5), donde se conoce popularmente como jalapa, jalapa de Brasil, batata de purga, batatão, jalapão, purga amarilla y brionia de América.¹⁵



Figura 5. Distribución geográfica de batata de purga, *Operculina hamiltonii*.

Es una planta herbácea de tallo trepador, púrpura glabo, cuadrangular, carente de zarcillos, puede alcanzar hasta 5 m de longitud (Figura 6). Hojas alternas de 9 cm de largo por 5 cm de ancho, pecioladas, en forma de corazón, lisas y biseladas en la base, verde oscuro en la parte superior y blanquecina por debajo. Las flores son solitarias, ocasionalmente de 1 a 3, 5 sépalos, pétalos amarillos de 7 cm de largo y con 5 estambres.

El fruto es una cápsula ovoide con 4 semillas, con un tamaño de 15 – 20 mm, deprimido-globosos, operculados, pardos, envueltos por los sépalos acrescentes. Semillas de alrededor de 5-8 mm, elipsoidales a redondeadas, negras y glabras. El rizoma es alargado y lechoso, con unos 5 – 45 cm de largo y tuberosidades con raíces secundarias (Figura 7).¹⁵



Figura 6. Enredadera (izquierda) flores (centro) y semillas (derecha) de *Operculina hamiltonii*.



Figura 7. Raíces tuberosas de *Operculina hamiltonii*.

A continuación, se presenta en el Cuadro 1 la clasificación taxonómica de *Operculina hamiltonii* (G. Dn) D.F. Austin et Staples.

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Operculina hamiltonii*.

Reino	<i>Plantae</i>
División	<i>Tracheophyta</i>
Clase	<i>Magnoliopsida</i>
Orden	<i>Solanales</i>
Familia	<i>Convolvulaceae</i>
Género	<i>Operculina</i>
Especie	<i>Operculina hamiltonii</i>

Numerosas sinonimias se encuentran descritas en la literatura botánica para esta especie (Cuadro 2). El basiónimo *Ipomoea hamiltonii* G. Don se describió en 1838¹⁶ y como *Operculina hamiltonii* Miquel en 1844,¹⁶ su reclasificación al género *Operculina* bajo la sinonimia de *Operculina alata* sucedió en 1902. En la actualidad, el nombre aceptado corresponde a *Operculina hamiltonii* (G. Don) Austin & Staples.¹⁶

Cuadro 2. Lista de sinonimias para *Operculina hamiltonii*.

<i>Operculina alata</i> (Hamilton) Urb.	<i>Ipomoea ampliata</i> Choisy
<i>Convolvulus alatus</i> Hamilton	<i>Ipomoea pterodes</i> Choisy
<i>Convolvulus ampliatus</i> Spreng	<i>Ipomoea alulata</i> Miq.
<i>Convolvulus hamiltonii</i> Spreng	<i>Operculina altissima</i> (Mart. Ex Choisy) Meisn.
<i>Convolvulus peruvianus</i> Spreng	<i>Operculina ampliata</i> House
<i>Ipomoea altissima</i> Mart.	<i>Operculina pterodes</i> (Choisy) Meisn
<i>Ipomoea altissima</i> Mart. Ex Choisy	<i>Operculina alata</i> (Hamilton)

e. Aplicaciones medicinales de la raíz de jalapa brasileña

Entre las propiedades medicinales de la raíz de jalapa brasileña destacan las actividades antiinflamatoria, depurativa, diurética, energética, febrífuga, laxante y purgante. Se utiliza específicamente para la congestión intestinal, hemorragias (cerebro, pulmón), hidropesía cardiaca o renal y el estreñimiento.^{15, 17} El uso popular incluye el tratamiento de edemas, inflamación, dolor de cabeza y fiebre.¹⁵

Existen preparados fitofarmacéuticos que se encuentran en el mercado como droga cruda seca en rodajas o pulverizada, soluciones hidroalcohólicas, jarabes y píldoras.²⁰ Se suele ingerir como infusión a partir de la droga cruda. La “tintura de jalapa” se utiliza en el noreste de Brasil como laxante y para el tratamiento del accidente vascular encefálico; sin embargo, aún no se ha comprobado de manera adecuada su seguridad y eficacia.¹⁸ En la Figura 8 se muestran algunas de estas presentaciones medicinales comerciales.



Figura 8. Droga cruda de la “batata de purga” considerada como purgante drástico (izquierda y centro); Tintura de jalapa SOBRAL® de efecto laxante (derecha).

f. Resinas glicosídicas metabolitos secundarios en la familia Convolvuláceae

Las resinas glicosídicas constituyen el segundo grupo de metabolitos que caracteriza a este género, después de los alcaloides del ergot. Desde el punto de vista estructural, los constituyentes individuales, en la mayoría de los ejemplos, consisten de oligosacáridos (porción hidrofílica) unidos a una aglicona (porción hidrofóbica) formando un macrólido a través de un enlace éster intramolecular (Figura 9).

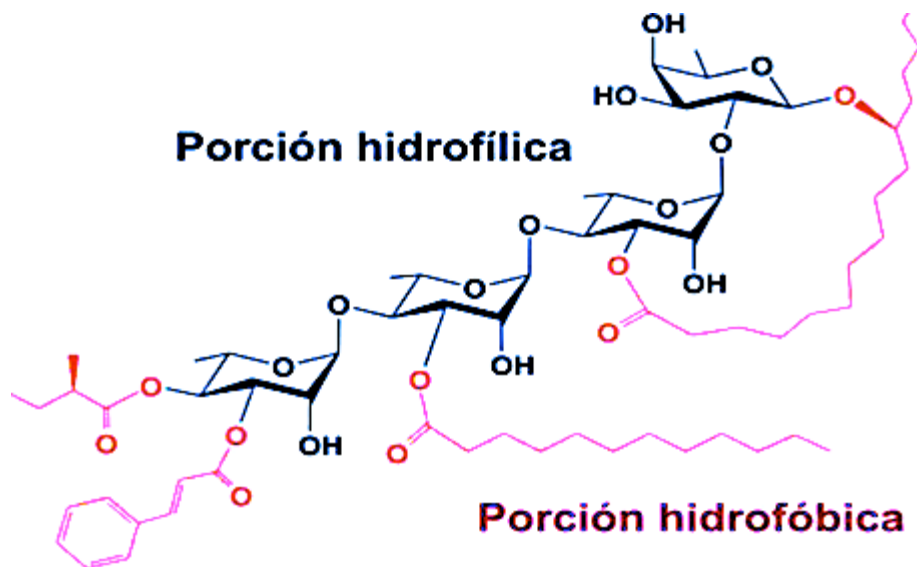


Figura 9. Estructura general de una resina glicosídica macrocíclica anfipática. Debido a esta característica estructural, se ha postulado que estos glicolípidos desempeñan un papel importante en la química de la familia de las convolvuláceas, ya que un gran número de sus propiedades biológicas pueden explicarse como un resultado de su posible acción ionofórica.

Los residuos volátiles identificados con mayor frecuencia incluyen a los ácidos acético, cinámico, metilbutírico, isobutírico, tíglico y nílico. Así como los ácidos hexanoico, octanoico, decanoico y dodecanoico, los cuales son ácidos grasos de cadena larga caracterizados en especies del género *Ipomoea*.²⁰

La diversidad estructural de estos compuestos se deriva 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, número y posición de los ácidos que se encuentran acilando al núcleo.²²

Así, se han podido identificar desde disacáridos hasta heptasacáridos y dímeros tipo éster, constituidos por tres hasta seis azúcares en cada unidad oligomérica. Estos núcleos se componen principalmente de cuatro carbohidratos, tres 6-desoxihexosas como son la D-fucosa, D-quinovosa, L-ramnosa y la D-glucosa, como la única hexosa presente en esta clase de metabolitos.²³ La D-xilosa se describió para las resinas glicosídicas de *Ipomoea pescaprae*^{22, 24} (Figura 10).

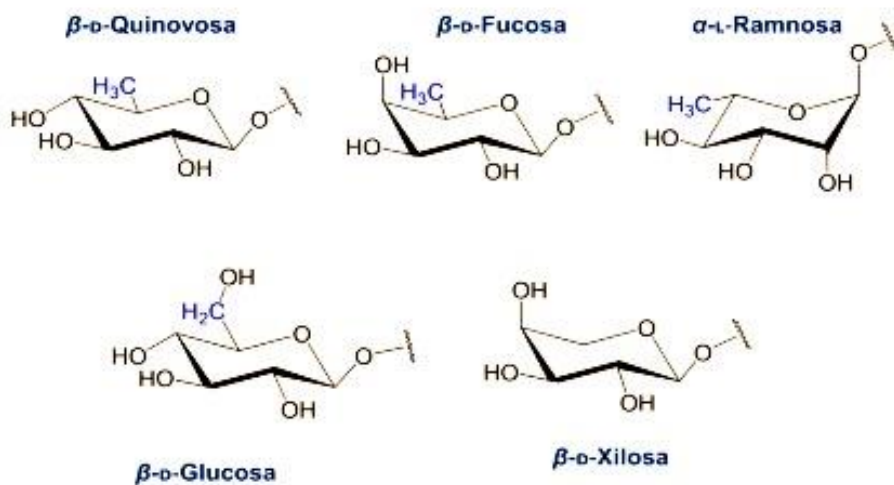


Figura 10. Carbohidratos presentes en las resinas glicosídicas.

En cuanto a la secuencia de glicosidación, se han encontrado lipooligosacáridos lineales o ramificados y los ácidos que con mayor frecuencia representan a las agliconas de las macrolactonas son los ácidos (11S)-hidroxihexadecanóico (ácido jalapínico) y el (11S)-hidroxitetradecanóico (ácido convolvulinico).⁴

Cabe mencionar que los constituyentes individuales que componen a las resinas glicosídicas de una misma especie comparten, en la mayoría de los casos, un mismo núcleo oligosacárido. Por lo tanto, a través de métodos de degradación (hidrólisis alcalina), los núcleos oligosacáridos de las resinas glicosídicas pueden ser identificados permitiendo la obtención de los ácidos glicosídicos que son distintivos a cada una de las especies que los biosintetizan.⁴

g. Ácidos operculínicos

En el año de 1989, los glucósidos de la fracción de la resina soluble en éter (jalapina) de la raíz de jalapa brasileña se analizaron a través de la saponificación, donde los ácidos *n*-decanóico y *n*-dodecanóico fueron identificados como los residuos esterificantes y los ácidos operculínicos A-G como los núcleos oligosacáridos.^{23,24} Dos pentasacáridos mayoritarios se identificaron: el ácido operculínico A (Figura 11) un lipooligosacárido, constituido por una unidad de D-fucosa, tres unidades de L-ramnosa, una unidad de D-glucosa y el ácido jalapínico como la aglicona y, el ácido operculínico B (Figura 12) cuya estructura cambia sólo en la sustitución de la unidad de D-fucosa por una unidad de D-glucosa respecto al ácido operculínico A.²³

La convolvulina, que está constituida por los glucósidos de la resina insoluble en éter, se analizó recientemente mediante saponificación y se identificaron a los residuos de los ácidos *n*-pentanóico, 2-metilbutanóico, 3-metilbutanóico, (2E)-metil 2-butenóico (tíglico), 3,6:6,9 diepoxidecanóico (exogónico) y acético. El ácido operculínico H se identificó como el núcleo oligosacárido que está compuesto por el ácido 3S,12S-dihidroxihexadecanóico como la aglicona y un núcleo hexasacárido formado por cuatro unidades de glucosa y dos de ramnosa.²⁵

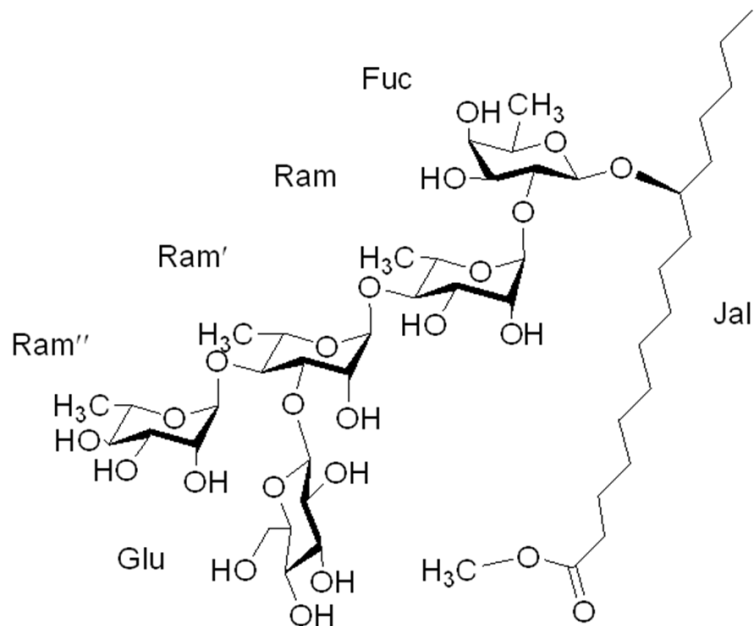


Figura 11. Estructura molecular del ácido operculínico A.

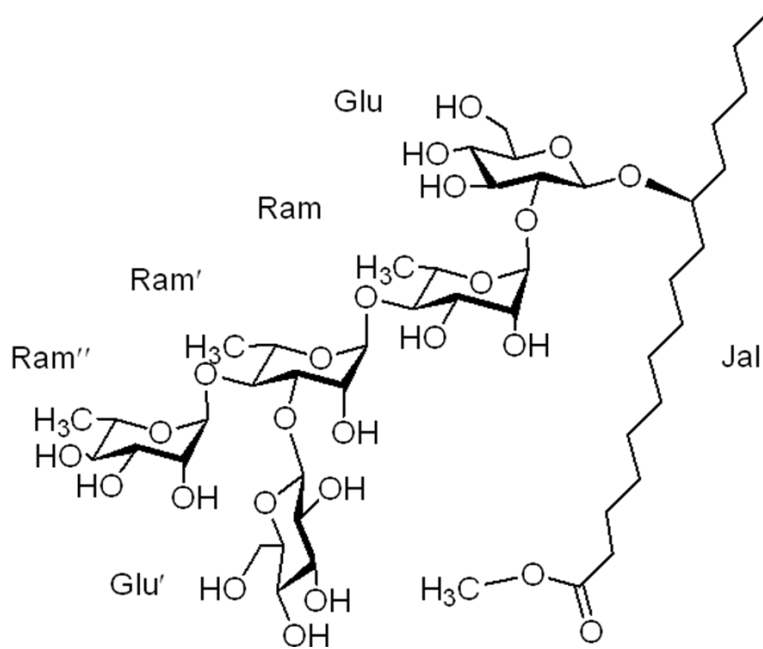


Figura 12. Estructura molecular del ácido operculínico B.

h. Métodos de separación

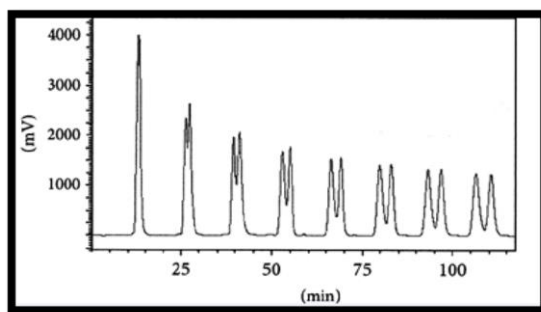
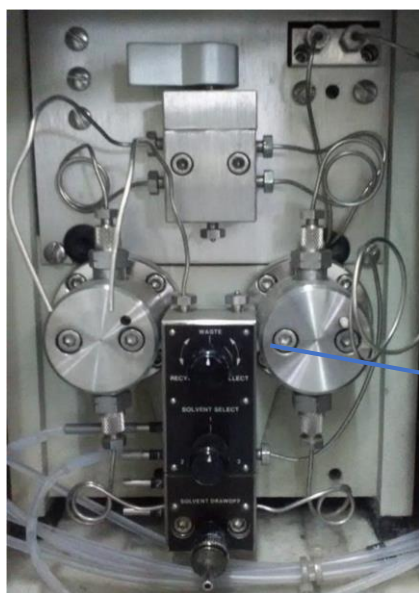
Entre los métodos de separación utilizados para resolver las mezclas complejas de oligosacáridos que conforman las resinas de las convolvuláceas, se cuenta con procedimientos de partición líquido-líquido y técnicas cromatográficas en capa fina y columna. De las particiones, en principio sólo se obtuvieron dos tipos de resinas, la fracción poco polar y soluble en éter denominada “jalapina” y la insoluble en este disolvente o también llamada “convolvulina” que es soluble en metanol o etanol. Los métodos de separación como la cromatografía de columna abierta utilizando gel de sílice, sephadex, intercambio iónico y filtración en gel fueron también empleados para la separación de estos compuestos, pero sin resultados exitosos.³ La naturaleza química (moléculas anfipáticas) y la complejidad de las resinas glicosídicas han requerido del empleo de métodos cromatográficos y espectroscópicos modernos para la separación de los constituyentes individuales y su caracterización estructural.^{3,5}

La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) ha sido una de las herramientas esenciales para la purificación de moléculas orgánicas simples y complejas. En el campo de las macromoléculas, este método analítico de separación ha permitido la purificación de numerosos glicolípidos que constituyen a las resinas glicosídicas.⁴⁰ Esta técnica provee la separación de los componentes de una mezcla con resolución máxima en un tiempo corto a través de dos fases una móvil y otra estacionaria. La fase estacionaria está formada por partículas de tamaño pequeño de forma esférica e irregular (< 25 μm), tamaño de poro de 60 y 130 Å. Establecer la mejor fase estacionaria y móvil, el modo de elución por un sistema gradiente o isocrático y la cantidad de muestra máxima que se requiere para obtener una resolución adecuada de la misma, constituyen las principales condiciones de análisis para establecer la composición química de las resinas glicosídicas. La ventaja del empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia, es el escalamiento a nivel semi-preparativo que permite la purificación de una mayor cantidad de muestra sin afectar la resolución.

Columnas de fase normal y columnas de fase reversa como la de octilsilano (C-8), octadecilsilano (C-18), ciano y fenilo, han demostrado ser las fases estacionarias adecuadas para el aislamiento de macromoléculas, como los glicolípidos.^{37, 40}

Las técnicas de corte de núcleo y rasurado de pico, empleadas individualmente o combinadas, han sido usadas en la purificación de los constituyentes individuales glicosilados. Inicialmente, cada pico del cromatograma se colecta mediante una válvula a nivel semipreparativo o preparativo (cantidad de muestra: 50 mg/500 μ L).⁴

La técnica de cromatografía de reciclaje ha permitido la purificación de cada pico colectado, hasta que se logra la separación adecuada de los componentes sobrepuestos como se ha demostrado para los batatinósidos^{32, 33}, intrapilosinas³⁵, murucoidinas^{35, 37}, orizabinas²² pescapreinas²³, tricolorinas⁴³, purginósidos⁴⁰, purginas, albinósidos y jalapinósidos⁴³. Esta técnica consiste en realizar la elución de la muestra por la fase estacionaria durante varios ciclos de manera manual o automática a través de una válvula de reciclaje. El procedimiento finaliza hasta que se observe un pico de comportamiento gaussiano, sin la presencia de picos minoritarios, como indicativos de impurezas en la muestra⁴ (Figura 13).



Válvula de reciclaje

Figura 13. Válvula de reciclaje (izquierda) acoplada a una bomba cuaternaria Waters® y cromatograma generado mediante la técnica de reciclaje (derecha) de una muestra con dos componentes diastereoisoméricos por HPLC.

En el Cuadro 3 se enlistan algunos de los productos que con mayor frecuencia se obtienen de los procesos degradativos de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas. Cabe destacar que al parecer el ácido jalapινόlico (ácido 11S-hidroxihexadecanóico) representa la aglicona que con mayor frecuencia se presenta en las resinas glicosídicas del género *Ipomoea*.

Cuadro 3 Principales productos de la degradación de las resinas glicosídicas

ÁCIDOS VOLÁTILES	ÁCIDOS GRASOS HIDROXILADOS	AZÚCARES
Ácido acético	7-OH-C ₁₀	D-Glucosa
Ácido propiónico	11-OH-C ₁₄ (Ac. convolvulinólico)	L-Ramnosa
Ácido isobutírico	11-OH-C ₁₆ (Ac. jalapινόlico)	D-Fucosa
Ácido α-metil-β-hidroxi-butírico	3,12-di-OH-C ₁₆ (Ac. operculinólico)	D-Quinovosa
Ácido α-metilbutírico	3, 11-di-OH-C ₁₄ (Ac. ipurólico)	
Ácido η-isovalérico	Tri-OH-C ₁₄ (Ac. brasilólico)	
Ácido tíglico		
Ácido <i>trans</i>-cinámico		

i. Elucidación estructural

Los principales métodos para la elucidación de las resinas glicosídicas involucran el uso de reacciones químicas degradativas o la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución, para la caracterización completa de estas moléculas complejas. Al llevar a cabo la saponificación del material crudo, se hidrolizan los ácidos grasos correspondientes a los sustituyentes que esterifican los núcleos oligosacáridos. De esta manera, los ácidos glicosídicos obtenidos son sometidos a una segunda reacción de hidrólisis en medio ácido para la obtención de los carbohidratos y la aglicona respectivos.

Los ácidos grasos libres o sus derivados metilados pueden ser analizados mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas⁴

Esta técnica permite la cuantificación de cada uno de los residuos que esterifican al núcleo a través de los cromatogramas registrados, en tanto que los espectros generados por la técnica de impacto electrónico permiten establecer el peso molecular y facilitan la identificación de los ácidos grasos ligados a la porción oligosacárida.⁴⁴

La secuencia de unión de los monosacáridos se ha determinado por la hidrólisis ácida parcial de los polisacáridos permetilados y acetilados. El empleo de la cromatografía de líquidos para la identificación de los azúcares generados mediante hidrólisis ácida de las resinas sólo permite establecer la naturaleza de éstos. Por lo tanto, se utiliza a la resonancia magnética nuclear de los ácidos glicosídicos y sus derivados peracetilados para confirmar la secuencia de glicosilación.⁸

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a la complejidad estructural presente en las resinas glicosídicas de las convolvuláceas, las técnicas convencionales como la cromatografía en columna abierta no permiten la resolución de las mismas. Así, la degradación mediante saponificación de la muestra permite la simplificación de la complejidad de las mezclas de glicolípidos acilados ya que ésta se debe principalmente a la diversidad observada en la posición de lactonización del oligosacárido por la aglicona y en el tipo, número y posición de los ácidos que se encuentran acilando a este núcleo. Por lo tanto, esta reacción degradativa libera los ácidos glicosídicos que son distintivos a cada una de las especies que los biosintetizan.

En este contexto, el presente trabajo plantea la purificación mediante HPLC del ácido glicosídico con mayor lipofilia presente en la mezcla de saponificación de la resina glicosídica de la jalapa brasileña amarilla, *Operculina hamiltonii*.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Realizar el aislamiento mediante HPLC y la caracterización estructural del peracetato del ácido glicosídico mayoritario presente en la fracción 7 generada por la acetilación del producto de hidrólisis alcalina del extracto orgánico total de *Operculina hamiltonii*, la raíz de jalapa brasileña amarilla.

4.2 Objetivos específicos

1. Obtener el extracto de diclorometano-etanol (1:1) a partir de las raíces pulverizadas de la raíz de jalapa brasileña, la “batata de purga” amarilla.
2. Realizar la hidrólisis básica del extracto orgánico.
3. Acetilar la fracción de *n*-butanol obtenida a partir de la hidrólisis básica.
4. Establecer las condiciones instrumentales a nivel analítico y preparativo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para aislar a los compuestos individuales presentes.
5. Elucidar la estructura molecular del producto peracetilado de mayor lipofilia aislado mediante los análisis espectroscópicos y espectrométricos adecuados.

5. Parte experimental

5.1 Métodos cromatográficos

Estos análisis se efectuaron de la manera convencional, empleando placas de aluminio recubiertas con gel de sílice (sílica gel F254, Merck) y diferentes sistemas de elución con la finalidad de analizar la complejidad cromatográfica de la resina glicosídica de interés. Se utilizó una solución de H₂SO₄-sulfato cérico como agente cromógeno calentando a 80°C para la visualización. Para llevar a cabo la separación de los constituyentes individuales presentes en el extracto se utilizó la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución en un cromatógrafo equipado con una bomba semipreparativa PU-4086 marca Jasco (Jasco Corporation Tokyo Japón) adaptada a una válvula de reciclaje de muestra y un refractómetro 410 marca Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division Milford, MA, EE.UU.). El control del equipo, así como la adquisición y el procesamiento de la información se realizaron utilizando el programa Empower 2 (Waters®).

5.2 Material vegetal

Para la realización del presente estudio, se empleó una muestra comercial de las raíces pulverizadas de la raíz de jalapa brasileña adquirida en el Mercado 2000 ubicado en Santarém, Pará, Brasil, el 28 de septiembre de 2015 (Figura 14).



Figura 14. Raíces pulverizadas de la jalapa brasileña comercializadas como “pó de batatão” y jalapa en el Mercado 2000.

5.3 Preparación del extracto orgánico

El material vegetal (868.5 g) fue sometido a un proceso de maceración exhaustiva con una mezcla de diclorometano-etanol (1:1). El extracto resultante se filtró y concentró a sequedad a presión reducida. De esta manera, se obtuvieron 48.8 g de extracto orgánico total.

5.4 Hidrólisis alcalina del extracto orgánico

Se pesaron 7 g de extracto, a los cuales se les adicionaron 200 mL de una solución de KOH 5%; esta mezcla de reacción se reflujo en un baño de aceite a 95 °C durante 3 h con agitación constante. Para llevar a cabo el aislamiento del producto crudo de la reacción, se realizó el ajuste de pH a 5 utilizando una solución de HCl 1N y extracciones sucesivas con diclorometano (3 × 250 mL). La fase acuosa se sometió a un segundo proceso de reparto utilizando *n*-butanol (3 × 250 mL). Esta fracción orgánica se lavó sucesivamente con agua (2 × 250 mL). Y finalmente, se concentró a sequedad obteniéndose 1.470 g.

5.5 Reacción de acetilación del producto saponificado.

El producto de reacción de saponificación (1.470 g) se disolvió en 27 mL de piridina y 54 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante a temperatura ambiente durante 48 hrs. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se adicionaron 320 mL de agua destilada y 320 mL de acetato de etilo y la mezcla se dejó en agitación por 5 minutos, y se separaron las fases acuosa y orgánica en un embudo de separación, efectuándose dos extracciones sucesivas con 320 mL de acetato de etilo. La fase orgánica fue tratada con HCl 1N (2 × 640 mL), seguida de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO₃ (2 × 640 mL). Por último, la fase orgánica se lavó con agua destilada (1 × 640 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a sequedad, obteniéndose 1.5 g del producto acetilado. Este mismo procedimiento se utilizó con las muestras colectadas en el quilombo de Varre-Vento, Rio Trombetas, Oriximiná y en el municipio de Rurópolis, Pará. También, se utilizó la muestra procedente de la Industria Sobral que comercializa una tintura con la raíz de jalapa, además de una

muestra auténtica de la jalapa brasileña de flores blancas (*Operculina macrocarpa*) como referencia para realizar el análisis cromatográfico comparativo en una cromatografía en capa fina (Figura 15).

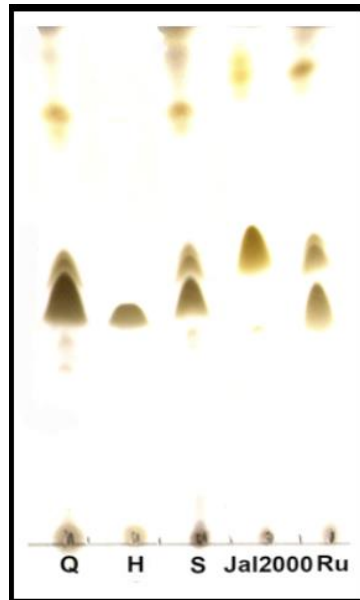


Figura 15. Cromatografía en capa fina (CH_2Cl_2 -MeOH, 95:5; Eluida tres veces) Q = muestra colectada en el quilombo de Varre-vento, Río Trombetas; H = muestra histórica de *Operculina macrocarpa* en depósito en la drogateca; S = Droga cruda utilizada por Industrias Sobral; Jal2000 = Muestra de la jalapa adquirida en mercado de Satarem, Pará, Brasil; Ru = colecta del Municipio de Rurópolis, Pará.

Con la finalidad de eliminar interferencias en la muestra de interés, el producto peracetilado se sometió a un proceso de purificación previo al análisis por HPLC. En una columna abierta empacada con 30 g de gel de sílice y como fase móvil se emplearon mezclas de CH_2Cl_2 -MeOH en diferentes proporciones (150 mL de cada fase móvil), recolectándose fracciones de 50 mL. Este proceso cromatográfico se resume en el cuadro 4.

Cuadro 4. Procedimiento cromatográfico de la purificación de la mezcla de acetilación.

Fracción	Composición Fase móvil
1-3	CH ₂ Cl ₂
4-6	95:5 CH ₂ Cl ₂ :MeOH
7-9	9:1 CH ₂ Cl ₂ :MeOH
10-12	85: 15 CH ₂ Cl ₂ :MeOH
13-15	4:1 CH ₂ Cl ₂ :MeOH
16-18	3:2 CH ₂ Cl ₂ :MeOH
19-21	2:3 CH ₂ Cl ₂ :MeOH
22-24	MeOH

Las fracciones obtenidas fueron analizadas por una cromatografía en capa fina para identificar al producto de interés utilizando como fase móvil una mezcla de CH₂Cl₂-MeOH (9:1).

Este procedimiento permitió observar que el conjunto de fracciones F5 – F7 contenían al producto mayoritario, y fueron reunidos y concentradas a sequedad obteniéndose 1.32 g de un residuo “café”.

5.6 Cromatografía de líquidos a nivel analítico

Para establecer las condiciones experimentales que permitieran la separación individual de los componentes presentes en las muestras analizadas se realizaron pruebas a nivel analítico usando dos fases estacionarias (Cuadro 5) y diversas fases móviles con un sistema de elución isocrático y un detector de índice de refracción (Cuadro 6). Con base en los resultados de los ensayos realizados, se estableció que las condiciones analíticas que permitieron la mejor resolución de la muestra problema fueron una columna C-18 con una fase móvil formada por una mezcla entre CH₃CN:H₂O (9:1).

Cuadro 5. Características de las fases estacionarias utilizadas para los análisis de HPLC a nivel analítico.

Fase estacionaria	Marca	Dimensiones	Tamaño de partícula
<i>Analítica octadecilsilano (C-18)</i>	Waters Symmetry® C18	4.6 x 250 mm	5 µm
<i>Analítica aminopropilmetilo (NH₂)</i>	Waters YMC	10 x 150 mm	5 µm

Cuadro 6. Condiciones experimentales utilizadas en los distintos análisis cromatográficos a nivel analítico.

Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo	Concentración de la muestra	Volumen de inyección	Detector
<i>C-18</i>	CH ₃ CN:H ₂ O 9:1	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL	Índice de refracción
<i>C-18</i>	CH ₃ CN:H ₂ O 7:3	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL	Índice de refracción
<i>C-18</i>	CH ₃ CN:H ₂ O 1:1	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL	Índice de refracción
<i>NH₂</i>	CH ₃ CN:H ₂ O 7:3	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL	Índice de refracción
<i>NH₂</i>	CH ₃ CN:MeO H 1:9	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL	Índice de refracción

5.7 Cromatografía de líquidos de alta resolución a nivel preparativo.

Las condiciones analíticas se extrapolaron a un nivel preparativo, este escalamiento se realizó utilizando la expresión matemática $F_p = F_a \left(\frac{l_p}{l_a}\right) \left(\frac{d_p^2}{d_a^2}\right)$ dónde:

F_p = Flujo de la fase móvil a nivel preparativo

F_a = Flujo de la fase móvil a nivel analítico

l_p = Longitud de la columna preparativa

l_a =Longitud de la columna analítica

d_p = Diámetro interno de la columna preparativa

d_a = Diámetro interno de la columna analítica

De esta forma, se logró establecer que las mejores condiciones instrumentales de trabajo correspondían con una columna C₁₈ (19 × 300 mm, 7 μm, Waters Symmetry), una fase móvil binaria de CH₃CN:H₂O (9:1) con un flujo de 8.0 mL/min, utilizando un detector de índice de refracción (sensibilidad 1024) y un volumen de inyección de la muestra de 500 μL (50mg/500 μL, MeOH). La técnica de corte de núcleo y reciclaje de la muestra se utilizó para lograr la mejor separación y pureza del analito.

6. Resultados y Discusión

6.1 Análisis por HPLC preparativo

Utilizando las condiciones instrumentales indicadas en el inciso 5.7 (sección experimental) para separar a los componentes de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados, se obtuvo el cromatograma ilustrado en la Figura 16.

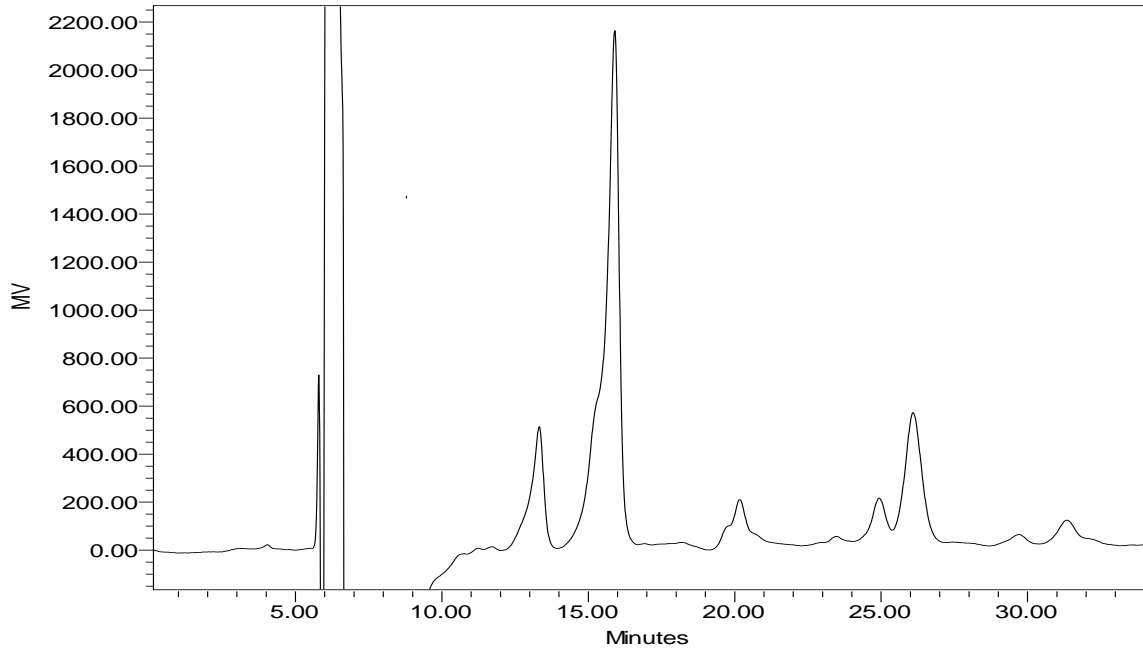


Figura 16. Cromatograma de líquidos a nivel preparativo de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados; columna C-18 (19 × 300 mm, 7 μ); fase móvil: CH₃CN:H₂O (9:1), flujo: 8.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección: 500 μL (50 mg/500 μL).

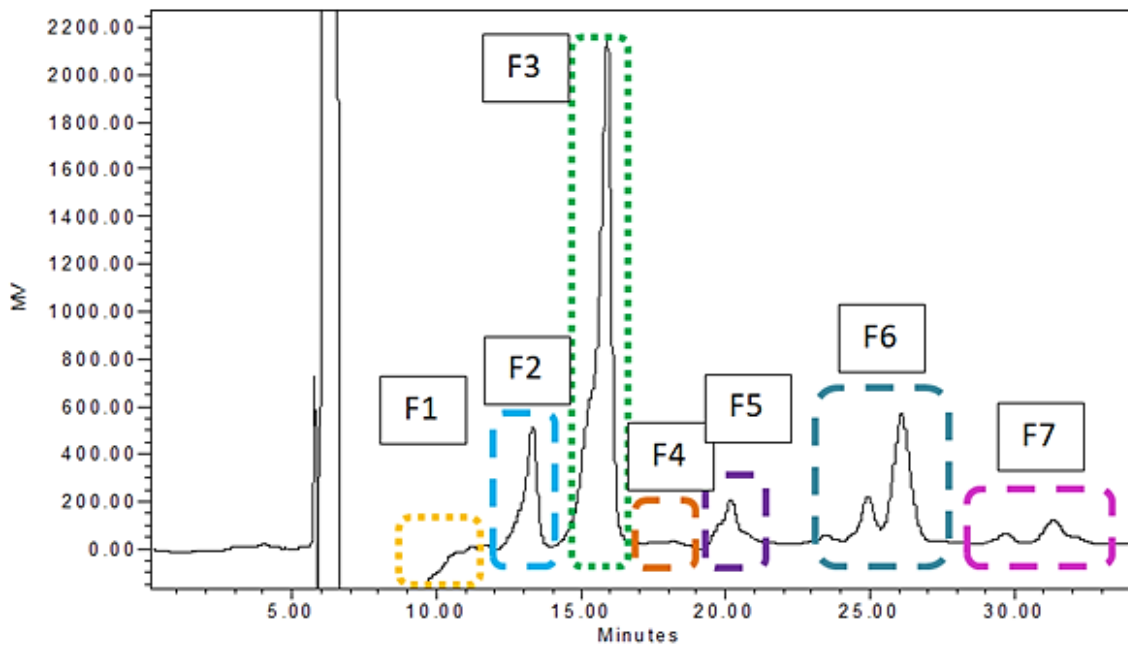


Figura 17. Cromatograma de las fracciones obtenidas a partir de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados, mediante el uso de la técnica de corte de núcleo.

En la figura 17 se ilustra el fraccionamiento mediante HPLC del conjunto de fracciones a nivel preparativo de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados mediante el uso de la técnica de corte de núcleo. Como resultado de este fraccionamiento secundario, se obtuvieron siete fracciones de menor complejidad (F1-F7). En el cuadro 7 se resume el rendimiento y el ion molecular (m/z) $[M+Na]^+$ detectado mediante la técnica de ionización por electrospray de cada fracción analizada.

Cuadro 7. Rendimientos del fraccionamiento por HPLC preparativo y análisis de masas mediante electrospray en modo positivo de las fracciones obtenidas.

Fracción	Tiempo de retención	Cantidad	EM-ESI $[M+Na]^+$ m/z
F1	10.8 min	132 mg	-
F2	13.0 min	136.2 mg	1603
F3	15.5 min	734 mg	1545
F4	17.8 min	34.4 mg	-
F5	20.5 min	36 mg	1617
F6	24-27 min	79.6 mg	1271 (minoritario) 1559 (mayoritario)
F7	29-32 min	32 mg	1573

6.2 Purificación del ácido glicosídico mayoritario presente en la Fracción 7.

La fracción 7 (32.0 mg) se sometió a la técnica de reciclaje y rasurado de pico con un t_R = 31.5 min para purificar al componente mayoritario, utilizando HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones instrumentales: columna NH_2 (19 × 150 mm, 10 μ m); fase móvil: $CH_3CN:H_2O$ (8:2), flujo: 5.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección: 500 μ L (32.0 mg/500 μ L).

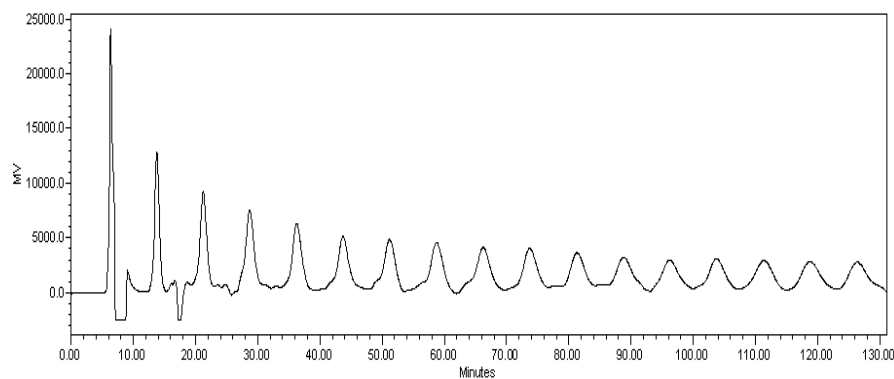


Figura 18. Purificación del ácido glicosídico peracetilado mayoritario presente en la fracción 7 ($t_R = 31.5$ min; cromatograma Figura 19).

El reciclaje del pico durante 15 ciclos (7 min cada uno) permitió la purificación de 17.0 mg del ácido glicosídico mayoritario presente (Figura 18) como un sólido blanco. Este derivado se analizó por espectrometría de masas mediante ionización por electroespray (EM-ESI) (Figura 19) para determinar el peso molecular del compuesto, observándose un ión molecular en una relación masa-carga (m/z) de 1573 $[M+Na]^+$ y una fórmula molecular calculada de $C_{72}H_{110}O_{36}$. La masa observada para este compuesto representa una diferencia de 28 unidades de masa adicionales al valor registrado para el ácido operculínico A (F3, $t_R = 15.5$ min, $[M+Na]^+$ 1545, $C_{70}H_{106}O_{36}$).

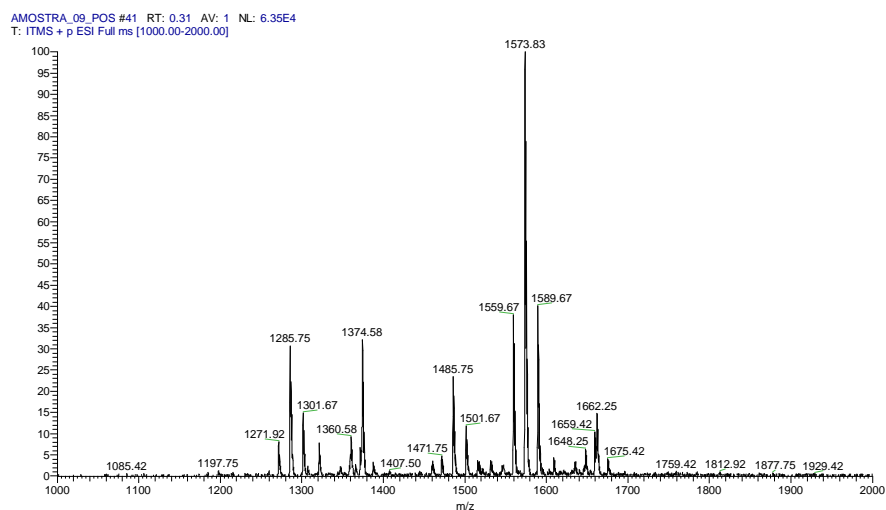


Figura 19. Espectro de masas de alta resolución (EM-ESI, modo positivo) del componente mayoritario purificado de la fracción 7.

De acuerdo a los resultados expuestos en la Figura 19 se observa que el producto mayoritario 1 aislado de la fracción 7, se trata de un ácido glicosídico novedoso que contiene la misma porción oligosacárida del ácido operculínico A presente en la fracción 3 teniendo una diferencia de 28Da lo que supone una aglicona con dos grupos metilenos adicionales y, por lo tanto, correspondiente a un ácido monohidroxilado octadecanóico. Para comprobar lo anterior, el compuesto purificado, se analizó mediante la técnica de resonancia magnética nuclear (RMN). El análisis de los espectros unidimensionales de ^1H (Figura 20) y ^{13}C (Figura 21), así como los experimentos bidimensionales, permitieron definir los desplazamientos químicos (δ) y las constantes de acoplamiento (J) para los constituyentes del núcleo oligosacárido (Cuadro 8). La asignación de los datos espectroscópicos para el producto mayoritario de la fracción F7(1) se realizó mediante comparación con los datos descritos para los derivados peracetilados del ácido operculínico A (2) (Ono *et. al.*, 1989) y el ácido glicosídico mayoritario de la fracción 6 (Jiménez-Barcena, 2018) (Figuras 22 y 23). Así, se pudo deducir que los tres derivados presentan la misma porción oligosacárida. La diferencia se encuentra en el ácido graso que constituye la aglicona ya que para el constituyente de la fracción F3 consta de 16 átomos de carbono, para el producto mayoritario de la fracción F6 es de 17 (heptadecanóico) y para el compuesto purificado de la fracción F7 es de 18 (octadecanóico) (Figura 24). El compuesto purificado de la fracción 7 muestra dos señales adicionales en el espectro RMN ^{13}C en la región alifática al compararlo con el producto 2 de la fracción F3 (Figura 24), por lo que el ácido graso que constituye a la aglicona contiene 18 carbonos. Esta información se complementa con los resultados obtenidos por espectrometría de masas mediante la técnica de ionización por electrospray (Cuadro 8).

Cuadro 8. HPLC acoplado fuera de línea con EM-ESI.

t_R (min)	ESIMS $[\text{M}+\text{Na}]^+ m/z$	Derivado peracetilado: Fórmula Molecular
13.0 (F2)	1603	Ácido operculínico B: $\text{C}_{72}\text{H}_{108}\text{O}_{38}$
15.5 (F3)	1545	Ácido operculínico A: $\text{C}_{70}\text{H}_{106}\text{O}_{36}$
20.5 (F5)	1617	Ácido operculínico B + CH_2 : $\text{C}_{73}\text{H}_{110}\text{O}_{38}$
26.2 (F6)	1559	Ácido operculínico A + CH_2: $\text{C}_{71}\text{H}_{108}\text{O}_{36}$
31.5 (F7)	1573	Ácido operculínico A + $2 \times \text{CH}_2$: $\text{C}_{72}\text{H}_{110}\text{O}_{36}$

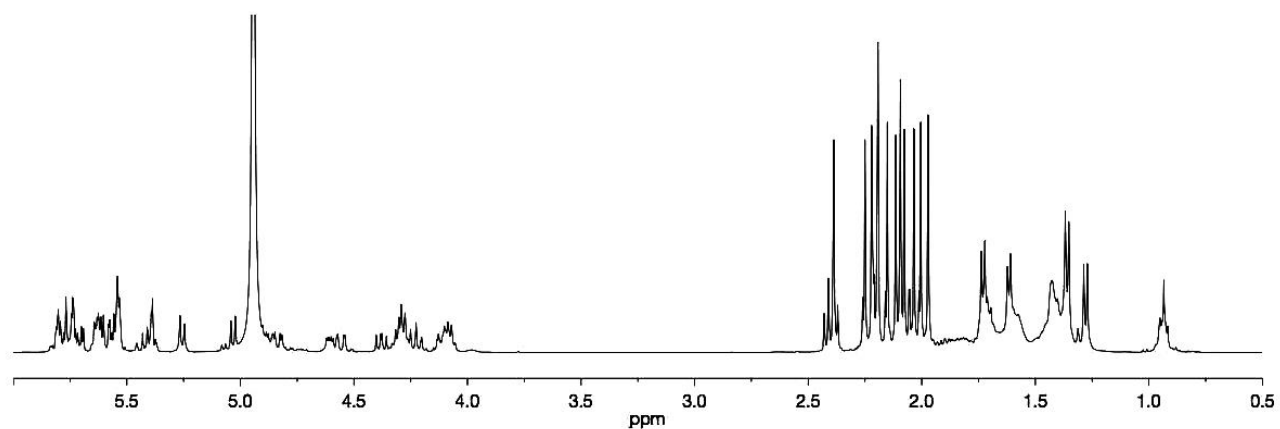


Figura 20. Espectro de RMN ¹H para el producto mayoritario 1 aislado de la fracción 7 (400 MHz, piridina-*d*₅).

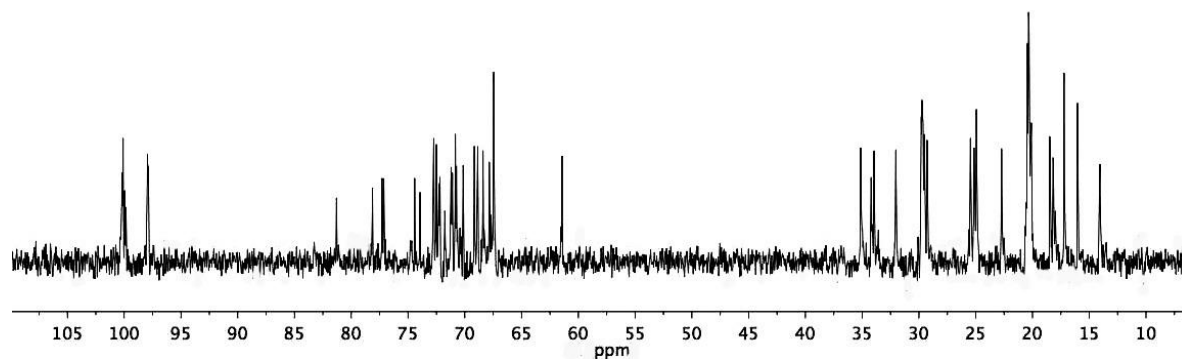


Figura 21. Espectro de RMN ¹³C para el producto mayoritario 1 aislado de la fracción 7 (100 MHz, piridina-*d*₅).

Cuadro 9. Asignaciones de los espectros de RMN para los productos aislados puros

Posición	Producto 2 <i>ácido Operculínico A</i>		Producto 3 <i>ácido 12-hidroxiheptadecanóico</i>		Producto 1 <i>ácido 12-hidroxiocetadecanóico</i>	
	δ H	δ C	δ H	δ C	δ H	δ C
Fuc-1	4.99 d (7.5)	99.9	5.00 d (7.6)	100.5	5.02	100.7
2	4.34 dd (9.5, 7.5)	73.9	4.34 dd (10.0, 7.6)	73.5	4.35 (9.5, 7.5)	74.6
3	5.50 dd (9.5, 3.0)	68.4	5.50 (9.5, 3.0)	68.6	5.50 dd (9.5, 3.0)	68.5
4	5.53 d (3.0)	72.1	5.57 brs	70.9	5.58-5.52	72.9
5	4.04 dd (6.5, 0.5)	68.8	4.07 (6.4, 0.8)	68.6	4.09 dd	69.8
6	1.24 d (6.5)	16.0	1.27 d (6.4)	16.5	1.27 d (6.4)	16.7
Ram-1	5.50 brs	97.8	5.50 brs	98.6	5.50 brs	98.6
2	5.60 dd (3.0, 1.5)	70.7	5.59 dd (3.6, 1.6)	71.6	5.60 dd (3.0, 1.5)	71.5
3	5.74 dd (9.5, 6.5)	71.0	5.74 dd (9.6, 6.4)	72.0	5.74 dd (9.5, 6.5)	71.4
4	4.19 dd (10.0, 9.5)	81.3	4.20 dd (10.0, 9.2)	82.1	4.21 dd (10.0, 9.5)	81.9
5	4.84 dq (9.5, 6.5)	67.4	4.84*	68.2	4.87 dq	68.1
6	1.69 d (6.0)	18.1	1.70 d (6.0)	18.6	1.72	18.37
Ram⁻¹	5.35 brs	100.2	5.35 brs	100.7	5.35 brs	100.8
2	5.53 m*	71.2	5.50*	72.9	5.51-5.55	71.7
3	4.56 dd (8.0, 3.5)	77.1	4.57 dd (8.4, 3.6)	77.9	4.57 dd (8.0, 3.5)	77.9
4	5.50 m*	68.4	5.50*	68.3	5.51-5.55	68.5
5	4.25 dq (6.0, 10.0)	77.2	4.25 dq (5.8, 10)	78.1	4.25 dq (6.0, 10.0)	77.8
6	1.57 d (5.5)	18.4	1.59 d (5.6)	18.9	1.58 d (5.5)	18.7
Ram⁻¹	5.70 brs	97.9	5.70 brs	98.4	5.70 brs	98.5
2	5.77 dd (3.5, 1.5)	70.0	5.77 dd (3.2, 1.2)	70.6	5.77 dd (3.5, 1.5)	70.8
3	5.67 dd (10.5, 3.5)	69.0	5.66 dd (10.4, 3.6)	69.6	5.64 dd (10.5, 3.5)	69.5
4	5.57 m	70.7	5.60 m*	71.4	5.58 m	71.8
5	4.26 dd (10.0, 6.5)	67.4	4.27 (9.6, 6.4)	68.2	4.30-4.26	68.1
6	1.32 d (6.5)	17.2	1.35 d (6.4)	17.7	1.34 d (6.5)	17.5
Glu-1	5.22 d (7.5)	100.1	5.23 d (8.0)	100.6	5.22 d (7.5)	100.7
2	5.37 dd (9.5, 9.5)	72.1	5.36*	72.0	5.37 dd (9.5, 9.5)	72.8
3	5.73 dd (9.5, 9.5)	72.8	5.73 t (9.2, 9.2)	73.0	5.73 dd (9.5, 9.5)	73.4
4	5.50 t (9.5)	74.4	5.51*	75.2	5.55-5.52	75.0
5	4.08 ddd (10.5, 3.0, 3.0)	72.5	4.10*	72.9	4.10*	73.1
6^a	4.51 dd (12.5, 2.5)	61.7	4.53 dd (12.4, 2.0)	62.2	4.51 (12.5, 2.5)	62.1
6^b	4.80 dd (12.5, 3.5)		4.79 dd (12.4, 3.6)		4.80 (12.5, 3.5)	

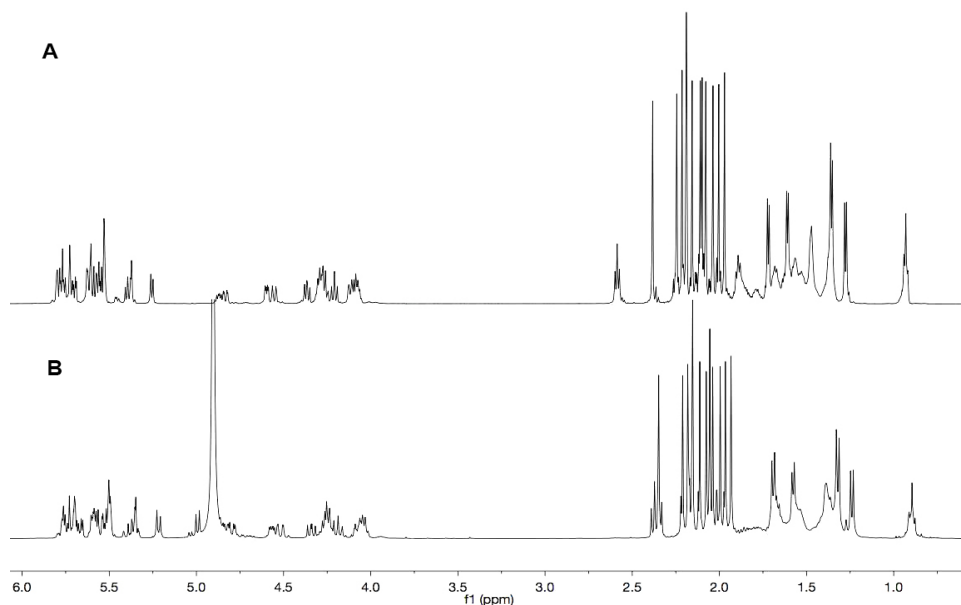


Figura 22. Comparación de los espectros de RMN ^1H (500 MHz, $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) para los peracetatos del ácido operculínico A (Producto 2; **A**: con supresión de H_2O) y del producto mayoritario 1 de la fracción 7 (**B**).

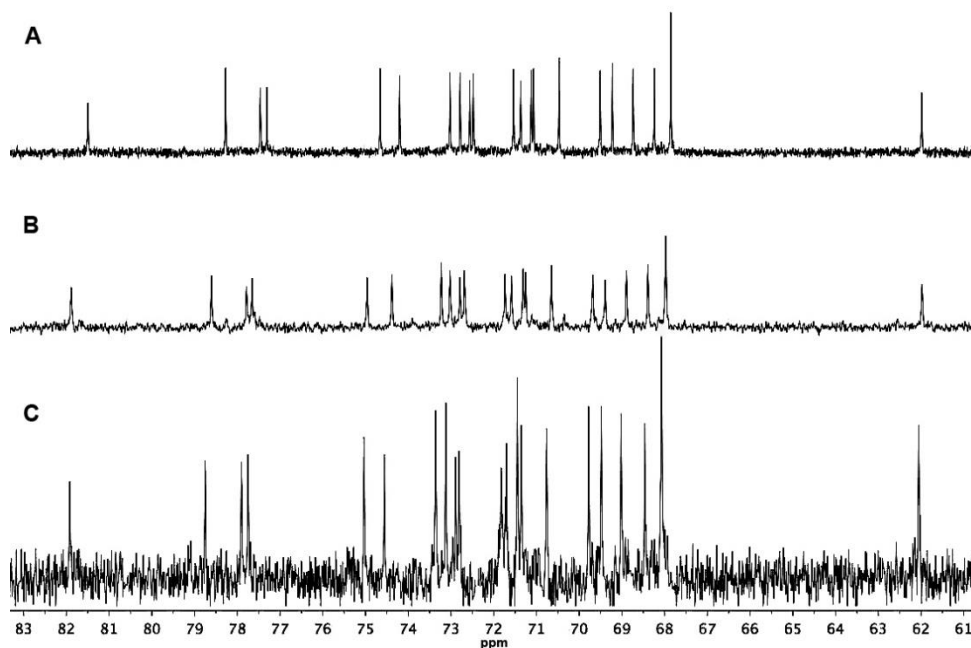


Figura 23. Comparación de los espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) para los derivados peracetilados del ácido operculínico A (Producto 2; **A**), los ácido glicosídicos mayoritarios de los productos 3 (**B**) y 1(**C**) obtenidos de las fracciones F6 y F7 respectivamente.

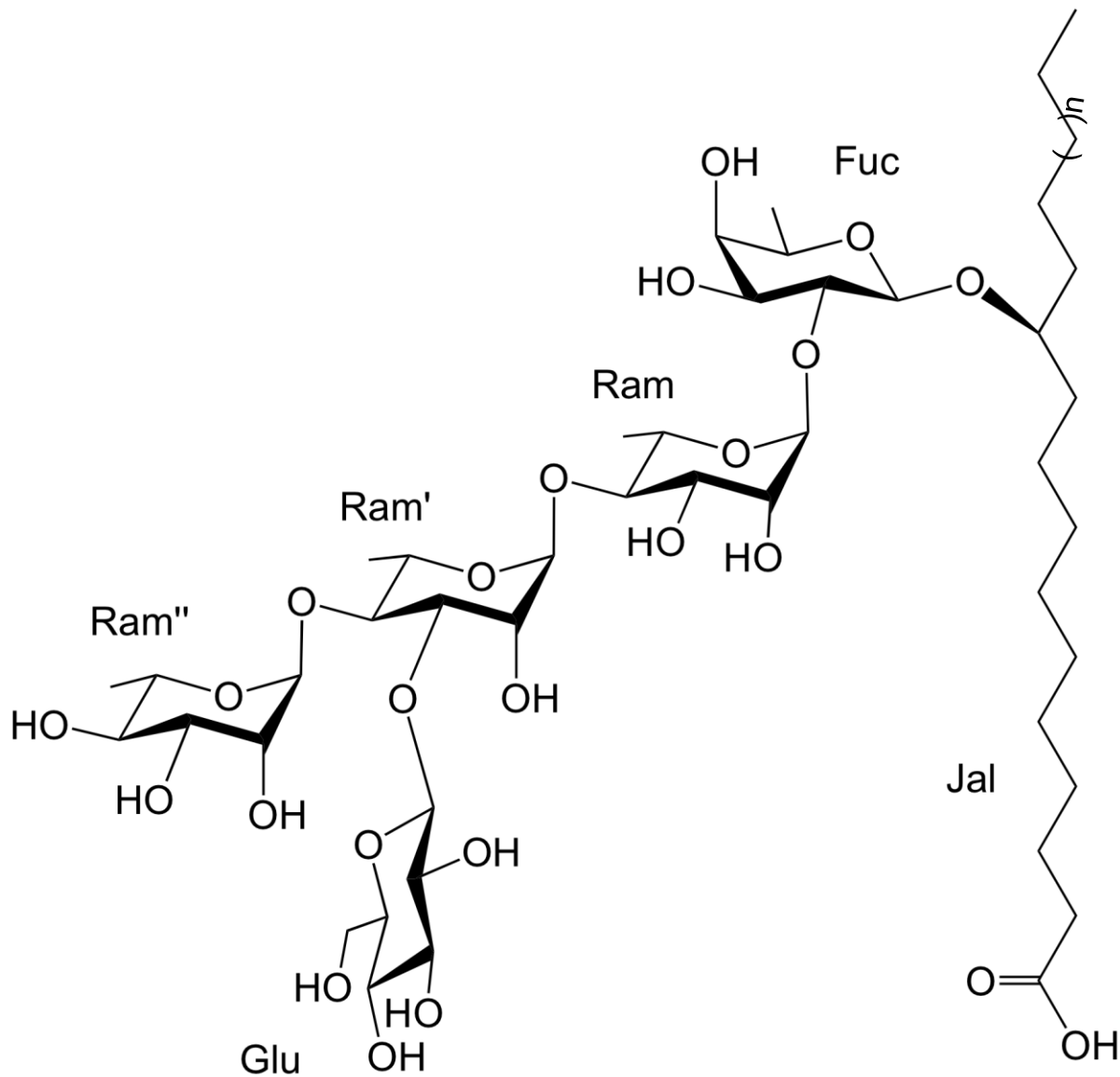


Figura. 24. Comparación de las estructuras para los ácidos glicosídicos del producto mayoritario 3 (peracetato: $C_{71}H_{108}O_{36}$; aglicona ácido 12-hidroxihexadecanoico, $n = 1$) y el producto mayoritario 1 (peracetato: $C_{72}H_{110}O_{36}$, aglicona ácido 12-hidroxioctadecanoico, $n = 2$).

6.3 Interpretación del ácido graso que forma la aglicona para el compuesto mayoritario 1 de la fracción 7.

Para llevar a cabo la caracterización de la longitud de los ácidos grasos pertenecientes a la aglicona, se realizó la comparación de los espectros de RMN ¹³C en la región alifática de la fracción 3 (ácido operculínico A) y para los picos F6 y F7 mayoritarios (Figura 25). También, se utilizó la información publicada para las agliconas descritas para la jalapa de la India (*Operculina turpethum*)⁸ ya que se ha descrito que las agliconas para este género presentan monohidroxilación en las posiciones C-11 o C-12 y la comparación con el ácido 12S-hidroxiheptadecanoico permitió la asignación para las señales en la RMN ¹³C para el compuesto F6. El compuesto purificado F7 muestra una señal adicional en el espectro RMN ¹³C en la región alifática y la comparación de los espectros resumida en el Cuadro 9 permitió completar la asignación para los desplazamientos químicos del ácido graso que constituye la aglicona que consta de 18 carbonos (el ácido 12-hidroxi-octadecanoico).

Cuadro 10. RMN ¹³C para las agliconas de los productos aislados 2, 3 y 1 (provenientes de las fracciones F3, F6 y F7 respectivamente).

Posición	δ C Producto 2 ácido <i>Operculínico A</i>	δ C Producto 3 ácido <i>12-hidroxiheptadecanoico</i>	δ C Producto 1 ácido <i>12-hidroxi-octadecanoico</i>
<i>Aglicona – 1</i>	175.0	175.0	175.0
2	35.80	34.50	34.57
3	26.33	25.60	25.77
4	30.44	30.40	30.42
5	30.41	30.30	30.36
6	30.35	30.20	30.34
7	30.35	30.10	30.26
8	30.21	29.80	30.15
9	32.60	29.80	29.90
10	35.70	26.00	26.09
11	78.70	34.40	34.82
12	34.50	78.30	78.75
13	26.08	35.70	35.79
14	25.54	25.50	25.57
15	22.33	32.60	32.65
16	14.66	23.30	23.34
17	---	14.60	29.87
18	---	---	14.68

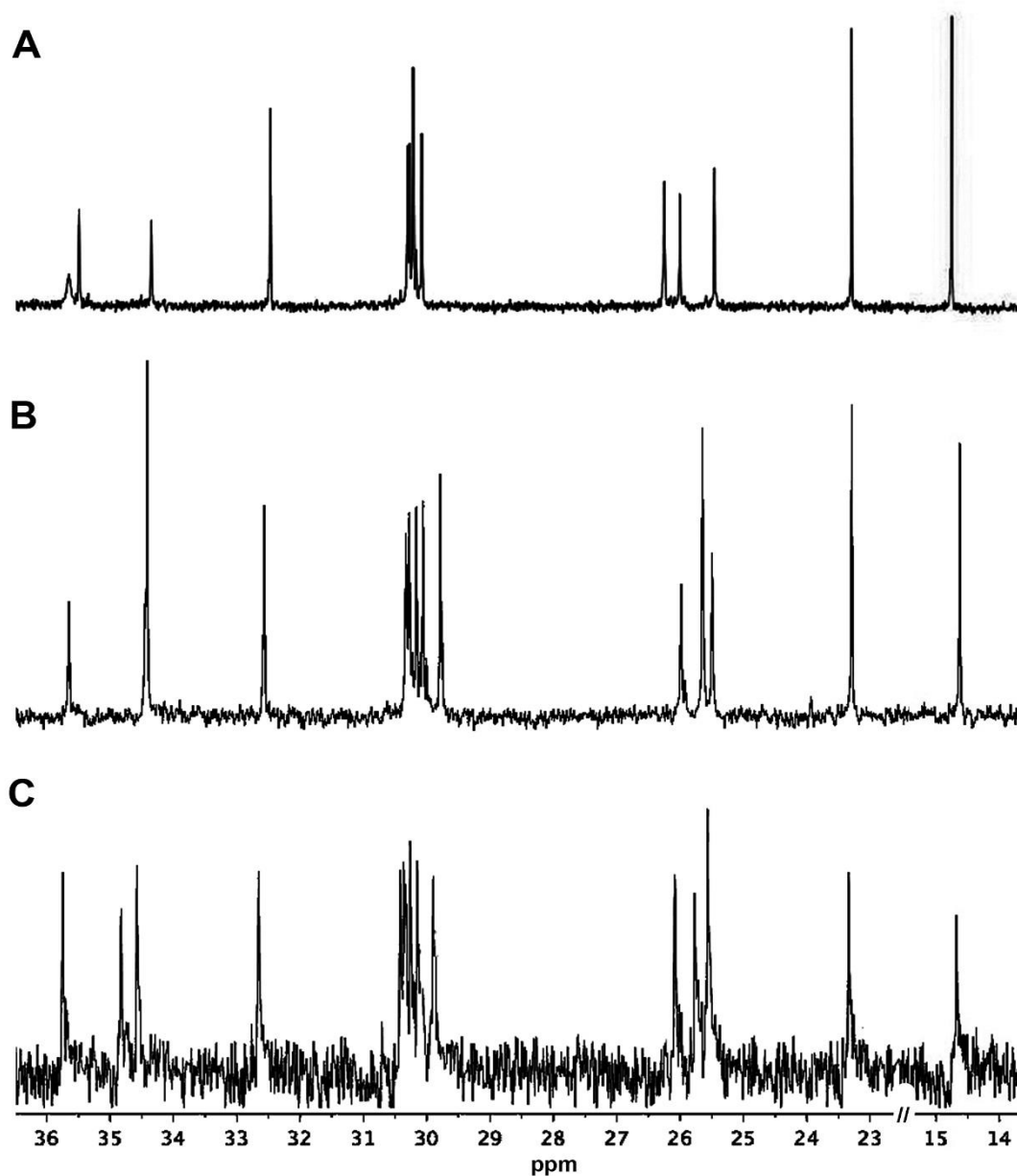


Figura. 25 Comparación de los espectros de RMN ^{13}C (125 MHz, $\text{C}_6\text{D}_5\text{N}$) de la porción correspondiente a las agliconas (δ 14-36) de los ácidos operculínicos mayoritarios aislados de las fracciones 3 (ácido operculínico A: ácido 11-hidroxihexadecanoico, ácido jalapinólico), 6 (Pico 6 mayoritario, ácido 12-hidroxiheptadecanoico) y 7 (Pico 7 mayoritario, ácido 12-hidroxiioctadecanoico). Se suprimió del espectro la porción centrada entre δ 15.5-22.5.

7. Conclusiones

1.- El estudio químico del material comercial pulverizado de la jalapa brasileña (*Operculina hamiltonii*) generó diferentes fracciones que permitieron el aislamiento de los ácidos glicosídicos mayoritarios en forma de derivados peracetilados. En el presente trabajo de investigación, se empleó la fracción F7 (Pico 7 mayoritario) para la purificación mediante HPLC en fase reversa y la elucidación estructural de su constituyente mayoritario.

2. El reciclaje del producto mayoritario 1 de la fracción F7 permitió la purificación del ácido glicosídico mayoritario que mediante espectrometría de masas en la modalidad de electroespray positivo (ESI-MS) determinó la fórmula molecular de $C_{72}H_{110}O_{36}$ para el derivado acilado. La masa observada para este compuesto representó una diferencia de 28 unidades de masa adicionales al valor registrado para el ácido operculínico A.

3. Mediante el uso de la resonancia magnética nuclear se elucidó la estructura química del constituyente mayoritario 1 en la fracción F7. Este análisis estructural permitió identificar la similitud entre la secuencia de glicosidación para el núcleo oligosacárido descrita para el ácido operculínico A con una aglicona de dieciséis átomos de carbono. Sin embargo, la aglicona para el producto mayoritario 1 de la fracción F7 se identificó como el 12-hidroxi-octadecanóico.

4.- La diversidad estructural de las agliconas identificadas para *Operculina hamiltonii* es comparable a la previamente descrita para la jalapa de la India (*Operculina turpethum*) con ácidos grasos de cadenas impares y monohidroxilación en la posición C-12.

Referencias

1. Diaz David M. (2009). *Ipomoea* un género con tradición, Laboratorio de Bioquímica Tisular. Pp 36-44.
2. Cox, P.A. (1994). The ethnobotanical approach to drug discovery: Strengths and limitations. En: *Ethnobotany and the Search for New Drugs*. Ciba Foundation Symposium 185. John Wiley and Sons, Gran Bretaña, pp. 25-4.
3. Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Escalante-Sánchez, E., HernándezCarlos, B., Linares, E., Bye, R., (2006). Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *J. Nat. Prod.* 69, 1460–1466.
4. Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramírez, D., Castañeda-Gómez, J., (2010). Resin glycosides from the morning glory family, in: Kinghorn A, Falk H, Kobayashi J. (Eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, vol. 92. Springer Verlag, New York, pp. 77–153.
5. 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. *J. Ethnopharmacol.* 46, 63-69.
6. Linares, A., Rico-Gray, V., Carrión, G. (1994). Traditional Production System of the Root of Jalap, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, México. *Econ. Bot.*, 48, 84-89.
7. Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2016). Jalapinoside II, a bisdesmoside resin glycoside, and related glycosidic acids from the officinal jalap root (*Ipomoea purga*). *Phytochem. Lett.*, 17, 85-93.
8. Wenbing Ding., Zi-Hua Jiang., Ping Wu., Liangxiong Xu., Xiaoyi Wei. (2012). Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry*, 81, 165–174.
9. 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. (b) 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.

10. Wenbing Ding., Zi-Hua Jiang., Ping Wu., Liangxiong Xu., Xiaoyi Wei. (2012). Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry*, 81, 165–174.
11. Monardes, N. (1990). *Herbolaria de Indias. Historia Natural del Nuevo Mundo*. Instituto Mexicano del Seguro Social: Mexico. pp. 96-118.
12. Heine, H. (1960). *Operculina macrocarpa* (L.) Urban (Convolvulaceae) in West Tropical Africa. *Kew Bulletin*. 14, 397-399.
13. Natureza Bela. <http://belezadacaatinga.blogspot.mx/search/?q=batata+de+purga>
Consultado el 8 de Enero de 2018.
14. Austin, D. F., Staples G. W. (1983). Additions and changes in the neotropical convolvulaceae-notes on merremia, operculina, and turbina. *Journal of the Arnold Arboretum*. 64, 483-489.
15. Matos, F.J.A. (2000) *Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil*. Fortaleza: Imprensa Universitária Universidade Federal do Ceará. p.185-187.
16. Gomes, A.M.M., Silva, P.L., Soares, S.A., Silva, C.E.M., Gallão, M.I., Germani, R., Ricardo. N.M.P.S. (2009). Isolation and physico-chemical and rheological characterization of the Brazilian jalap starch (*Operculina tuberosa* Meisn.). *Carbohydr. Polymer*, 77, 885- 890.
17. Hernández-Carlos, B., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (1999). Orizabins V-VIII, Tetrassaccharides Glycolipds from the Mexican Sacammony Root (*Ipomoea orizabensis*). *J. Nat. Prod.*, 62, 1096-1100.
18. Davidow, J. (1999). *Infusions of Healing. A Treasury of Mexican-American Herbal Remedies*; Fireside: New York, p 134.
19. Escobedo-Martínez, C., Cruz-Morales, S., Fragoso-Serrano, M., Mukhlesur Rahman, M., Gibbons, S., Pereda-Miranda, R. (2010). Characterization of a xylose Containing oligosaccharide, an inhibitor multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry* 71: 1796.

20. Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1989). Resin Glycosides V. Identification and Characterization of the Component Organic and Glycosidic Acids of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides ("Jalapin") from Rhizoma *Jalapae braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, 37, 3209-3213.
21. Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1989). Operculin I and II, New Ether Soluble Resin Glycosides ("Jalapin") with Fatty Acid Ester Groups from Rhizoma *Jalapae braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 37, 241.
22. Ono, M. Fukunaga, T.; Kawasaki, T; Miyahara, K. *Chem Pharm Bull.* 1990, 38, 2650-2656.
23. Ono, M.; Nishioka, H.; Fukushima, T.; Kunimatsu, H.; Mine, A.; Kubo, H.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.* 2009, 57, 262-268.
24. Escalante Sánchez, E. (2004). Aislamiento y caracterización estructural de cuatro lipopentacáridos *Ipomoea pes-caprae*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.
25. Noda, N., Takahashi, T., Kawasaki, T., Miyahara, K., Yang C.R. (1994). Stoloniferins I-VII, Resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* 36, 365-371.
26. Barnes, C.C., Smalley, M. K., Manfredi, K. P., Kindscher, K., Loring, H., Sheeley, D.M. (2003). Characterization of an anti-tuberculosis resin glycoside from the prairie medicinal plant *Ipomoea leptophylla*. *J. Nat. Prod.* 66, 1457-1462.
27. Ono, M., Kuwabata, K., Kawasaki, T., Miyahara, K., (1992). Resin Glycosides XVI. Quamoclins I-IV, new ether-soluble resin glycosides (Jalapin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. *Chem. Pharm. Bull.* 40, 2674-2680.
28. Noda, N., Tsuji, K., Miyahara, K., Yang, C. R. (1994). Resin Glycosides XXI. Tuguajalapins I-X, the Resin Glycosides Having Long-Chain Fatty Acid Groups from the Root of *Merremia hungaiensis*. *Chem. Pharm. Bull.* 42, 2011.

29. Kitagawa, Y., Baek, N.I., Ohashi, K., Sakagami, M., Yoshikawa, M., Shibuya, H. (1989). Mammosides B and H1, new ionophoric resin-grlycosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an Indonesian folk medicine. *Chem. Pharm. Bull.* 37, 1131-1133.
30. Kitagawa, Y., Baek, N.I., Kawashima, K., Yokokawa, M., Ohashi, K., Shibuya, H. (1996). Indonesian medicinal plants. XVI. Chemical structures of four new resinglycosides, merremosides f, g, h₁ and h₂, from the tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 44, 1693-1699
31. Yin, Y-Q., Wang, J-S., Luo, J-G., Kong, L-Y. (2009). Novel acylated lipooligosaccharides from the tubers of *Ipomoea batatas*. *Carbohydr. Res.* 344, 466.
32. Escalante-Sánchez, E., Rosas-Ramírez, D., Linares, E., Bye, R., PeredaMiranda, R. (2008). Batatinosides II–VI, Acylated Lipooligosaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. *J. Agric. Food Chem.* 56, 9423.
33. Ono, M., Fukuda, H., Murata, H., Miyahara, K. (2009). Resin Glycosides from the leaves and steams of *Ipomoea digitata*. *J. Nat. Med.* 63, 176.
34. Bah, M., Chérigo, L., Cardoso, A., Fragoso-Serrano, M., Hammond, B., Pereda Miranda, R. (2007). Intrapilosins I-VII, Pentasaccharides from the Seeds of *Ipomoea intrapilosa*. *J. Nat. Prod.* 70, 1153.
35. Kitagawa, I., Ohashi, K., In, N., Sakagami, M., Yoshikawa, M., Shibuya, H. (1997). Indonesian Medinal Plants. XIX. Chemical Structures of Four Additional Resin Glycosides, Mammosides A, B, H1 and H2, from the Tuber of *Merremia mammosa* (Convolvulaceae). *Chem. Pharm. Bull.* 45, 786.
36. Chérigo, L., Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Jacobo-Herrera, N., Kaatz, G. W., Gibbons, S. (2008). Inhibitors of Bacterial Multidrug Efflux Pumps from the Resin Glycosides of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 71, 1037.
37. Chérigo, L., Pereda-Miranda, R. (2006). Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 69, 595.

38. Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1989). Operculin I and II, New Ether Soluble Resin Glycosides ("Jalapin") with Fatty Acid Ester Groups from Rhizoma *Jalapae braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 37, 241.
39. Ono, M.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1991). Resin Glycosides XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII. New Ether-Soluble Resin Glycosides of Rhizoma *Jalapae Braziliensis* (Root of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 39, 2534.
40. Castañeda-Gómez, Jhon F.; Charry Paula A., Pereda Miranda R. (2013) Analytical methods for isolation and identification of resin glycosides from *convolvulaceae* family. *Rev. Invest. Univ. Quindío, Colombia.* P 19-29.
41. Castañeda-Gómez J, Pereda-Miranda R. (2011). Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap. *J. Nat. Prod.* 74, 1148-1153.
42. Bah, M., Pereda-Miranda, R. (1997). Isolation and structural characterization of new glicolipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* 53, 9007-9022.
43. 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.
44. Castañeda Gómez, Jhon F. (2012). Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, México.