



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**  
**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

“Aplicación de la cromatografía de líquidos en la resolución de los ácidos glicosídicos mayoritarios de la jalapa brasileña”

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. NADIA ROSALINA JIMÉNEZ BÁRCENAS

DR. ROGELIO GREGORIO PEREDA MIRANDA  
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX, MAYO DE 2018



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.**

<b>Presidente</b>	Dr. Raúl Guillermo Enríquez Habib
<b>Vocal</b>	Dr. José Federico del Río Portilla
<b>Vocal</b>	Dra. María del Pilar Canizares Macías
<b>Vocal</b>	Dr. Mamadou Moustapha Bah
<b>Secretario</b>	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar

### **Sitio donde se desarrolló el tema:**

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

## **AGRADECIMIENTOS.**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación y la beca otorgada (Número de becario: 596642) durante el periodo Febrero 2016 - Enero 2018.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN215016) por el financiamiento parcial de esta investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química por la formación a nivel maestría que me han brindado.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda, por permitirme ser parte de su equipo de trabajo, por la atención y asesoría brindadas durante la maestría.

A la Dra. Mabel Fragoso Serrano, por su asistencia técnica, asesoría, apoyo y observaciones recibidas durante la maestría.

Al Dr. Jhon Castañeda Gómez por la asesoría brindada durante su estancia.

Al Dr. Mario A. Figueroa Saldívar por el apoyo en la realización de los espectros de masas.

A la USAII por la adquisición de los espectros de Resonancia Magnética Nuclear y espectros de masas

A los miembros del jurado, por brindarme de su valioso tiempo para la revisión y mejora del presente texto.

## ÍNDICE.

I. LISTA DE FIGURAS.	i
II. LISTA DE CUADROS.	v
III. LISTA DE ABREVIATURAS.	vi
1. INTRODUCCIÓN.	8
2. ANTECEDENTES.	9
2.1 La familia Convolvulaceae.	9
2.2 El género <i>Ipomoea</i> .	10
2.2.1 Historia de algunas especies purgantes endémicas de México.	10
2.2.2 Historia de las especies purgantes de Brasil.	13
2.2.2.1 <i>Operculina hamiltonii</i> .	15
2.2.2.2 Usos medicinales de las jalapas brasileñas.	19
2.3 Resinas glicosídicas.	19
2.3.1 Naturaleza química.	19
2.3.2 Núcleos oligosacáridos aislados de especies de jalapas brasileñas.	24
2.4 Métodos de aislamiento y purificación, etc.	28
2.5 Elucidación estructural.	31
2.5.1 Métodos degradativos.	31
2.5.2 Métodos no degradativos.	32

3. JUSTIFICACIÓN.	33
4. HIPÓTESIS	33
5. OBJETIVOS.	34
5.1 Objetivo general.	34
5.2 Objetivos específicos.	34
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.	35
6.1 Métodos cromatográficos.	35
6.2 Material vegetal.	35
6.3 Preparación del extracto orgánico.	36
6.4 Hidrólisis alcalina del extracto orgánico (saponificación).	36
6.5 Peracetilación del producto de saponificación.	36
6.6 “Clean-up” del producto peracetilado.	37
6.7 Aislamiento de los ácidos glicosídicos peracetilados mediante HPLC.	38
6.7.1 Análisis por HPLC a escala analítica.	38
6.7.2 Purificación por HPLC a escala preparativa.	38
6.8 Determinación de las constantes físicas y propiedades espectroscópicas y espectrométricas.	40
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	41
7.1 Preparación del extracto orgánico.	41

7.2 Hidrólisis alcalina del extracto orgánico (obtención de los ácidos glicosídicos).	41
7.3 Aislamiento y purificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios.	41
7.3.1 Peracetilación de los ácidos glicosídicos.	41
7.3.2 “Clean-up” del producto peracetilado.	41
7.3.3 Aislamiento de los ácidos glicosídicos peracetilados mediante HPLC.	42
7.3.3.1 Análisis por HPLC escala analítica.	42
7.3.3.2 Purificación por HPLC escala preparativa.	43
7.3.4 Purificación de los ácidos glicosídicos peracetilados y caracterización estructural.	45
7.3.4.1 Ácido glicosídico mayoritario de la fracción 5.	45
7.3.4.2 Purificación del ácido glicosídico mayoritario de la fracción 6.	57
7.3.4.3 Purificación del ácido glicosídico minoritario de la fracción 6.	62
7.3.4.4. Caracterización de la longitud del ácido graso que forma la aglicona.	67
8. CONCLUSIONES.	69
9. BIBLIOGRAFÍA.	70
10. ANEXOS.	77

## LISTA DE FIGURAS.

<b>Figura 1.</b>	Forma de crecimiento de las convolvuláceas.	9
<b>Figura 2.</b>	Raíces (izquierda) y flor con hoja (derecha) de la auténtica raíz de Jalapa ( <i>I. purga</i> ).	11
<b>Figura 3.</b>	Especies del complejo comercializado como “las jalapas”: <i>I. orizabensis</i> (A: raíz, B: flor), <i>I. simulans</i> (C) e <i>I. stans</i> (D: flor, E: raíz).	12
<b>Figura 4.</b>	Raíz (izquierda y centro) y flor (derecha) de la jalapa de Brasil (batata de purga: <i>Operculina macrocarpa</i> ).	13
<b>Figura 5.</b>	Distribución geográfica de la jalapa de Brasil ( <i>Operculina macrocarpa</i> ).	14
<b>Figura 6.</b>	Distribución geográfica de la batata de purga ( <i>Operculina hamiltonii</i> ).	15
<b>Figura 7.</b>	Planta (izquierda) y flores (centro y derecha) de <i>Operculina hamiltonii</i> .	16
<b>Figura 8.</b>	Semillas (izquierda) y futos (derecha) de <i>Operculina hamiltonii</i> .	16
<b>Figura 9.</b>	Rizoma de <i>Operculina hamiltonii</i> .	18
<b>Figura 10.</b>	Estructura general de un glicolípido constituyente de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas.	20
<b>Figura 11.</b>	Ácido operculínico A (Ono <i>et al.</i> , 1989).	25
<b>Figura 12.</b>	Ácido operculínico B (Ono <i>et al.</i> , 1989).	25
<b>Figura 13.</b>	Ácido operculínico C (Ono <i>et al.</i> , 1989).	26
<b>Figura 14.</b>	Estructura de los ácidos operculínicos D, E, F y G (Ono <i>et al.</i> , 1990).	27
<b>Figura 15.</b>	Válvula de reciclaje acoplada a una bomba semipreparativa de la marca JASCO (izquierda) y esquema general del proceso de reciclaje (derecha) (Bidlingmeyer, 1992).	30

<b>Figura 16.</b>	Ejemplo de cromatograma generado mediante la técnica de reciclaje de muestra.	30
<b>Figura 17.</b>	Cromatograma de HPLC a escala analítica de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados.	42
<b>Figura 18.</b>	Cromatograma obtenido a escala preparativa que muestra las fracciones aisladas a partir de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados mediante el uso de la técnica de “corte de núcleo”.	43
<b>Figura 19.</b>	Espectro de masas (EM-ESI, modo positivo) de la fracción F5. Molécula cationizada $m/z$ 1617 $[M + Na]^+$ , 1618 $[M + 1 + Na]^+$ y 1653 $[M + Na + 2H_2O]^+$ .	46
<b>Figura 20.</b>	Purificación del ácido glicosídico peracetilado mayoritario presente en la fracción 5 del extracto saponificado y peracetilado, por la técnica de “reciclaje”, “corte y rasurado de pico”; (--- indica los fragmentos eliminados del pico).	46
<b>Figura 21.</b>	Espectro de masas de alta resolución (EM-ESI, modo positivo) del componente purificado de la fracción 5.	47
<b>Figura 22.</b>	Espectro de $^1H$ -RMN del compuesto purificado de la fracción 5 (400 MHz, piridina- $d_5$ ).	48
<b>Figura 23.</b>	Espectro de $^{13}C$ -RMN del compuesto purificado de la fracción 5 (100 MHz, piridina- $d_5$ ).	48
<b>Figura 24.</b>	Espectro HSQC de la zona anomérica del compuesto purificado de la fracción 5.	49
<b>Figura 25.</b>	Espectro COSY de la región oligosacárida del compuesto purificado de la fracción 5.	50
<b>Figura 26.</b>	Espectro TOCSY de la región oligosacárida del compuesto purificado de la fracción 5.	51

<b>Figura 27.</b>	Espectro HMBC del núcleo oligosacárido del compuesto purificado de la fracción 5.	52
<b>Figura 28.</b>	Comparación de los espectros de $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, piridina- $d_5$ ) en la región comprendida entre 4.0 y 6.0 ppm; i) ácido operculínico B (Fracción F2), ii) compuesto purificado de la fracción F5.	53
<b>Figura 29.</b>	Comparación de los espectros de $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, piridina- $d_5$ ) de la región comprendida entre 14 y 36 ppm; i) ácido operculínico B (Fracción F2), ii) compuesto purificado de la fracción F5.	53
<b>Figura 30.</b>	Estructura del ácido turpético C.	56
<b>Figura 31.</b>	Purificación del ácido glicosídico peracetilado mayoritario presente en la fracción 6; (--- indica los fragmentos eliminados del pico).	57
<b>Figura 32.</b>	Espectro de masas de alta resolución (EM-ESI, modo positivo) del componente mayoritario purificado de la fracción 6.	58
<b>Figura 33.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto mayoritario purificado de la fracción 6 (400 MHz, piridina- $d_5$ ).	59
<b>Figura 34.</b>	Espectro de $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto mayoritario purificado de la fracción 6 (100 MHz, piridina- $d_5$ ).	59
<b>Figura 35.</b>	Estructura propuesta para el ácido glicosídico peracetilado mayoritario de F6.	61
<b>Figura 36.</b>	Purificación del ácido glicosídico peracetilado minoritario de F6.	62
<b>Figura 37.</b>	Espectro de masas (EM-ESI, modo positivo) del componente minoritario de la fracción 6.	63
<b>Figura 38.</b>	Espectro de $^1\text{H}$ -RMN del compuesto minoritario purificado de la fracción 6 (400 MHz, piridina- $d_5$ ).	64

- Figura 39.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto minoritario purificado de la fracción 6 (100 MHz, piridina- $d_5$ ). 64
- Figura 40.** Estructura propuesta para el ácido glicosídico peracetilado minoritario de F6. 66
- Figura 41.** Comparativo de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la región alifática; i) ácido operculínico A, ii) compuesto mayoritario purificado de la fracción 6. 67
- Figura 42.** Comparativo de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la región alifática; i) compuesto purificado de la fracción 5, ii) compuesto mayoritario purificado de la fracción 6, iii) compuesto minoritario purificado de la fracción 6. 68

## LISTA DE CUADROS.

<b>Cuadro 1.</b>	Lista de sinonimias de <i>Operculina hamiltonii</i> (Reflora Flora do Brasil 2020, 2017).	17
<b>Cuadro 2.</b>	Clasificación taxonómica de <i>Operculina hamiltonii</i> .	18
<b>Cuadro 3.</b>	Estructuras de algunos ácidos orgánicos que esterifican al núcleo oligosacárido de las resinas glicosídicas. <sup>a</sup>	21
<b>Cuadro 4.</b>	Composición de la fase móvil y correspondencia con el número de fracción generada durante la elución de la muestra en la cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice.	37
<b>Cuadro 5.</b>	Características de las fases estacionarias utilizadas en los análisis por HPLC a escala analítica.	38
<b>Cuadro 6.</b>	Condiciones experimentales utilizadas en cada ensayo a escala analítica.	39
<b>Cuadro 7.</b>	Cantidad recuperada de cada fracción aislada mediante HPLC a escala preparativa y resultado de los análisis por EM-ESI.	44
<b>Cuadro 8.</b>	Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) del ácido operculínico B peracetilado y compuesto purificado F5.	54
<b>Cuadro 9.</b>	Constantes espectroscópicas ( <sup>13</sup> C-RMN) de la aglicona del ácido turpético C y del compuesto purificado F5.	55
<b>Cuadro 10.</b>	Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) del ácido operculínico A peracetilado y el compuesto mayoritario F6.	60
<b>Cuadro 11.</b>	Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) del compuesto minoritario F6.	65

## LISTA DE ABREVIATURAS.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
<b>2D</b>	Dos dimensiones
<b>COSY</b>	Correlation Spectroscopy
<b>d</b>	Doblete
<b>dd</b>	Doble de doble
<b>ddd</b>	Doble de doble de doble
<b>EM</b>	Espectrometría de Masas
<b>ESI</b>	Electrospray Ionization
<b>FAB</b>	Fast Atom Bombardment
<b>Fuc</b>	Fucosa
<b>Glu</b>	Glucosa
<b>HMBC</b>	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
<b>HSQC</b>	Heteronuclear Single Quantum Correlation spectroscopy
<b>HPLC</b>	Cromatografía de líquidos de alta resolución
<b>I.R.</b>	Índice de refracción
<b><i>J</i></b>	Constante de acoplamiento
<b>MALDI</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization
<b>piridina-<i>d</i><sub>5</sub></b>	Piridina deuterada
<b>Ram</b>	Ramnosa

<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TOCSY</b>	Total Correlation Spectroscopy
<b><math>t_R</math></b>	Tiempo de retención
<b>uma</b>	Unidad de masa atómica
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b><math>[M+H]^+</math></b>	Ión pseudomolecular positivo
<b><math>[M-H]^-</math></b>	Ión pseudomolecular negativo
<b><math>\delta</math></b>	Desplazamiento químico
<b><math>\Delta</math></b>	Error de masa

## 1. INTRODUCCIÓN.

El uso de productos naturales con fines terapéuticos ha tenido lugar de manera simultánea con el desarrollo de las civilizaciones. A pesar de la carencia de sustento científico de estos tratamientos, su uso ha sido respaldado por el conocimiento etnomédico. La búsqueda de moléculas potencialmente activas en la terapéutica actual se basa en los datos etnofarmacológicos que se fundamentan en uso de la medicina tradicional a partir de productos naturales, aumentando de esta forma el proceso de descubrimiento de fármacos y acelerando la identificación de nuevas terapias (Buenz *et al.*, 2018).

El género *Ipomoea* se ha utilizado desde tiempos inmemorables para diferentes fines que pueden ser nutricionales (*Ipomoea batatas*), medicinales (*I. purga*), de carácter ritual (*I. violacea*) y agrícolas (*I. tricolor*). El uso etnomédico de estas plantas está respaldado por numerosos estudios químicos (Pereda-Miranda y Bah, 2003; Pereda-Miranda *et al.*, 2010); por ejemplo, la actividad purgante y citotóxica está asociada con la presencia de resinas glicosídicas en sus partes aéreas y raíces, en tanto que la actividad alucinógena de algunas especies se debe a la presencia de alcaloides derivados del ácido lisérgico principalmente en las semillas (Daló y Moussatché, 1978; Taber *et al.*, 1963).

Las raíces purgativas originarias de Brasil, llamadas comúnmente como “batata de purga” ganaron una rápida y amplia aceptación en las prácticas médicas del imperio colonial portugués debido a sus efectos purgantes más leves. Los colonizadores de Suramérica le otorgaron el nombre de “jalapa de Brasil” en reconocimiento de sus importantes beneficios terapéuticos, similares a los de la raíz mexicana de Jalapa (*I. purga*) (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).

En la presente disertación, se describe el estudio químico de la raíz comercial de la jalapa brasileña, a través del aislamiento mediante cromatografía de líquidos de alta resolución “HPLC” (por sus siglas en inglés) y la caracterización estructural de los ácidos glicosídicos mayoritarios presentes en el extracto de diclorometano-etanol (1:1).

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 La familia Convolvulaceae.

Dentro de las angiospermas, la familia Convolvulaceae representa una de las más grandes y diversas, estimándose alrededor de 55 géneros y 1650 especies. Su nombre proviene del latín *convolvere* que significa entrelazarse, refiriéndose a la forma de su crecimiento característico en forma de enredaderas que se enroscan a un soporte (**Figura 1**) (Pereda-Miranda *et al.*, 2010). Son plantas de distribución cosmopolita, especialmente en las regiones de clima tropical y subtropical de Asia y América, los géneros más significativos de esta familia son *Ipomoea*, *Convolvulus*, *Exogonium* y *Operculina* (Eich, 2008; Pereda-Miranda y Bah, 2003).



**Figura 1.** Forma de crecimiento de las convolvuláceas.

Una de las características anatómicas más notables de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas glicosídicas en sus tejidos foliares y en las raíces de la planta. Estas resinas son un marcador quimiotaxonómico de esta familia (Wagner, 1973). Dichas resinas ejercen su acción purgante de utilidad en la medicina tradicional (Pereda-Miranda y Bah, 2003). Muchas de estas especies se encuentran mencionadas en numerosas farmacopeas y forman parte de remedios comerciales (Davidow, 1999), incluso son consideradas dentro del reino vegetal como una de las familias que mejor representa las propiedades medicinales purgantes y alucinógenas (Eich, 2008; Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

## **2.2 El género *Ipomoea*.**

El género *Ipomoea* lo comprenden aproximadamente 500 a 600 especies siendo así el más grande de la familia Convolvulaceae (Austin y Huáman, 1996). Estas especies se encuentran distribuidas principalmente en los trópicos del mundo, aunque algunas especies también se pueden encontrar en zonas templadas (Cao *et al.*, 2005). Las especies de este género se distribuyen principalmente en centro y sur del Continente Americano y zonas tropicales de África (Austin y Huáman, 1996).

Las especies pertenecientes a este género se utilizan en diferentes partes del mundo para el tratamiento de diversos padecimientos, tales como diabetes, hipertensión, disentería, fatiga, hidrocefalia, meningitis, inflamación, artritis, reumatismo, entre otras. También, estas plantas medicinales muestran actividad antimicrobiana, analgésica, espasmolítica, hipotensiva, anticoagulante, antiinflamatoria y anticancerígena (Meira *et al.*, 2012).

### **2.2.1 Historia de algunas especies purgantes endémicas de México.**

De las especies endémicas de México, destacan: a) por sus propiedades nutricionales, *I. batatas* (el camote), b) por sus propiedades medicinales, *I. purga*, c) por su importancia agrícola, *I. tricolor* y d) por su uso ritual y religioso, *I. violácea*.

En lo que corresponde a las especies con importancia terapéutica, el uso de sustancias purgantes solía ser una práctica común en la medicina prehispánica por la creencia de alcanzar la “purificación del cuerpo” a través de su consumo. Los remedios purgantes conocidos por los aztecas como “*cacamotli tlanoquiloni*” consistían en diversos tipos de raíces tuberosas que variaban en sus características morfológicas, hábitat y potencia efectora. Investigaciones etnobotánicas actuales han identificado a estas raíces como miembros del género *Ipomoea* (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).

Desde la época colonial, estas raíces atrajeron la atención de los colonizadores españoles por sus propiedades purgantes; éstas se han conocido y comercializado con el denominativo de “jalapas”, tales como *I. purga* (**Figura 2**), considerada como la auténtica raíz de Jalapa; *I. orizabensis*, conocida comunmente como escamonea mexicana o falsa jalapa; *I. simulans*, conocida como jalapa de Tampico; *I. stans*, llamada comúnmente como tumbavaqueros; entre otras (**Figura 3**) (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).

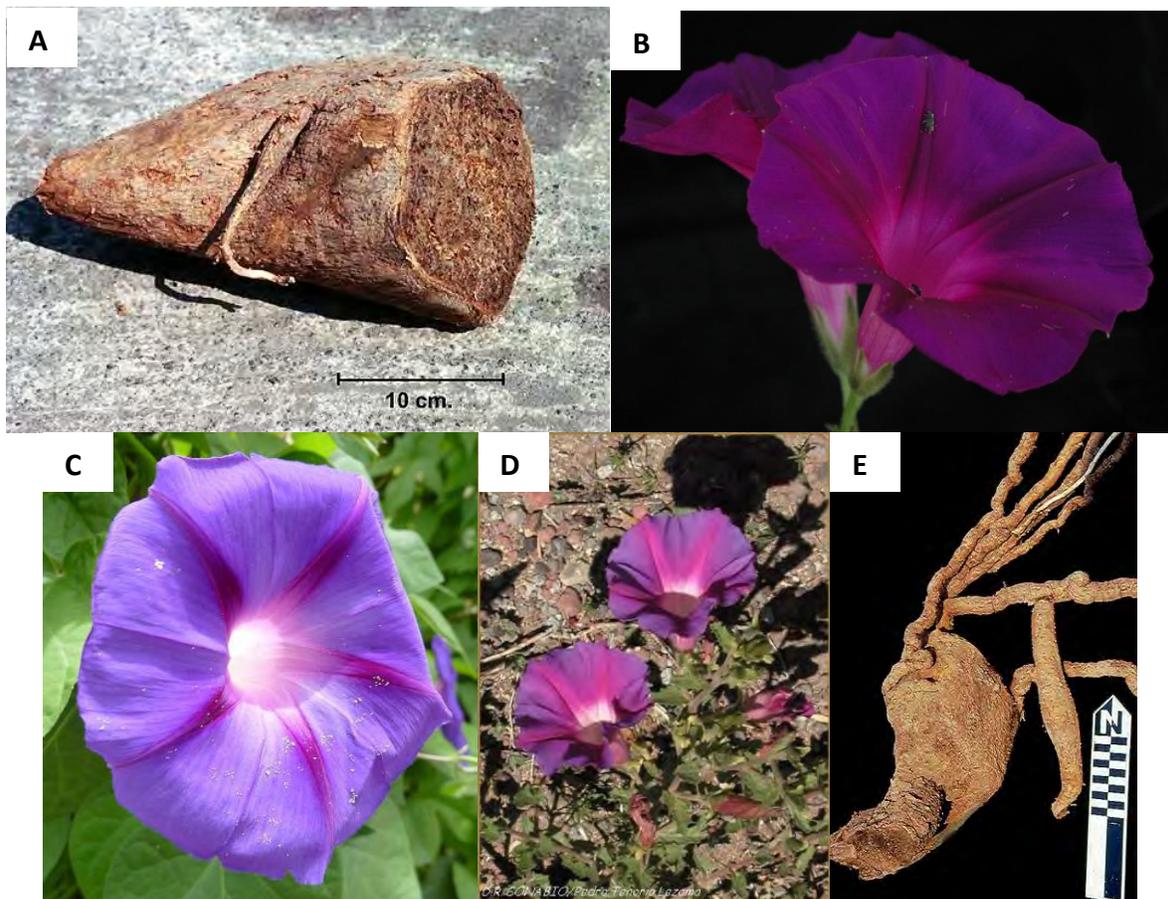


**Figura 2.** Raíces (izquierda) y flor con hoja (derecha) de la auténtica raíz de Jalapa (*I. purga*).

Desde la introducción de *I. purga* a Europa en el siglo XVI, fue conocida con el nombre de ruibarbo de las Indias y fue considerada la más importante dentro de este tipo de remedios, incluso al punto de convertirse en el sucedáneo americano más importante de la escamonea (*Convolvulus scammonia*), misma que había sido utilizada desde tiempos precristianos en todo el imperio Romano (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

En la década de 1940, en la región de Xico Veracruz se cultivaba y exportaban cerca de 40 toneladas de raíz seca por año de *I. purga* a los Estados Unidos y manteniéndose hasta la década de 1990; después de esta fecha su exportación se redujo hasta casi cero (Linares *et al.*, 1994). La demanda comercial de la raíz de Jalapa ha disminuido en México debido al uso de otros laxantes derivados de las cáscaras de las semillas de *Psyllium plantago* y las

hojas de *Cassia angustifolia* (senósidos), entre otros, así como por la dominación del mercado mundial de drogas herbolarias a través de distribuidores mayoristas principalmente italianos y alemanes cuyos productos distribuidos se basan en la jalapa brasileña (*Operculina macrocarpa*) y la jalapa de la India (*Operculina turpethum*) (Pereda-Miranda *et al.*, 2010; Wenbing *et al.*, 2012).



**Figura 3.** Especies del complejo comercializado como “las jalapas”: *I. orizabensis* (A: raíz, B: flor), *I. simulans* (C) e *I. stans* (D: flor, E: raíz).

### 2.2.2 Historia de las especies purgantes de Brasil.

La historia de las jalapas brasileñas es similar a la acontecida con las jalapas mexicanas. Los colonizadores portugueses introdujeron en sus colonias americanas la medicina galénica europea del siglo XVI, en la que los remedios purgantes gozaban de gran importancia terapéutica. Las propiedades medicinales de enredaderas herbáceas perennes con raíces de sabor agrio y productoras de resinas con propiedades purgantes, fueron aprovechadas como sustitutos de las especies originarias del mediterráneo oriental y el oriente próximo (*Convolvulus scammonia*) que fueron importantes para la medicina medieval europea (Monardes, 1990).

Las raíces purgativas originarias de Brasil, llamadas comúnmente como “batata de purga”, debido a sus efectos purgantes más leves, ganaron una rápida y amplia aceptación en las prácticas médicas del imperio colonial portugués. Los colonizadores de Suramérica le otorgaron el nombre de “jalapa de Brasil” en reconocimiento de sus beneficios terapéuticos, importantes y similares a los de la raíz de Jalapa (*I. purga*) originaria de México y que constituyó uno de los productos agrícolas de mayor comercio entre la Nueva España y la península Ibérica.



**Figura 4.** Raíz (izquierda y centro) y flor (derecha) de la jalapa de Brasil (batata de purga: *Operculina macrocarpa*).

En la actualidad, la identificación precisa de la raíz purgante de “jalapa de Brasil” corresponde a *Ipomoea operculata* (*Operculina macrocarpa*) (**Figura 4**), cuya distribución se limita a los matorrales de la “mata” atlántica (**Figura 5**); en la actualidad se ha introducido en las Antillas menores y África occidental.



**Figura 5.** Distribución geográfica de la jalapa de Brasil (*Operculina macrocarpa*).

Sin embargo, el nombre popular “batata de purga” se usa indistintamente para referirse a dos especies con raíces purgantes de las convolvuláceas: *Operculina macrocarpa* y *Operculina hamiltonii*. Esta última especie es sucedánea de la auténtica jalapa de Brasil es común en el norte del territorio brasileño (**Figura 6**) y sus raíces tuberosas son motivo de un extenso comercio para fines terapéuticos (Vegetall, 2017).

### 2.2.2.1 *Operculina hamiltonii*.

En Brasil, se le conoce popularmente como jalapa, jalapa de Brasil, batata de purga, “batatão”, “jalapão”, “purga amarela” y “brônia” de América (Natureza Bela, 2017). Su distribución geográfica abarca Centro América, las Antillas y el Norte de Suramérica (Figura 6).



**Figura 6.** Distribución geográfica de la batata de purga (*Operculina hamiltonii*).

Es una planta herbácea de tallo trepador, de color púrpura, glabro, cuadrangular y carente de zarcillos; los tallos pueden alcanzar hasta 5 m de longitud; sus hojas son alternas de 9 cm de largo por 5 cm de ancho, pecioladas, en forma de corazón, lisas y biseladas; en la base, el haz de la hoja es de color verde oscuro y blanquecina el envés (**Figura 7**).



**Figura 7.** Planta (izquierda) y flores (centro y derecha) de *Operculina hamiltonii*.

Las flores son solitarias, ocasionalmente 1-3, 5 sépalos, pétalos amarillos de 7 cm de largo y 5 estambres (**Figura 7**). 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 (**Figura 8**). Semillas de alrededor de 5-8 mm, elipsoidales a redondeadas, negras y glabras (**Figura 8**). El rizoma es alargado y lechoso, con unos 5-45 cm de largo y tuberosidades con raíces secundarias (**Figura 9**) (Reflora, Flora do Brasil 2020, 2017).



**Figura 8.** Semillas (izquierda) y frutos (derecha) de *Operculina hamiltonii*.

Numerosas sinonimias se encuentran descritas en la literatura botánica para esta especie (**Cuadro 1**). El basiónimo *Ipomoea hamiltonii* G. Don, se describió en 1838 (Austin y Staples, 1983) y como *Ipomoea alulata* Miquel en 1844. 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 (Austin y Staples, 1983). La clasificación taxonómica de *Operculina hamiltonii* (G. Don), se presenta en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 1.** Lista de sinonimias de *Operculina hamiltonii* (Reflora, Flora do Brasil 2020, 2017).

<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)



**Figura 9.** Rizoma de *Operculina hamiltonii*.

**Cuadro 2.** Clasificación taxonómica de *Operculina hamiltonii*.

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

### **2.2.2.2 Usos medicinales de las jalapas brasileñas.**

Entre sus propiedades medicinales destacan la analgésica, antiinflamatoria, depurativa, diurética, energética, febrífuga, laxante y purgativa. Estos laxantes se utilizan, especialmente para la congestión intestinal, hemorragias (cerebro, pulmón), hidropesía cardiaca o renal y el estreñimiento. El uso en la medicina tradicional también incluye el tratamiento de edema, inflamación, dolor de cabeza y fiebre (Natureza Bela, 2017; Matos, 2000).

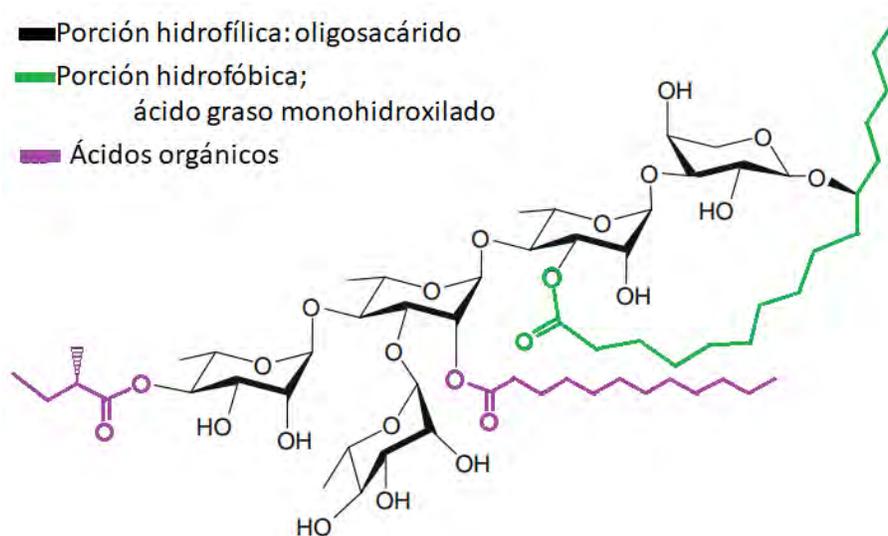
Existen preparados fitofarmacéuticos que se encuentran disponibles en el mercado para su comercialización o bien como droga cruda. Como ejemplo, tenemos la "tintura de jalapa" que se utiliza en el noreste de Brasil como laxante y para el tratamiento del accidente vascular encefálico; pero, aún no se ha probado de manera adecuada su seguridad y eficacia (Gomes *et al.*, 2009).

## **2.3 Resinas glicosídicas.**

### **2.3.1 Naturaleza química.**

Las resinas glicosídicas son metabolitos secundarios representativos de la familia de las Convolvuláceas (Pereda-Mianda *et al.*, 2010), y consisten en un conjunto de glicolípidos de alto peso molecular; constituidos por una porción hidrofílica de naturaleza oligosacárida y una porción hidrofóbica compuesta por un ácido graso mono o dihidroxilado de 14 ó 16 átomos de carbono llamada aglicona. En la mayoría de los ejemplos descritos en la literatura, estos dos constituyentes se encuentran unidos mediante un enlace de tipo éster cíclico intramolecular, formando una macrolactona, y el núcleo oligosacárido se encuentra esterificado por ácidos orgánicos de diferentes longitudes de cadena (Pereda-Miranda *et al.*, 2010) (**Cuadro 3**).

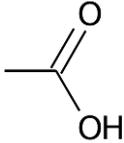
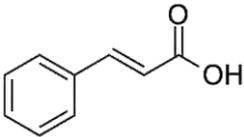
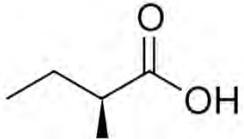
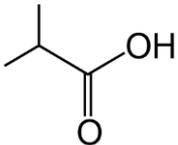
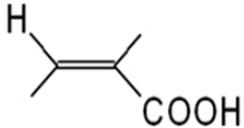
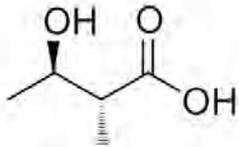
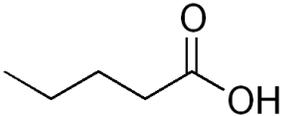
Las características estructurales de los glicolípidos (**Figura 10**) les confieren propiedades de solubilización propias para moléculas anfipáticas, es decir, pueden solubilizarse en disolventes orgánicos apróticos como el cloroformo, el dimetilsulfóxido, la piridina y en disolventes polares próticos como el metanol. En casos donde el grado de esterificación del núcleo oligosacárido es muy alto o los residuos corresponden a ácidos grasos saturados ( $C_6$  a  $C_{12}$ ), estos oligosacáridos complejos son solubles en hexano (Rosas-Ramírez, 2012).

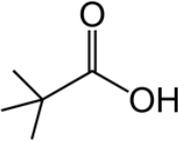
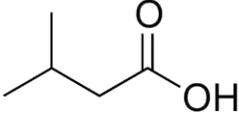
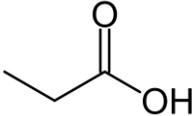
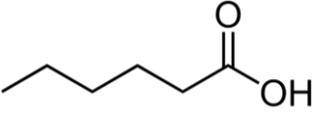
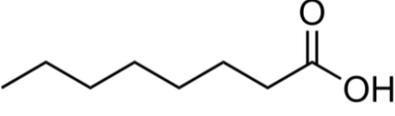
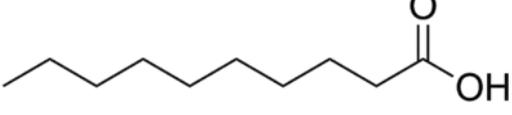
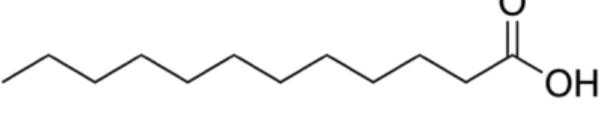
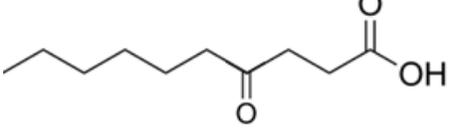
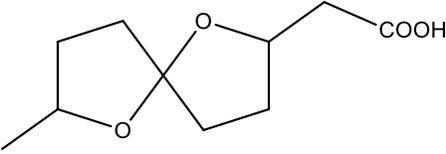


**Figura 10.** Estructura general de un glicolípidio constituyente de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas.

La complejidad de las resinas glicosídicas radica en la semejanza estructural de los constituyentes individuales, debido a que representan una mezcla de isómeros que involucran variaciones entre los azúcares constitutivos y los sitios de esterificación. Así, la diversidad estructural de estos compuestos surge de las variaciones en el tipo y número de unidades sacáridas que componen al núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosilación, la posición de lactonización y en el tipo, número y posición de los ácidos orgánicos que se encuentran acilando al núcleo oligosacárido (Pereda-Miranda *et al.* 2010).

**Cuadro 3.** Estructuras de algunos ácidos orgánicos que esterifican al núcleo oligosacárido de las resinas glicosídicas.<sup>a</sup>

Ácido	Estructura
Acético (ac)	
Cinámico (CA)	
(2S)-α-metilbutírico (mba)	
Isobutírico (iba)	
Tíglico (tga)	
Nílico (nla) (2R,3R)-3-hidroxi-2-metilbutanoico	
Valérico	

Trimetilacético	
$\beta$ -metilbutírico (3-mba)	
Propiónico (pa)	
Hexanoico (hexa)	
Octanoico (octa)	
Decanoico (deca)	
Dodecanoico (dodeca)	
4-oxododecanoico*	
Exogónico*	

<sup>a</sup>Hernández-Carlos *et al.*, 1999; Ono *et al.*, 1989; Pereda-Miranda *et al.*, 2010. \*Son marcadores para diferenciar entre las jalapas mexicanas y las brasileñas (Wagner y Kazmaier, 1977).

Los núcleos oligosacáridos se componen principalmente de cuatro carbohidratos: tres 6-desoxihexosas (D-fucosa, D-quinovosa y L-ramnosa) y la D-glucosa como la única hexosa presente en esta clase de metabolitos (Pereda-Miranda y Bah, 2003). La D-xilosa se describió para las resinas glicosídicas de *I. pes-caprae* (Escobedo-Martínez *et al.*, 2010). Se han descrito desde disacáridos hasta heptasacáridos y dímeros tipo éster constituidos por tres hasta siete azúcares en cada unidad oligomérica. Para la secuencia de glicosidación, se han descrito núcleos oligosacáridos lineales, ramificados (Pereda-Miranda *et al.*, 2010), bidesmósidos (Bautista *et al.*, 2016) y estructuras diméricas tipo éster (Bah y Pereda-Miranda, 1997; Castañeda-Gómez y Pereda-Miranda, 2011).

Los ácidos grasos que con mayor frecuencia representan a las agliconas (la parte hidrofóbica del glicolípido) son los ácidos (11S)-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínolico) y el (11S)-hidroxitradecanoico (ácido convolvulinólico) (Pereda-Miranda *et al.*, 2010). Sin embargo, son muy pocos los ejemplos de otras agliconas descritas en la literatura, por ejemplo, los ácidos turpéticos A-C que contienen, como las agliconas de los pentasacáridos constitutivos de las resinas de la jalapa de la India (*Operculina turpethum*), a los ácidos grasos saturados monohidroxilados (C-12) con cadenas de C<sub>15</sub>-C<sub>17</sub> (Ding *et al.*, 2012). Estudios de actividad biológica realizados con este tipo de compuestos han demostrado que la lactona macrocíclica constituye una característica estructural muy importante para la actividad purgante y citotóxica, ya que cuando se hidroliza el enlace éster disminuye o desaparece la actividad biológica (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Los constituyentes individuales que componen a las resinas glicosídicas de una misma especie comparten, en la mayoría de los casos, un mismo núcleo oligosacárido. Los núcleos oligosacáridos de las resinas glicosídicas pueden ser identificados a través de métodos de degradación (hidrólisis alcalina), obteniendo ácidos glicosídicos que son distintivos de las especies que los biosintetizan (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

Las resinas glicosídicas, en función de su solubilidad en éter y metanol, se clasifican en dos grupos: “jalapinas” y “convolvulinas”, respectivamente (Ono *et al.*, 1989; Shellard, 1961). La primeras representan oligosacáridos con un alto grado de esterificación que son solubles en éter, y aquellas insolubles en este disolvente apolar que resultan solubles en metanol han proporcionado los oligómeros de mayor peso molecular, como los heptasacáridos bidesmósidos de la convolvulina de *Quamoclit pennata* (Ono *et al.*, 2010).

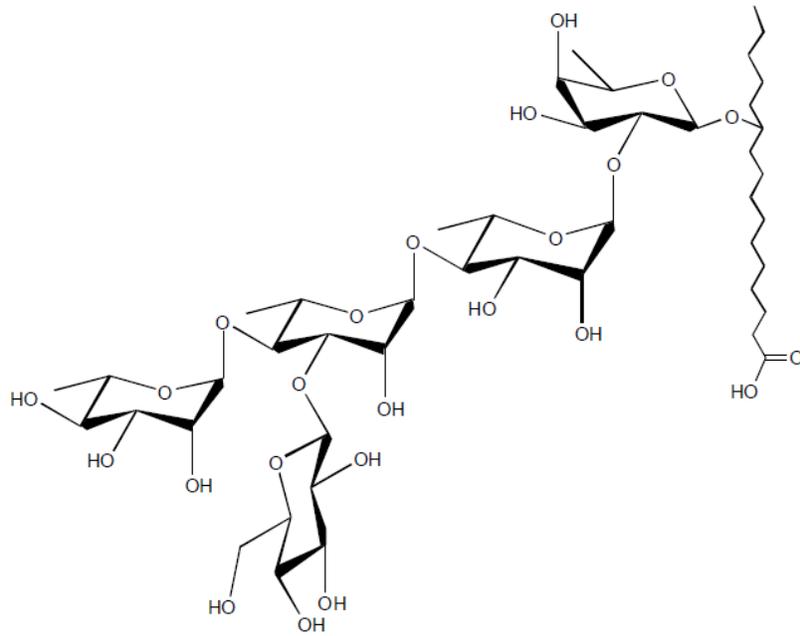
### 2.3.2 Núcleos oligosacáridos aislados de especies de jalapas brasileñas.

En el año de 1989, fueron aislados a partir de la fracción soluble en éter de la raíz de jalapa brasileña, *I. operculata* (Gomes) Mart. (Ono *et al.*, 1989), dos pentasacáridos: 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 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.

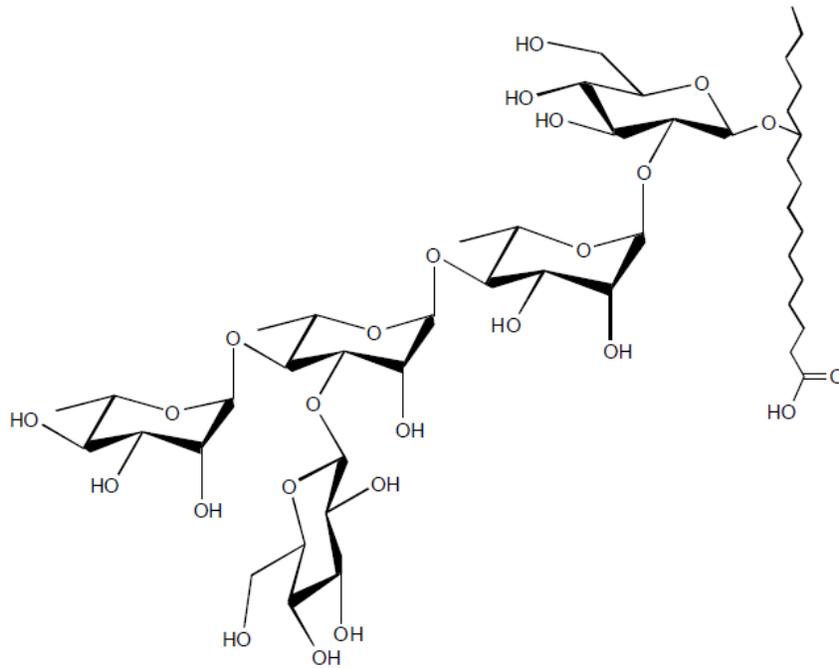
El ácido operculínico A es el núcleo oligosacárido que con mayor frecuencia se ha descrito en las resinas de las convolvuláceas, como un constituyente de las especies *I. operculata* (Ono *et al.*, 1989), *I. intrapilosa* (Bah *et al.*, 2007), *I. stolonifera* (Noda *et al.*, 1994), *I. leptophylla* (Barnes *et al.*, 2003), *Quamoclit pennata* (Ono *et al.*, 1992), *Merremia hungaiensis* (Noda *et al.*, 1994) y *Merremia mammosa* (Kitagawa *et al.*, 1989).

Numerosas resinas derivadas del ácido operculínico B han sido aisladas de *I. operculata* y se han denominado como operculinas III, IV, IX, X, XVI, XVII y XVIII (Ono *et al.*, 1991).

La diversidad estructural de las resinas glicosídicas intactas derivadas de los ácidos operculínico A y B, radica en los diferentes tipos de sustituyentes que se encuentran acilando la posición C-2 de la tercera unidad monosacárida (ram') y las posiciones C-2, C-3 y C-4 de la unidad (ram''), así como la posición de lactonización.

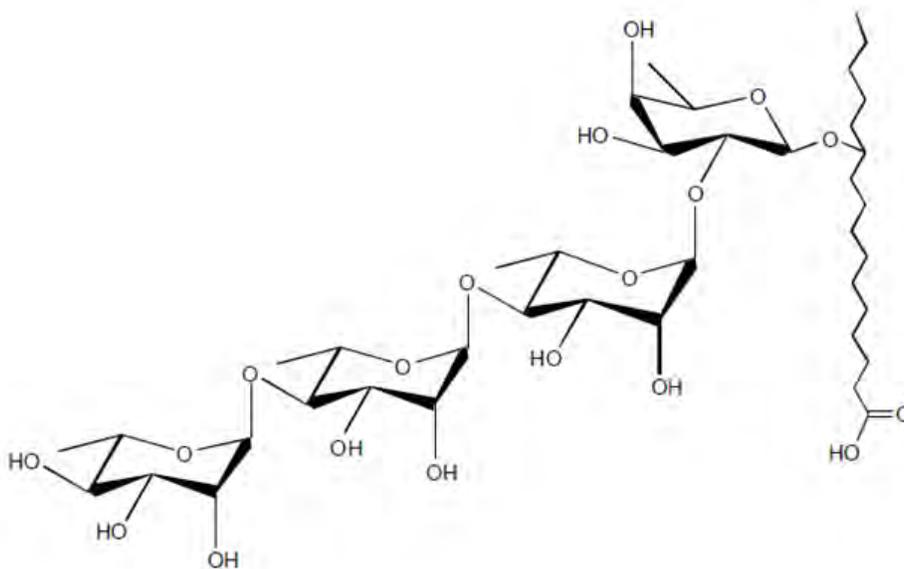


**Figura 11.** Ácido operculínico A (Ono *et al.*, 1989).



**Figura 12.** Ácido operculínico B (Ono *et al.*, 1989).

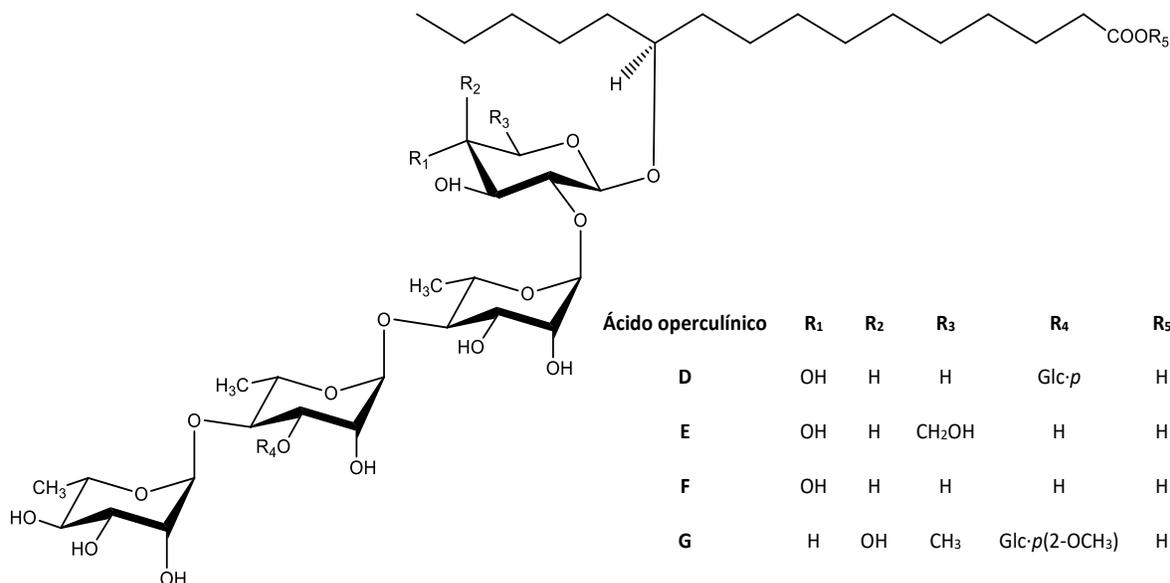
El ácido operculínico C (**Figura 13**) fue nombrado originalmente como mammósido I al ser aislado de la especie *Merremia mammosa* (Kitagawa *et al.*, 1997). Este compuesto es un heterotetrasacárido lineal del ácido jalapinólico, constituido por una unidad de D-fucosa y tres unidades de L-ramnosa. Se le asignó el nombre de ácido operculínico C después de ser aislado de *I. operculata* Mart. & Spix. (*syn. Operculina macrocarpa* (L.) Urban) (Ono *et al.*, 1989; Pereda-Miranda *et al.*, 2010).



**Figura 13.** Ácido operculínico C (Ono *et al.*, 1989).

El ácido operculínico C se ha descrito en las resinas constituyentes de especies como *I. murucoides* (Chérigo *et al.*, 2009), *I. batatas* (Noda *et al.*, 1992), *I. pes-caprae* (Escobedo-Martínez y Pereda-Miranda, 2007), *I. operculata* (Ono *et al.*, 1992) e *I. stolonifera* (Noda *et al.*, 1998). Además, el ácido operculínico C ha sido descrito como constituyente de las batatinas III-VI, que son resinas glicosídicas intactas aisladas de *I. batatas* (Rosas-Ramírez *et al.*, 2011). Éstas representan a los primeros ejemplos de dímeros tipo éster constituidos por este ácido glicosídico, y cuya diferencia estructural radica en la posición, tipo y cantidad de residuos ácidos que esterifican al núcleo oligosacárido.

Por hidrólisis alcalina de las resinas solubles en éter, obtenidas a partir de la raíz de la especie *I. operculata*, se describieron como constituyentes minoritarios los ácidos operculínicos D, E, F y G (Ono *et al.*, 1990) (**Figura 14**).



**Figura 14.** Estructura de los ácidos operculínicos D, E, F y G (Ono *et al.*, 1990).

El ácido operculínico E está constituido por una unidad de D-glucosa y tres unidades de L-ramnosa. Por otro lado, el ácido operculínico F está constituido por una unidad de D-xylosa y tres unidades de L-ramnosa, es decir, son heterotetrasacáridos lineales del ácido jalapínico.

Las marubajalapias I-XI descritas a partir de las partes aéreas de *I. purpurea* (L.) Roth (*syn. Pharbitis purpurea* Voigt.) (Ono, M., Ueguchi, T., Murata, H. *et al.*, 1992; Ono, M., Ueguchi, T., Kawasaki, T. *et al.*, 1992) fueron los primeros ejemplos de resinas glicosídicas constituidas por el ácido operculínico E. Las murucoidinas XII y XIII de *I. murucoides* (Chérigo *et al.*, 2009) y los batatósidos J-L de *I. batatas* (Yin *et al.*, 2009) son resinas glicosídicas constituidas por el ácido operculínico E. Hasta el momento, no se han encontrado resinas glicosídicas intactas constituidas por el ácido operculínico F (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

Los ácidos operculínicos D y G son heteropentasacáridos ramificados del ácido jalapínolico. Sus estructuras son similares a la descrita para el ácido operculínico A. Sólo difieren en la primera unidad monosacárida, es decir, para el ácido operculínico A, se tiene una unidad de D-fucosa y para el ácido operculínico D una de D-xylosa. En lo que respecta al ácido operculínico G, su estructura es prácticamente la misma que para el ácido operculínico A, con la única diferencia que la posición C-2 de la glucosa terminal se encuentra metilada, por lo que se cree que podría tratarse de un artefacto de extracción (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

#### **2.4 Métodos de aislamiento y purificación, etc.**

Los carbohidratos son considerados como un grupo de compuestos en donde el número y tipos de isómeros que muestran son mayores que los de cualquier otro grupo (Sanz y Martínez-Castro, 2007). De acuerdo con la naturaleza química de las resinas glicosídicas que las hace moléculas anfipáticas, el aislamiento de éstas y su purificación no es tarea sencilla, ya que siempre están presentes en forma de mezclas complejas de homólogos que tienen el mismo núcleo oligosacárido, pero con diferentes agliconas y sustituyentes acilantes, y variaciones en los sitios de esterificación del núcleo oligosacárido (Pereda-Miranda *et al.*, 2002; 2010).

Por esa razón, los métodos tradicionales para el aislamiento y la purificación de productos de origen natural, tales como la partición líquido-líquido, la cromatografía en capa fina y cromatografía en columna, usando gel de sílice, sephadex, intercambio iónico y filtración en gel, resultan ser técnicas inapropiadas para la purificación exitosa de estos constituyentes (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

Desde los inicios de su creación cerca de los años sesenta, la HPLC ha ganado terreno en las ciencias de la separación ya que demostró ser una herramienta idónea para el análisis de macromoléculas de interés biomédico, productos naturales y una gran variedad de moléculas con pesos moleculares altos y compuestos termolábiles, y para los cuales se

encuentra limitado su análisis mediante técnicas como cromatografía de gases; algunos de estos compuestos son de tipo polisacárido, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Snyder y Kirkland, 1979).

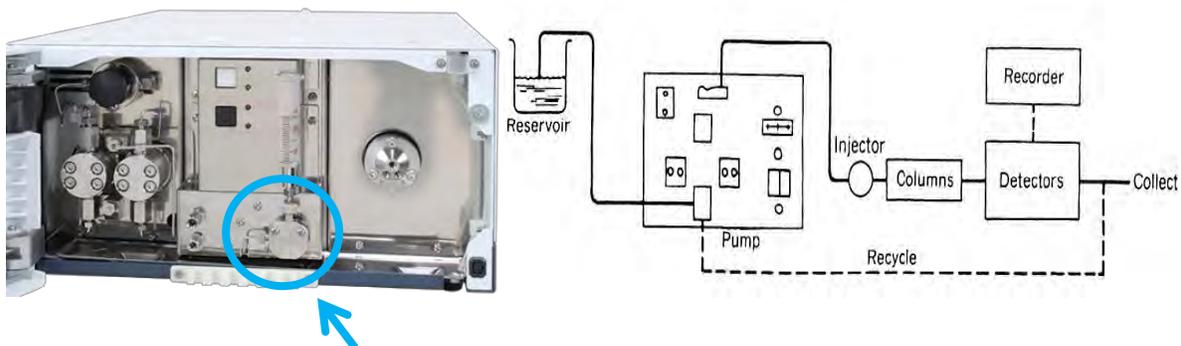
La HPLC ofrece una resolución máxima de una mezcla compleja en un tiempo de análisis corto, con la disponibilidad de fases estacionarias de partículas porosas pequeñas (<25  $\mu\text{m}$ ) de forma irregular o esférica, y con tamaño de poro entre 60 y 130 Å (Pereda-Miranda *et al.*, 2010; Snyder y Kirkland, 1979).

En el año de 1987, se publicó por primera vez la resolución de una mezcla de resinas glicosídicas por HPLC, logrando purificar cuatro lipotetrasacáridos acilados intactos, las orizabinas I-IV (Noda *et al.*, 1987). Esta investigación demostró que, debido a la complejidad estructural de las resinas glicosídicas, se requiere del empleo de técnicas cromatográficas y métodos espectroscópicos modernos de alta resolución (como la HPLC y la resonancia magnética nuclear) para lograr la purificación individual y la caracterización estructural de los constituyentes presentes en las resinas glicosídicas de las convolvuláceas.

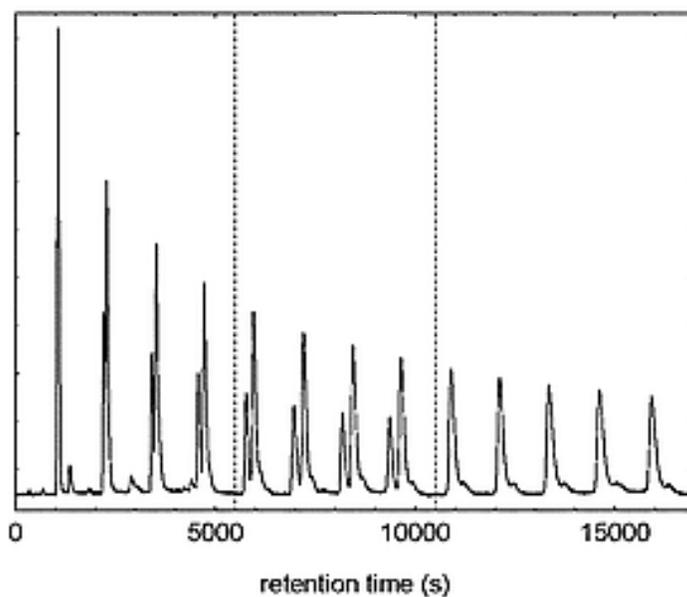
Las columnas de fase normal y de fase químicamente enlazada como C8, C18, amino, ciano y fenilo, han demostrado ser fases estacionarias adecuadas para el aislamiento y purificación de este tipo de moléculas (Bah y Pereda-Miranda, 1996; Castañeda-Gómez y Pereda-Miranda, 2011; Nikolov *et al.*, 1985; Ono *et al.*, 1989).

El éxito en la purificación (>99%) de los glicolípidos aislados a partir de las resinas glicosídicas con el empleo de HPLC, se debe principalmente al uso de la técnica conocida como “corte de núcleo”, seguida del “reciclaje de pico” (Bah y Pereda-Miranda, 1997; Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002). Esta técnica necesita el empleo de un aditamento instrumental llamado válvula de reciclaje (**Figura 15**), que permite, una vez que la muestra ha sido registrada por el detector, enviarla de vuelta a la bomba con el “loop” cerrado a través de la línea de paso al inyector, y posteriormente a la columna y al detector nuevamente (Bidlingmeyer, 1992) (**Figura 15**). El procedimiento finaliza hasta que se observa un registro de señal como un pico de comportamiento Gaussiano, sin la

presencia de picos minoritarios como indicativos de impurezas (**Figura 16**) (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002).



**Figura 15.** Válvula de reciclaje acoplada a una bomba semipreparativa de la marca JASCO (izquierda) y esquema general del proceso de reciclaje (derecha) (Bidlingmeyer, 1992).



**Figura 16.** Ejemplo de cromatograma generado mediante la técnica de reciclaje de muestra.

La técnica conocida como “corte de núcleo” seguida del “reciclaje de pico”, han permitido la purificación de numerosos oligosacáridos de resinas glicosídicas, por ejemplo las tricolorinas (Bah y Pereda-Miranda, 1996; 1997), las intrapilosinas (Bah *et al.*, 2007), las orizabinas (Hernández-Carlos *et al.*, 1999), los batatinósidos (Escalante-Sánchez *et al.*, 2008), las murucoidinas (Chérigo y Pereda-Miranda, 2006; Chérigo *et al.*, 2008), las pescapreínas (Escobedo-Martínez *et al.*, 2010), los purginósidos y las purginas (Castañeda-Gómez y Pereda-Miranda, 2011), entre otros.

## **2.5 Elucidación estructural.**

Debido a la complejidad estructural de este tipo de moléculas, suelen utilizarse métodos degradativos (reacciones de derivatización) así como técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución, para la caracterización completa de este tipo de metabolitos secundarios de origen natural.

### **2.5.1 Métodos degradativos.**

Consisten en el uso de diversas reacciones químicas para romper de manera paulatina, la estructura compleja y generar moléculas más pequeñas, y por lo tanto, simplificar la elucidación espectroscópica de las moléculas intactas. Una de estas reacciones es la hidrólisis alcalina (saponificación) del material vegetal, con lo que se logra la liberación de los ácidos orgánicos que esterifican al núcleo oligosacárido y la hidrólisis de la lactona, obteniéndose así los ácidos glicosídicos presentes en la muestra. Los ácidos orgánicos obtenidos se someten a una reacción de derivatización para formar los ésteres metílicos y se analizan por cromatografía de gases (CG) acoplada a espectrometría de masas (EM).

Los ácidos glicosídicos se someten a una reacción de hidrólisis ácida, obteniendo así a los carbohidratos simples y el ácido graso que forma la macrolactona (aglicona). La longitud del ácido graso, así como su posición de hidroxilación, se determinan a partir de la

obtención de su derivado metilado-sililado y su análisis por CG-EM. Esta técnica también se utiliza para la caracterización de las unidades sacáridas; para esto, en primer lugar se derivatizan por tratamiento con cloruro de trimetilsilano, y para evitar la anomerización de los monosacáridos, se realiza la sililación de los grupos hidroxilo y la mercaptación de la función aldehído (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

### **2.5.2 Métodos no degradativos.**

El empleo de técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrométricas como la espectrometría de masas de alta resolución (EM-AR) son herramientas muy efectivas para la elucidación estructural de los lipooligosacáridos sin utilizar métodos que degraden el producto natural.

A partir de la obtención y análisis de los espectros de RMN de protón ( $^1\text{H}$ -RMN) y carbono ( $^{13}\text{C}$ -RMN) se obtiene la información general acerca de la estructura de los lipooligosacáridos, tal como la identificación del número y tipo de unidades sacáridas que forman al núcleo oligosacárido. Al recurrir a experimentos en dos dimensiones como COSY, TOCSY, HSQC y HMBC, se asigna la conectividad de cada uno de los constituyentes de este tipo de moléculas complejas (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

La naturaleza química de este tipo de moléculas (no volátiles) imposibilita su análisis por EM mediante la técnica de impacto electrónico (EI), y por lo tanto, son útiles las técnicas de ionización suave para evitar la degradación térmica de la muestra. Durante décadas la técnica de ionización por bombardeo de átomos acelerados (FAB) fue una técnica muy importante en el campo de la elucidación estructural de este tipo de moléculas (Pereda-Miranda *et al.*, 2010); sin embargo, ha caído en desuso. En la actualidad, las técnicas de ionización por electrospray (ESI) y MALDI proporcionan información valiosa sobre la composición, la secuencia y la ramificación de la cadena oligosacárida (Castañeda-Gómez *et al.*, 2017; Escalante-Sánchez, 2007; Pereda-Miranda *et al.*, 2010; Rosas-Ramírez, 2012).

### **3. JUSTIFICACIÓN.**

Las resinas glicosídicas como metabolitos secundarios característicos de la familia Convolvulaceae; representan una fuente potencial para la búsqueda de nuevos compuestos químicos con aplicación terapéutica y agroquímica, debido al amplio espectro de actividad biológica descrita para estas plantas, como son: sus propiedades purgantes, fitoinhedoras, citotóxicas y antimicrobianas. Por otra parte resulta de gran relevancia el desarrollo de métodos modernos de aislamiento, purificación y elucidación estructural de los glicolípidos pertenecientes a esta familia de plantas; con la finalidad de validar desde un punto de vista científico su uso etnomédico, de igual manera para establecer que glicolípidos podrían funcionar como marcadores moleculares de cada especie, a efectos de poder realizar de manera rápida y eficaz estudios que revelen la autenticidad de las resinas comerciales que se comercializan a nivel mundial. Finalmente, es importante que el estudio científico de las plantas pertenecientes a la familia Convolvulaceae impacte en la sociedad ya que podría implementarse el cultivo de la jalapa brasileña bajo condiciones especiales y junto con las especies endémicas de México podrían elaborarse medicamentos herbolarios cuya sinergia de los principios de las especies mezcladas genere un efecto más rápido y eficaz y así impulsar la producción de medicamentos herbolarios a nivel nacional.

### **4. HIPÓTESIS**

El extracto obtenido con los disolventes diclorometano y etanol en proporción 1:1 a partir de la raíz comercial de la jalapa brasileña; presenta un alto contenido en ácidos glicosídicos, en cantidades suficientes, que permiten su aislamiento, purificación y elucidación estructural.

## **5. OBJETIVOS.**

### **5.1 Objetivo general.**

Purificar mediante el uso de HPLC los ácidos glicosídicos mayoritarios constitutivos de las resinas glicosídicas presentes en el extracto de diclorometano-etanol (1:1) de las raíces comerciales de jalapa brasileña.

### **5.2 Objetivos específicos.**

5.2.1 Establecer las condiciones instrumentales a escala analítica en HPLC para la separación de los ácidos glicosídicos presentes en el extracto de diclorometano-etanol (1:1) de las raíces comerciales de jalapa brasileña.

5.2.2 Realizar el escalamiento de las condiciones instrumentales de escala analítica a preparativa para el fraccionamiento del extracto de diclorometano-etanol (1:1) de las raíces comerciales de la jalapa brasileña.

5.2.3 Purificar los componentes mayoritarios mediante la técnica de reciclaje y realizar su elucidación estructural utilizando EM y RMN ( $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ).

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### 6.1 Métodos cromatográficos.

Se utilizó la cromatografía en capa fina para la detección de las resinas glicosídicas en los extractos preparados con el material vegetal de interés; para lo cual se emplearon cromatoplasmas de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> sobre aluminio. Se utilizó una mezcla de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-sulfato cérico como agente cromógeno calentando a 80 °C sobre una parrilla eléctrica.

Se empleó la HPLC para lograr la separación de los constituyentes mayoritarios individuales presentes en el extracto. Para llevar a cabo esta separación, se utilizó un equipo cromatográfico de tipo modular, compuesto por un sistema de liberación de disolventes PU-4086 Semi-preparative Pump de la marca JASCO que cuenta con una válvula que permite el reciclaje de la muestra y el disolvente, y un detector de índice de refracción modelo 410 de la marca Waters integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex GX-280, DELL). El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de la información se realizaron por medio del software Empower 2 de la marca Waters.

### 6.2 Material vegetal.

El material vegetal corresponde a una muestra comercial de las raíces pulverizadas de la jalapa brasileña (“batata de purga”) adquiridas en el Mercado 2000, ubicado en Santarém, Pará, Brasil, el 28 de septiembre de 2015. El material vegetal fue identificado por la Dra. Suzana Leitão (Facultad de Farmacia, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil) mediante la comparación con las características anatómicas microscópicas descritas para *Operculina macrocapa* (Carvalho Michelin *et al.*, 2010).

### **6.3 Preparación del extracto orgánico.**

El material vegetal (868.5 g) fue sometido a un proceso de maceración exhaustiva con mezcla de diclorometano-etanol (1:1), el extracto resultante se filtró y se llevó a sequedad para su posterior saponificación.

### **6.4 Hidrólisis alcalina del extracto orgánico (saponificación).**

El extracto seco (7 g) fue sometido a una hidrólisis alcalina con 205 mL de una solución de KOH al 5%, la mezcla resultante se colocó en un baño de aceite a 95 °C donde se calentó a reflujo durante 3 h con agitación constante. Para el aislamiento del producto crudo de la reacción, se ajustó el pH a 5 con HCl 1 N y se extrajo con diclorometano (3 × 250 mL). La fase acuosa se sometió a extracciones con isobutanol (3 × 250 mL), posteriormente la fase orgánica se lavó con agua (2 × 250 mL). La fracción orgánica resultante (isobutanol) se concentró a sequedad.

### **6.5 Peracetilación del producto de saponificación.**

El producto saponificado (1.470 g) se sometió a una reacción de peracetilación con 27 mL de piridina y 54 mL de anhídrido acético. La mezcla se dejó reaccionar durante 48 h a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo de reacción, se realizó el aislamiento del producto peracetilado de interés mediante partición líquido-líquido, adicionando 320 mL de agua y 320 mL de acetato de etilo. La mezcla resultante se transfirió a un embudo de separación permitiendo el equilibrio entre las fases y se realizaron dos extracciones más con 320 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se reunieron y se adicionó HCl 1 N (2 × 640 mL). Posteriormente, se trató con una solución saturada de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (2 × 640 mL) y, finalmente, con agua destilada (1 × 640 mL). La fase orgánica resultante se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro y se concentró a sequedad.

## 6.6 “Clean-up” del producto peracetilado.

El producto peracetilado se sometió a un proceso de limpieza previa al análisis por HPLC; para esto se utilizó una columna abierta empacada con 30 g de gel de sílice y como fase móvil se utilizó diclorometano, metanol y mezclas de estos en diferentes proporciones (150 mL de cada fase móvil); se recolectaron fracciones de 50 mL como se muestra en el **Cuadro 4**.

**Cuadro 4.** Composición de la fase móvil y correspondencia con el número de fracción generada durante la elución de la muestra en la cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice.

Fracción	Fase móvil
1-3	100% CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>
4-6	95:5 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH
7-9	90:10 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH
10-12	85: 15 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH
13-15	80:10 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH
16-18	60:40 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH
19-21	40:60 CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> :MeOH
22-24	100% MeOH

Mediante el uso de cromatografía en capa fina se monitorearon las fracciones que contenían resinas glicosídicas; se utilizó como fase móvil la mezcla de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: MeOH (9:1) y una solución ácida de sulfato sérico como agente cromógeno mediante degradación por calentamiento.

## 6.7 Aislamiento de los ácidos glicosídicos peracetilados mediante HPLC.

### 6.7.1 Análisis por HPLC a escala analítica.

Con la finalidad de establecer las condiciones experimentales que permitieran la mejor separación de los componentes de la mezcla objeto de estudio, se realizaron numerosos ensayos usando dos fases estacionarias (**Cuadro 5**) y diversas fases móviles. En todos los casos, se empleó elución en modo isocrático y como sistema de detección, se utilizó detector de índice de refracción (Waters modelo 410). En el **Cuadro 6**, se muestran las condiciones establecidas en cada experimento.

**Cuadro 5.** Características de las fases estacionarias utilizadas en los análisis por HPLC a escala analítica.

Fase estacionaria	Marca	Dimensiones	Tamaño de partícula
Octadecil silano (C18)	Waters Symmetry® C18	4.6 x 250 mm	5 µm
Amino propil silano (NH <sub>2</sub> )	Waters YMC®	10 x 150 mm	5 µm

### 6.7.2 Purificación por HPLC.

Una vez establecidas las condiciones experimentales que brindaron la mejor separación de los componentes de la mezcla a escala analítica, se procedió a realizar el escalamiento de la técnica a escala preparativa, con la finalidad de realizar el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales de la muestra peracetilada. El escalamiento se hizo mediante el uso de la siguiente ecuación:

Dónde:

$F_p$  = Flujo de la fase móvil a nivel preparativo

$F_a$  = Flujo de la fase móvil a nivel analítico

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

$l_p$  = 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

Se utilizó la técnica de “corte de núcleo” y “reciclaje” para obtener la máxima separación y pureza de los constituyentes de la muestra (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002).

**Cuadro 6.** Condiciones experimentales utilizadas en cada ensayo a escala analítica.

Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo	Concentración de la muestra	Volumen de inyección
C18	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O 9:1	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL
C18	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O 7:3	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL
C18	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O 1:1	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL
NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN:H <sub>2</sub> O 7:3	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL
NH <sub>2</sub>	CH <sub>3</sub> CN:MeOH 1:9	0.4 mL/min	2 mg/100 µL	20 µL

## 6.8 Determinación de las constantes físicas y propiedades espectroscópicas y espectrométricas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher-Jhons sin corrección. Las rotaciones ópticas se obtuvieron en un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizando metanol como disolvente.

Los experimentos de RMN de hidrógeno ( $^1\text{H}$ ) y carbono ( $^{13}\text{C}$ ) se registraron en un equipo Varian Innova operando a una frecuencia de 400 MHz para  $^1\text{H}$  y 100 MHz para  $^{13}\text{C}$ . Se utilizó piridina deuterada (piridina- $d_5$ ) como disolvente de las muestras y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en ppm utilizando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS).

Los espectros de masas de baja resolución se registraron en un aparato Waters Acquity UPLC clase H (Waters Co., Milford, MA, USA) acoplado a un espectrómetro de masas con analizador de masas cuadrupolo simple SQD2 (Waters Co., Milford, MA, USA) con una cámara de ionización por electrospray (ESI). La inyección de la muestra se realizó por introducción directa en MeOH a una concentración de 2 mg/mL, con un volumen de inyección de 10  $\mu\text{L}$ . El espectrómetro de masas SQD2 fue acondicionado para detectar iones entre 150 y 2000  $m/z$ . El voltaje para ambos modos de ionización (positivo y negativo) fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador (25 bar) junto con un gas auxiliar (5 bar). Los espectros de masas de alta resolución se obtuvieron en un equipo LQT XL Orbitrap (Thermo Fisher) con ionización por ESI e introducción directa de la muestra. Los parámetros de análisis del equipo fueron los siguientes: voltaje de nebulización, 6 kV; temperatura del capilar, 350  $^{\circ}\text{C}$ ; voltaje del capilar, 35 V; volumen de muestra, 10  $\mu\text{L}$  de la solución del compuesto puro con una concentración de 2 mg/mL preparada en mezcla de MeOH:H<sub>2</sub>O (9.5:0.5) suplementado con ácido fórmico (0.1%).

## **7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.**

### **7.1 Preparación del extracto orgánico.**

A partir del procedimiento descrito en el inciso 5.3, se obtuvieron 48.8 g de extracto orgánico.

### **7.2 Hidrólisis alcalina del extracto orgánico (obtención de los ácidos glicosídicos).**

Las resinas glicosídicas representan una mezcla compleja de glicolípidos de alto peso molecular. Por medio de la reacción de hidrólisis alcalina (saponificación), se logró la separación de los ácidos orgánicos de cadena corta unidos por un enlace de tipo éster a los núcleos oligosacáridos, así como la hidrólisis del enlace éster de las agliconas que constituyen el enlace macrocíclico. De esta forma, se obtuvieron 1.470 g de una mezcla de ácidos glicosídicos.

### **7.3 Aislamiento y purificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios.**

#### **7.3.1 Peracetilación de los ácidos glicosídicos.**

Para facilitar la separación de los ácidos glicosídicos mayoritarios se llevó a cabo la derivatización del producto obtenido de la hidrólisis alcalina del extracto total. A través de la reacción con anhídrido acético y piridina (ver inciso 5.5), se obtuvieron 1.496 g de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados.

#### **7.3.2 “Clean-up” del producto peracetilado.**

Con la finalidad de eliminar posibles interferencias y concentrar los analitos de interés, se realizó un proceso de limpieza previa al análisis por HPLC del producto peracetilado tal y como se describe en el inciso 5.6. Así las fracciones que contenían resinas glicosídicas

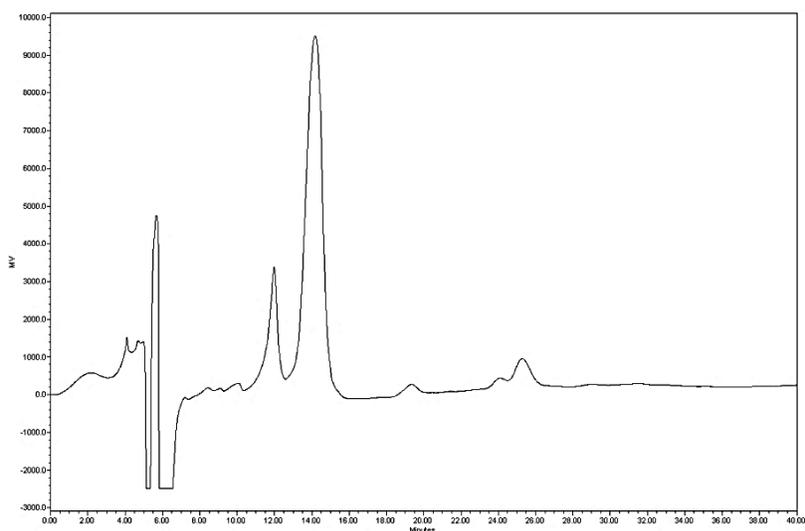
correspondieron a los eluatos 5-7. Éstos se mezclaron y se concentraron a sequedad obteniéndose 1.325 g del extracto saponificado y peracetilado.

### 7.3.3 Aislamiento de los ácidos glicosídicos peracetilados mediante HPLC.

#### 7.3.3.1 Análisis por HPLC escala analítica.

El análisis del extracto saponificado y peracetilado por HPLC se realizó con la finalidad de establecer las condiciones instrumentales (ver inciso 5.7.1) más adecuadas y que permitieran la mejor resolución de la muestra.

Con base en los resultados obtenidos, se estableció que las condiciones analíticas que permitieron la mejor resolución de la muestra problema fueron: columna Waters Symmetry® C18 (4.6 × 250 mm, 5 $\mu$ ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1); flujo: 0.4 mL/min; detector: índice de refracción; volumen de inyección de la muestra: 20  $\mu$ L (0.02 mg/ $\mu$ L) (Figura 17).

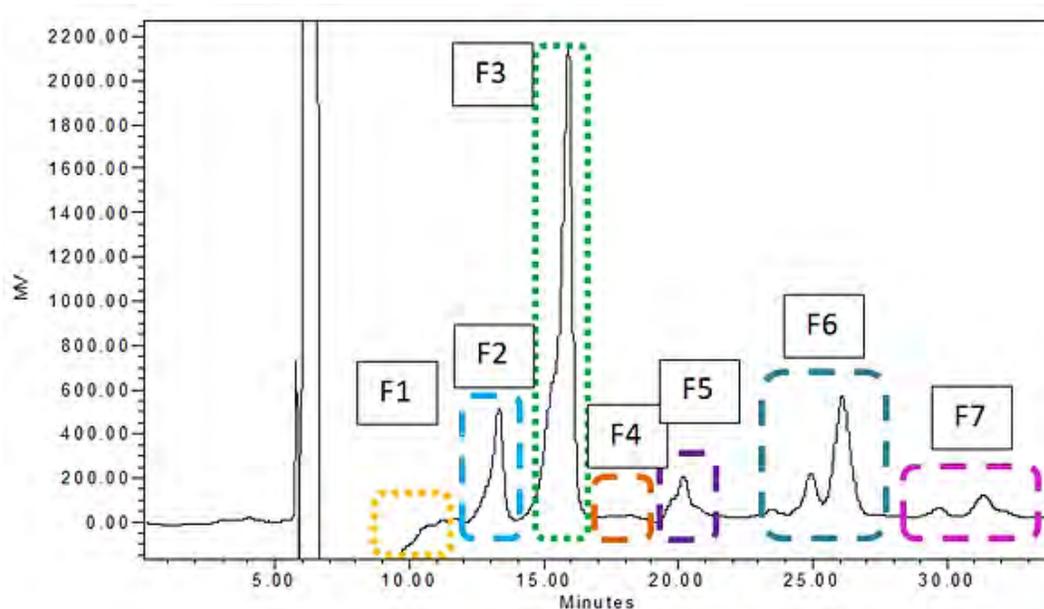


**Figura 17.** Cromatograma de HPLC a escala analítica de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados.

### 7.3.3.2 Purificación por HPLC escala preparativa.

Las condiciones instrumentales más adecuadas obtenidas a escala analítica fueron extrapoladas a escala preparativa (ver inciso 5.7.2) para separar los componentes de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados. Las condiciones finales de trabajo fueron las siguientes: columna Waters Symmetry® C18 (19 × 300 mm, 7 μ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1); flujo: 8.0 mL/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 1024); volumen de inyección: 500 μL (50 mg/500 μL de metanol).

Con base en los resultados obtenidos, se realizó el fraccionamiento de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados, como se muestra en la **Figura 18**, mediante el uso de la técnica de “corte de núcleo” (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002).



**Figura 18.** Cromatograma obtenido a escala preparativa que muestra las fracciones aisladas a partir de la mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados mediante el uso de la técnica de “corte de núcleo”.

Como resultado del fraccionamiento primario por HPLC a escala preparativa, se lograron obtener 7 fracciones de menor complejidad, obteniéndose las cantidades indicadas en el **Cuadro 7** para cada fracción.

**Cuadro 7.** Cantidad recuperada de cada fracción aislada mediante HPLC a escala preparativa y resultados de los análisis por EM-ESI.

Fracción	$t_R$	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	20.0 min	36 mg	1617
F6	24-27 min	79.6 mg	1271 (minoritario) 1559 (mayoritario)
F7	29-32 min	32 mg	1550 (minoritario) 1321 (mayoritario)

La presencia de compuestos conocidos o alguna resina novedosa se estableció mediante los valores de  $m/z$  para las especies  $[M+Na]^+$  en el espectro de masas generado mediante electrospray en la modalidad positiva (**Cuadro 7**). Las fracciones F2 ( $t_R$  13.0 min) y F3 ( $t_R$  15.5 min) presentaron valores de masas que correspondían a los ácidos constitutivos mayoritarios de la jalapina de *Operculina macrocarpa*. Cada uno de estos eluatos se purificó mediante HPLC en columna preparativa C18 (19 × 300 mm, 7  $\mu$ ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1); flujo: 8.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: 500  $\mu$ L, utilizando la técnica de reciclaje de muestra durante 15 ciclos. De este proceso se logró

la purificación total de cada uno de ellos, obteniéndose 13 mg (p.f. 83-85 °C) y 79.3 mg (p.f. 105-109 °C) de los picos mayoritarios de las fracciones F2 y F3 respectivamente.

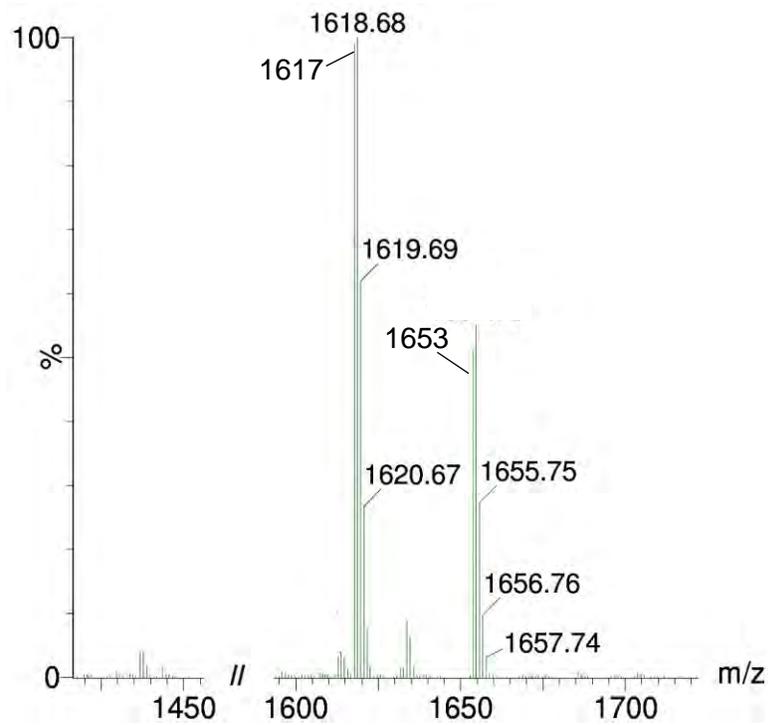
Posteriormente, se llevó a cabo el análisis espectroscópico de estos productos, mediante RMN y EM, permitiendo la identificación de estos compuestos como los ácidos operculínicos A (F3) y B (F2) (Ono *et al.*, 1989).

### **7.3.4 Purificación de los ácidos glicosídicos peracetilados y caracterización estructural.**

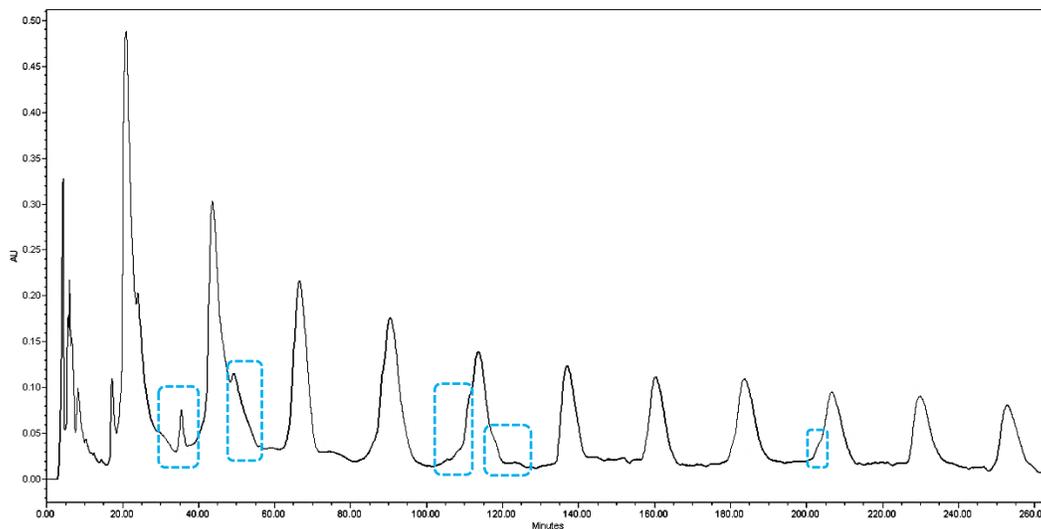
#### **7.3.4.1 Ácido glicosídico mayoritario de la fracción 5.**

El espectro de masas de baja resolución generado por electrospray de la muestra F5 permitió la identificación de un constituyente mayoritario a través de los aductos de  $m/z$  1617  $[M + Na]^+$  y 1653  $[M + Na + 2H_2O]^+$  (**Figura 19**), indicando que se trata de un compuesto con un peso molecular de 1594 Da y, con una diferencia de 14 unidades de masa por encima del ácido operculínico B ( $m/z$  1603  $[M + Na]^+$ ) (**Cuadro 7**).

La totalidad de la fracción F5, con un  $t_R = 20.0$  min (36 mg) se sometió a la técnica de “reciclaje” y “rasurado de pico” (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002) para purificar el componente mayoritario de dicha fracción (**Figura 20**), utilizando HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones instrumentales de trabajo: columna C18 (19 × 300 mm, 7 $\mu$ ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1); flujo: 8.0 mL/min; detector: UV; volumen de inyección de la muestra: 500  $\mu$ L (36 mg/500  $\mu$ L). La técnica de rasurado de pico permitió la eliminación de homólogos que se encuentran en menor proporción. El reciclaje del pico durante 11 ciclos permitió la purificación total del ácido glicosídico mayoritario. Se obtuvieron 14 mg de un sólido blanco con p.f. de 72 °C y rotación óptica:  $[\alpha]_D$  de -32.2 ( $c$  0.18, MeOH).

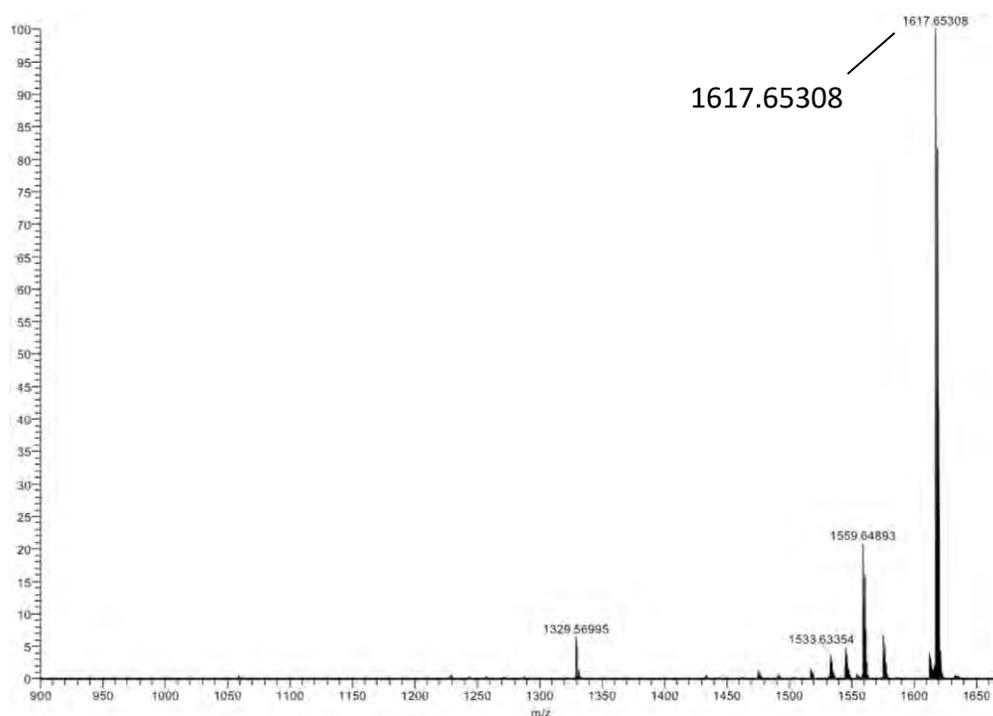


**Figura 19.** Espectro de masas (EM-ESI, modo positivo) de la fracción F5. Molécula cationizada  $m/z$  1617  $[M + Na]^+$ , 1618  $[M + 1 + Na]^+$  y 1653  $[M + Na + 2H_2O]^+$ .



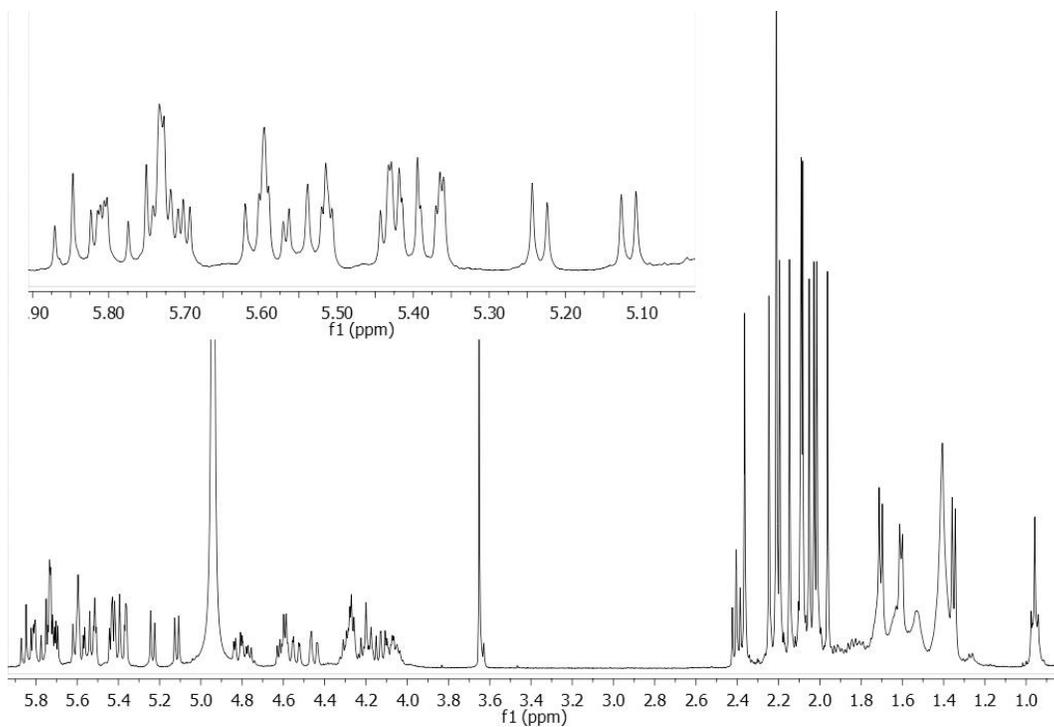
**Figura 20.** Purificación del ácido glicosídico peracetilado mayoritario presente en la fracción 5 del extracto saponificado y peracetilado, por la técnica de “reciclaje”, “corte y rasurado de pico”; (--- indica los fragmentos eliminados del pico).

El compuesto purificado se analizó por espectrometría de masas de alta resolución mediante ionización por electrospray en modo positivo (**Figura 21**), registrándose la especie  $[M + Na]^+$  con un valor de masa exacta de 1617.65308 (calcd para  $C_{73}H_{110}O_{38} + Na^+$ , 1617.65673,  $\Delta = -2.25$  ppm) que permitió el cálculo de la fórmula molecular  $C_{73}H_{110}O_{38}$  para el ácido glicosídico peracetilado de la fracción F5. El compuesto purificado se analizó mediante la técnica de RMN para la elucidación de su estructura molecular. El análisis de los espectros  $^1H$ -RMN (**Figura 22**) y  $^{13}C$ -RMN (**Figura 23**) permitió obtener información general acerca de la estructura de la molécula.

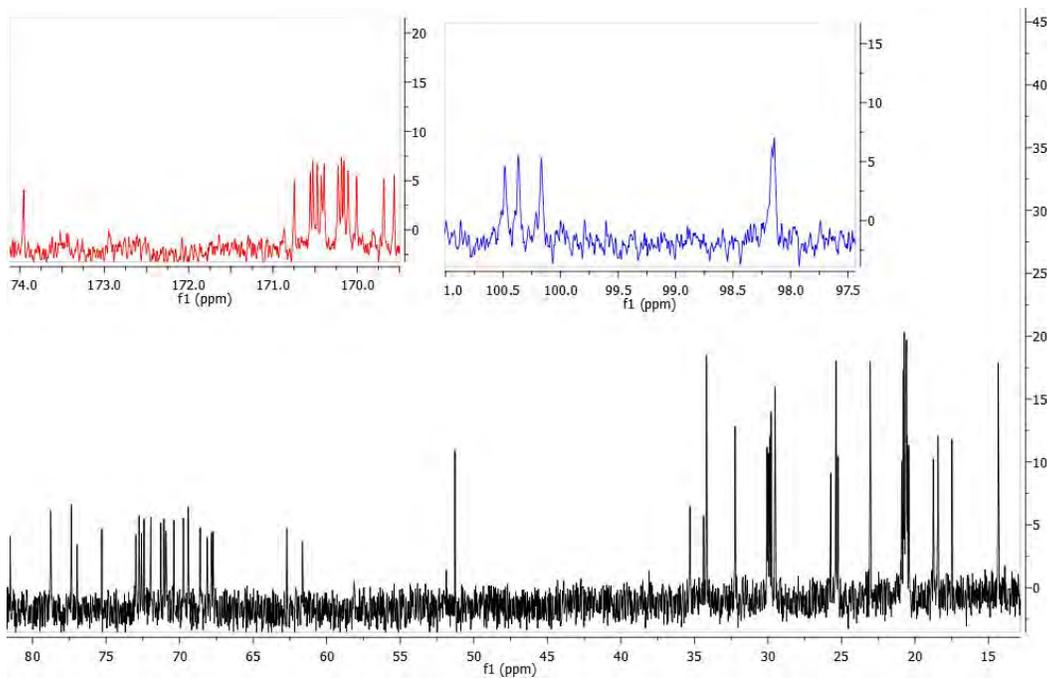


**Figura 21.** Espectro de masas de alta resolución (EM-ESI, modo positivo) del componente purificado de la fracción 5.

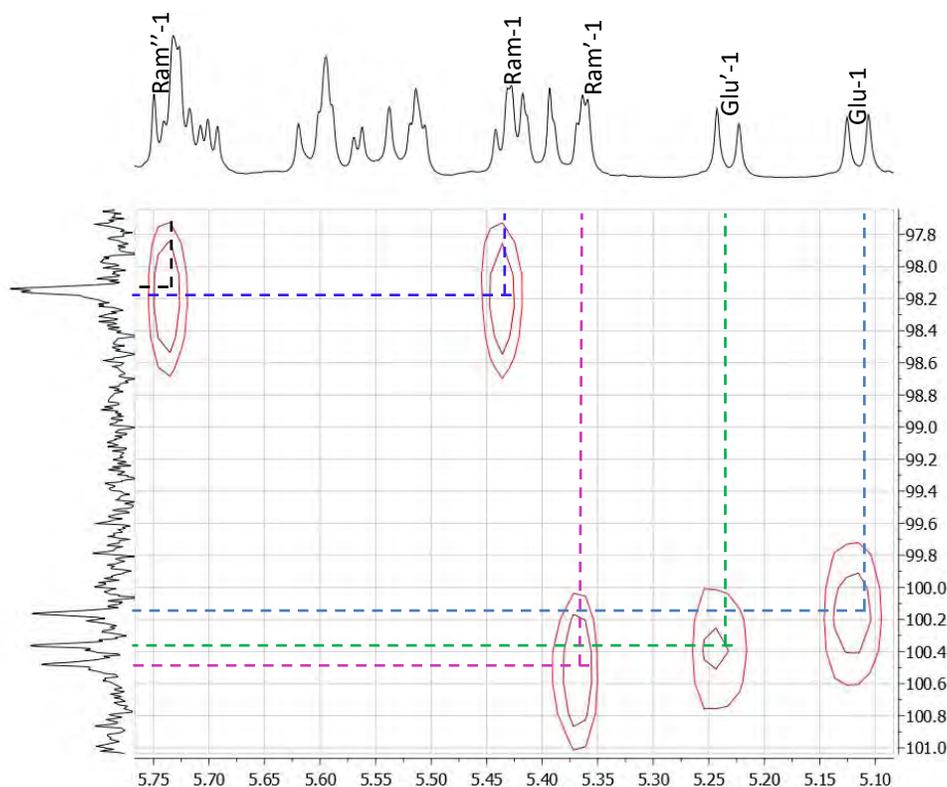
De esta forma, se observaron cinco señales correspondientes a carbonos anoméricos en la región comprendida entre  $\delta_C$  97.50 – 100.50, que se encuentran correlacionando con cinco señales de protón entre  $\delta_H$  5.00 y 5.75, confirmadas por la técnica de correlación heteronuclear ( $^1J_{C-H}$ ) HSQC (**Figura 24**); este análisis permitió determinar que el núcleo oligosacárido de esta molécula se encuentra formado por cinco monosacáridos.



**Figura 22.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto purificado de la fracción 5 (400 MHz, piridina- $d_5$ ).



**Figura 23.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto purificado de la fracción 5 (100 MHz, piridina- $d_5$ ).

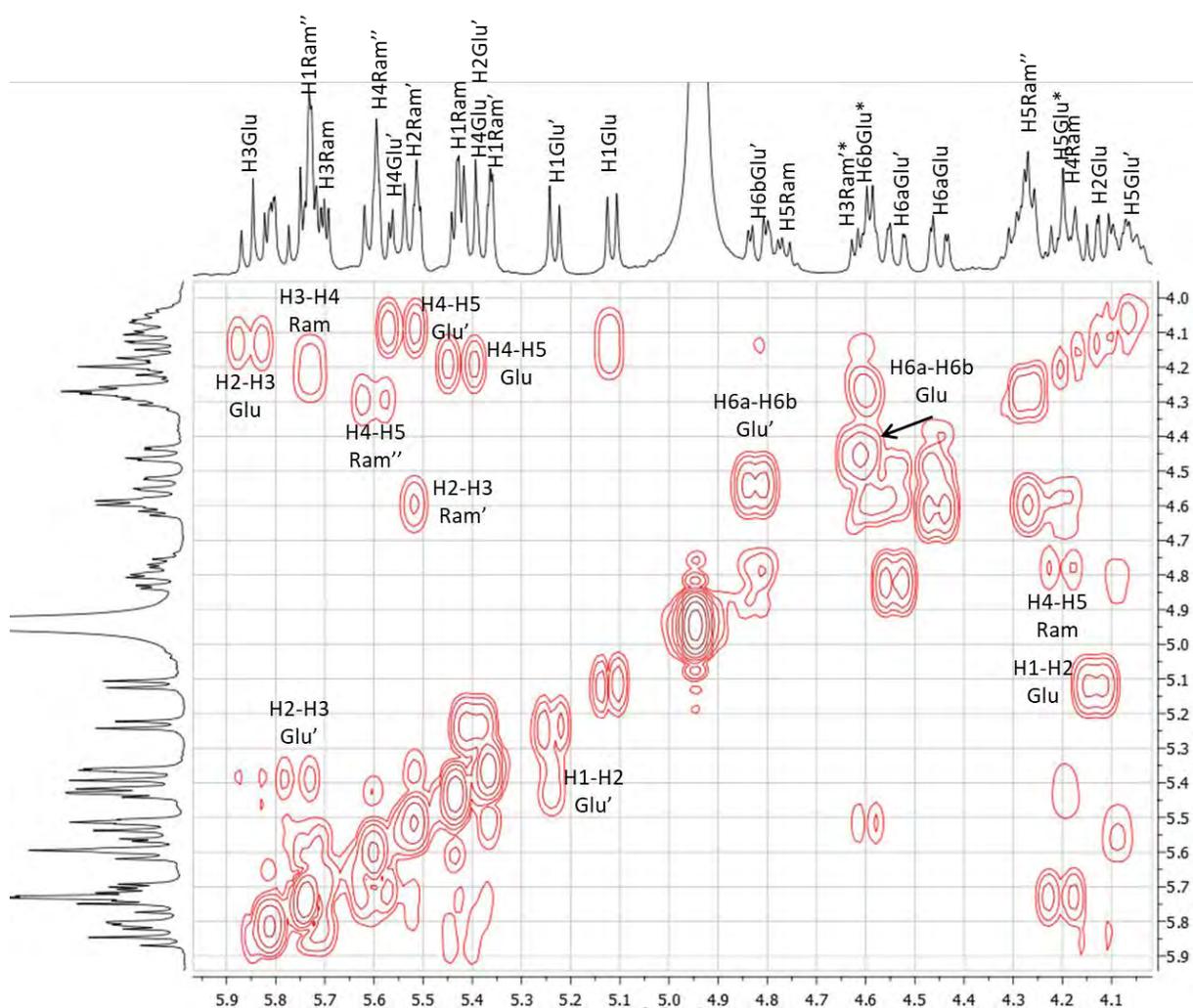


**Figura 24.** Espectro HSQC de la zona anomérica del compuesto purificado de la fracción 5.

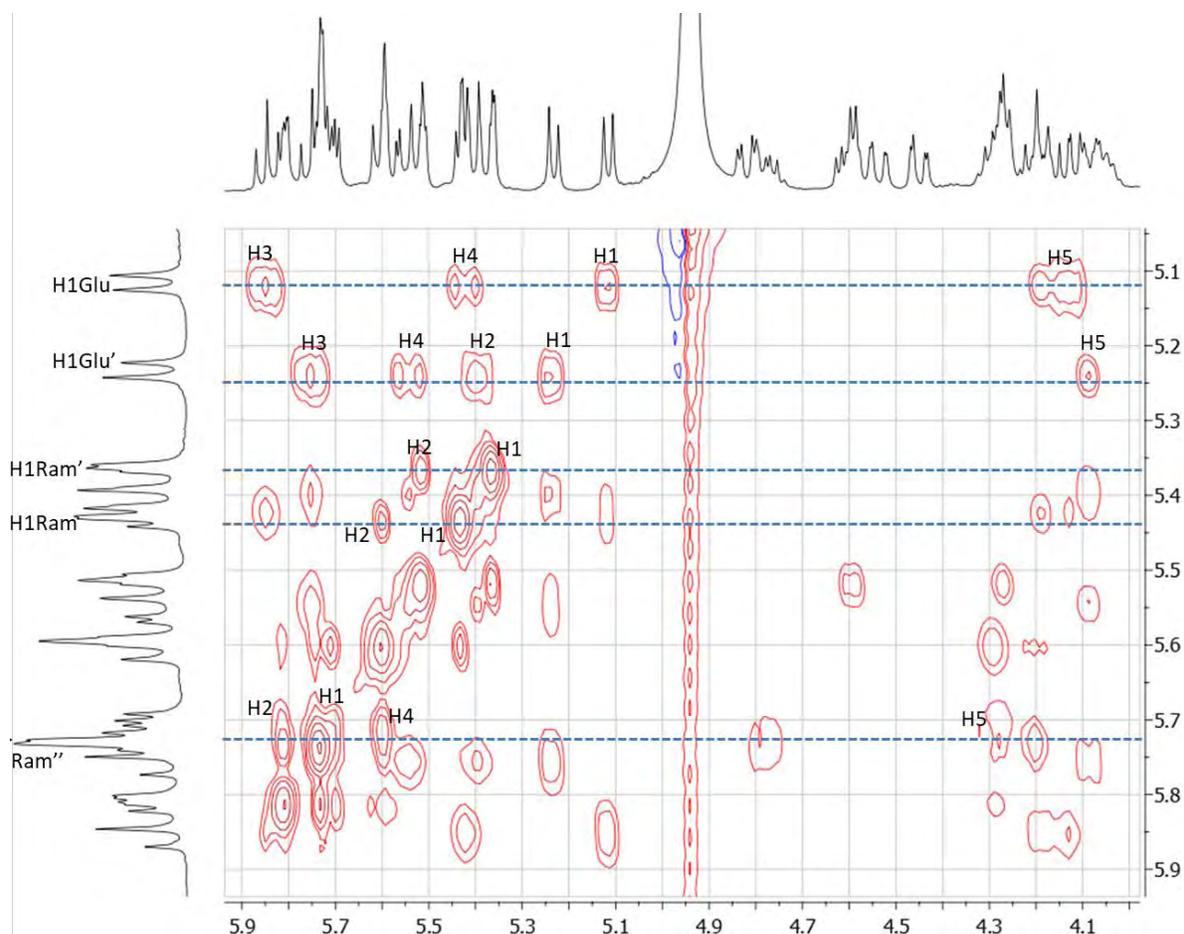
De acuerdo con los patrones de acoplamiento observados para los protones anoméricos de las unidades monosacáridas, se logró establecer su naturaleza. De esta forma, las señales con  $\delta_H$  5.12 y 5.23 se observaron en forma de dobletes ( $^3J_{H-H} = 7.5$  Hz) con desplazamiento químico característico y fueron atribuibles a unidades de D-glucosa (Castañeda-Gómez, 2010); las señales centradas en 5.35, 5.42 y 5.72 ppm se observaron como singuletes anchos que corresponden a los protones anoméricos de tres unidades de L-ramnosa (Pereda-Miranda y Bah, 2003).

Otra característica importante fue el número de señales dobles observadas en el espectro de  $^1H$ -RMN entre 1.3-1.7 ppm, y que corresponden a los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas. Así, tres dobletes fueron observados en esta región indicando la presencia de tres unidades de este tipo de monosacárido (L-ramnosa) en el núcleo pentasacárido.

Con ayuda de las técnicas de RMN bidimensional, como son  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY, se logró resolver la asignación de las señales para los metinos centrados entre  $\delta_{\text{H}}$  4.0-6.0, y que son atribuibles a cada unidad monosacárida. La asignación de dichas señales se realizó a partir de la señal correspondiente al protón anomérico (H-1) y su correlación con la señal para H-2 identificada a través de cuadro de conectividad en el espectro COSY (**Figura 25**). La identificación de estas señales se confirmó con el espectro TOCSY (**Figura 26**). De la misma forma, se identificaron las secuencias de interacción vecinal restantes: H-2/H3, H-4/H-5 y H-5/H-6 en cada unidad monosacárida (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).



**Figura 25.** Espectro COSY de la región oligosacárida del compuesto purificado de la fracción 5.

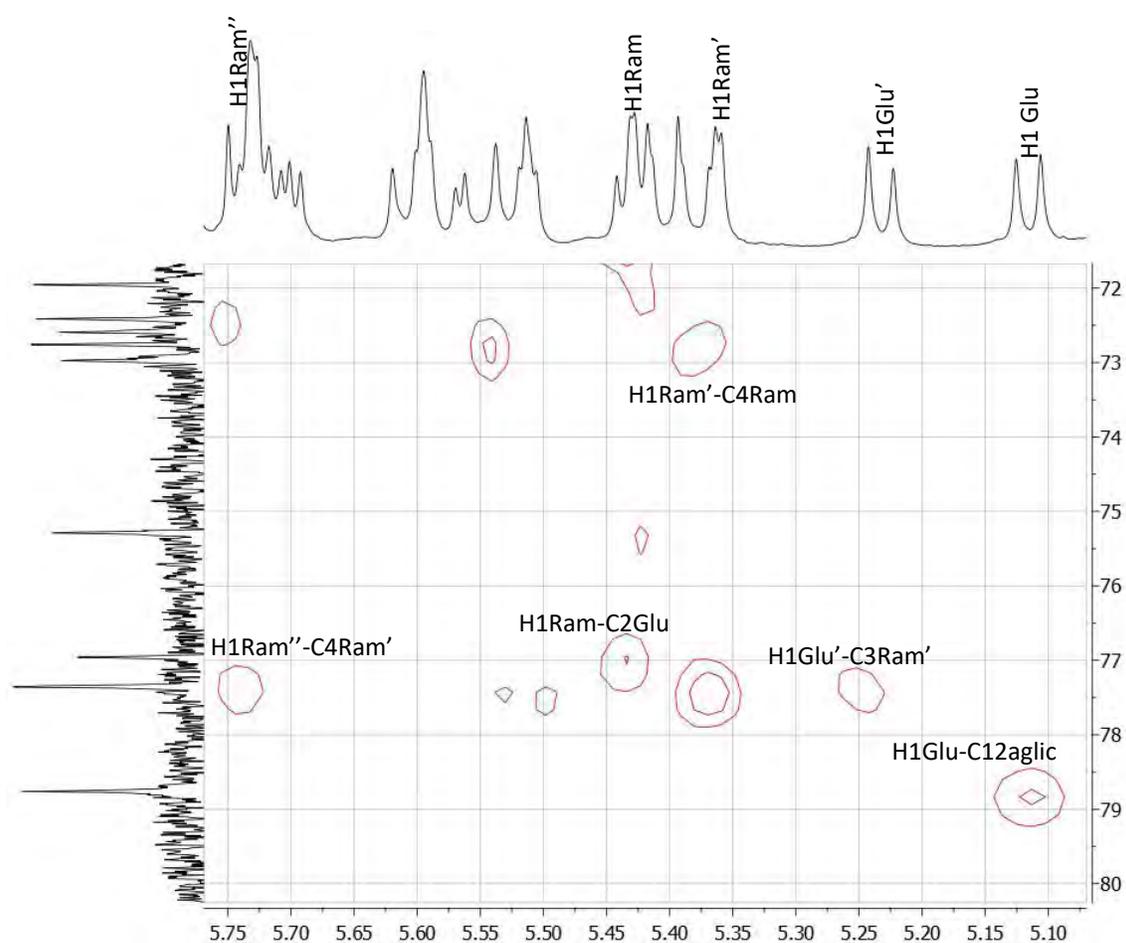


**Figura 26.** Espectro TOCSY de la región oligosacárida del compuesto purificado de la fracción 5.

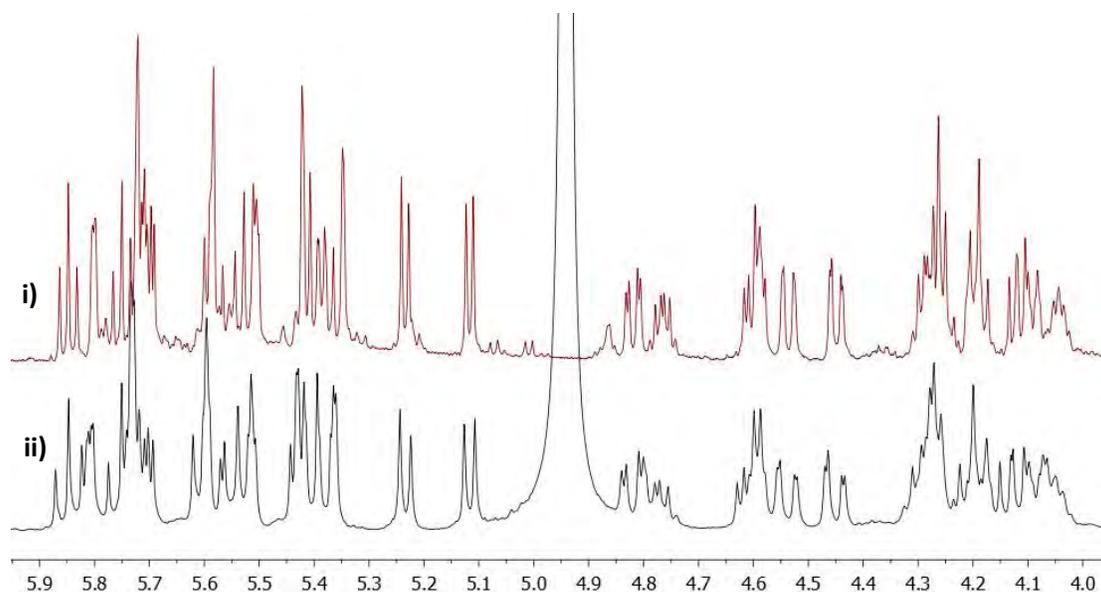
La correspondencia de cada señal de protón con su átomo de carbono geminal se realizó a través del experimento HSQC. De esta forma, fueron localizadas 22 señales en la región del espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN entre 60–80 ppm que correspondieron a los carbonos oxigenados para las cinco unidades monosacáridas, y diferentes a las cinco señales diagnósticas de los carbonos anoméricos entre 97.5- 100.5 ppm.

La secuencia de glicosidación se identificó a través de las correlaciones en el experimento HMBC a partir de las principales conectividades observadas entre: H-1 Gluc ( $\delta$  5.12)/C-12 aglicona ( $\delta$  78.62), H-1 Ram ( $\delta$  5.43)/C-2 Glu ( $\delta$  77.03), H-1 Ram' ( $\delta$  5.36)/C-4 Ram ( $\delta$  72.75), H-1 Ram'' ( $\delta$  5.73)/C-4 Ram' ( $\delta$  77.31) y H-1 Gluc' ( $\delta$  5.23)/C-3 Ram' ( $\delta$  77.37) (**Figura 27**).

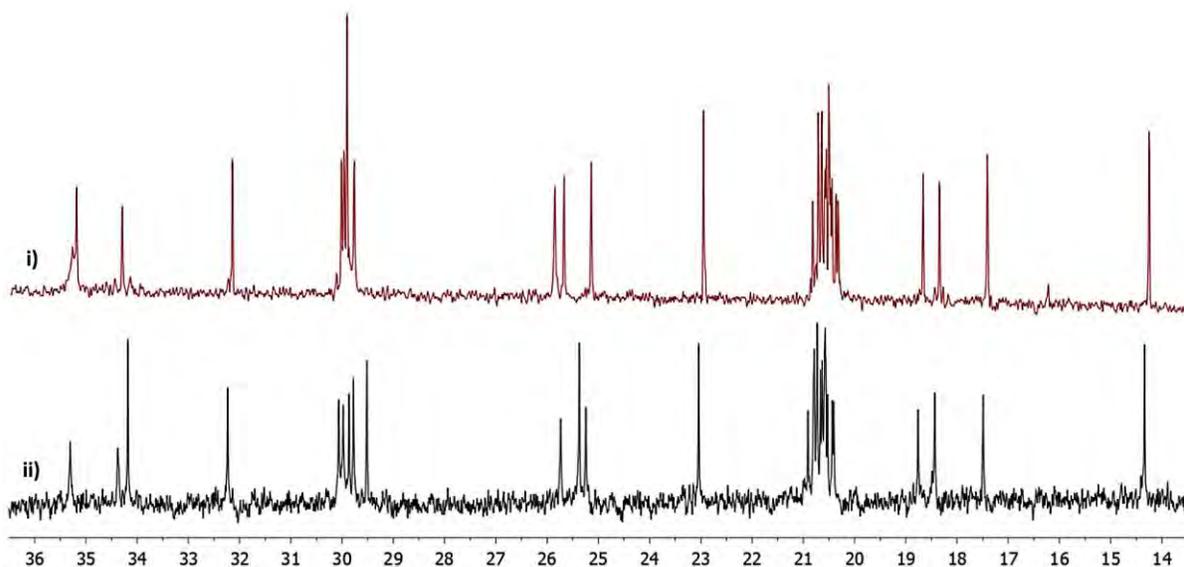
En el **Cuadro 8** muestra el resumen de los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento correspondientes a los protones y los carbonos de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida del ácido glicosídico peracetilado purificado de la fracción F5 y se comparan con los valores para el peracetato del ácido operculínico B (Fracción F2). Con lo anterior, se comprobó que el ácido glicosídico peracetilado purificado a partir de la fracción 5 tiene en común el mismo núcleo oligosacárido que presenta el ácido operculínico B (**Figura 28**), y que la única diferencia radica en el ácido graso que forma la aglicona, ya que consta de una cadena hidrocarbonada de 17 átomos de carbono en lugar de C<sub>16</sub> (**Figura 29**).



**Figura 27.** Espectro HMBC del núcleo oligosacárido del compuesto purificado de la fracción 5.



**Figura 28.** Comparación de los espectros de  $^1\text{H}$ -RMN (400 MHz, piridina- $d_5$ ) en la región comprendida entre 4.0 y 6.0 ppm; i) ácido operculínico B (Fracción F2), ii) compuesto purificado de la fracción F5.



**Figura 29.** Comparación de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN (100 MHz, piridina- $d_5$ ) de la región comprendida entre 14 y 36 ppm; i) ácido operculínico B (Fracción F2), ii) compuesto purificado de la fracción F5.

**Cuadro 8.** Constantes espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) del ácido operculínico B peracetilado y el compuesto purificado F5.

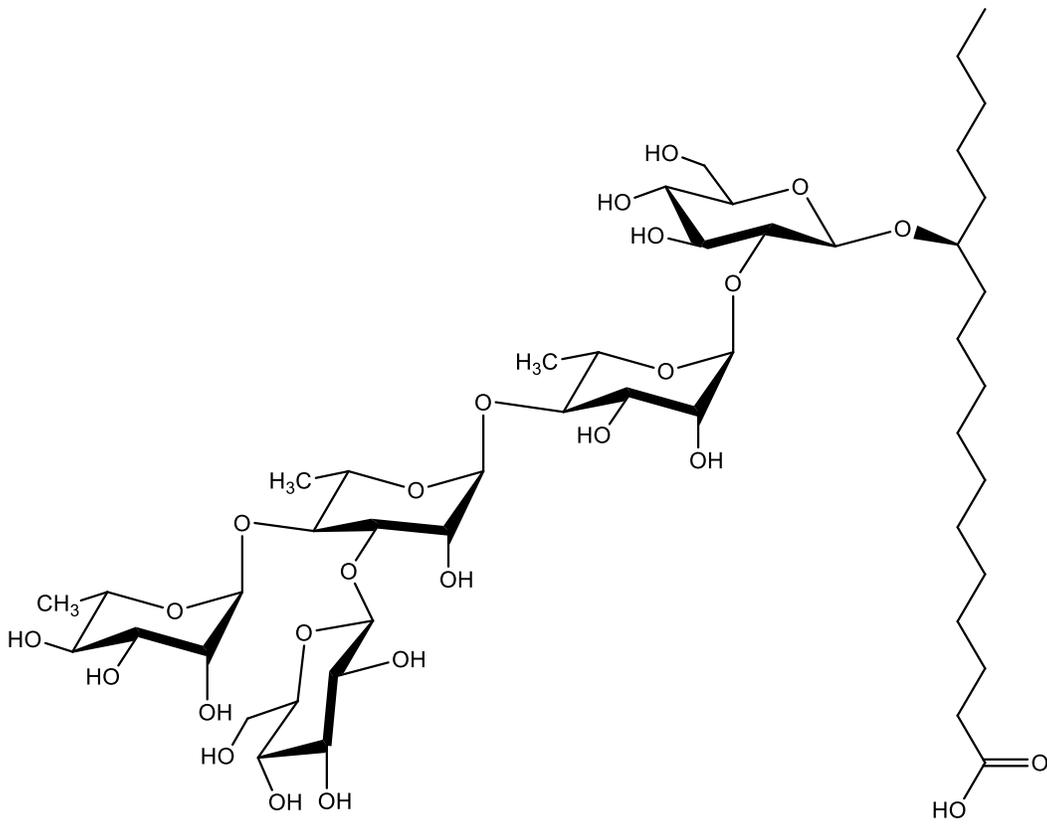
Posición	Ac. operculínico B peracetilado		Compuesto F5	
	$\delta$ H	$\delta$ C	$\delta$ H	$\delta$ C
Glu-1	5.10 d (7.7)	100.59	5.12 d (8.0)	100.16
2	4.11 dd (7.7, 9.5)	77.03	4.13 dd (8.0, 9.6)	77.03
3	5.82 dd (9.5, 9.5)	75.72	5.85 dd (9.6, 9.6)	75.25
4	5.40 dd (9.5, 9.5)	70.18	5.42 dd (9.6, 9.6)	69.74
5	4.17 *	82.01	4.19 *	81.48
6a	4.40 dd (2.2, 12.5)	63.14	4.45 dd (2.2, 12.1)	62.71
6b	4.59 dd (5.2, 12.5)		4.59 *	
Ram-1	5.42 brs	98.61	5.43 brs	98.16
2	5.58 *	71.49	5.61 *	71.04
3	5.70 dd (4.0, 9.2)	69.85	5.70 dd (3.6, 6.4)	69.4
4	4.18 dd (9.2, 9.2)	72.39	4.18 dd (9.6, 9.6)	72.75
5	4.76 dq (9.2, 6.1)	68.16	4.78 dq (9.2, 6.0)	67.7
6	1.69 d (6.1)	18.87	1.68 d (6.1)	18.44
Ram'-1	5.35 brs	100.96	5.36 brs	100.49
2	5.50 *	73.03	5.51 *	72.56
3	4.57 dd (9.5, 9.5)	77.82	4.59 *	77.37
4	4.26 *	77.46	4.27 *	77.31
5	4.26 *	68.56	4.27 *	68.09
6	1.60 d (5.5)	19.20	1.58 d (5.3)	18.76
Ram''-1	5.72 *	98.65	5.73 brs	98.14
2	5.80 br d (3.5)	70.85	5.79 dd (1.6, 3.6)	70.38
3	5.72 *	71.71	5.70 *	71.09
4	5.58 dd (10.0, 10.0)	71.36	5.59 dd (10.0, 10.0)	70.80
5	4.28 dq (10.0, 6.1)	68.26	4.28 *	67.81
6	1.34 d (6.1)	17.94	1.33 d (6.2)	17.49
Glu'-1	5.22 d (7.9)	100.81	5.23 d (8.0)	100.34
2	5.38 dd (7.9, 9.5)	72.87	5.39 dd (9.6, 9.6)	72.42
3	5.73 dd (9.5, 9.5)	73.44	5.75 dd (9.2, 9.2)	72.96
4	5.52 dd (9.5, 9.5)	69.04	5.54 dd (9.6, 9.6)	68.58
5	4.06 *	73.19	4.08 *	72.88
6 <sup>a</sup>	4.53 dd (2.2, 12.5)	62.11	4.54 dd (2.0, 12.4)	61.65
6 <sup>b</sup>	4.80 dd (3.3, 12.5)		4.82 dd (3.6, 12.8)	

Datos registrados a 400 MHz para RMN  $^1\text{H}$  y a 100 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  en piridina- $d_5$ . Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en paréntesis y están expresadas en Hz. Los desplazamientos químicos marcados con un asterisco (\*) indican señales sobrepuestas. Los patrones de acoplamiento están expresados como: s = señal singulete, brs = señal ancha, d = señal doble, t = señal triple, m = señal múltiple. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, TOCSY) y heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC, HMBC). Abreviaciones: ram = ramnosa, glu = glucosa.

En el **cuadro 9** muestra los desplazamientos químicos  $^{13}\text{C}$ -RMN que corresponden a los carbonos que constituyen el ácido graso de la aglicona de F5. Estos valores se comparan con los descritos para el ácido graso que conforma la aglicona del ácido turpético C (Wenbing *et. al.*, 2012), aislado de las partes aéreas de *Operculina turpethum*; este compuesto representa la primera resina caracterizada con el ácido 12-hidroxiheptadecanoico como aglicona. La similitud en los desplazamientos químicos es una evidencia de que la aglicona del compuesto purificado F5 corresponde al ácido 12-hidroxiheptadecanoico y, por lo tanto, este producto corresponde al ácido turpético C (**Figura 30**), que presenta al ácido operculínico B como el núcleo oligosacárido.

**Cuadro 9.** Constantes espectroscópicas ( $^{13}\text{C}$ -RMN) de la aglicona del ácido turpético C y del compuesto purificado F5.

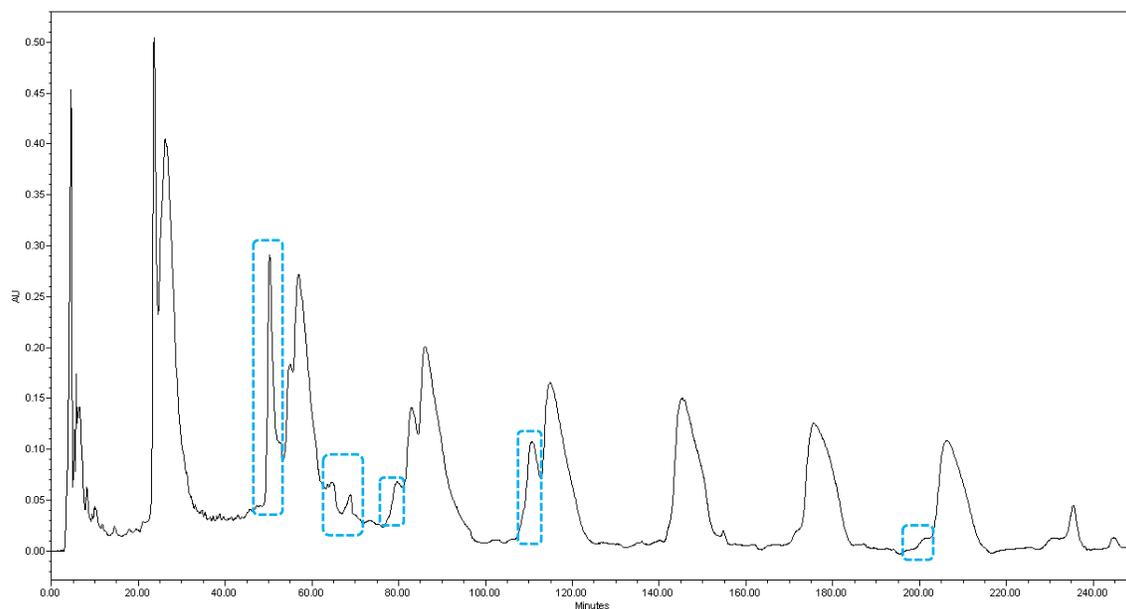
	Ácido turpético C	Compuesto puro F5
Posición	$\delta$ C	$\delta$ C
1	175.9	174.0
2	34.7	34.4
3	25.4	25.7
4-9	29.3-29.9	29.5-30.1
10	25.3	25.3
11	33.7	34.1
12	77.7	78.6
13	35.1	35.3
14	24.9	25.2
15	32.1	32.2
16	22.7	23.0
17	14.0	14.3



**Figura 30.** Estructura del ácido turpético C.

### 7.3.4.2 Purificación del ácido glicosídico mayoritario de la fracción 6.

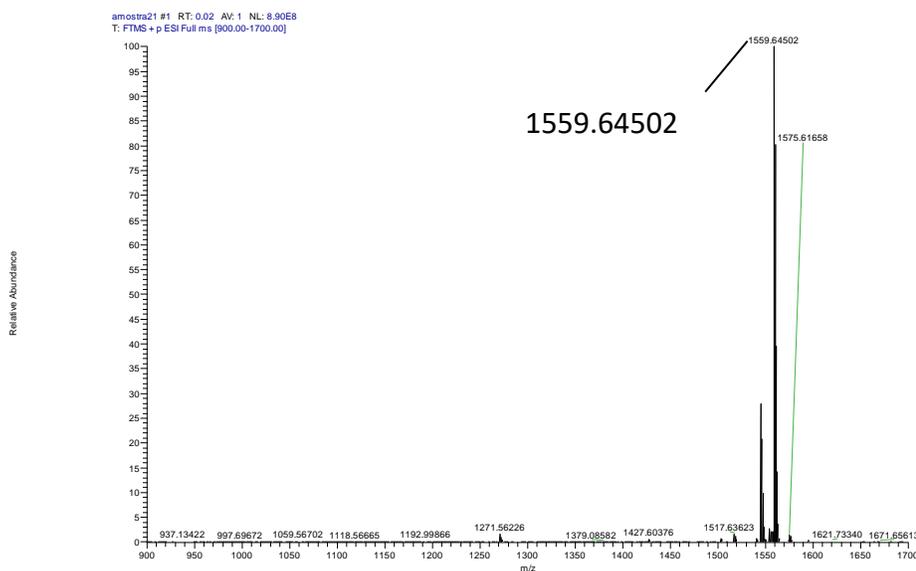
La totalidad de la fracción 6 (79.6 mg) se sometió a la técnica de reciclaje y rasurado de pico (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002), para purificar el componente mayoritario de la fracción, utilizando HPLC a nivel preparativo bajo las siguientes condiciones instrumentales de trabajo: columna Waters symmetry® C18 (19 × 300 mm, 7 $\mu$ ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1); flujo: 8.0 mL/min; detector: UV; volumen de inyección de la muestra: 500  $\mu$ L (39.8 mg/500  $\mu$ L).



**Figura 31.** Purificación del ácido glicosídico peracetilado mayoritario presente en la fracción 6; (--- indica los fragmentos eliminados del pico).

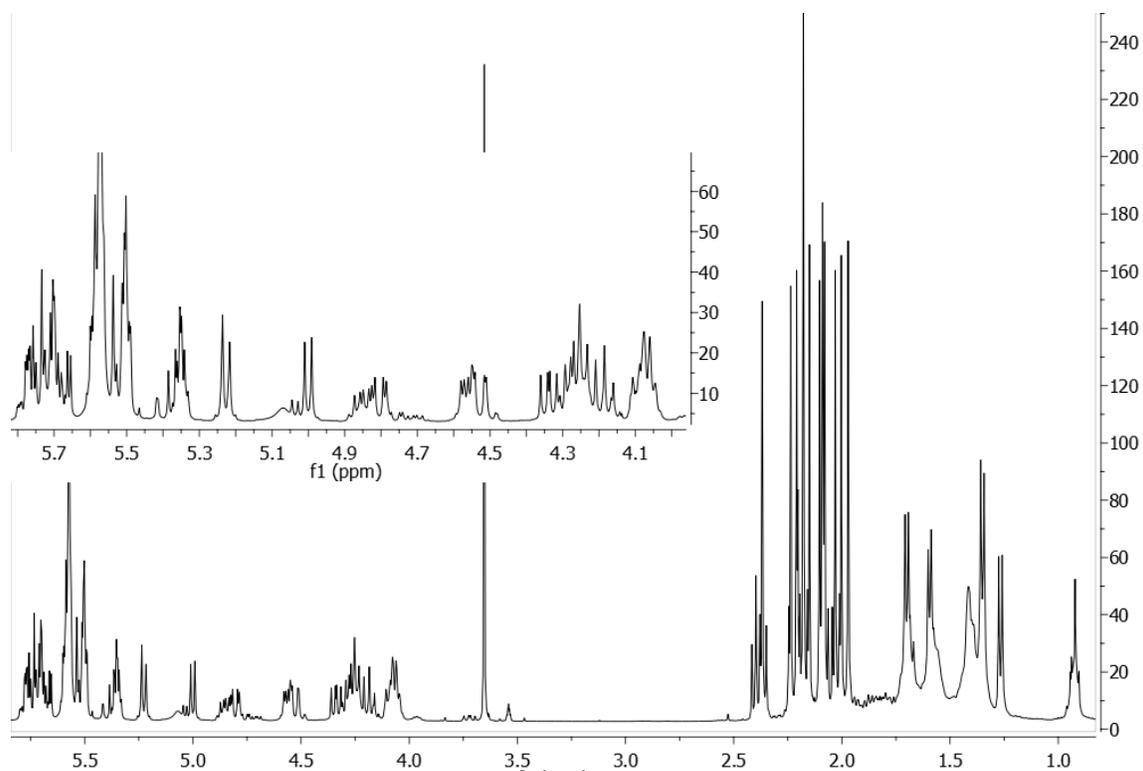
La técnica de “rasurado de pico” permitió la eliminación de homólogos que se encuentran en menor proporción. El reciclaje del pico durante 7 ciclos permitió la purificación total del ácido glicosídico mayoritario presente en la fracción 6 (**Figura 31**). Así se obtuvieron 30 mg de un sólido blanco con p.f. de 104-105 °C y rotación óptica:  $[\alpha]_D$  de -32.0 (c 0.1, MeOH).

El compuesto purificado se analizó por EM-ESI en modo positivo (**Figura 32**), obteniéndose un valor de 1536 uma y una fórmula molecular calculada de  $C_{71}H_{108}O_{36}$ , con base en el ión de  $m/z$  1559.64502  $[M + Na]^+$  (calcd. para  $C_{71}H_{108}O_{36}Na [M + Na]^+$ , requiere 1559.65125,  $\Delta = -3.99$  ppm); la masa observada para este compuesto representa una diferencia de 14 unidades de masa por encima del ácido operculínico A descrito con anterioridad en las partes aéreas de *I. purga* (Castañeda-Gómez, 2010). Esta diferencia indicó que se trata de un ácido glicosídico novedoso que tiene en común la porción oligosacárida con el ácido operculínico A previamente reportado.

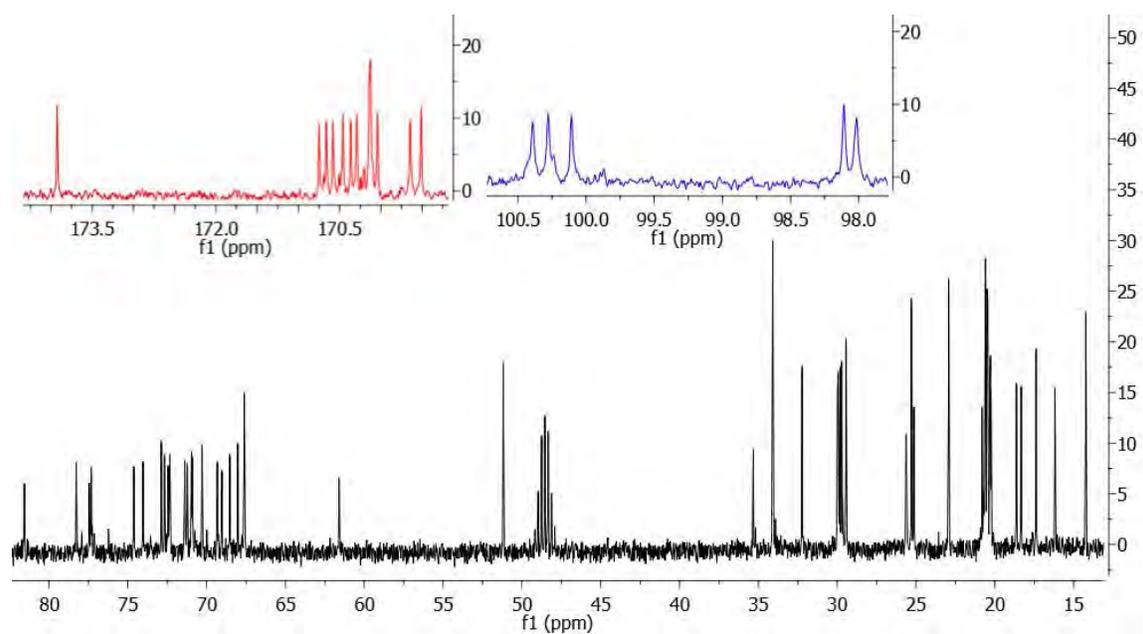


**Figura 32.** Espectro de masas de alta resolución (EM-ESI, modo positivo) del componente mayoritario purificado de la fracción 6.

Para comprobar lo anterior, el compuesto purificado se analizó mediante la técnica de RMN. El análisis de los espectros de  $^1H$ -RMN (**Figura 33**) y  $^{13}C$ -RMN (**Figura 34**), así como los experimentos bidimensionales (ver anexos), permitieron definir los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento para los constituyentes del núcleo oligosacárido (**Cuadro 10**) tal como se describió en la sección anterior.



**Figura 33.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto mayoritario purificado de la fracción 6 (400 MHz, piridina- $d_5$ ).



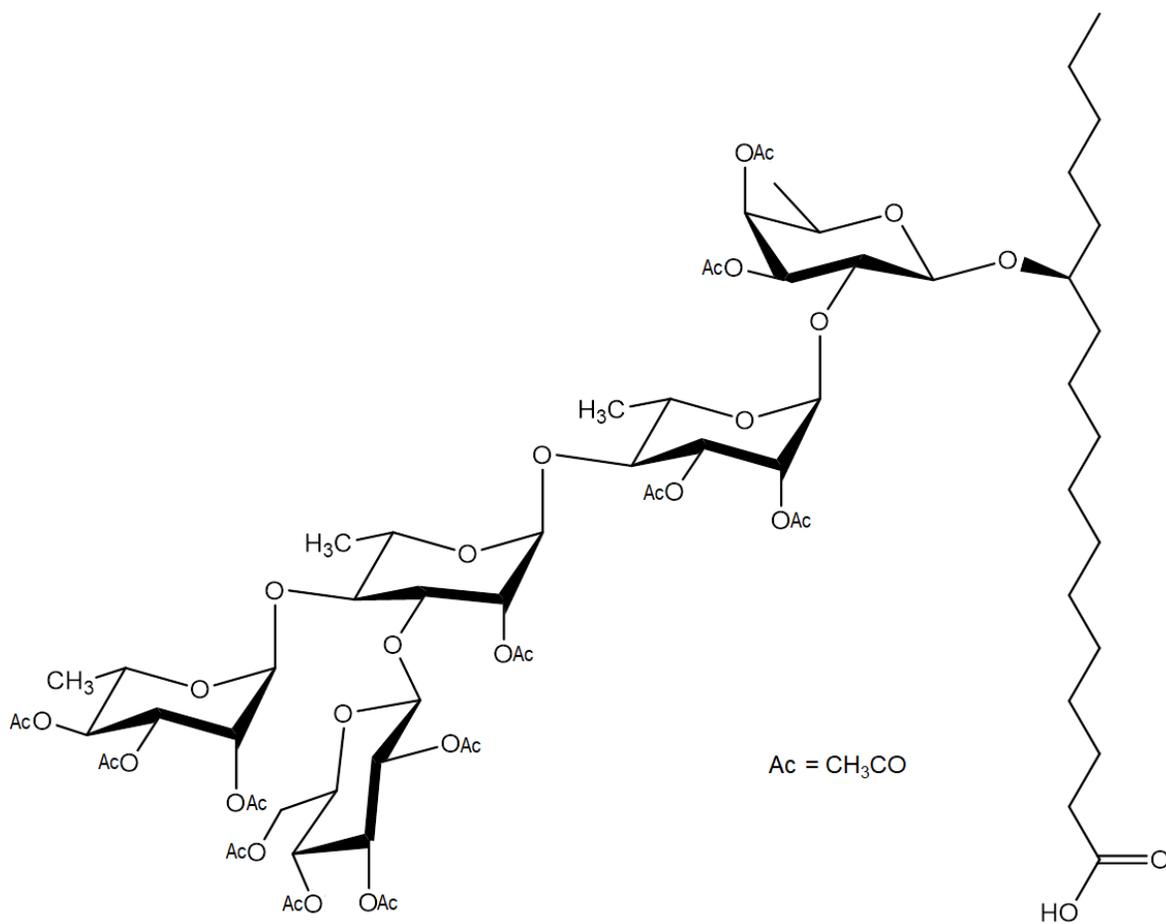
**Figura 34.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto mayoritario purificado de la fracción 6 (100 MHz, piridina- $d_5$ ).

**Cuadro 10.** Constantes espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) del ácido operculínico A peracetilado y el compuesto mayoritario F6.

Posición	Ácido Operculínico A peracetilado		F6 mayoritario	
	$\delta$ H	$\delta$ C	$\delta$ H	$\delta$ C
Fuc-1	4.99 d (7.5)	99.9	5.0 d (7.6)	100.1
2	4.34 dd (9.5, 7.5)	73.9	4.34 dd (10,7.6)	73.5
3	5.50 dd (9.5, 3.0)	68.4	5.51*	68.6
4	5.53 d (3.0)	72.1	5.57 brs	70.9
5	4.04 dd (6.5, 0.5)	68.8	4.07 (6.4, 0.8)	68.6
6	1.24 d (6.5)	16.0	1.27 d (6.4)	16.2
Ram-1	5.50 brs	97.8	5.50 brs	98.0
2	5.60 dd (3.0, 1.5)	70.7	5.59 dd (3.6, 1.6)	71.6
3	5.74 dd (9.5, 6.5)	71.0	5.74 dd (9.6, 6.4)	72.0
4	4.19 dd (10.0, 9.5)	81.3	4.20 dd (10.0, 9.2)	82.1
5	4.84 dq (9.5, 6.5)	67.4	4.84*	68.2
6	1.69 d (6.0)	18.1	1.70 d (6.0)	18.1
Ram'-1	5.35 brs	100.2	5.35 brs	100.4
2	5.53 m*	71.2	5.50*	72.9
3	4.56 dd (8.0, 3.5)	77.1	4.57 dd (8.4, 3.6)	77.9
4	5.50 m*	68.4	5.50*	68.3
5	4.25 dq (6.0, 10.0)	77.2	4.25 dq (5.8, 10)	78.1
6	1.57 d (5.5)	18.4	1.59 d (5.6)	18.3
Ram''-1	5.70 brs	97.9	5.70 brs	98.1
2	5.77 dd (3.5, 1.5)	70.0	5.77 dd (3.2, 1.2)	70.6
3	5.67 dd (10.5, 3.5)	69.0	5.66 dd (10.4, 3.6)	69.6
4	5.57 m	70.7	5.60 m*	71.4
5	4.26 dd (10.0, 6.5)	67.4	4.27 (9.6, 6.4)	68.2
6	1.32 d (6.5)	17.2	1.35 d (6.4)	17.3
Glu-1	5.22 d (7.5)	100.1	5.23 d (8.0)	100.3
2	5.37 t (9.5)	72.1	5.36*	72.0
3	5.73 t (9.5)	72.8	5.73 t (9.2)	73.0
4	5.50 t (9.5)	74.4	5.51*	75.2
5	4.08 ddd (10.5, 3.0, 3.0)	72.5	4.10*	72.9
6a	4.51 dd (12.5, 2.5)	61.7	4.53 dd (12.4, 2.0)	62.2
6b	4.80 dd (12.5, 3.5)		4.79 dd (12.4, 3.6)	

Datos registrados a 400 MHz para RMN  $^1\text{H}$  y a 100 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  en piridina- $d_5$ . Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en paréntesis y están expresadas en Hz. Los desplazamientos químicos marcados con un asterisco (\*) indican señales sobrepuestas. Los patrones de acoplamiento están expresados como: s = señal singulete, brs = señal ancha, d = señal doble, t = señal triple, m = señal múltiple. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, TOCSY) y heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC, HMBC). Abreviaciones: fuc= fucosa, ram = ramnosa, glu = glucosa.

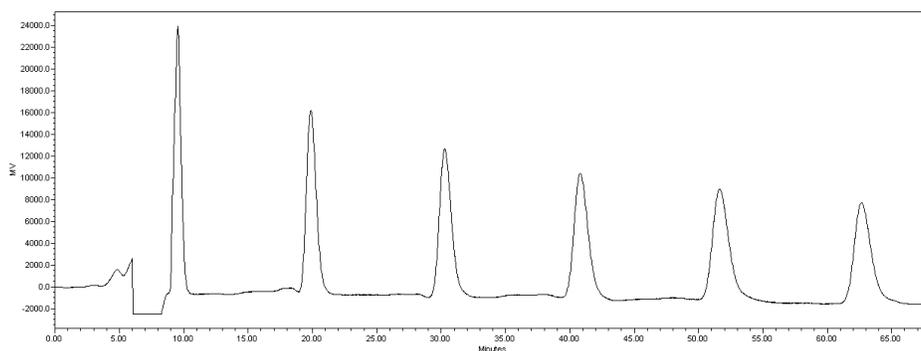
La comparación de los datos espectroscópicos permitió concluir que el compuesto aislado efectivamente presenta la misma porción oligosacárida que el ácido operculínico A previamente reportado, y que la diferencia se encuentra en el ácido graso que forma la macrolactona que consta de 17 carbonos (**Figura 35**).



**Figura 35.** Estructura propuesta para el ácido glicosídico peracetilado mayoritario de F6.

### 7.3.4.3 Purificación del ácido glicosídico minoritario de la fracción 6.

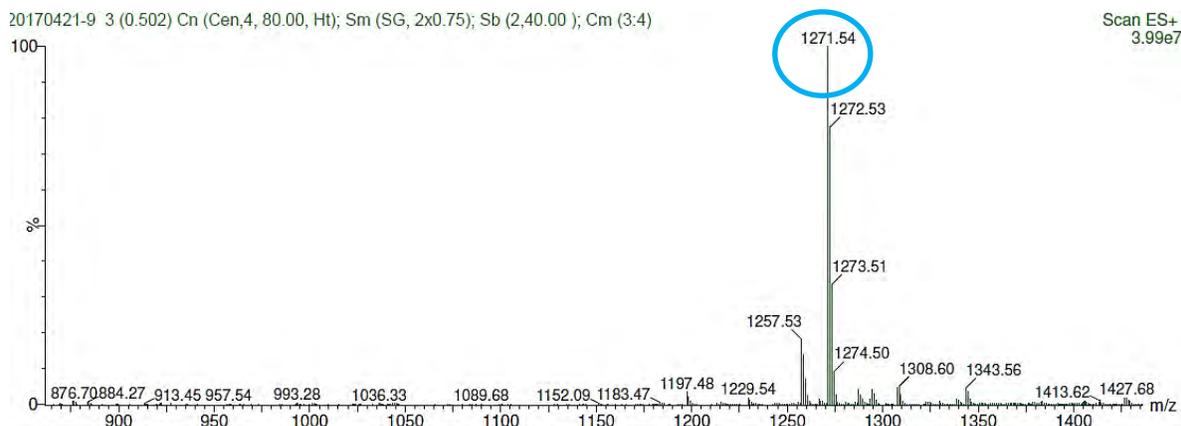
La fracción 6 residual (20 mg) de la purificación del ácido glicosídico mayoritario, se sometió a la técnica de “reciclaje” y “rasurado de pico” (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002), con la finalidad de obtener el componente minoritario presente en la fracción. Las condiciones cromatográficas fueron: columna Waters symmetry® C18 (19 × 300 mm, 7μ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN; flujo: 8.0 mL/min; detector: IR; volumen de inyección de la muestra: 500 μL (20 mg/500 μL).



**Figura 36.** Purificación del ácido glicosídico peracetilado minoritario de F6.

La técnica de “rasurado de pico” permitió la eliminación de impurezas. El reciclaje del pico durante 6 ciclos permitió la purificación total del ácido glicosídico minoritario presente en la fracción 6 (**Figura 36**). Así se obtuvieron 9 mg de un sólido blanco con p.f. de 92-94 °C y rotación óptica:  $[\alpha]_D$  de -28.3 (c 0.12, MeOH).

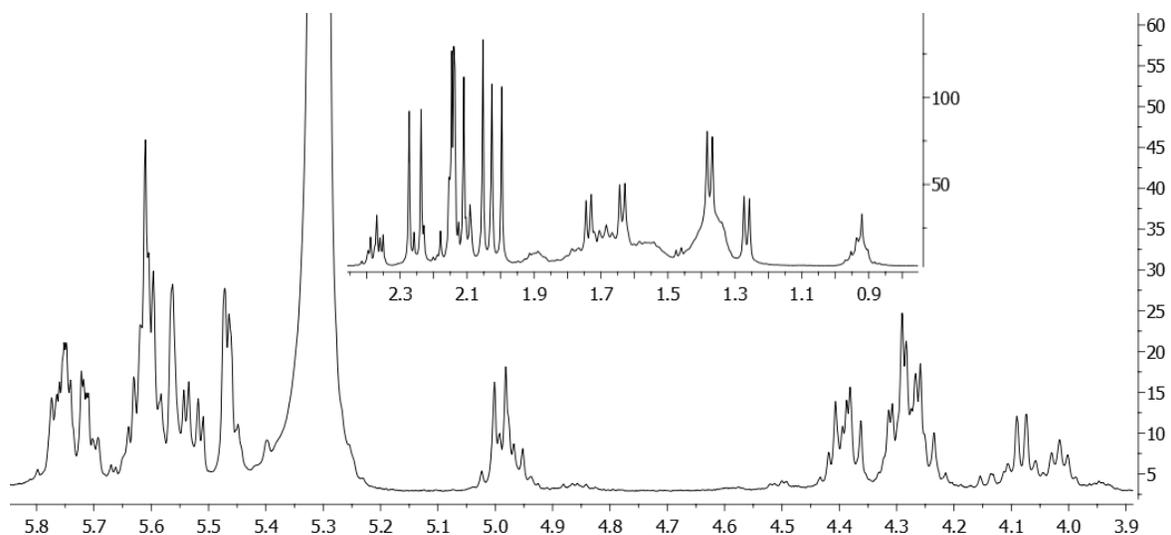
El compuesto purificado se analizó por EM-ESI en modo positivo (**Figura 37**), registrándose la especie  $[M+Na]^+$  con  $m/z$  1271, indicando que se trata de un compuesto de peso molecular 1248 uma con una diferencia de 14 unidades de masa por encima del ácido operculínico C, previamente descrito para la raíz de *Operculina macrocarpa* (Ono *et al.*, 1989) e *I. batatas* (Rosas-Ramírez *et al.*, 2011). Esta diferencia reveló que se podría tratar de un ácido glicosídico novedoso que tiene la misma porción oligosacárida que presenta el ácido operculínico C.



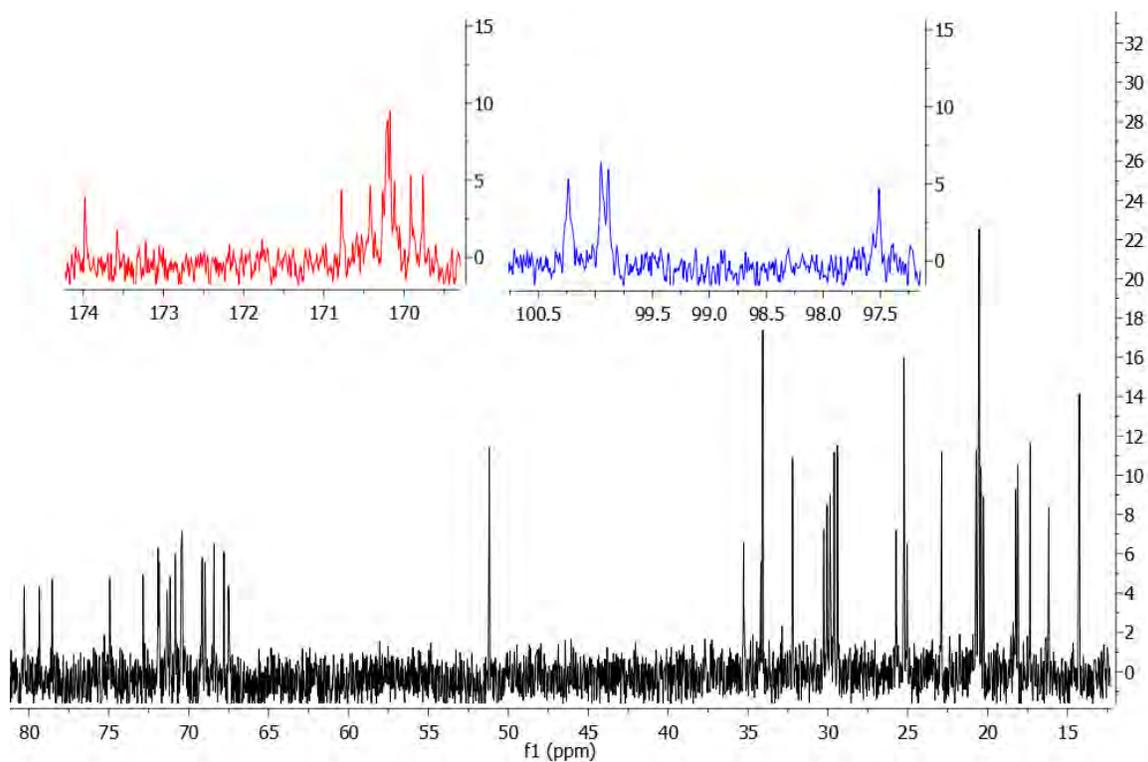
**Figura 37.** Espectro de masas (EM-ESI, modo positivo) del componente minoritario de la fracción 6.

Para comprobar lo anterior, se realizó la misma secuencia de análisis espectroscópico aplicada para el constituyente mayoritario de la F6; en primer lugar, el compuesto purificado se analizó mediante la técnica de RMN. El análisis de los espectros  $^1\text{H}$ -RMN (**Figura 38**) y  $^{13}\text{C}$ -RMN (**Figura 39**), así como los experimentos bidimensionales (ver anexos) permitió establecer los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento para los constituyentes del núcleo oligosacárido, tal como se describió en la sección 6.3.4.1.

En el **Cuadro 11** se muestran los datos espectroscópicos de los protones y los carbonos de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida del ácido glicosídico peracetilado minoritario purificado de la fracción 6.



**Figura 38.** Espectro de  $^1\text{H}$ -RMN del compuesto minoritario purificado de la fracción 6 (400 MHz, piridina- $d_5$ ).



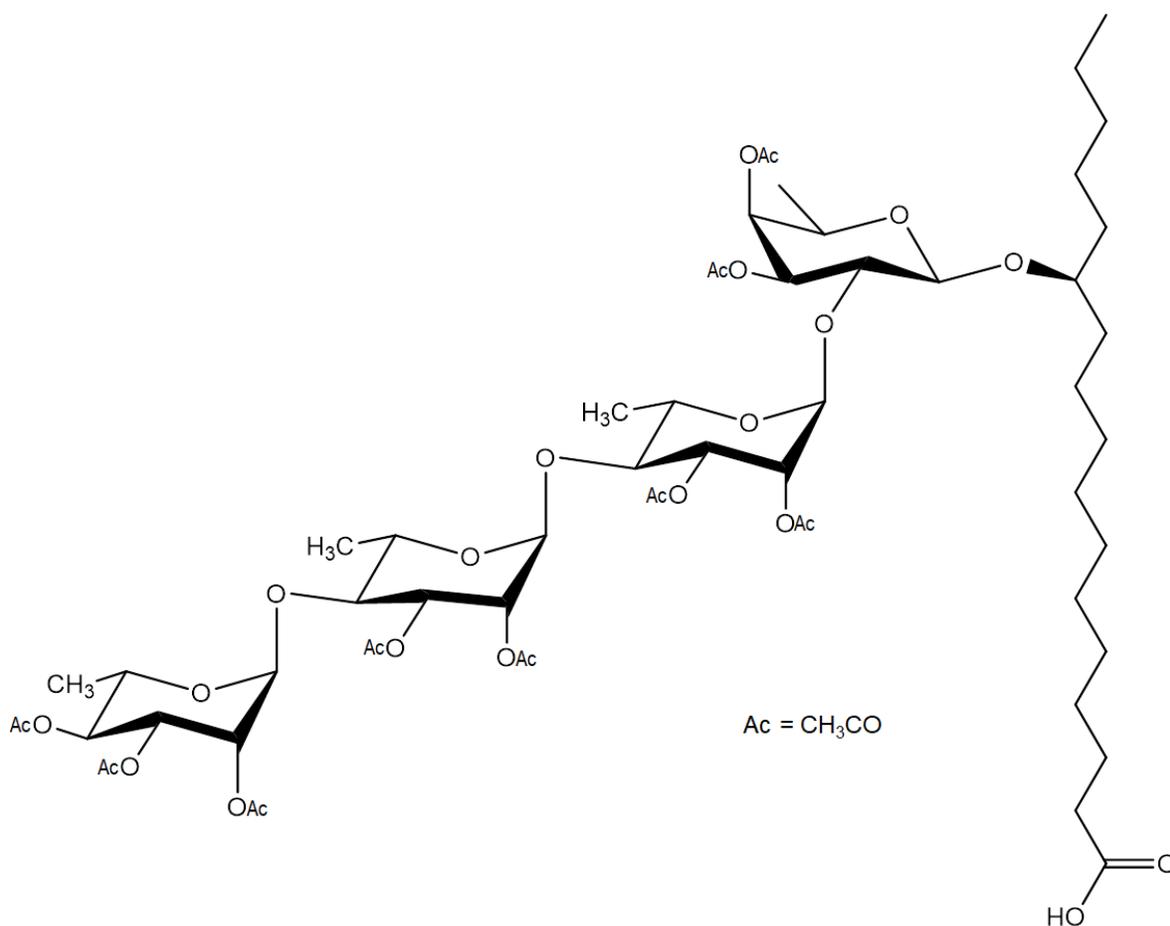
**Figura 39.** Espectro de  $^{13}\text{C}$ -RMN del compuesto minoritario purificado de la fracción 6 (100 MHz, piridina- $d_5$ ).

**Cuadro 11.** Constantes espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) del compuesto minoritario F6.

Posición	F6 minoritario	
	$\delta$ H	$\delta$ C
Fuc-1	5.00 d (8.0)	99.89
2	4.40 dd (7.6, 9.6)	68.67
3	5.54 dd (3.2, 10.0)	71.83
4	5.62*	70.63
5	4.09 q (6.8)	69.95
6	1.28 d (6.4)	16.84
Ram-1	5.48 brs	100.23
2	5.62 *	71.47
3	5.77 *	70.68
4	4.30 *	67.81
5	4.99 dd (6.4, 10.0)	68.04
6	1.75 d (6.1)	18.91
Ram'-1	5.47 brs	99.95
2	5.77 *	70.71
3	5.61 *	71.64
4	4.29 *	68.02
5	4.41 *	68.43
6	1.65 d (6.1)	18.78
Ram''-1	5.58 brs	97.51
2	5.73 dd (1.6, 3.6)	71.13
3	4.29 dd (3.2, 9.6)	79.61
4	4.40 *	73.13
5	4.30 *	68.37
6	1.39 d (6.2)	18.02

Datos registrados a 400 MHz para RMN  $^1\text{H}$  y a 100 MHz para RMN  $^{13}\text{C}$  en piridina- $d_5$ . Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm en relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en paréntesis y están expresadas en Hz. Los desplazamientos químicos marcados con un asterisco (\*) indican señales sobrepuestas. Los patrones de acoplamiento están expresados como: s = señal singulete, brs = señal ancha, d = señal doble, t = señal triple, m = señal múltiple. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, TOCSY) y heteronuclear  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  (HSQC, HMBC). Abreviaciones: fuc= fucosa, ram = ramnosa.

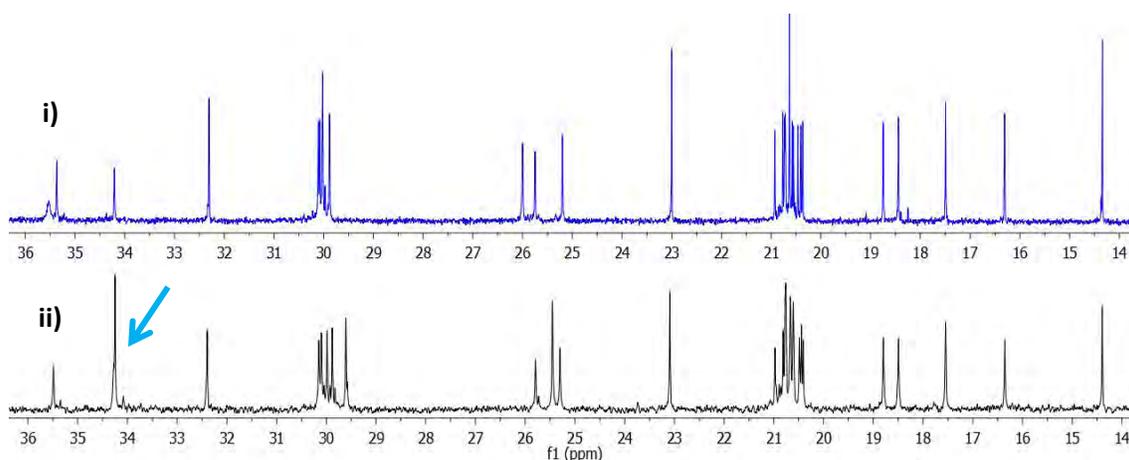
La asignación de los datos espectroscópicos permitió concluir que el compuesto aislado, en efecto, está constituido por la misma porción oligosacárida que la del ácido operculínico C previamente descrito, y la diferencia entre ambas moléculas se encuentra en el ácido graso que forma la macrolactona, que consta de 17 carbonos (**Figura 40**), como se descubrió para los ácidos glicosídicos peracetilados descritos en las secciones anteriores.



**Figura 40.** Estructura propuesta para el ácido glicosídico peracetilado minoritario de F6.

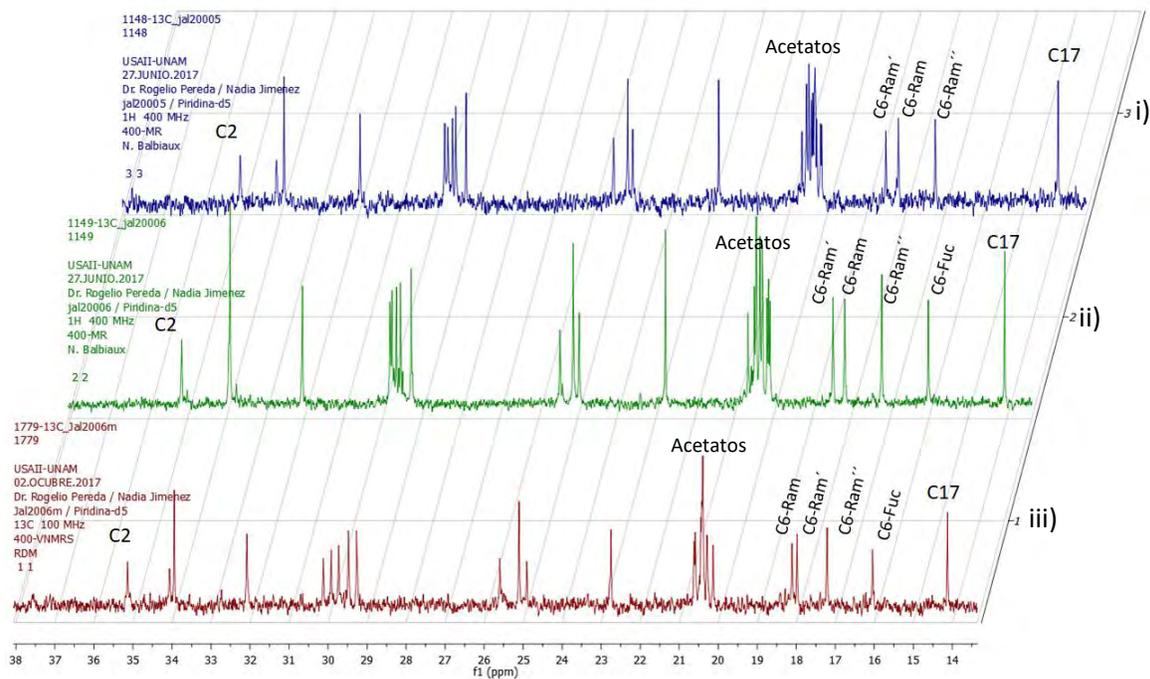
#### 7.3.4.4 Caracterización de la longitud del ácido graso que forma la aglicona.

Se realizó el comparativo de los espectros  $^{13}\text{C}$ -RMN en la región alifática para el compuesto mayoritario de la fracción 6 y el ácido operculínico A peracetilado, este último cuya aglicona está formada por el ácido jalapinólico (11S-hidroxihexadecanoico), previamente caracterizado en nuestro grupo de trabajo (Pereda-Miranda *et al.*, 2010) (**Figura 41**) (véase **Cuadro 9**). El compuesto purificado de la fracción 6 muestra una señal adicional en el espectro  $^{13}\text{C}$ -RMN en la región alifática, por lo que el ácido graso que constituye la aglicona consta de 17 carbonos; esta información se complementa con los resultados obtenidos por EM.



**Figura 41.** Comparativo de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la región alifática; i) ácido operculínico A, ii) compuesto mayoritario purificado de la fracción 6.

Además mediante el análisis comparativo de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la región alifática correspondiente a los tres ácidos glicosídicos peracetilados aislados de la fracción 5 y 6 (**Figura 42**), se pudo identificar que los tres ácidos glicosídicos purificados están constituidos por el mismo ácido graso que forma la aglicona, ya que las señales espectroscópicas obtenidas son las mismas en cantidad y en desplazamiento químico, además de que se logró observar que la diferencia está en el tipo de azúcares que constituye cada núcleo oligosacárido de los compuestos purificados.



**Figura 42.** Comparativo de los espectros de  $^{13}\text{C}$ -RMN en la región alifática; i) compuesto purificado de la fracción 5, ii) compuesto mayoritario purificado de la fracción 6, iii) compuesto minoritario purificado de la fracción 6.

Finalmente se observó que los tres ácidos glicosídicos peracetilados, purificados de las fracciones 5 y 6, están constituidos por el ácido 12-hidroxiheptadecanoico como aglicona.

## 8. CONCLUSIONES.

1. Se optimizó un procedimiento analítico en HPLC empleando una columna de fase inversa C18, para la separación y la purificación a nivel preparativo de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas glicosídicas solubles en diclorometano-etanol (1:1) de las raíces comerciales de jalapa brasileña.
2. Se realizó la purificación y la elucidación estructural de cinco ácidos glicosídicos mayoritarios presentes en el extracto orgánico total de las raíces comerciales de la jalapa brasileña.
3. Se identificaron tres ácidos glicosídicos conocidos: los ácidos operculínicos A y B (pentasacáridos del ácido 11-hidroxihexadecanoico) y el ácido turpético C (pentasacárido del ácido 12-hidroxihexadecanoico), que constituyen los núcleos oligosacáridos mayoritarios de las resinas de las jalapas brasileñas y de la India, respectivamente.
4. Se elucidó la estructura química de dos ácidos glicosídicos novedosos mediante el empleo de las técnicas de RMN y EM. El análisis estructural permitió identificar la misma secuencia de carbohidratos descrita para los ácidos operculínicos A y C, sin embargo, su aglicona se identificó como el ácido 12-hidroxihexadecanoico.
- 5.- Los compuestos purificados constituyen una evidencia adicional para la existencia de ácidos grasos hidroxilados con cadenas hidrocarbonadas impares entre los miembros de la familia de las convolvuláceas.

## 9. BIBLIOGRAFÍA.

- Austin, D. F., Huáman, Z. (1996). A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas. *Taxon*. 45, 3-38.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bidlingmeyer, B. A. (1992). Practical HPLC methodology and applications. John Wiley, Nueva York, 220-224.
- Buenz, E. J., Verpoorte, R., Bauer, B. A. (2018). The Ethnopharmacologic Contribution to Bioprospecting Natural Products. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 58, 19.1–19.22.
- Cao, S., Guzza, R. C., Wisse, J. H., Miller, J. S., Evans, R., Kingston, D. G. I. (2005). Ipomoeassins A-E, cytotoxic macrocyclic glicoresins from the leaves of *Ipomoea squamosa* from the Suriname rainforest. *J Nat Prod.* 68, 487-492.

- Carvalho-Michelin, D., Gandolfo-Finati, S.C., Silva-Sacramento, L.V., Vilegas, W., Nunes-Salgad, H. R. (2010). Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. *Braz. J. Pharmacogn.*, 20, 18-22.
- Castañeda-Gómez, J., Pereda-Miranda, R. (2011). Resin glycosides from the herbal drug jalap (*Ipomoea purga*). *J. Nat. Prod.* 74 (5): 1148-53.
- Castañeda-Gómez, J. F. (2012). Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, México. P. 55-64
- Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Cruz-Morales, S., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2017) HPLC-MS profiling of the multidrug-resistance modifying resin glycoside content of *Ipomoea alba* seeds. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 27, 434-439.
- Chérigo, L., Pereda-Miranda, R. (2006) Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J. Nat. Prod.* 69: 595.
- 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.
- Chérigo, L., Pereda-Miranda, R., Gibbons, S. (2009) Bacterial resistance modifying tetrasaccharide agents from *Ipomoea murucoides*. *Phytochemistry.* 70 (2):222-227
- Daló, N., Moussatché, H. (1978). Acción tóxica de las plantas del género *Ipomoea*. *Rev. Universidad Centro Occidental.* 6: 25-39.
- Davidow, J. (1999). *Infusions of Healing. A Treasury of Mexican-American Herbal Remedies*; Fireside: New York, p. 134.
- Ding, W., Jiang, Z.H., Wu, P., Xu, L. and Wei, X. (2012). Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry.* 81, 165-174.
- Eich, E. (2008), *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)*, p. 532

- Escalante-Sánchez, E. (2007), Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de tres remedios herbolarios purgantes del género *Ipomoea* (CONVOLVULACEAE). Tesis doctoral. Posgrado en ciencias químicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Escalante-Sánchez, E., Rosas-Ramírez, D., Linares, E., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (2008) Batatinosides II–VI, Acylated Lipooligosaccharides from the Resin Glycosides of Sweet Potato. *J. Agric. Food Chem.* 56: 9423.
- Escobedo-Martínez, C., Cruz-Morales, S., Fragoso-Serrano, M., Mukhlesur Rahman, M., Gibbons, S., Pereda-Miranda, R. (2010). Characterization of xylose Containing oligosaccharide, an inhibitor multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* from *Ipomoea pes-caprae*. *Phytochemistry* 71: 1796
- Escobedo-Martínez, C., Pereda-Miranda, R. (2007). Resin Glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *J. Nat. Prod.*, 70 (6): 974-978.
- 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
- Hernández-Carlos, B., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (1999). Orizabins V-VIII, Tetrassaccharides Glycolipids from the Mexican Scammony Root (*Ipomoea orizabensis*). *J. Nat. Prod.*, 62, 1096-1100.
- 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.
- Kitagawa I, Ohashi K, In N, Sakagami M, Yoshikawa M, Shibuya H (1997) Indonesian Medicinal 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.

- Linares, A., Rico-Gray, V., Carrión, G. (1994). Traditional Production System of the Root of Jalap, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, Mexico. *Econ. Bot.*, 48, 84-89.
- 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.
- Meira, M., Pereira da Silva, E., David, J.M., David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 22(3): 682-713.
- Monardes, N. (1990). *Herbolaria de Indias. Historia Natural del Nuevo Mundo*. Instituto Mexicano del Seguro Social: México. p. 96-118.
- Natureza Bela  
<http://naturezabela.com.br/2014/02/bata-de-purga-operculina-alata.html?m=1>  
13 de Octubre de 2017.
- Nikolov, Z., Meagher, M. y Reilly, P. (1985). High-performance liquid chromatography of disaccharides on amine-bonded silica column. 319, 51-57.
- Noda, N., Takahashi, T., Kawasaki, T., Miyahara, K., Yang C.R. (1994). Stoloniferins I-VII, Resin glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* 36, 365-371.
- Noda, N., Takahashi, N., Miyahara, K., Yang, C.R. (1998) Stoloniferins VIII–XII, Resin Glycosides from *Ipomoea stolonifera*. *Phytochemistry* 48: 837.
- 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.
- Noda, N., Yoda, S., Kawaski, 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.
- Noda, N., Yoda, S., Kawaski, T., Miyahara, K. (1992). Resin glycosides XV. Simonins I-V, Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapins) from the Roots of *Ipomoea batatas* (cv. Somin). *Chem. Pharm. Bull.*, 40 (12), 3163-3168.

- Ono, M., Fijimoto, K., Kawata, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T., Miyahara, K., (1992). Resin Glycosides XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) From Rhizoma Jalapae Braziliens (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 40 (6), 1400-1403.
- Ono, M.; Fukunaga, T., Kawasaki, T.; Miyahara, K. (1990). Resin Glycosides VIII. Four Nez Glycosidic Acids, Operculinic Acids D, E, F, and G, of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides ("jalapin") from Rhizoma Jalapae Braziliensis (Root of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.* 38 (10), 2650-2655.
- Ono, M., Imao, M. and Miyahara, K., (2010). Two new glycosidic acids, quamoclinic acids G and H, of the resin glycosides (convolvulin) from the seeds of *Quamoclit pennata*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 58(9), pp.1232-1235.
- 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.
- 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.
- 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.
- Ono M, Ueguchi T, Kawasaki T, Miyahara K (1992) Resin Glycosides XVII. Marubajalapins VIII–XI, Jalapins from the Aerial Part of *Pharbitis purpurea*. *Yakugaku Zasshi* 112: 866.
- Ono M, Ueguchi T, Murata H, Kawasaki T, Miyahara K (1992) Resin Glycosides XVI. Marubajalapins I–VII, New Ether-Soluble Resin Glycosides from *Pharbitis purpurea*. *Chem. Pharm. Bull.* 40: 3169.

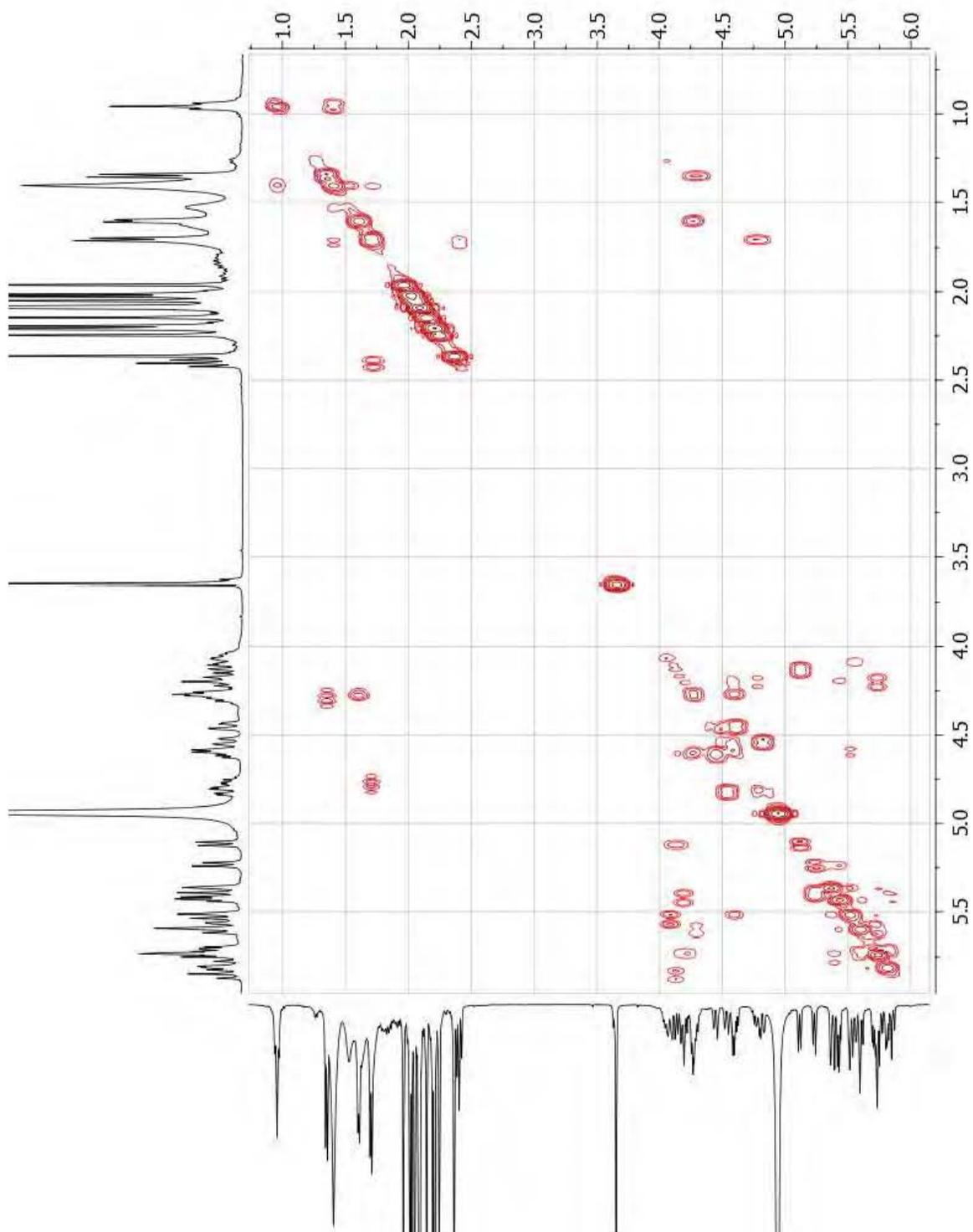
- Pereda-Miranda, R., Bah, M. (2003) Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr Top Med Chem.* 3: 111.
- Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Escalante-Sánchez, E., Hernández-Carlos, B., Linares, E., Bye, R. (2006). Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *J. Nat. Prod.* 69, 1460-1466.
- Pereda-Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niroyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron.* 58, 3145-3154.
- Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J. (2010). Progress in the Chemistry of Organic Natural Products; Kinghorn, AD, Falk H, Kobayashi J. Eds.; Springer-Verlag: New York; Vol. 92, Chapter 2, 77-152.
- Refflora, Flora do Brasil 2020. [http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=5&genero=Operculina&especie=hamiltonii&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=SUBESP\\_VAR&opcoesBusca=TODOS\\_OS\\_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica](http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/listaBrasil/ConsultaPublicaUC/BemVindoConsultaPublicaConsultar.do?invalidatePageControlCounter=1&idsFilhosAlgas=%5B2%5D&idsFilhosFungos=%5B1%2C11%2C10%5D&lingua=&grupo=5&genero=Operculina&especie=hamiltonii&autor=&nomeVernaculo=&nomeCompleto=&formaVida=null&substrato=null&ocorreBrasil=QUALQUER&ocorrencia=OCORRE&endemismo=TODOS&origem=TODOS&regiao=QUALQUER&estado=QUALQUER&ilhaOceanica=32767&domFitogeograficos=QUALQUER&bacia=QUALQUER&vegetacao=TODOS&mostrarAte=SUBESP_VAR&opcoesBusca=TODOS_OS_NOMES&loginUsuario=Visitante&senhaUsuario=&contexto=consulta-publica). 15 de octubre de 2017.
- Rosas-Ramírez, 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.
- Rosas-Ramírez, D., Escalante-Sánchez, E., Pereda-Miranda, R. (2011). Batatins III–VI, glycolipid ester-type dimers from *Ipomoea batatas*. *Phytochemistry* 72 (2011) 773–780.

- Sanz, M. y Martínez-Castro, I. (2007). Recent developments in sample preparation for chromatographic analysis of carbohydrates. *Journal of Chromatography A*. 1153, 74-89.
- Shellard E.J., (1961). The chemistry of some Convolvulaceous resins part 1. Vera Cruz Jalap. *Planta Med.* 9, 102
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. (1979), Introduction to Modern Liquid Chromatography, 2nd edition, JOHN WILEY & SONS, INC. USA, p.1-5
- Taber, W. A., Vinig, L.C., Heacock, R. A. (1963). Clavine and lysergic acid alkaloids in varieties of morning glory. *Phytochemistry* 2: 65-70.
- Vegetall, Guia de plantas medicinais, Manual do Botânico-Fitoterapeuta. <https://www.vegetall.com.br/batata-de-purga/>. 23 de Noviembre de 2017
- Wagner, H., Kazmaier, P. (1977). Struktur der operculinsäure aus dem harz von *Ipomoea operculata*. *Phytochemistry*. 16, 711.
- Wagner, H. (1973). The chemistry of the resin glycosides of the Convolvulaceae family, in: Bendz G, Santesson J (eds.), Medicine and Natural Sciences, Chemistry in Botanical Classification, Academic Press., New York, p. 235-240.
- 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.
- 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.

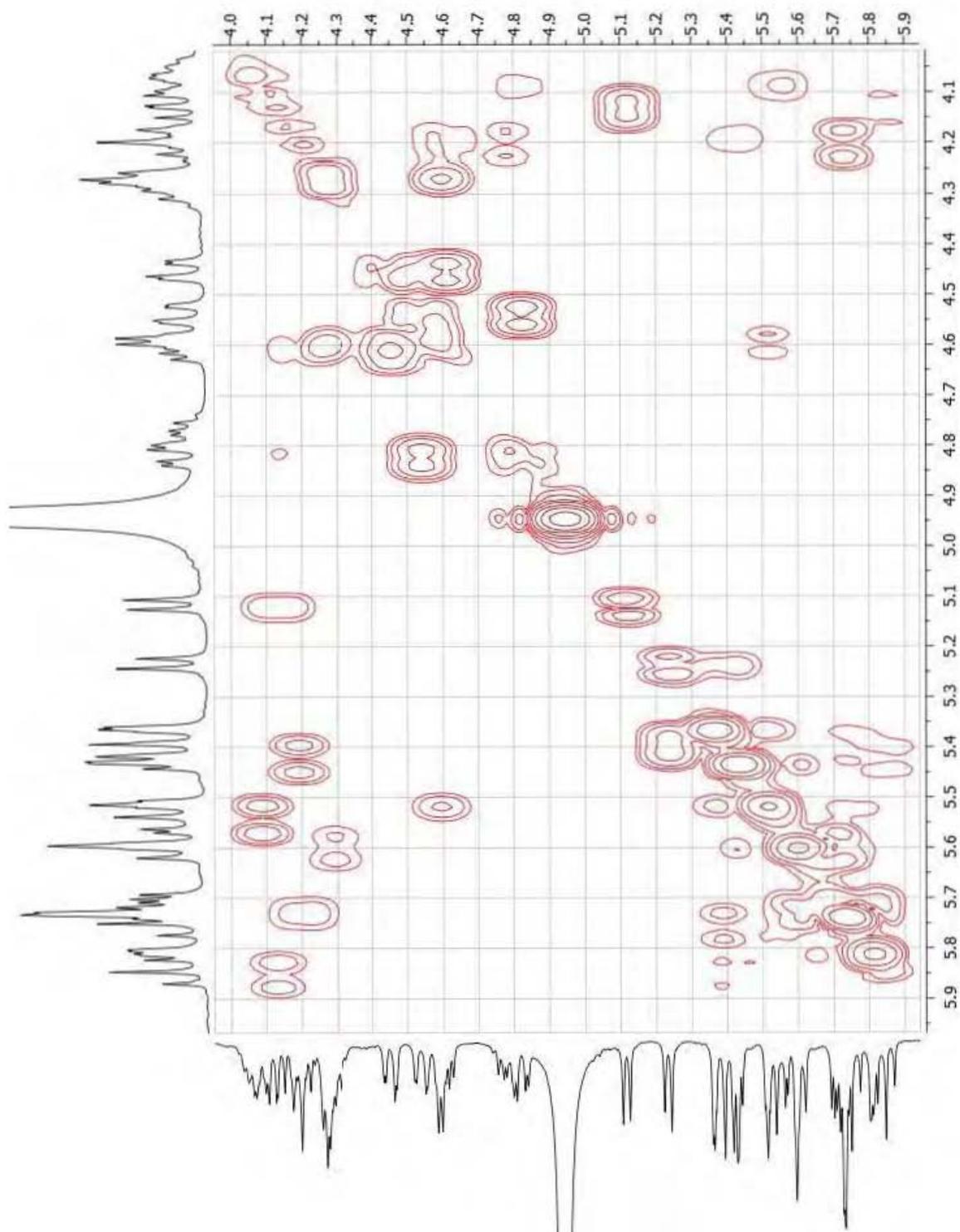
## 10. ANEXOS.

### 10.1 Espectros de RMN en 2D del ácido glicosídico purificado de la fracción 5.

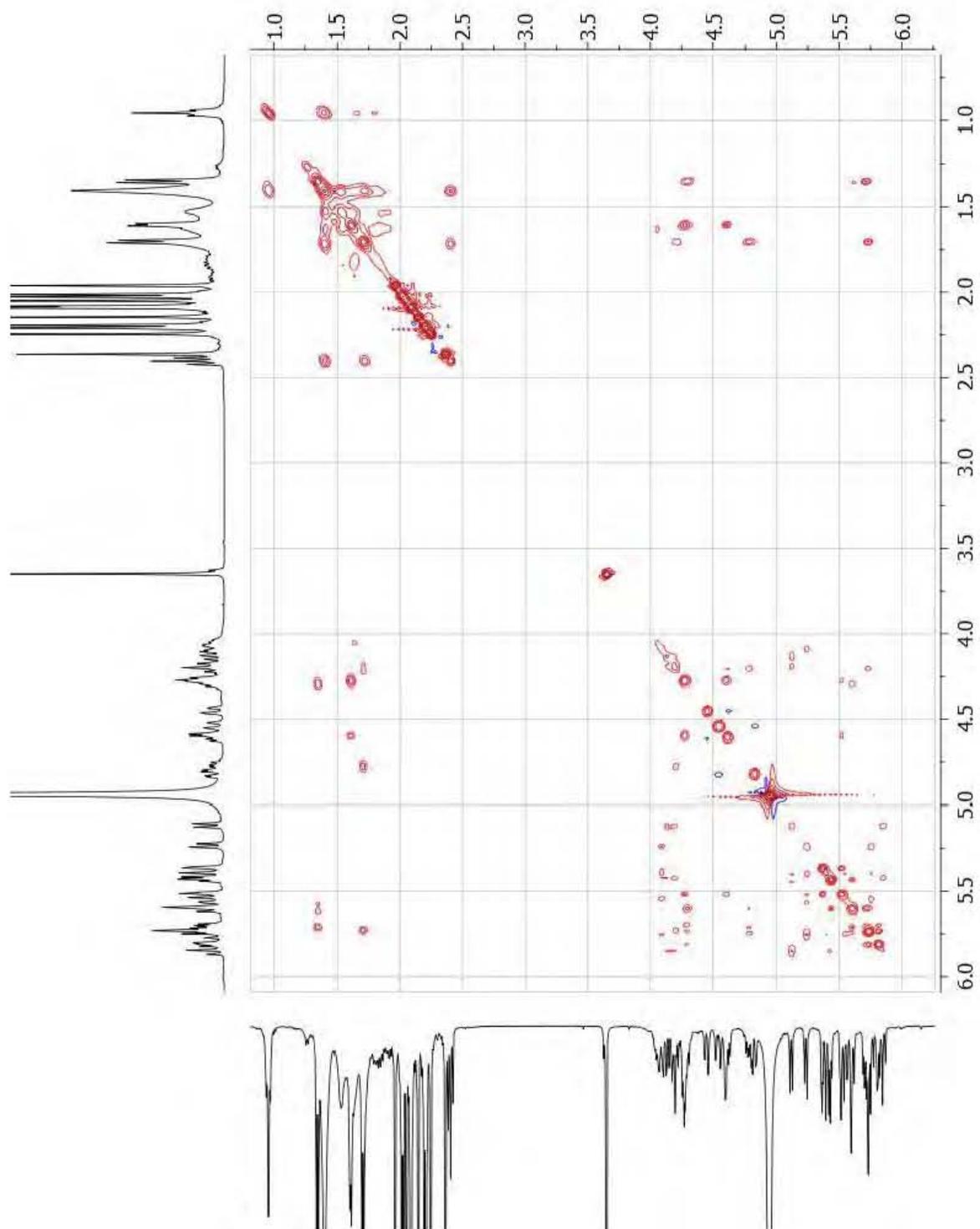
COSY



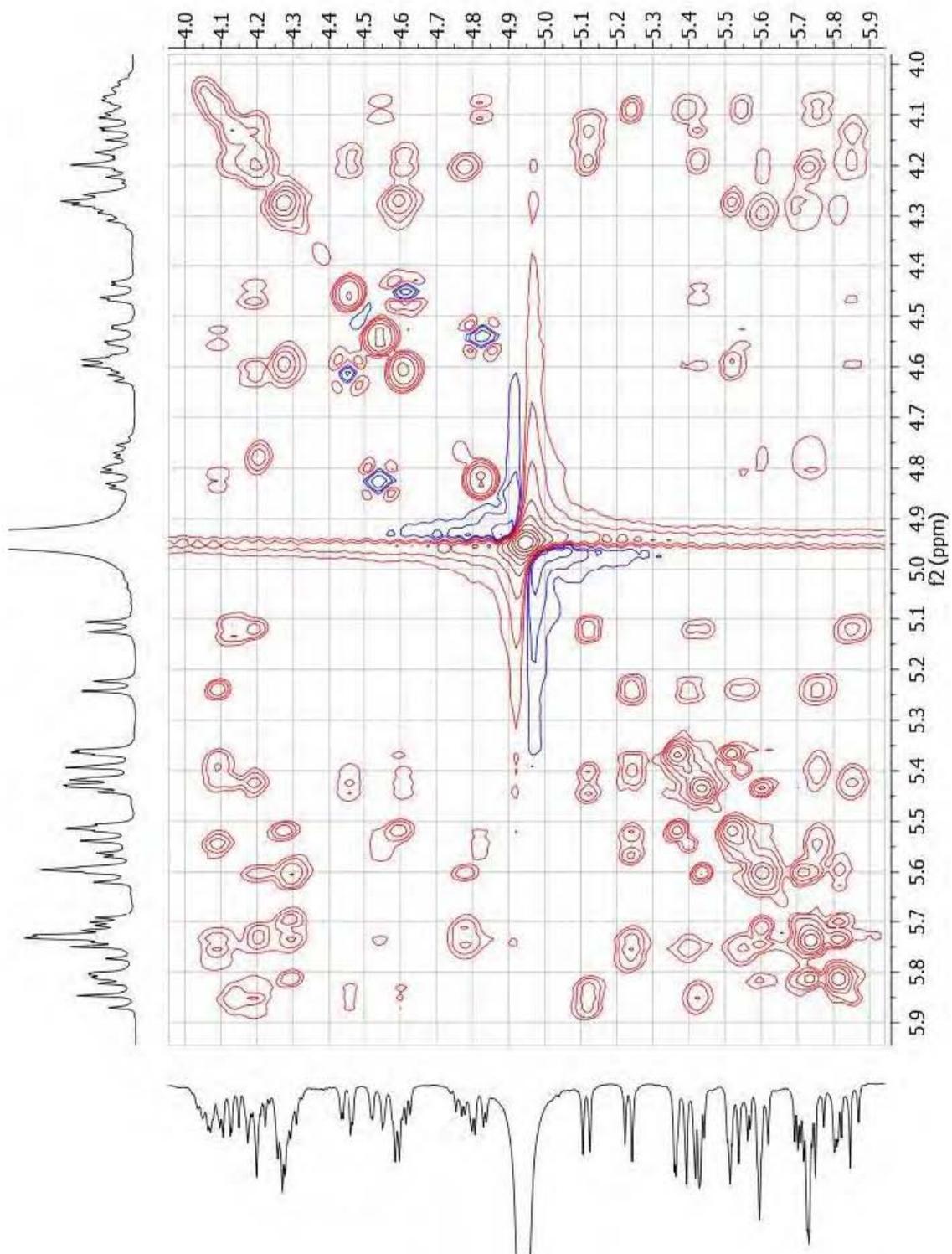
# COSY (ampliación)



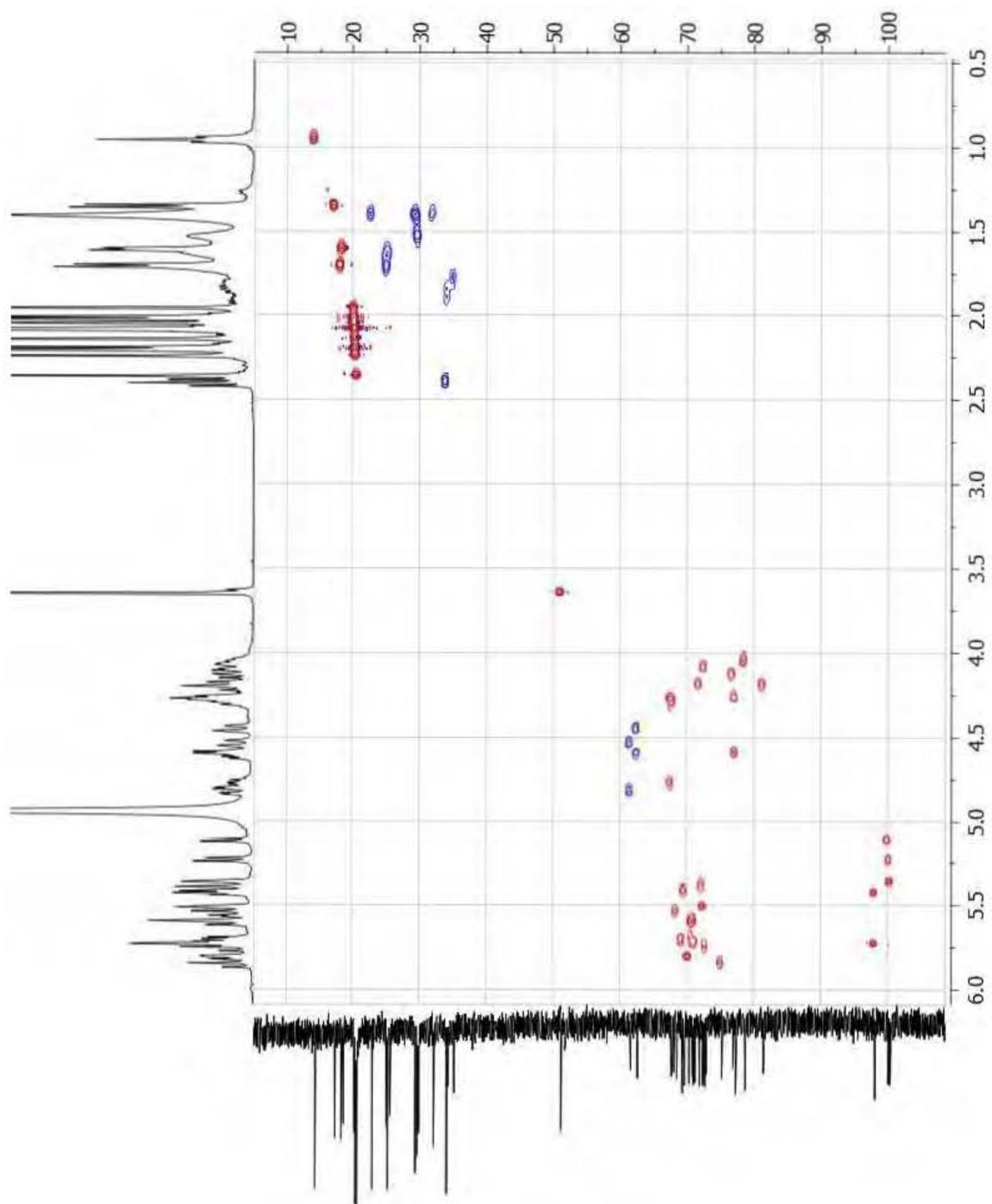
# TOCSY



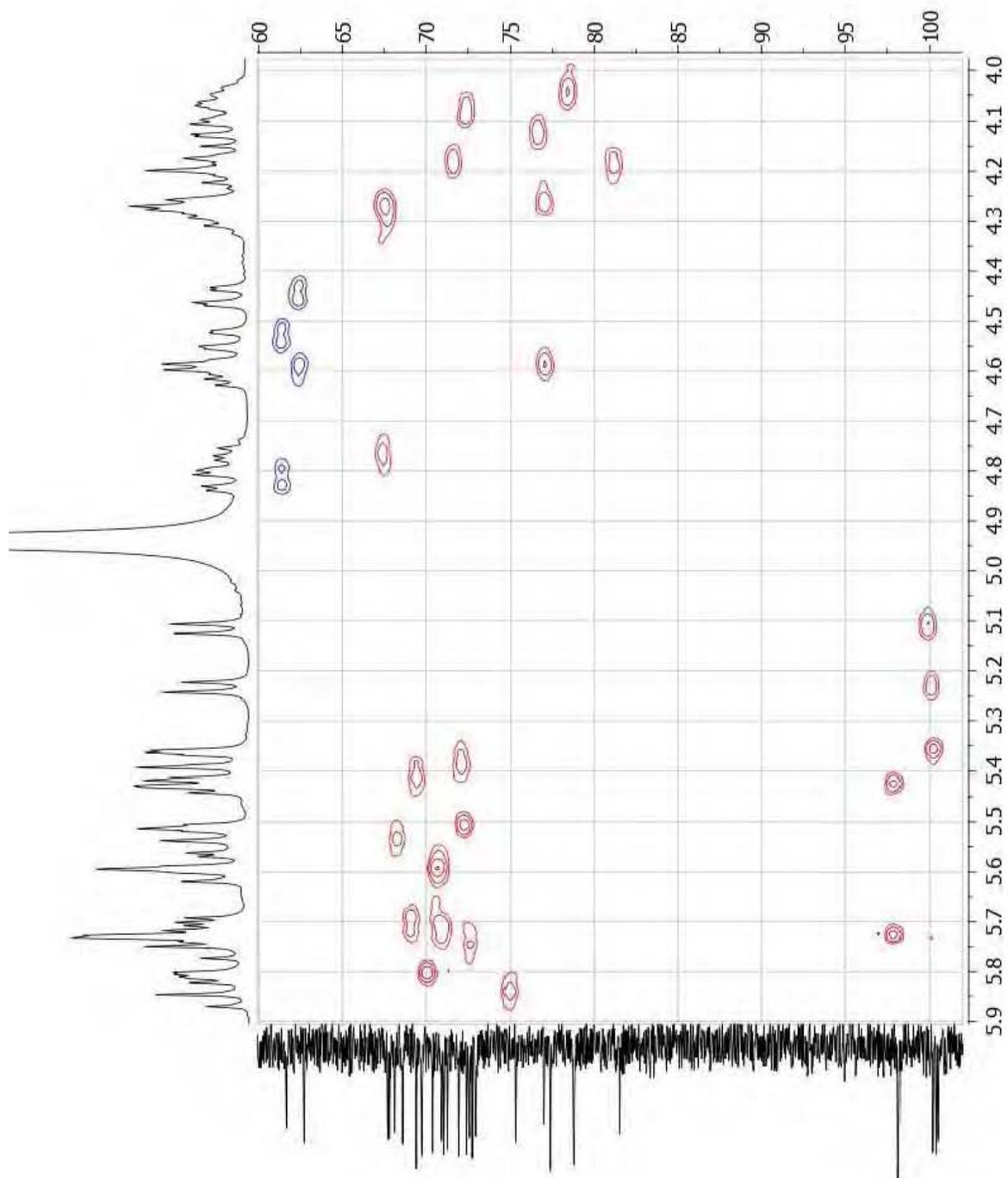
# TOCSY (ampliación)



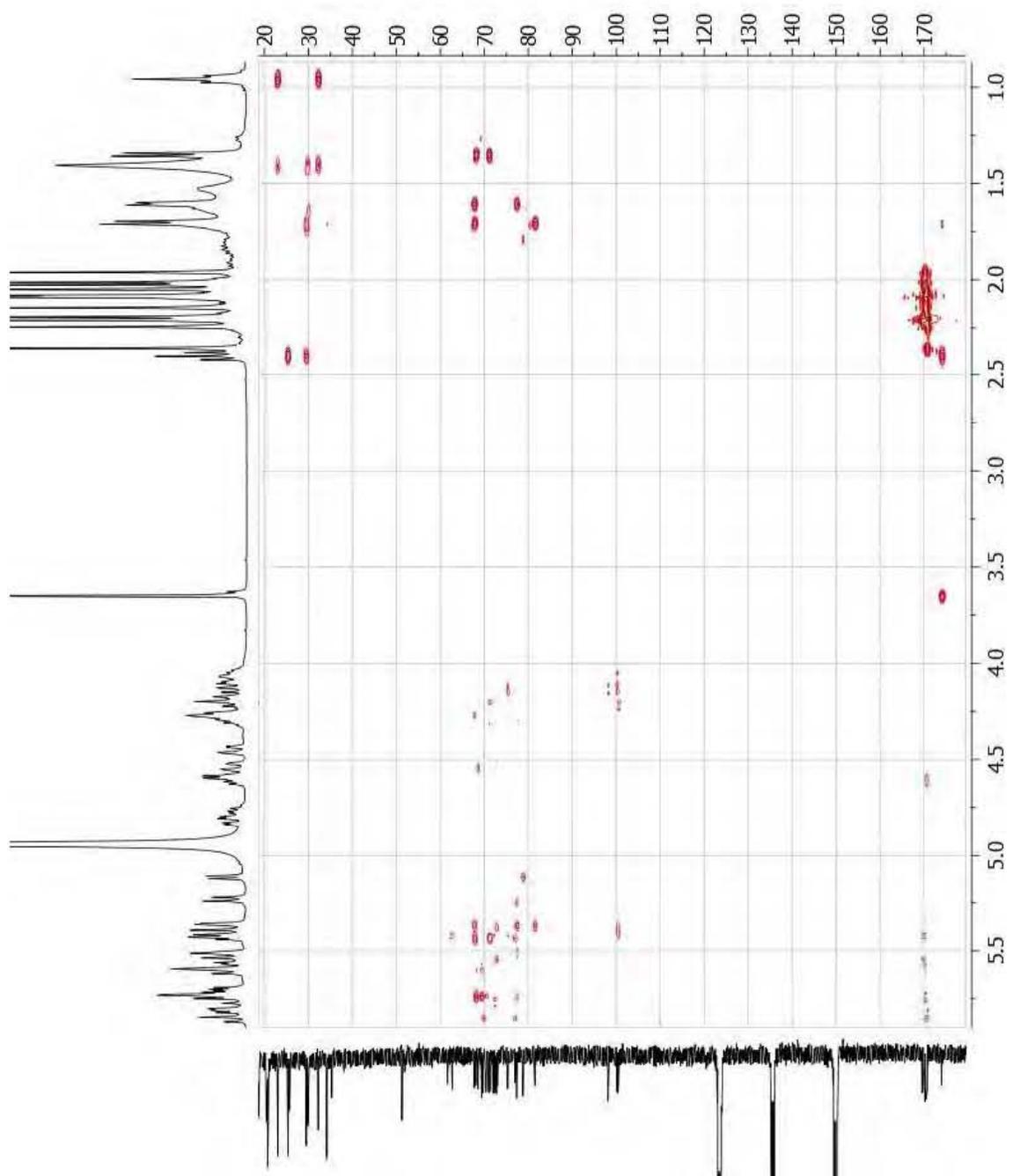
# HSQC



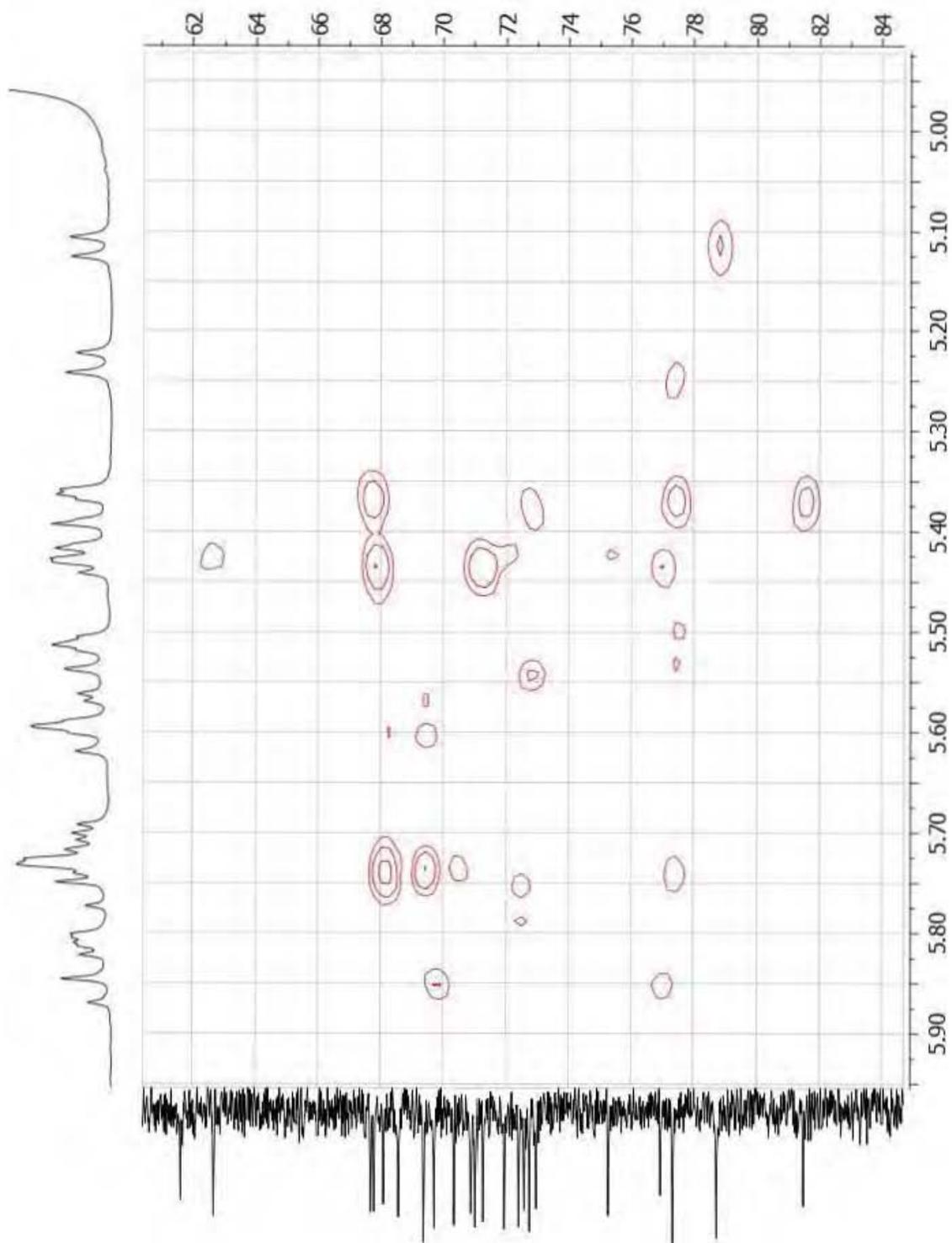
# HSQC (ampliación)



# HMBC

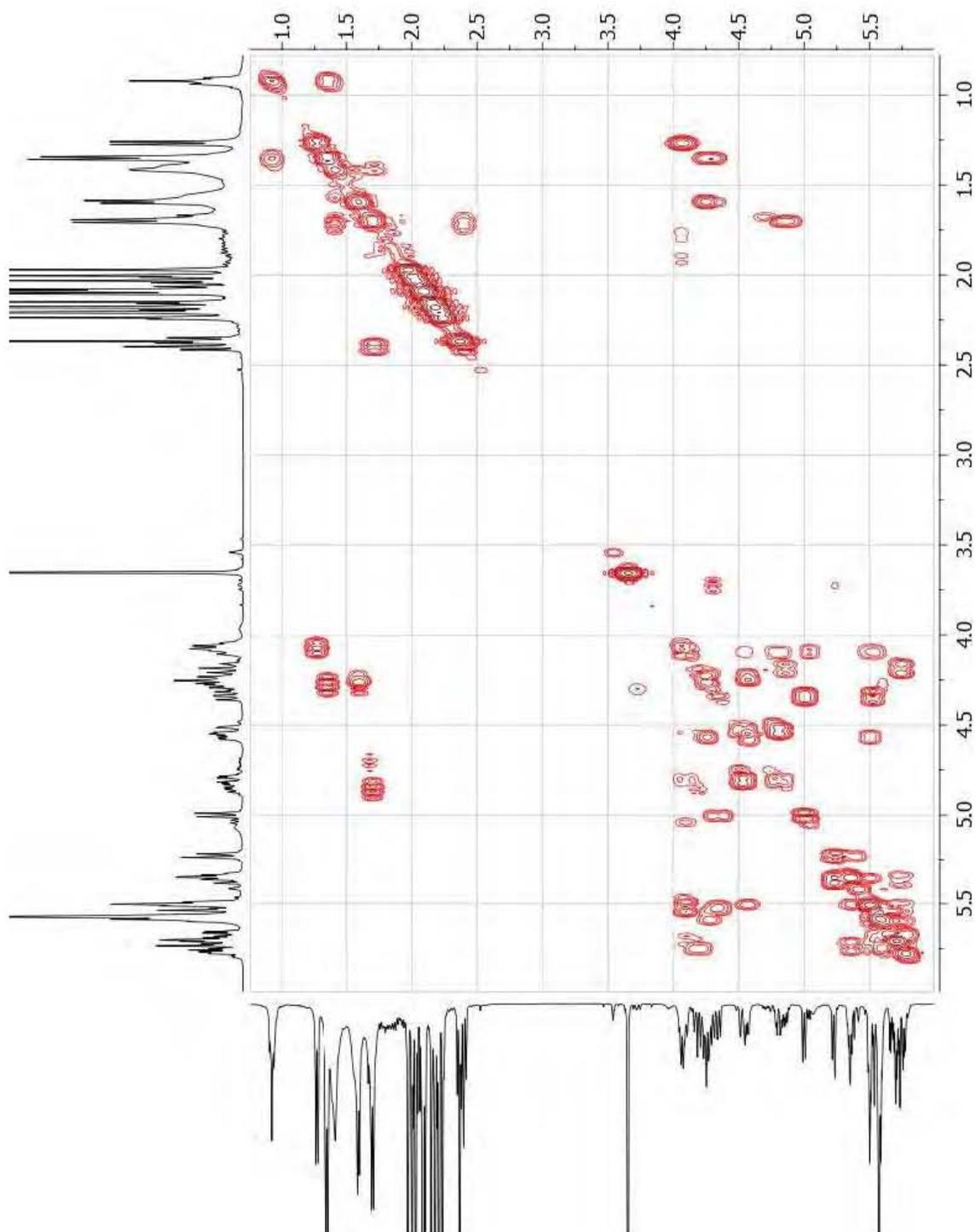


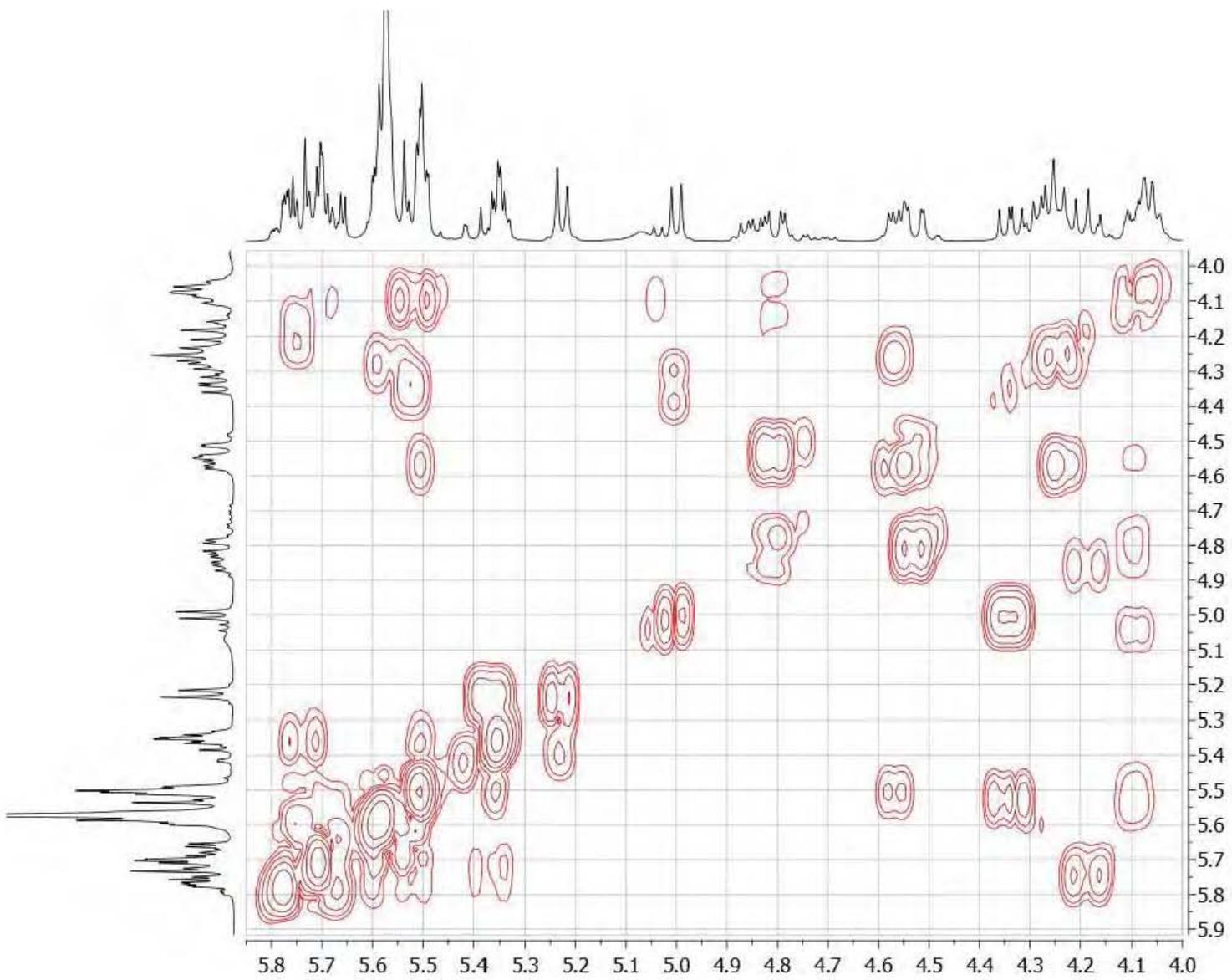
# HMBC (ampliación)



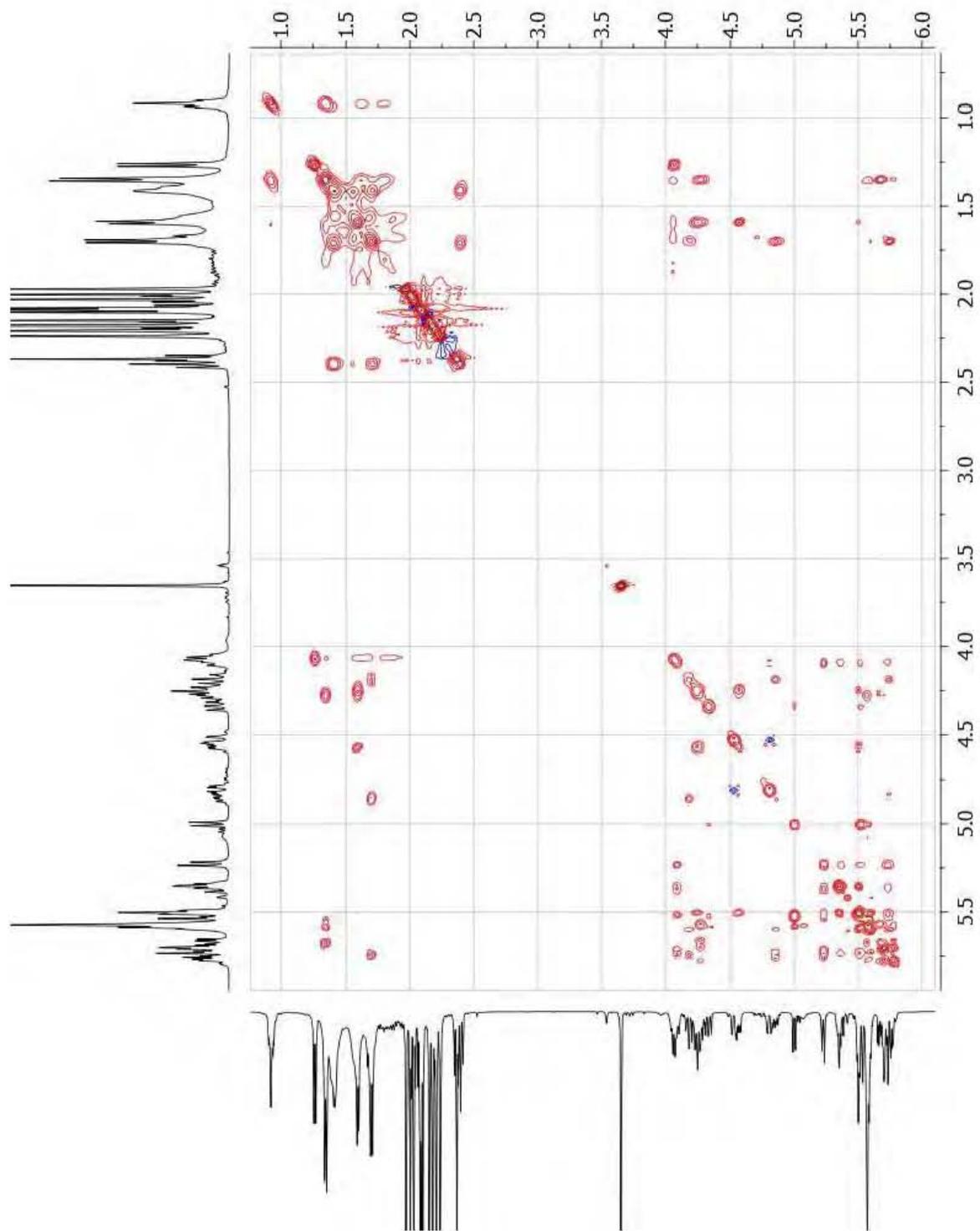
10.2 Espectros de RMN en 2D del ácido glicosídico mayoritario purificado de la fracción 6.

COSY

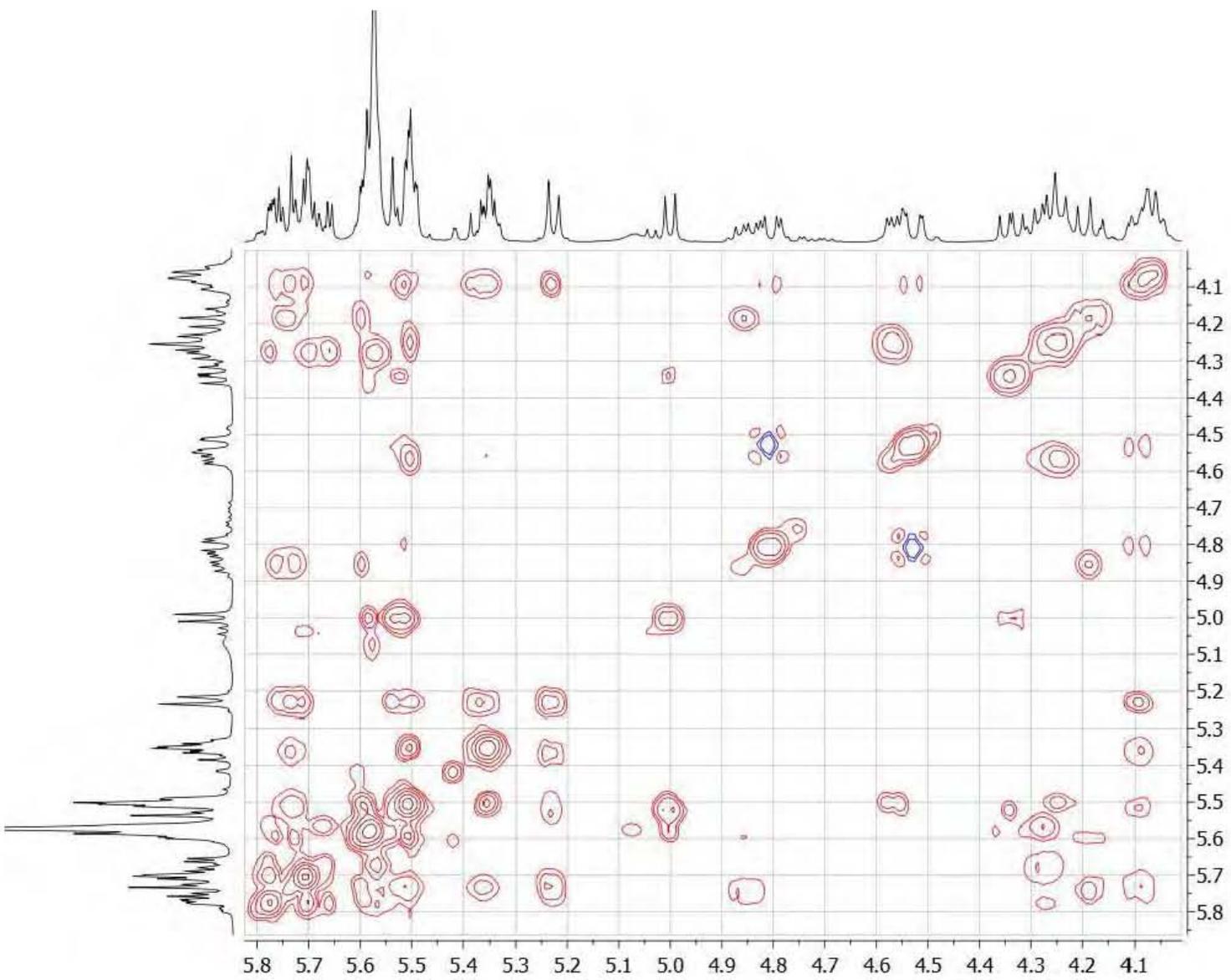




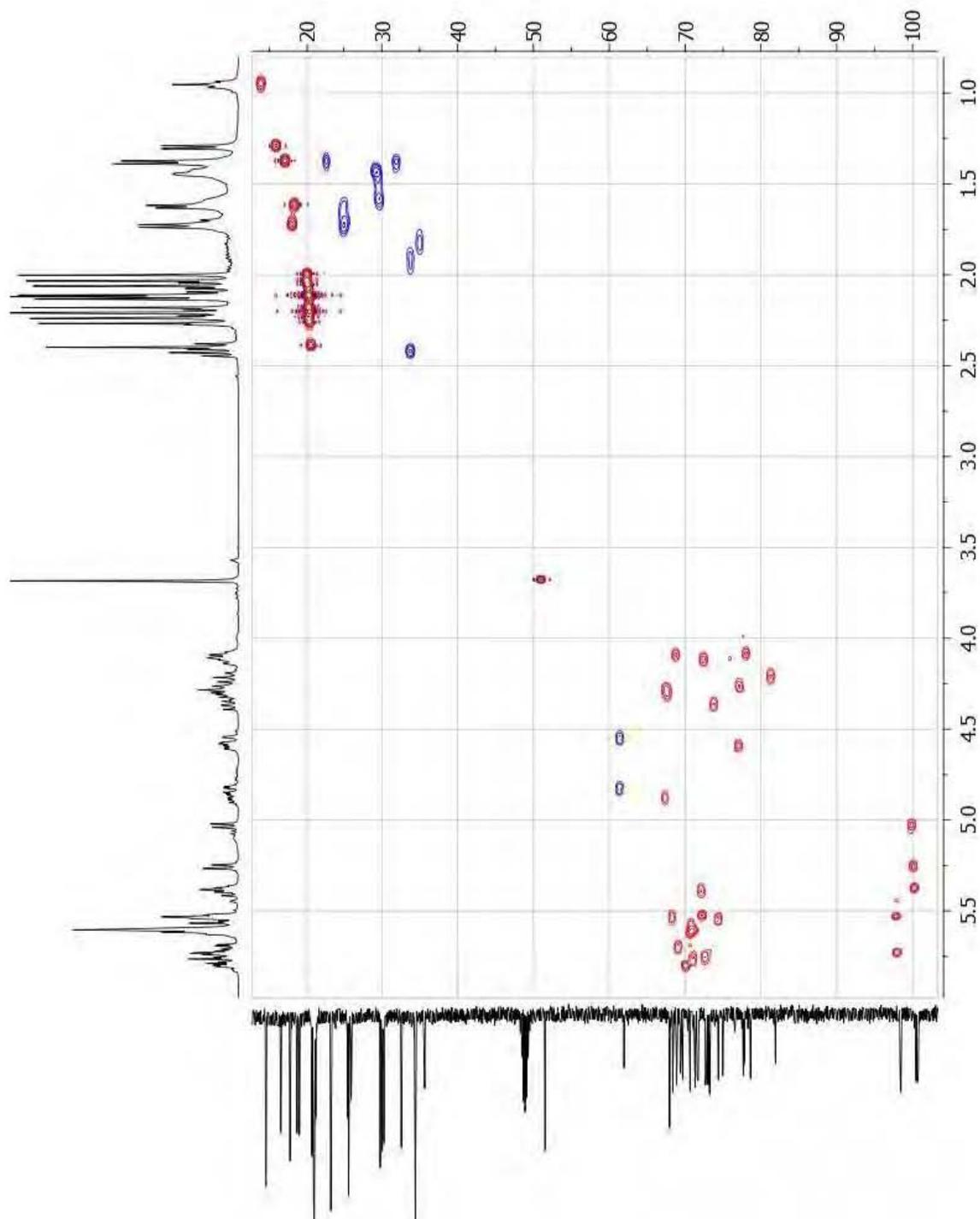
# TOCSY



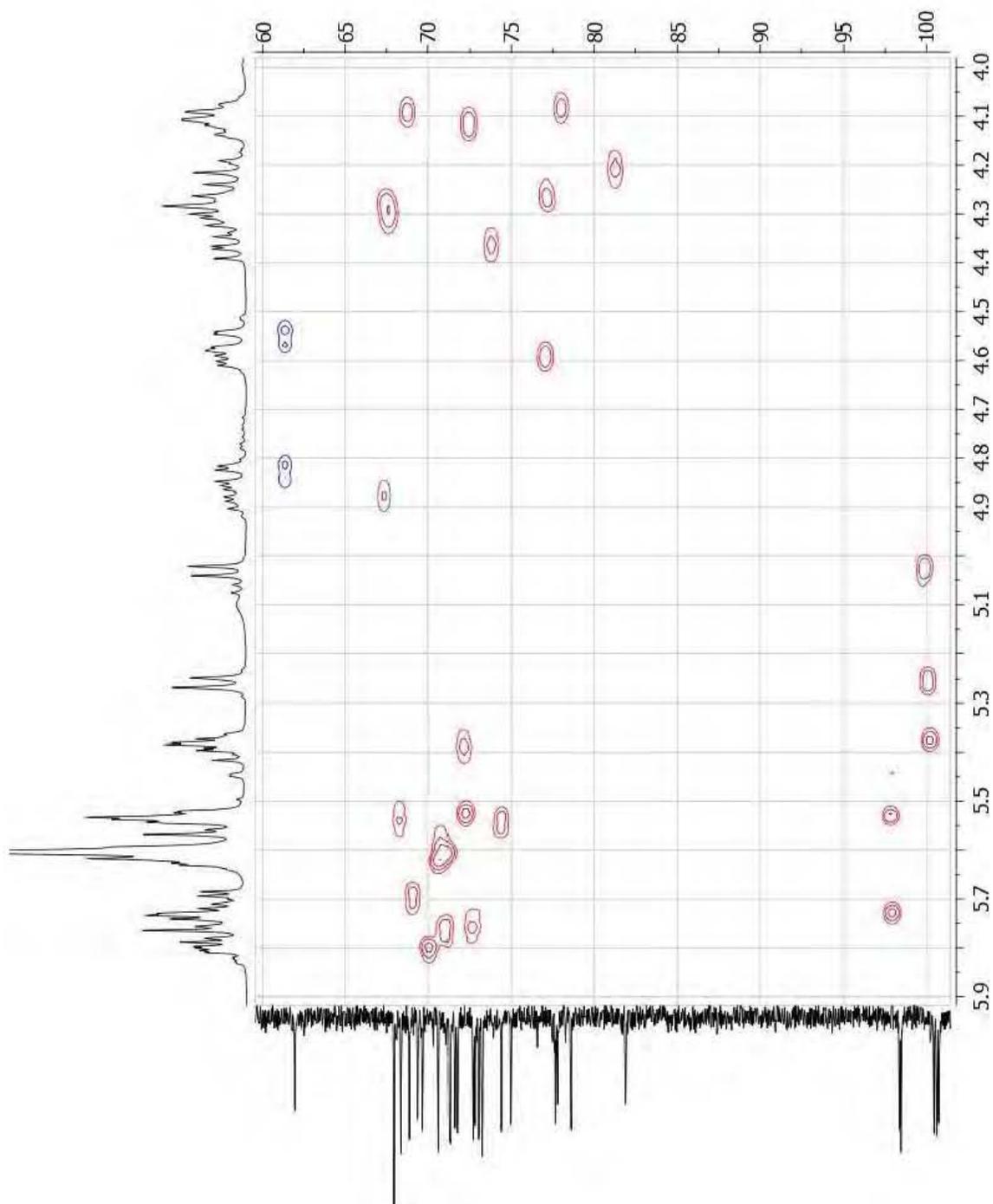
TOCSY (ampliación))



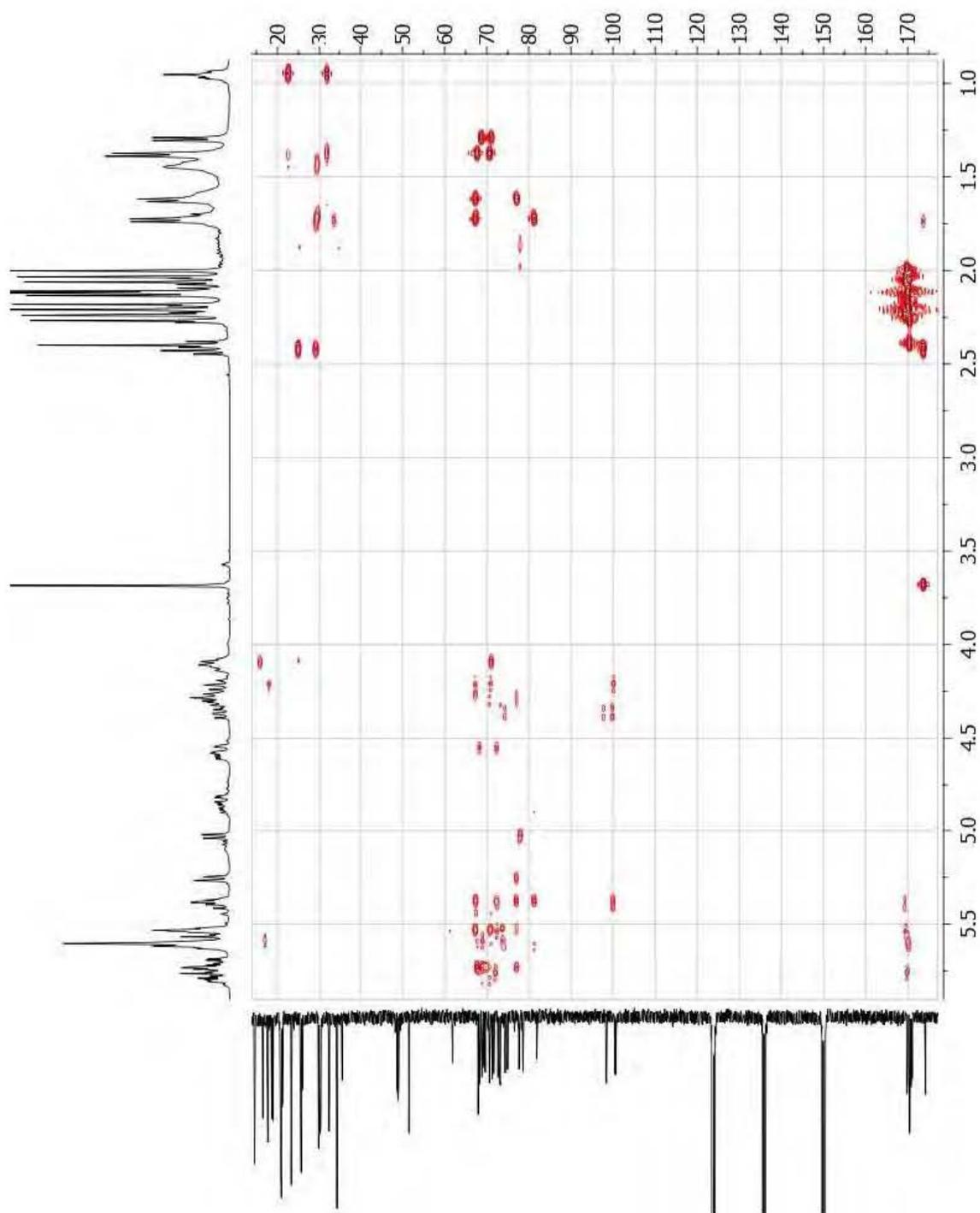
# HSQC



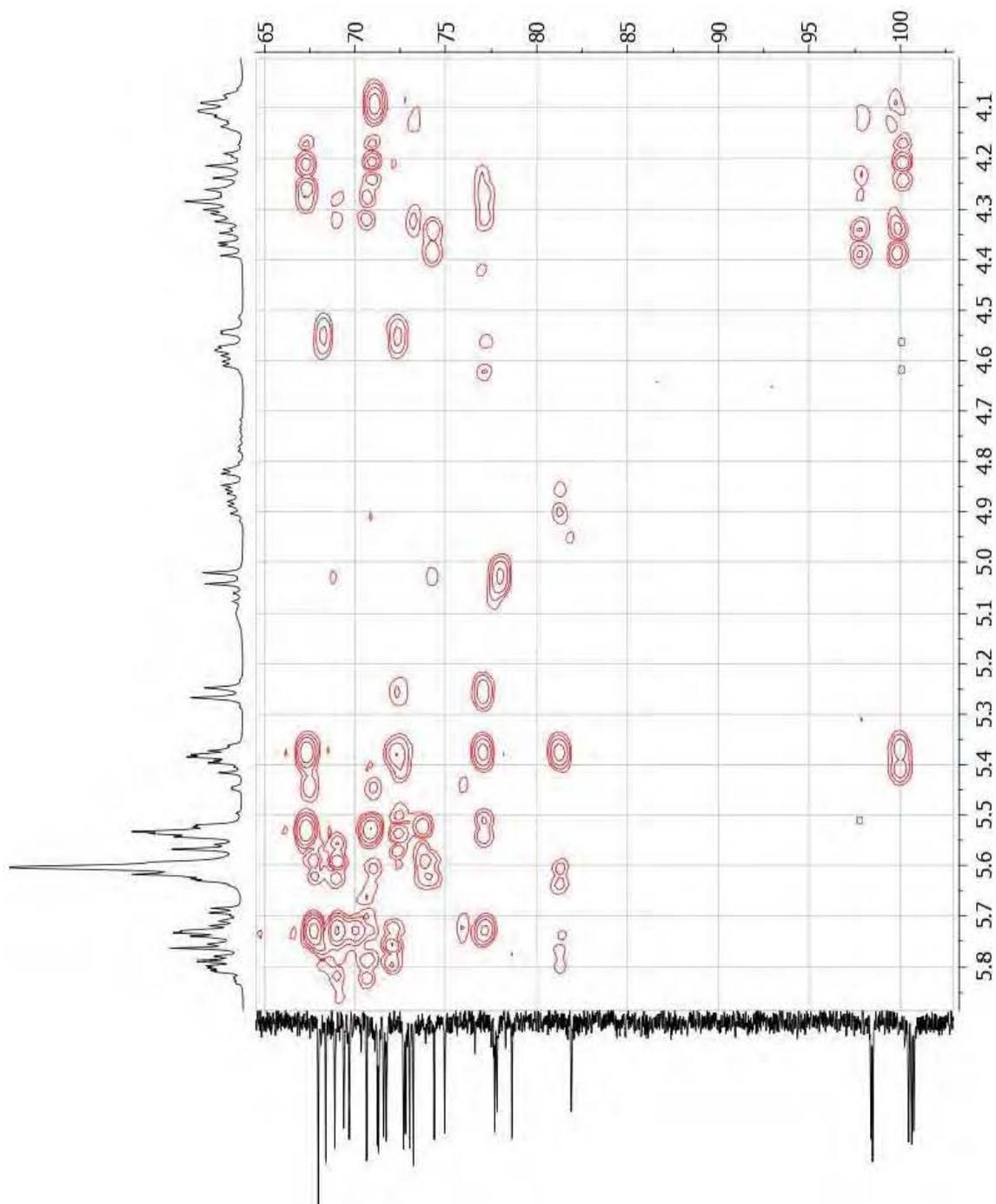
# HSQC (ampliación)



# HMBC

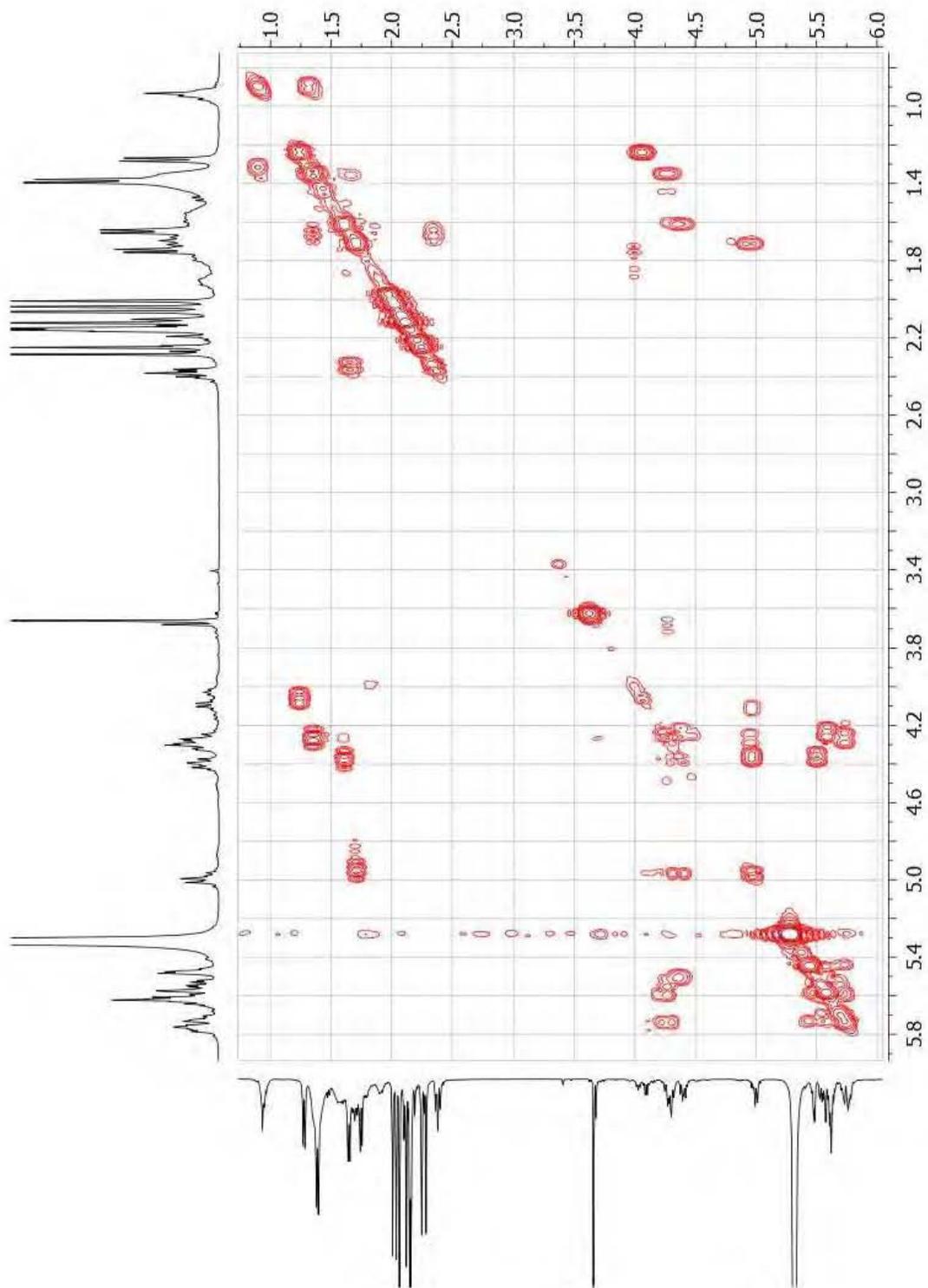


# HMBC (ampliación)

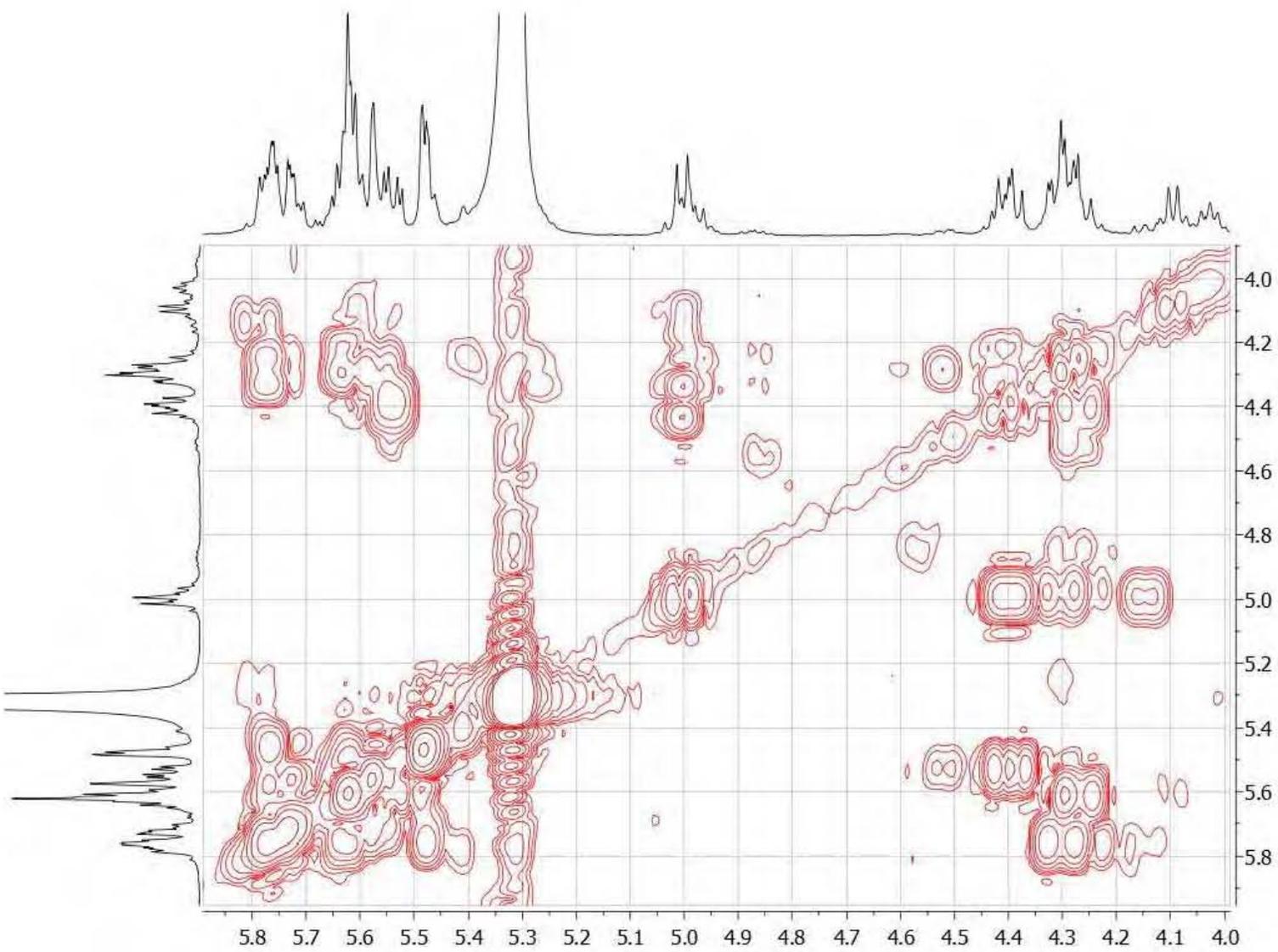


### 10.3 Espectros de RMN en 2D del ácido glicosídico minoritario purificado de la F6.

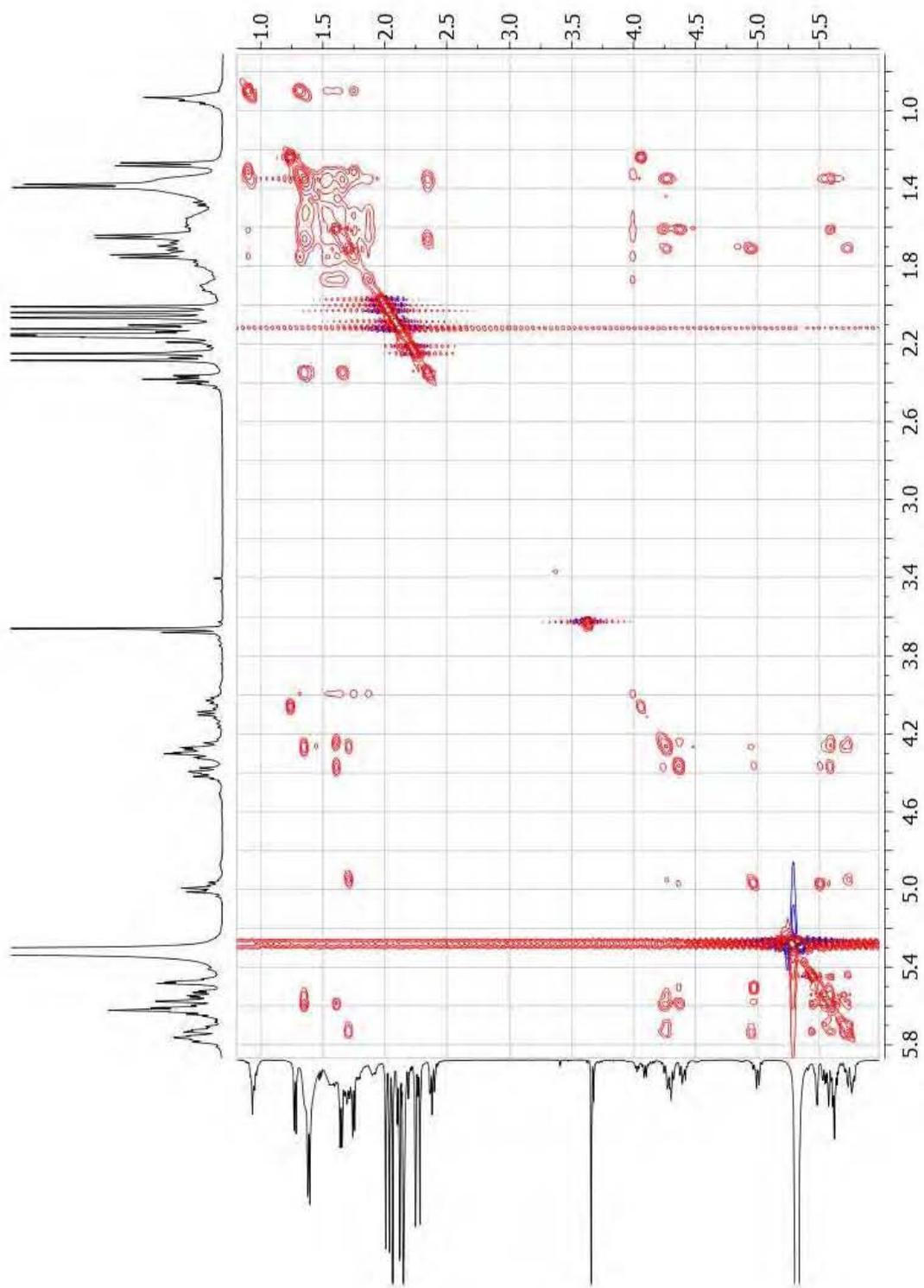
COSY



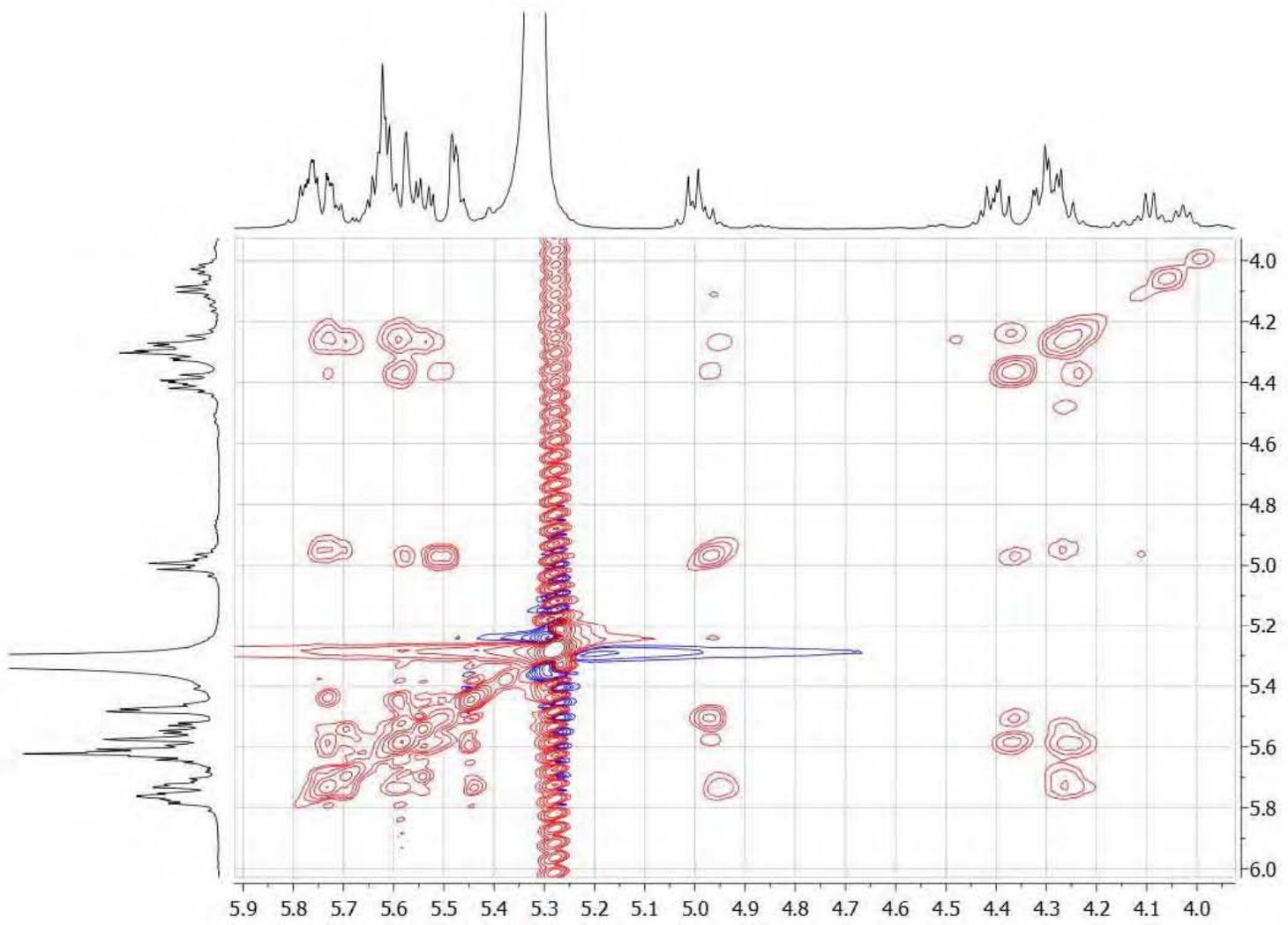
COSY (ampliación)



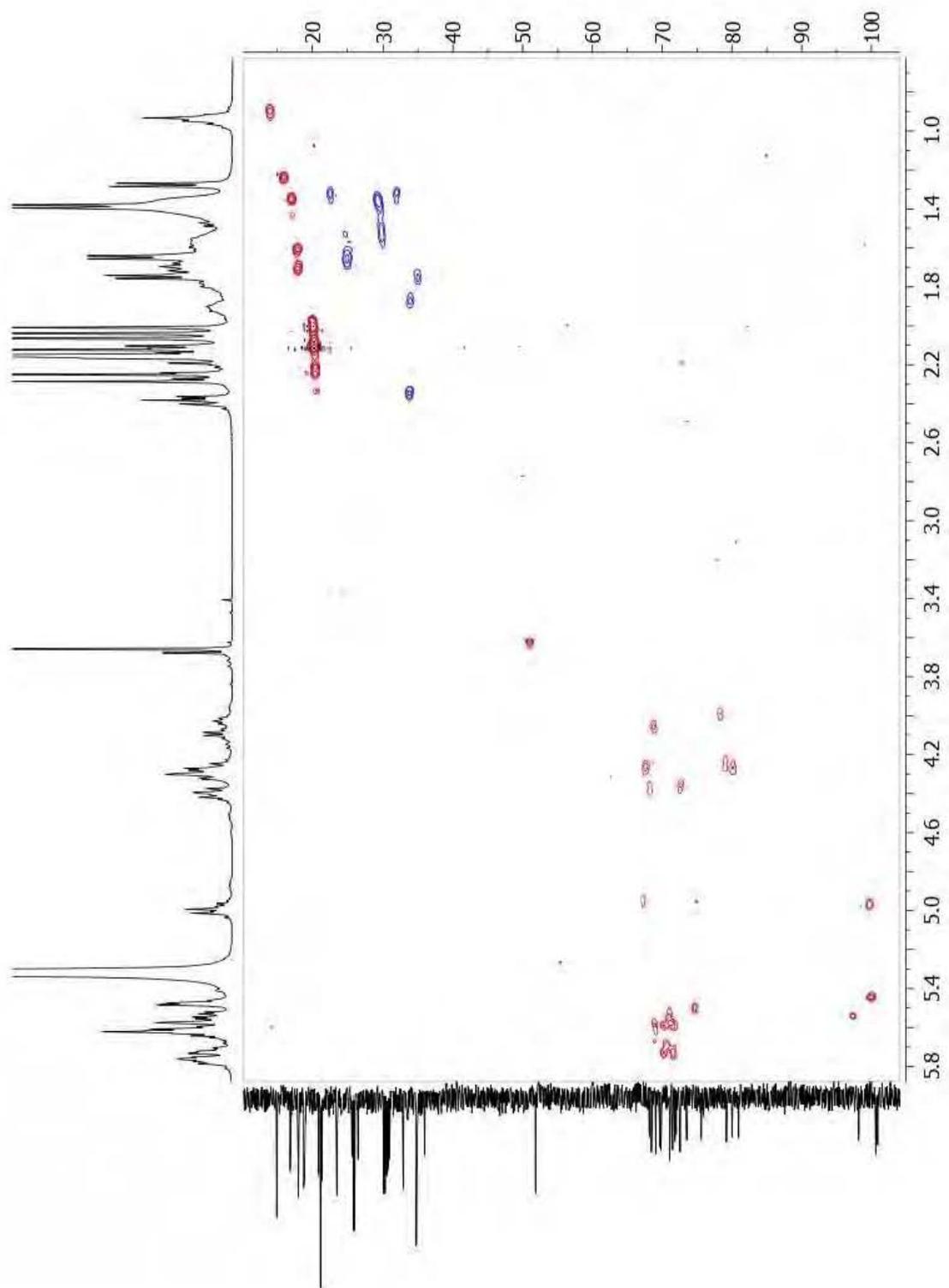
# TOCSY



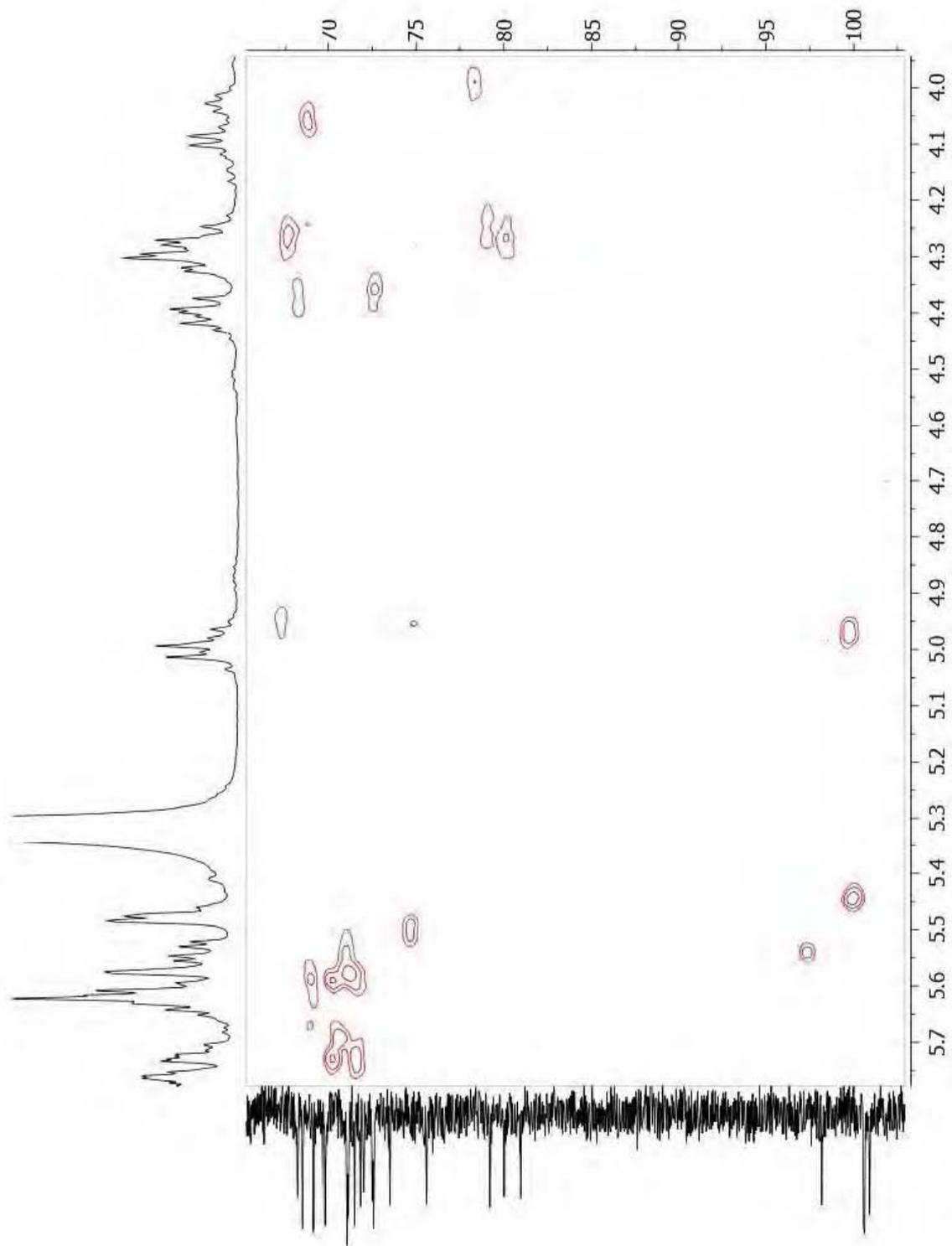
TOCSY (ampliación)



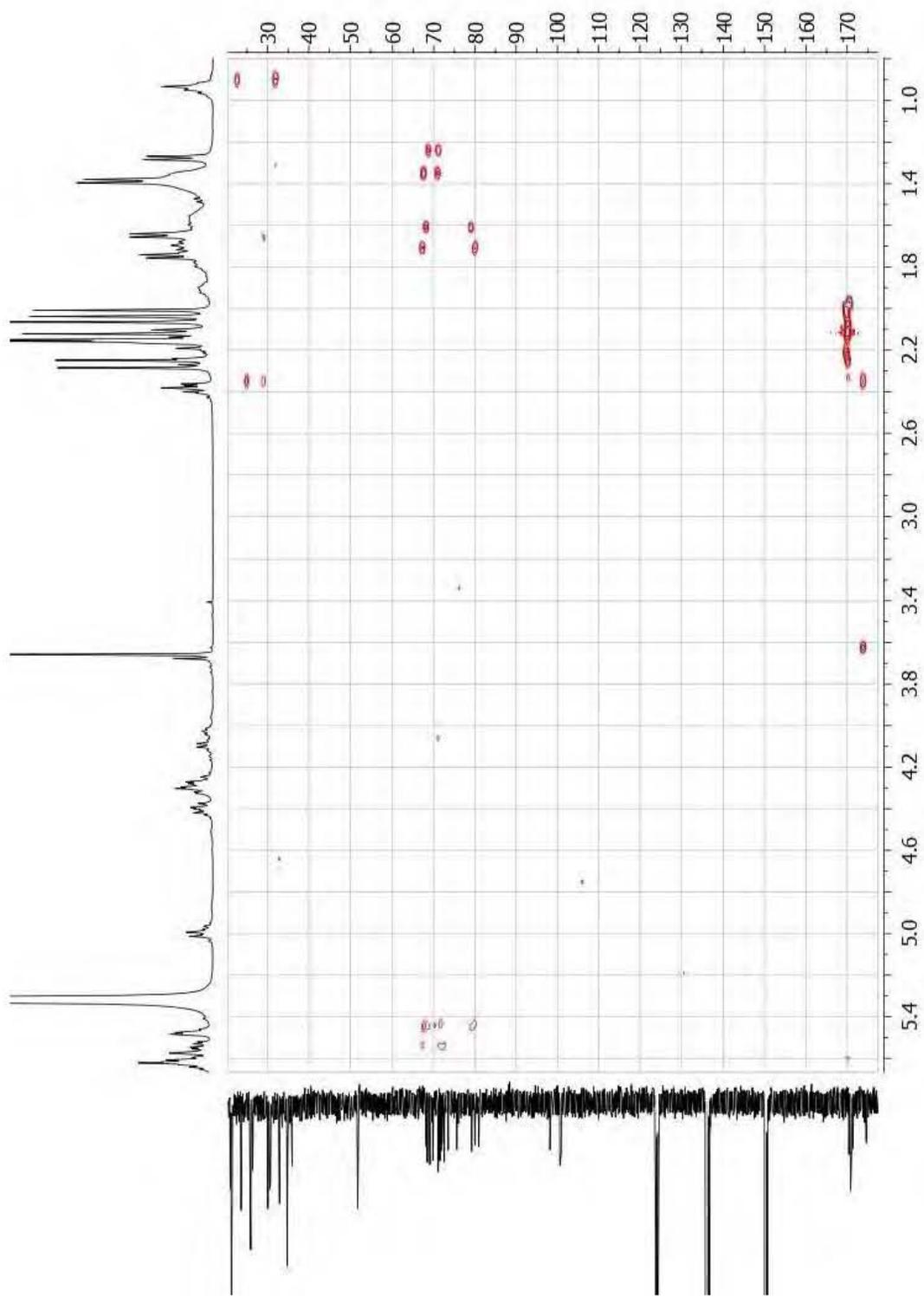
# HSQC



# HSQC (ampliación)



# HMBC



# HMBC (ampliación)

