



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Aplicación de técnicas analíticas de alta resolución para la purificación (HPLC) y la caracterización estructural (RMN y EM) de las resinas glicosídicas de *Ipomoea alulata*.”

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Q. Armando Moreno Velasco

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Facultad de Química.

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., Enero 2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO.

Presidente	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Vocal	Dra. Rachel Mata Essayag
Vocal	Dr. José Federico del Río Portilla
Vocal	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
Secretario	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.

Este trabajo se realizó en el laboratorio 123 de la Facultad de Química de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Rogelio Pereda Miranda.

Los resultados derivados de esta investigación se presentaron en:

- 54th annual meeting of the Phytochemical Society of North America. "Glycosidic acids from Brazilian Jalap Root (*Operculina hamiltonii* (G.Don) D.F Austin & Staples) with Purgative Activity", 04 al 08 de agosto de 2018, Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, 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: 626644) durante el periodo octubre 2017–enero 2019.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN215016; IN208019) por el financiamiento parcial de esta investigación.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (Facultad de Química) por la obtención de los espectros de RMN.

Al Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar por el apoyo para la obtención de los espectros de masas de baja resolución.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por aceptarme como miembro de su equipo de colaboración y por los conocimientos transmitidos.

A la Dra. Mabel Fragoso Serrano por la paciencia y la ayuda brindada a lo largo de la realización del presente trabajo de investigación.

A los miembros del jurado por las observaciones y correcciones sugeridas para el enriquecimiento del presente texto.

RESUMEN

Ipomoea alulata Miq., *Operculina hamiltonii* (G.Don) D.F Austin & Staples, es una planta trepadora originaria de Brasil, en donde se comercializa como un remedio purgante. En los mercados populares, la raíz de la “batata de purga” se vende como una droga cruda en trozos o pulverizada y en diferentes preparados fitoterapéuticos elaborados con sus raíces y su contenido de resinas, que incluyen polvos, pastillas, jarabes, extractos alcohólicos, tinturas con algunos otros ingredientes herbolarios para la administración oral.

El presente trabajo describe el aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de dos resinas glicosídicas macrocíclicas presentes en *O. hamiltonii* y sin descripciones previas en la literatura fitoquímica. A partir del extracto obtenido con la mezcla CH₂Cl₂–C₂H₅OH (1:1) de la droga cruda pulverizada y comercializada con el nombre de “jalapa” y haciendo uso de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en una columna de fase reserva (C-18), aunado a las técnicas de corte y rasurado de núcleo y reciclaje de la muestra, se aislaron dos oligosacáridos del ácido jalapínico (11S-hidroxihexadecanoico). La saponificación de ambos compuestos proporcionó el ácido operculínico A, mientras que los ácidos grasos que se encuentran esterificando los núcleos oligosacáridos se identificaron como el ácido decanoico para el pico **F4P4** y el ácido dodecanoico para el pico **F4P7**.

Haciendo uso de las técnicas de RMN en 1D y 2D se determinó la secuencia de glicosilación del núcleo pentasacárido de los compuestos intactos, llegando a la conclusión que la diferencia principal entre ambos principios radicaba en el largo de la cadena alifática que esterifica una de las posiciones del núcleo oligosacárido. La caracterización de estos compuestos permite demostrar las diferencias exiguas que existen entre este tipo de moléculas y confirma que sólo es posible su separación haciendo uso de las técnicas analíticas de alta resolución (HPLC). El aislamiento y la elucidación estructural de estas resinas de estructura novedosa.

ABSTRACT

Ipomoea alulata Miq. *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples, is a vine native of Brazil, where its roots are extensively traded as depurative and laxative remedies. In the popular markets, this remedy known as “batata de purga”, consists of many products made with their roots and/or resin glycoside contents, which include powders, pills, syrups, hydro-alcoholic extracts, and tinctures with some other herbal ingredients for oral administration, among others.

This investigation describes the isolation, purification and structural elucidation of two novel macrocyclic glycosidic resins from *O. hamiltonii*. These two novel derivatives of jalapinic acid (11S-hydroxyhexadecanoic acid) were isolated by HPLC from the CH₂Cl₂–C₂H₅OH (1:1)-soluble extract obtained from pulverized roots, which are commercialized as “jalap”. The saponification products obtained from the two novel compounds lead to the identification of operculinic acid A as the pentasaccharide core, meanwhile the esterifying fatty acids were identified as decanoic and dodecanoic acids for compounds **F4P4** and **F4P7**, respectively.

The glycosylation sequence was determined through 1D and 2D NMR experiments, leading to the conclusion that the only difference between these two macrocyclic molecules was the chain length for the acylating residue of the oligosaccharide core. This structural characterization demonstrates that resin glycosides are not very easy to isolate and purify for they are always present as complex mixtures of homologues. HPLC provides maximal resolution in a short-term analysis. The isolation and the structural characterization of these novel macrocyclic resin glycosides allowed to increase the knowledge of the diversity of these amphipathic biodynamic molecules.

ÍNDICE

I. LISTA DE FIGURAS.	8
II. LISTA DE CUADROS.	12
III. LISTA DE ABREVIATURAS.	13
1. INTRODUCCIÓN.	15
2. ANTECEDENTES.	17
2.1 La familia Convolvulaceae.....	17
2.2 El género <i>Ipomoea</i> , una breve descripción etnobotánica.....	18
2.2.1. Especies purgantes endémicas de México.....	19
2.2.2 Especies purgantes endémicas de Brasil.....	21
2.3 Metabolitos secundarios de las convolvuláceas.....	29
2.3.1 Resinas glicosídicas.....	29
2.5 Elucidación estructural.	40
2.5.1 Métodos degradativos.	41
2.5.2 Métodos no degradativos.	41
3. JUSTIFICACIÓN.....	42
4. HIPÓTESIS	42
5. OBJETIVOS.	43
5.1 Objetivo general.....	43
5.2. Objetivos específicos.	43
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	44
6.1 Métodos cromatográficos.	44
6.2 Material vegetal.....	44
6.3 Preparación del extracto orgánico.....	45

6.4 Fraccionamiento primario del extracto orgánico.....	45
6.5 Separación y purificación de las resinas glicosídicas.....	46
6.5.1 Obtención de perfiles cromatográficos a escala analítica.....	46
6.5.2 Purificación de los compuestos mayoritarios.....	47
6.6 Determinación de constantes físicas y propiedades espectroscópicas.....	48
6.7 Determinación de propiedades espectrométricas.....	48
6.8. Derivatización del Pico F4P7.....	48
6.8.1 Reacción de saponificación.....	48
6.8.2 Reacción de acetilación.....	49
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	50
7.1 Preparación del extracto orgánico.....	50
7.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico.....	50
7.3 Aislamiento de las resinas glicosídicas mediante HPLC.....	51
7.3.1 Obtención de los perfiles cromatográficos a escala analítica.....	51
7.3.2 HPLC a escala preparativa.....	52
7.4 Purificación y elucidación estructural.....	54
7.4.1 Purificación de las resinas glicosídicas.....	54
7.4.2 Elucidación estructural de los compuestos mayoritarios.....	56
8. CONCLUSIONES.....	73
9. BIBLIOGRAFÍA.....	74
10 ANEXOS.....	79

I. LISTA DE FIGURAS.

- Figura 1.** Tallos especializados (zarcillos), característicos de las plantas trepadoras. ----- 17
- Figura 2.** Raíces tuberosas de *Ipomoea batatas* (Wender.) Hayne (izquierda). Flores campanuladas de *I. indica* (derecha).----- 18
- Figura 3.** Algunas de las especies pertenecientes al complejo medicinal¹ comercializado como jalapas mexicanas: A) flor y hoja de *I. purga*; B) flores de *I. orizabensis*; C) tallos, hojas y raíz de *I. stans*; y D) droga cruda de la jalapa oficial (*I. purga*). ----- 20
- Figura 4.** Manuscrito Badiano (1552 herbario Azteca). Fragmento en donde se ilustra a la raíz de jalapa (*I. purga*) ingrediente principal en el remedio purgativo prehispánico conocido como “cacamotli tlanquinoli”. ----- 21
- Figura 5.** A) Flor y hoja de *I. tuberosa* L. B) zarcillos, hojas y flor de *O. alata* C) flores y tallo de *O. macrocarpa*. Algunas de las especies pertenecientes al complejo medicinal brasileño conocido como la “batata de purga”. ----- 22
- Figura 6.** Distribución de una de las raíces conocida como jalapa brasileña (*O. macrocarpa*) con flores blancas. ----- 23
- Figura 7.** *I. alulata* (*O. hamiltonii*). A) flor amarilla-pálida; B) cáliz, pedúnculo y brácteas; C) algunas formas particulares de las hojas y D) fruto.----- 25
- Figura 8.** Distribución geográfica de la raíz de jalapa con flores amarillas, *O. hamiltonii*.-- 26
- Figura 9.** Raíz de jalapa brasileña: droga cruda, polvos y fitofármacos. La jalapa brasileña se comercializa ampliamente para fines medicinales en las regiones del norte brasileño como droga cruda, además de numerosos productos elaborados con las raíces y el contenido de sus resinas: A) raíces; B) raíces secas cortas en rodajas; C) polvos comercializados de "batatão" y "jalapa" para la venta en un mercado local; D) jarabe de batatão (Hypólito), extracto alcohólico (Industria Farmacéutica Sobral) y píldoras

(Maciel). Todos los productos fueron adquiridos en el Mercado 2000, Santarém, Pará, Brasil en septiembre de 2015-----	28
Figura 10. Unidades monosacáridas presentes en las resinas glicosídicas.-----	30
Figura 11. Estructura general de una resina glicosídica macrocíclica anfipática. Porción hidrofílica (azul); porción hidrofóbica (rojo).-----	30
Figura 12. Estructuras de los ácidos glicosídicos aislados de <i>O. macrocarpa</i> .-----	32
Figura 13. Resinas glicosídicas aisladas de <i>O. macrocarpa</i> . -----	33
Figura 14. Resinas glicosídicas aisladas de <i>O. macrocarpa</i> (continuación).-----	34
Figura 15. Estructuras de los ácidos turpéticos.-----	35
Figura 16. Resinas glicosídicas de <i>O. turpethum</i> . -----	36
Figura 17. Perfil cromatográfico del extracto saponificado de <i>O. hamiltonii</i> .-----	37
Figura 18. Núcleos oligosacáridos minoritarios constitutivos de las resinas glicosídicas de la jalapa brasileña (<i>O. hamiltonii</i>) donde A) presenta una aglicona de C ₁₆ (ácido 12S-hidroxihexadecanoico); el compuesto B) una cadena de C ₁₇ (ácido 12S-hidroxiheptadecanoico); y el compuesto C) una aglicona de C ₁₈ (ácido 12S-hidroxi-octadecanoico).-----	38
Figura 19. Ejemplo de un cromatograma generado mediante la técnica de reciclaje.-----	40
Figura 20. Placa cromatográfica de las fracciones F1-F8, usando como referencia la tricolorina A, resina glicosídica mayoritaria del “queiebraplatos” (<i>I. tricolor</i>). -----	51
Figura 21. Fase móvil: CH ₃ CN:H ₂ O (17:3); Flujo: 0.4 mL/min.-----	52
Figura 22. Perfil cromatográfico a escala preparativa donde se muestran los picos aislados mediante la técnica “corte de núcleo”. -----	53

Figura 23. Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave F4P7, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.	55
Figura 24. Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave F4P4, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.	55
Figura 25. Comparativo entre los espectros de RMN ¹ H del derivado saponificado peracetilado del compuesto F4P7 (trazo inferior) y del derivado peracetilado del ácido operulínico A previamente caracterizado en las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa. (trazo superior).	56
Figura 26 Espectro de RMN ¹ H del ácido operculínico A peracetilado (800 MHz, C ₅ D ₅ N, con supresión de H ₂ O, δ _H 5.00; expansión 500 MHz, sin supresión de H ₂ O). Señal centrada en 3.58 ppm corresponde a MeOH.	57
Figura 27. Espectro de RMN ¹³ C del ácido operculínico A peracetilado (200 MHz). Señal de MeOH (δ _C 49.0).	58
Figura 28. Estructura del ácido operculínico A.	59
Figura 29. Comparación entre los espectros de RMN ¹ H de los compuestos F4P4 (trazo superior) y F4P7 (trazo inferior).	60
Figura 30. Distribución isotópica y abundancias relativas para el ión [M – H] ⁻ que se genera por la desprotonación de la molécula F4P4 [C ₅₆ H ₉₈ O ₂₄] ⁻ mediante ESI en modo negativo.	61
Figura 31. Distribución isotópica y abundancias relativas para el ión [M + Na] ⁺⁺ que se genera por la adición de sodio a la molécula F4P7 [C ₅₈ H ₁₀₂ O ₂₄ Na] ⁺⁺ mediante ESI en modo positivo.	62
Figura 32. Comparativo entre espectros de RMN ¹³ C del ácido operculínico A (trazo superior en rojo) y del compuesto F4P7 intacto (trazo inferior en negro).	63

Figura 33. Espectro de RMN ^1H del compuesto F4P7 (400 MHz, piridina- d_5). -----	64
Figura 34. Espectro de RMN ^{13}C de la resina aislada y purificada de la fase F4P7 (100 MHz, piridina- d_5). En rojo se muestra los carbonos correspondientes a la porción alifática y las señales azules corresponden a carbonos que forman parte de los azúcares.-----	65
Figura 35. Espectro COSY de la porción oligosacárida del compuesto F4P7. -----	66
Figura 36. Espectro TOCSY de la porción oligosacárida del compuesto F4P7. -----	67
Figura 37. Espectro HSQC de la porción oligosacárida del compuesto F4P7. -----	68
Figura 38. Espectro HMBC de la porción oligosacárida del compuesto F4P7 donde se indica la secuencia de glicosilación. Asignaciones: 1) Agl C-11/Fuc H-1; 2) Rha C-1/Fuc H-2; 3) Rha 'C-1/Rha H-4; 4) Rha ''C-1/Rha 'H-4; 5) Glc H-1/Rha 'C-3. -----	69
Figura 39. Estructura del compuesto mayoritario aislado de la fracción F4P7. -----	70
Figura 40. Estructura del compuesto mayoritario aislado de la fracción F4P4. -----	71

II. LISTA DE CUADROS.

Cuadro 1 Clasificación taxonómica de <i>O. hamiltonii</i> . -----	26
Cuadro 2. Lista de sinonimias de <i>O. hamiltonii</i> .-----	27
Cuadro 3. Datos espectrométricos de los eluatos detectados. -----	37
Cuadro 4. Fraccionamiento primario -----	46
Cuadro 5. Condiciones instrumentales en escala analítica de los ensayos realizados.-----	47
Cuadro 6. Rendimientos del fraccionamiento primario del extracto-----	50
Cuadro 7. Rendimientos del fraccionamiento de F4. -----	53
Cuadro 8. Rendimientos en HPLC y constantes físicas de los compuestos P4 y P7. -----	54
Cuadro 10. Especies iónicas detectadas y fórmula moleculares calculadas para F4P4 y F4P7 mediante ESI (baja resolución). -----	61
Cuadro 11. Constantes espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) del compuesto F4P7y F4P4. -----	72
Cuadro 9. Constantes espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) del ácido operculínico A peracetilado. -----	79

III. LISTA DE ABREVIATURAS.

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
2D	Dos dimensiones
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
dq	Doble cuarteto
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Ionización mediante “electrospray”
Fuc	Fucosa
Glc	Glucosa
HMBC	Correlation heteronuclear a múltiples enlaces
HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de sistemas cuánticos simples
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución
IR	Índice de refracción
J	Constante de acoplamiento

MHz	Megahertz
piridina-<i>d</i>₅	Piridina deuterada
Rha	Ramnosa
RMN ¹³C	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
RMN ¹H	Resonancia magnética nuclear protónica
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano
TOCSY	Espectroscopía de correlacion homuclear total
t_R	Tiempo de retención
uma	Unidad de masa atómica
[M + H]⁺	Catión de la molécula protonada
[M – H]⁻	Anión de la molécula desprotonada
δ	Desplazamiento químico

1. INTRODUCCIÓN.

La importancia que desempeñan las plantas en el tratamiento de enfermedades se encuentra ampliamente demostrado por su empleo en la mayoría de los sistemas medicinales, independientemente del origen filosófico de los tratamientos. Sabemos que los orígenes de la medicina occidental se encuentran en Mesopotamia y Egipto, además de la medicina Yunani (persa-árabe) y Ayurveda (hindú), las cuales, a su vez, comparten raíces con culturas del continente asiático (China, Japón, etc.) Este conocimiento inherente a la naturaleza humana tiene sus primeros registros escritos que datan del 1600 a. C. (el papiro Ebers del antiguo Egipto que describe una farmacopea con más de 700 drogas crudas extraídas del reino vegetal) y que gran parte de este conocimiento empírico de las plantas medicinales, en la actualidad, sigue siendo transmitido de generación en generación por las sociedades tribales y rurales, particularmente aquellas de la parte tropicales de África, América y Asia (Evans, 2010).

A pesar de que el uso de los productos naturales bioactivos, como los contenidos en los remedios herbolarios, data de hace miles de años, su aplicación como compuestos puros y caracterizados con el fin de obtener nuevos fármacos empezó en el siglo XIX. Se encuentra bien documentado que los productos naturales contribuyen en el desarrollo moderno de fármacos, especialmente para agentes antibacterianos y antitumorales. Los metabolitos secundarios presentan estructuras químicas únicas, que la mayoría del tiempo van más allá de la imaginación humana, y son una inspiración para que los científicos desarrollen nuevas entidades químicas con estructuras completamente diferentes a los fármacos ya conocidos (Fang & Wei-Shuo, 2006).

La medicina tradicional que se practica en el centro y sur de América, se encuentra enriquecida debido a la gran diversidad biológica desarrollada gracias a los elementos geográficos característicos de la zona. Específicamente, el género *Ipomoea* (Convolvulaceae) constituye un ejemplo importante debido a que su continuo uso, desde tiempo inmemorables, abarca propósitos nutricionales, medicinales, filosóficos, y económicos (Pereda & Bah, 2003, Pereda-Miranda et al., 2010). Numerosas actividades

biológicas de algunas especies perteneciente a la familia de las convolvuláceas, se atribuyen a sus contenidos ricos en glicorresinas (Pereda-Miranda et al., 2010).

El presente trabajo contribuye al reconocimiento de la diversidad química de los componentes de naturaleza glicolípida de las resinas de la jalapa brasileña, *Ipomoea alulata* Miq., sin. *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F Austin & Staples, mediante la separación y la purificación, haciendo uso de la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), así como la elucidación estructural mediante el empleo de la espectrometría de masas y la resonancia magnética nuclear de dos componentes mayoritarios presentes en el extracto obtenido con una mezcla de CH₂Cl₂-C₂H₅OH (1:1).

2. ANTECEDENTES.

2.1 La familia Convolvulaceae.

Las convolvuláceas, también conocidas como campánulas o glorias de la mañana, comprenden aproximadamente 1600-1700 especies agrupadas en 55-60 géneros (Mabberley, 2008). La familia presenta una distribución cosmopolita; sin embargo, sus miembros son primordialmente plantas tropicales, con numerosos géneros endémicos en cada continente (Austin, 1973). El nombre de esta familia deriva del latín *convolvere* que significa entrelazado y hace referencia a su forma de crecimiento característico de las plantas trepadoras, en donde los zarcillos se entrelazan en torno a un soporte (Pereda & Bah, 2003; Pereda-Miranda et al., 2010).



Figura 1. Tallos especializados (zarcillos), característicos de las plantas trepadoras.

Algunas especies poseen células secretoras de resinas que se distinguen por sus dimensiones considerables alrededor de los haces vasculares tal como las encontradas en las drogas derivadas de las jalapas. Muchas especies contienen alucinógenos derivados del ergot producidos por hongos endófitos del género *Periglandula* (Steiner & Lestner, 2018), tal es el caso del ololiuqui (*Rivea corymbosa* L.), y su contenido es principalmente abundante en las semillas de algunas especies de *Ipomoea* (Evans, 2010).

2.2 El género *Ipomoea*, una breve descripción etnobotánica.

El género *Ipomoea* comprende el número más grande de especies dentro de la familia *Convolvulaceae*. A lo largo del mundo, se estima que este género contiene alrededor de 700 especies. Más de la mitad de éstas se concentran en América, donde se encuentran alrededor de 500 especies, la mayoría nativas y unas pocas introducidas (Austin & Huáman, 1996). Este género se caracteriza morfológicamente por la presencia de una corola infundibuliforme diferenciada en una especie de campana, las tecas de las anteras no forman espirales después de la dehiscencia, un estigma fusiforme y una fruta capsular que cuando seca abre a través de válvulas (Wilkin, 1999).



Figura 2. Raíces tuberosas de *Ipomoea batatas* (Wender.) Hayne (izquierda). Flores campanuladas de *I. indica* (derecha).

La mayor parte de las especies correspondientes a este género se distribuyen a lo largo de los trópicos; sin embargo, se han encontrado especies que se desarrollan en zonas templadas. Las especies más representativas son originarias del centro y sur de América, en donde su uso abarca fines nutricionales, como el camote (*I. batatas* L.) y el xonequi (*I. dumosa* (Benth) L. O. Williams), medicinales, principalmente purgantes, como la raíz de jalapa (*I. purga* (Wender.) Hayne) y sus congéneres o falsas jalapas (*I. orizabensis* (G.Pelletan) Ledeb ex. Steud, *I. stans* Cav. e *I. simulans* D. Hanb), de interés económico como las campánulas ornamentales utilizadas en la jardinería (*I. violacea* L.) o como cultivos de cobertura en la agricultura tradicional (*I. tricolor* Cav.). Cabe mencionar que, en algunas

comunidades nativas de México, estas especies continúan teniendo un papel importante en el asentamiento de la filosofía ancestral en los rituales mágico-adivinatorios como agentes enteógenos (Pereda y Bah, 2003; Pereda-Miranda et al., 2010).

Cabe resaltar el impacto a nivel mundial que ha tenido la importancia nutricional de *I. batatas*. Esta especie, originaria de Centroamérica, se cultiva y consume a lo largo del mundo. Además de esta especie, las partes aéreas de *I. aquatica* Forsk son muy apreciadas en la culinaria asiática principalmente como vegetal en Sri Lanka, Hong Kong, Taiwán y China (Meira et al., 2012).

Debido a su contenido de alcaloides derivados del ergot, las semillas de numerosas especies del género *Ipomoea* son usadas como alucinógenos. Algunas de éstas fueron empleadas en tiempo precolombinos para alcanzar un estado mental que conectara con los dioses durante ceremonias religiosas y prácticas de sanación (Taber et al., 1963; Daló et al., 1978).

2.2.1. Especies purgantes endémicas de México.

El uso de las especies representativas del género *Ipomoea* endémicas de la región mesoamericana están relacionadas íntimamente con el desarrollo cultural y etnomédico de sus culturas nativas. Tal es el caso del ololiuqui (*Ryvea corymbosa* L. e. *I. tricolor* Cav.), nombre náhuatl de las semillas de estas plantas, las cuales fueron utilizadas desde tiempos prehispánicos por los Aztecas y otras tribus de la región por sus propiedades psicotrópicas (Hoffman, 1971).

En Mesoamérica, los remedios purgativos o laxantes, conocidos por los aztecas como “*cacamotili tlanquiloni*”, consisten en diversas especies de raíces tuberosas, las cuales varían en características morfológicas, hábitat y potencia de sus efectos. Actualmente, las investigaciones han identificado a estas raíces como especies pertenecientes al género *Ipomoea*, caracterizadas como *I. purga*, *I. orizabensis*, *I. stans*, e *I. simulans* (**Figura 3**), entre otras que son menos usadas (Pereda Miranda et al., 2006). Este grupo de plantas medicinales llamó la atención de los colonizadores españoles, debido a que las propiedades

purgativas eran importantes en la medicina europea galénica del siglo XVI (Pereda Miranda, et al., 2010) y fue aceptado como sustituto de la raíz de escamonia (*Convolvulus scammonia* L.), que fue usada desde los tiempos precristianos en todo el imperio romano. La “raíz de Michoacán” (*I. jalapa* (L.) Pursh), también conocida por los herbolarios europeos como ruibarbo de las Indias, fue la especie de más importancia en el uso terapéutico de las jalapas comercializadas en Europa. Cabe señalar que estas plantas se encuentran ilustradas en el Códice de la Cruz-Badiano y eran prescritas como remedios purgativos por los sanadores aztecas (Pereda Miranda, et al., 2006).

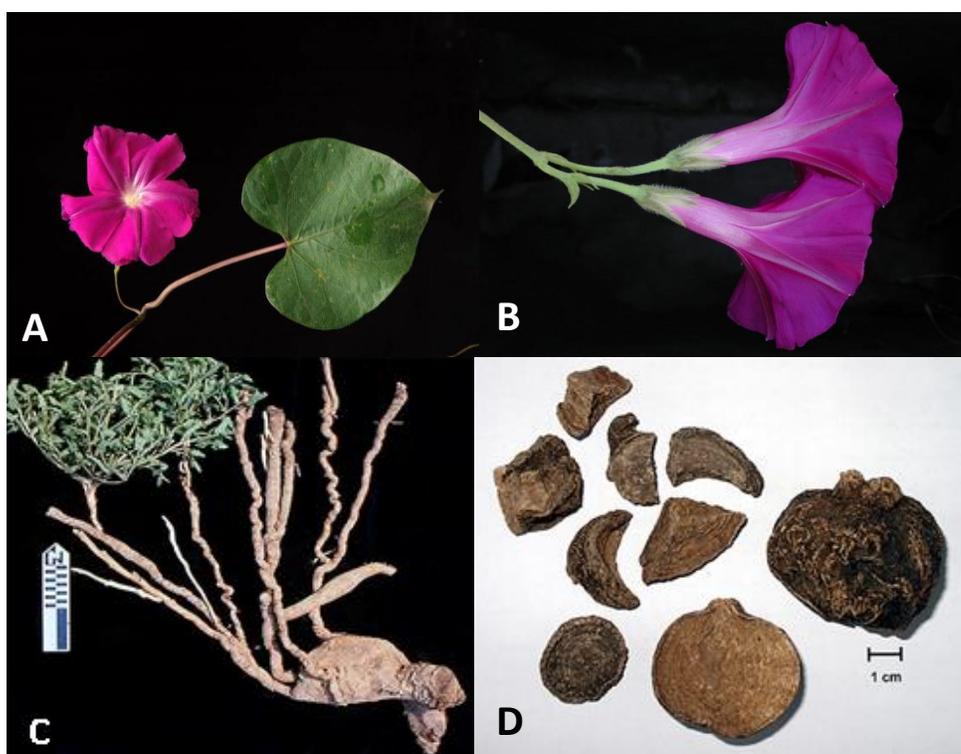


Figura 3. Algunas de las especies pertenecientes al complejo medicinal¹ comercializado como la raíz de jalapa: A) flor y hoja de *I. purga*; B) flores de *I. orizabensis*; C) tallos, hojas y raíz de *I. stans*; y D) droga cruda de la jalapa oficial (*I. purga*).

¹Un complejo de plantas medicinales es un conjunto de drogas crudas que son taxonómicamente diferentes a nivel de especie, género o incluso familia, pero comparten: (a) una o varias características morfológicas distintivas; (b) un nombre común; (c) algunas características organolépticas; y (d) al menos una aplicación terapéutica. Véase: Linares, E.; Bye, R. J. *Ethnopharmacol.* **1987**, *19*, 153-183; Pereda-Miranda, R. et al., *J. Nat. Prod.* **2006**, *69*, 1460-1466.



Figura 4. Manuscrito Badiano (1552 herbario Azteca). Fragmento en donde se ilustra a la raíz de jalapa (*I. purga*) ingrediente principal en el remedio purgativo prehispánico conocido como “cacamotli tlanquinoli”.

Hasta finales del siglo XX, la jalapa (*I. purga*) había sido una fuente de ingresos para la región del Xico, Veracruz. La demanda se ha visto disminuida debido a la obtención de purgantes de diversas fuentes vegetales, entre las que destacan la jalapa brasileña (*Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples y *O. macrocarpa* (L.) Urb.) y la jalapa de la india (*O. turpethum* (L.) Silva Manso) (Linajes et al., 1994; Castañeda Gómez & Pereda Miranda, 2011).

2.2.2 Especies purgantes endémicas de Brasil.

En 1574, Nicolás Monardes (Monardes, 1990), médico sevillano quien se propuso estudiar y experimentar con los productos y medicinas del nuevo Mundo y que contribuyó al desarrollo de la Farmacognosia europea, escribió la *Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales*, donde se documentaron las propiedades purgantes

de la jalapa mexicana. Esta planta fue la más importante en el ámbito de los remedios purgantes originarios de América, hasta el punto de convertirse en el sucedáneo americano de la escamonea, pero con efectos considerados como moderados. Esta contribución a la medicina española fue muy relevante y facilitó la introducción y aceptación en Europa de las raíces de la jalapa mexicana y, de esta manera, favoreció la aprobación de las especies congéneres purgantes y depurativas en las prácticas médicas del imperio colonial portugués.



Figura 5. A) Flor y hoja de *I. tuberosa* L. B) zarcillos, hojas y flor de *O. alata* C) flores y tallo de *O. macrocarpa*. Algunas de las especies pertenecientes al complejo medicinal brasileño conocido como la “batata de purga”.

Los colonizadores portugueses introdujeron en sus colonias en el continente americano un poco del conocimiento de la medicina galénica de siglo XVI. Este sistema medicinal compartía ciertos remedios con los encontrados en las tribus de los antiguos pobladores de América, tal es el caso de los remedios provenientes de plantas trepadores perennes con raíces de sabor amargo que reconocieron como remedios purgantes.

Este complejo de plantas medicinales conocido como la jalapa brasileña (**Figura 5**) está compuesto por especies pertenecientes a la familia de las convolvuláceas y son comunes en la vegetación secundaria de las áreas costeras (Matos, 1997) y se distribuyen en las regiones tropicales comprendidas entre las Antillas y Brasil (Planchon y Bretin, 1937). Se han identificado principalmente dos especies con raíces tuberosas purgantes, *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (sin. *I. operculata* Gómez) de flores blancas y otra de flores amarillas, *O. hamiltonii*. Otra especie con propiedades laxantes es *O. tuberosa* (sin. *I. tuberosa*) (Matos, 1997). Todas estas especies se conocen popularmente con el nombre de “batata de purga” y se emplean por sus propiedades purgantes y laxantes, también como un remedio contra las enfermedades infecciosas de la piel y en el tratamiento de la leucorrea (Gomes, et al., 2009).



Figura 6. Distribución de una de las raíces conocida como jalapa brasileña (*O. macrocarpa*) con flores blancas.

El “michoacam” o “mechoacam”, otro nombre vernáculo mexicano (*I. jalapa* Pursh) para las raíces purgantes, se describió entre las plantas medicinales brasileñas por el naturalista francés Pierre Pomet en su obra “*Histoire Générale des Drogues, Traitant de Plantes, des*

Animaux des Mineraux" (1694). En la colección descriptiva de plantas de Ceará (*Coleção Descritiva das Plantas da Capitania Ceará*) publicado por J. S. Feijó en 1799, el uso de raíz de jalapa también se indicó por el nombre de "mechoacam"; por lo tanto, esta referencia es una de las más antiguas sobre la utilización tradicional de la "batata de purga" en el noreste de Brasil (Lira-Ricárdez et al., 2018).

2.2.2.1. *Ipomoea alulata*. Usos terapéuticos de la jalapa brasileña.

Ipomoea alulata (*O. hamiltonii*) es una planta trepadora leñosa perenne o liana con una raíz tuberosa, tallo alado y las porciones más viejas y leñosas se estrían longitudinalmente en espiral. Las hojas presentan peciolo alados o al menos estriados, glabros, con 8 a 35 mm de longitud y son simples, cordadas ya sea estrechas o amplias, ocasionalmente astada de base cordada, el seno ocasionalmente se forma muy superficial dando a la base de la hoja la apariencia redondeada. Los bordes foliares son enteros con dos lóbulos laterales separados por un seno. Posee un ápice acortado o atenuado, lóbulos laterales redondos u obtusos, subclavias con tricomas simples, longitud de 45 a 90 mm y ancho de 30 a 75 mm (**Figura 7**).

Las flores axilares son solitarias, rara vez en pequeños racimos; pedúnculos estriados, algunas veces distantemente alados, glabros, de 33 a 80 mm de longitud; dos brácteas lanceoladas, de base redonda, ápice acotado; pedicelos claviformes, alados y glabros con 15-25mm de longitud, adelgazados cerca del fruto; sépalos iguales, ampliamente ovados a suborbiculares, basalmente obtusos a acotados, bordes delgados y membranosos; corola campanulada, amarilla, con hirsuto apicalmente o glabra, de 35-52 mm de longitud y 33-51 mm de ancho; estambres incluidos, filamentos adnatos de 2/3 a 3/4 de su altura, barbado en la porción anclada y glabra en la porción libre, anteras llevan a cabo dehiscencia en forma de espiral en la madurez, amarilla de 6 a 7 mm de largo.

Los frutos constan de una cápsula operculada de cuatro lóbulos, con opérculo y endocarpio dehiscentes, septados en dos cámaras, cada uno conteniendo una o dos

semillas. Mide de 15 a 20 mm de diámetro, cáliz acrescente y leñoso (**Figura 7**). (Austin & Huáman, 1996; Staples & Er, 2011).

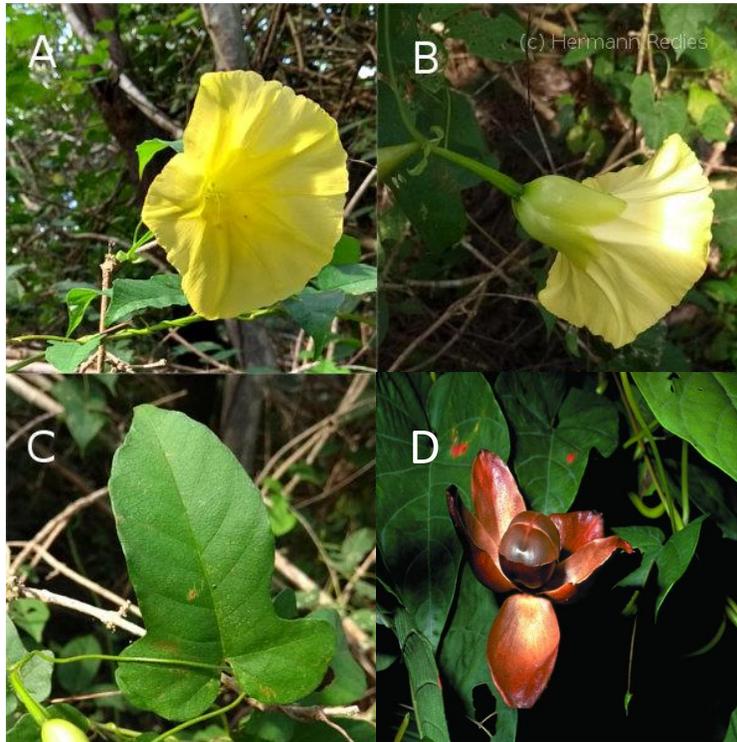


Figura 7. *I. alulata* (*O. hamiltonii*). A) flor amarilla-pálida; B) cáliz, pedúnculo y brácteas; C) algunas formas particulares de las hojas y D) fruto.

En Brasil se le conoce popularmente como “jalapa”, “jalapa de Brasil”, “batata de purga”, “batatão”, “jalapão”, “purga amarela”, “tapioca de batatão” y “broinia”. Se distribuye geográficamente por el Centro de América, las Antillas y el Norte de Suramérica (Costa, 2014). Esta especie florece en los meses de septiembre a diciembre y crece en matorrales en el norte y nordeste de Brasil (**Figura 8**). En los mercados populares, el remedio conocido como “batata de purga” comprende la droga cruda en trozos o pulverizada y diferentes preparados fitoterapéuticos elaborados con sus raíces y contenido de resinas, que incluyen polvos, pastillas, jarabes, extractos alcohólicos, tinturas con algunos otros ingredientes herbolarios para la administración oral (Lira-Ricárdez et al., 2018), entre otros, y para su

preparación se utilizan dos especies diferentes: *O. macrocarpa* y *O. hamiltonii*, principalmente (**Figura 9**).



Figura 8. Distribución geográfica de la raíz de jalapa con flores amarillas, *O. hamiltonii*.

Cuadro 1 Clasificación taxonómica de *O. hamiltonii*.

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

La clasificación taxonómica de *Operculina hamiltonii* se describe en el **Cuadro 1**, la cual, ha variado de acuerdo al autor (**Cuadro 2**). El basiónimo *I. hamiltonii* G. Don, se describió en

1838 y como *I. alulata* en 1844. Su reclasificación al género *Operculina* bajo la sinonimia de *Operculina alata* Urb. sucedió en 1902. En la actualidad, el nombre aceptado corresponde a *O. hamiltonii* (G. Don) D.F Austin & Staples (Austin & Staples, 1983).

Cuadro 2. Lista de sinonimias de *O. hamiltonii*.

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

Diversos preparados fitofarmacéuticos (**Figura 9**) se encuentran disponibles en el mercado para su comercialización o bien como droga cruda. Como ejemplo, tenemos a la “tintura de jalapa” que se utiliza en el noreste de Brasil como laxante y para el tratamiento del accidente vascular encefálico (Ximenes dos Santos et al., 2012; Cunha et al., 2011).

Entre sus propiedades medicinales destacan la analgésica, antiinflamatoria, depurativa, diurética, energética, febrífuga, laxante y purgativa. Estos laxantes se utilizan, especialmente para la congestión intestinal y la hidropesía cardíaca o renal. El uso en la

medicina tradicional también incluye el tratamiento de edema, inflamación, dolor de cabeza y fiebre (Matos, 1997; Costa, 2014).



Figura 9. Raíz de jalapa brasileña: droga cruda, polvos y fitofármacos. La jalapa brasileña se comercializa ampliamente para fines medicinales en las regiones del norte brasileño como droga cruda, además de numerosos productos elaborados con las raíces y el contenido de sus resinas: A) raíces; B) raíces secas cortas en rodajas; C) polvos comercializados de "batatão" y "jalapa" para la venta en un mercado local; D) jarabe de batatão (Hypólito), extracto alcohólico (Industria Farmacéutica Sobral) y píldoras (Maciel). Todos los productos fueron adquiridos en el Mercado 2000, Santarém, Pará, Brasil en septiembre de 2015.

2.3 Metabolitos secundarios de las convolvuláceas.

La química de la familia de las convolvuláceas ha sido estudiada desde 1950. Algunas especies mostraron actividad antimicrobiana, analgésica, espasmolítica, espasmogénica, hipotensiva, psicomimética y anticancerígena (Pereda-Miranda et al., 2010). Los constituyentes biológicamente activos más comunes provenientes de estas plantas son alcaloides del ergot, alcaloides indolizidínicos, alcaloides nortropanos, compuestos fenólicos, cumarinas, norisoprenoides, diterpenos, isocumarinas, flavonoides, antocianidinas, resinas glicosídicas, lignanos y triterpenos (Meira et al., 2012).

2.3.1 Resinas glicosídicas.

Las resinas glicosídicas son parte de una extensa familia de metabolitos secundarios conocidos como glicolípidos o lipooligosacáridos y son constituyentes de resinas complejas (resinas glicosídicas o glicorresinas) únicas de la familia de las convolvuláceas. Dependiendo de su solubilidad en éter, se clasifican en dos grupos: la jalapina (soluble) y la convolvulina (insoluble) (Ono, 2017).

2.3.1.1 Naturaleza química.

Estos compuestos son derivados glicosilados de ácidos grasos mono o dihidroxilados de 14 a 16 átomos de carbono. Sus estructuras son poco comunes debido a que son metabolitos anfipáticos, es decir, su molécula está compuesta por una porción hidrofóbica (agliconas que corresponden a ácidos grasos) y una porción hidrofílica (núcleo oligosacárido o glicona) (**Figura 11**). Esta última porción está compuesta por un heteropolisacárido de sólo algunos residuos (hasta siete). Las unidades de carbohidratos encontradas en estos metabolitos son D-glucosa, algunos epímeros de hexosas (L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa) en sus formas de piranosa y la pentosa D-xilosa (**Figura 10**) (Pereda Miranda et al., 2010).

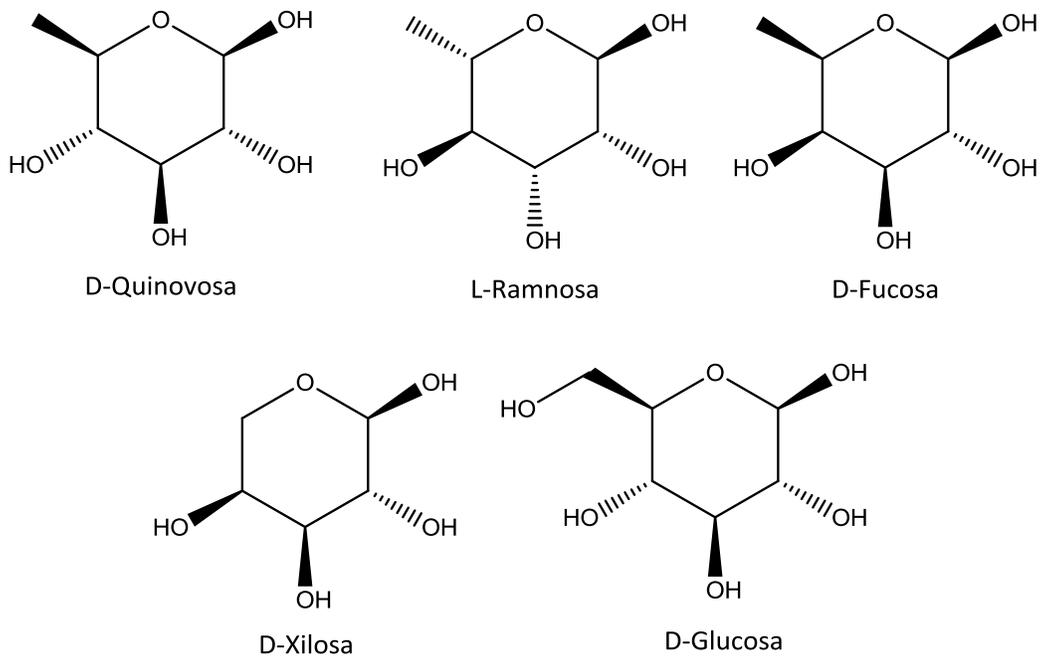


Figura 10. Unidades monosacáridas presentes en las resinas glicosídicas.

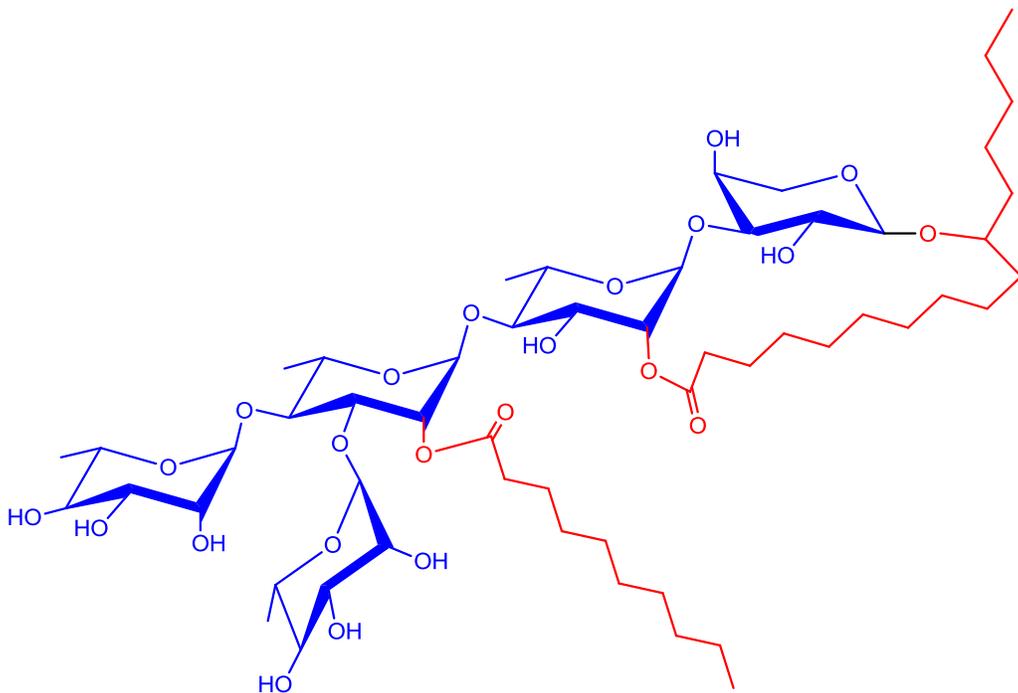


Figura 11. Estructura general de una resina glicosídica macrocíclica anfipática. Porción hidrofílica (azul); porción hidrofóbica (rojo).

Tanto las unidades sacáridas como las agliconas se encuentran unidas entre sí gracias a enlaces *O*-glicosídicos. La complejidad de estas resinas radica en la semejanza estructural de los constituyentes individuales debido a que representan una mezcla de isómeros que involucran variaciones entre los azúcares constitutivos, los ácidos orgánicos esterificantes y los sitios de acilación. Así, la diversidad estructural de estos compuestos surge de las variaciones en el tipo y número de unidades sacáridas que componen a la parte hidrofílica de la molécula, en la secuencia de glicosilación, la posición de lactonización, así como en el número y la posición de los ácidos que se encuentran esterificando a los núcleos oligosacáridos (Rosas-Ramírez et al., 2011). 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), bidesmosídicos (Bautista et al., 2016) y estructuras diméricas tipo éster (Bah & Pereda Miranda, 1997; Castañeda Gómez & Pereda Miranda, 2011).

Entre los sustituyentes de tipo éster más comunes que se encuentran enlazados a los núcleos oligosacáridos se encuentran **los ácidos de cadena alifática corta**: acético (*ac*), propiónico (*pa*), *n*-butírico (*ba*), isobutírico (*iba*), (*2S*)-metilbutírico (*mba*), 3-metilbutírico (*3-mba*), (-)-(2*R*, 3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nílico, *nla*) y tíglico (*tga*); **los ácidos arilalquílicos**: (*E*)-cinámico (*ca*); y **los ácidos grasos saturados** con diferente largo de cadena: *n*-hexanoico (*hexa*) o caproico, *n*-octánico (*deca*) o cáprico, *n*-dodecanoico (*dodeca*) o láurico, *n*-hexadecanoico (*hexadeca*) o palmítico, *n*-octadecanoico (*octadeca*) o esteárico, y *n*-eicosanoico (*eicosa*) (Pereda Miranda et al., 2010).

Los ácidos grasos que con mayor frecuencia representan a las agliconas (una de las porciones lipofílicas de las resinas glicosídicas) son los ácidos (11*S*)-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínolico) y el (11*S*)-hidroxitetradecanoico (ácido convolvulinólico) (Pereda Miranda et al., 2010). Sin embargo, son muy pocos los ejemplos de otras agliconas descritas en la literatura, tal es el caso de los ácidos turpéticos A-C, aislados de la jalapa de la India (*O. turpethum*), los cuales tienen ácidos de 15 a 17 átomos de carbono (Ding, Jiang et al., 2012).

2.3.1.2 Resinas glicosídicas de Operculina.

Debido a la complejidad de las estructuras que conforman a las resinas glicosídicas y a la similitud que guardan entre ellas, la mayoría de las elucidaciones estructurales se realizan a partir de los ácidos glicosídicos, es decir, la molécula se somete a un proceso de saponificación con el fin de reducir la complejidad y facilitar su caracterización estructural (Pereda Miranda et al., 2010).

No fue sino hasta 1989 que un grupo de investigadores japoneses, liderados por Masateru Ono, caracterizaron las primeras resinas glicosídicas intactas provenientes de la raíz de la jalapa brasileña (*O. macrocarpa*) tras haber reconocido siete ácidos operculínicos (A-G) (Figura 12) (Ono et al., 1989), como los núcleos mayoritarios de las resinas glicosídicas.

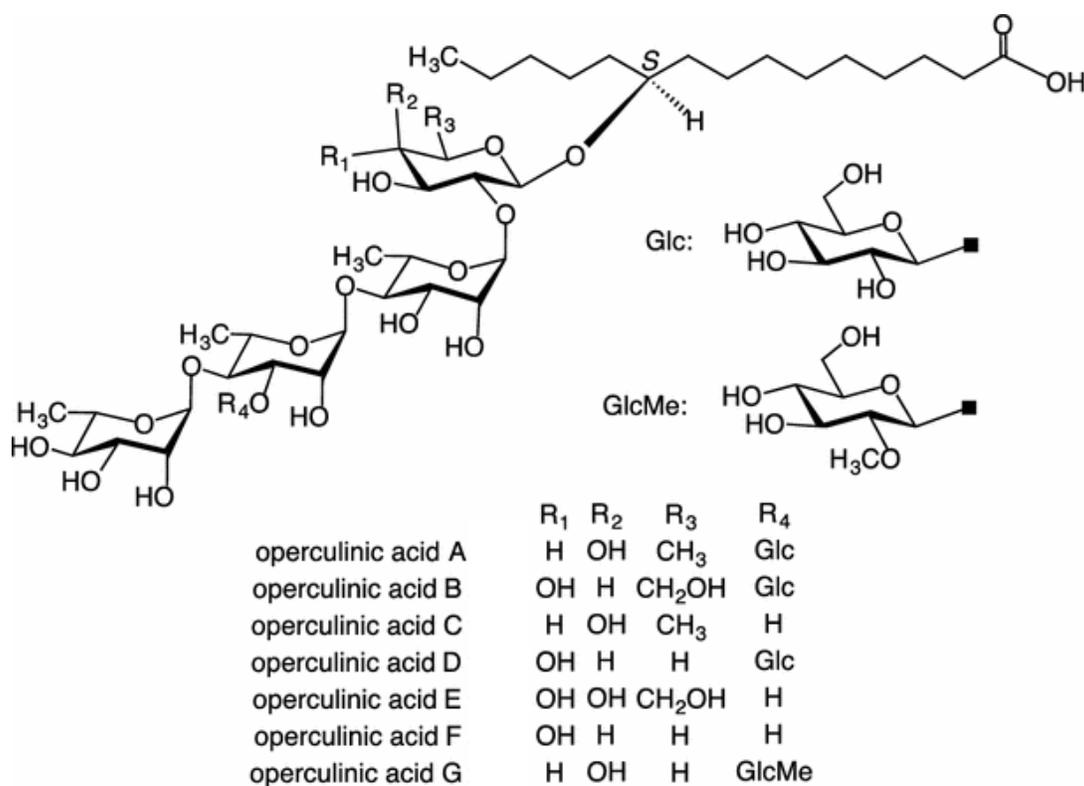
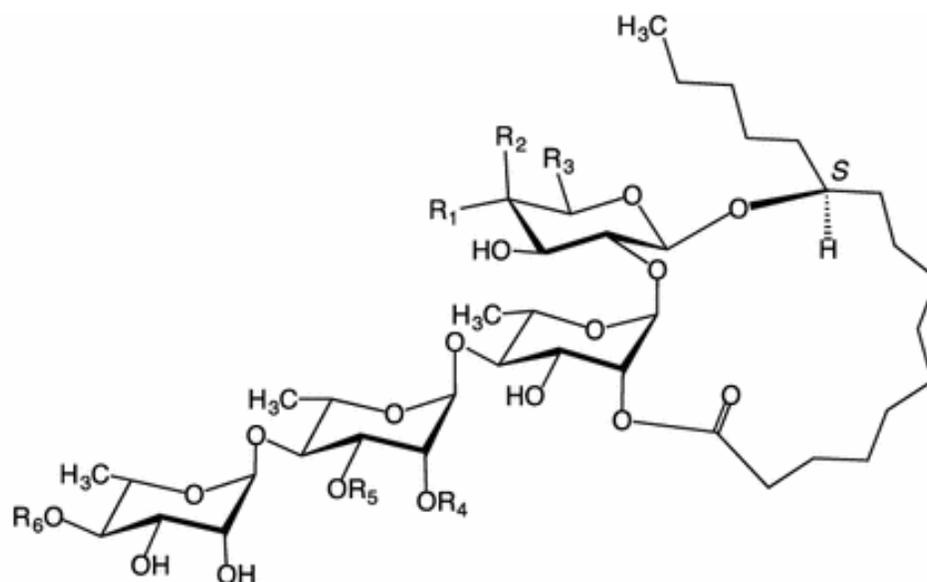


Figura 12. Estructuras de los ácidos glicosídicos aislados de *O. macrocarpa*.



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅	R ₆
operculin I	H	OH	CH ₃	Dodeca	Glc	Dodeca
operculin II	H	OH	CH ₃	Deca	Glc	Deca
operculin III	OH	H	CH ₂ OH	Dodeca	Glc	Dodeca
operculin IV	OH	H	CH ₂ OH	Deca	Glc	Deca
operculin VI	H	OH	CH ₃	Dodeca	H	Dodeca
operculin VII	H	OH	CH ₃	Dodeca	Glc	Deca
operculin VIII	H	OH	CH ₃	Deca	Glc	Dodeca
operculin IX	OH	H	CH ₂ OH	Dodeca	Glc	Deca
operculin X	OH	H	CH ₂ OH	Deca	Glc	Dodeca
operculin XIII	H	OH	CH ₃	Dodeca	Glc	H
operculin XIV	H	OH	CH ₃	Deca	Glc	H
operculin XV	H	OH	CH ₃	H	Glc	Dodeca
operculin XVI	OH	H	CH ₂ OH	Dodeca	Glc	H
operculin XVII	OH	H	CH ₂ OH	Deca	Glc	H
operculin XVIII	OH	H	CH ₂ OH	H	Glc	Dodeca

Figura 13. Resinas glicosídicas aisladas de *O. macrocarpa*.

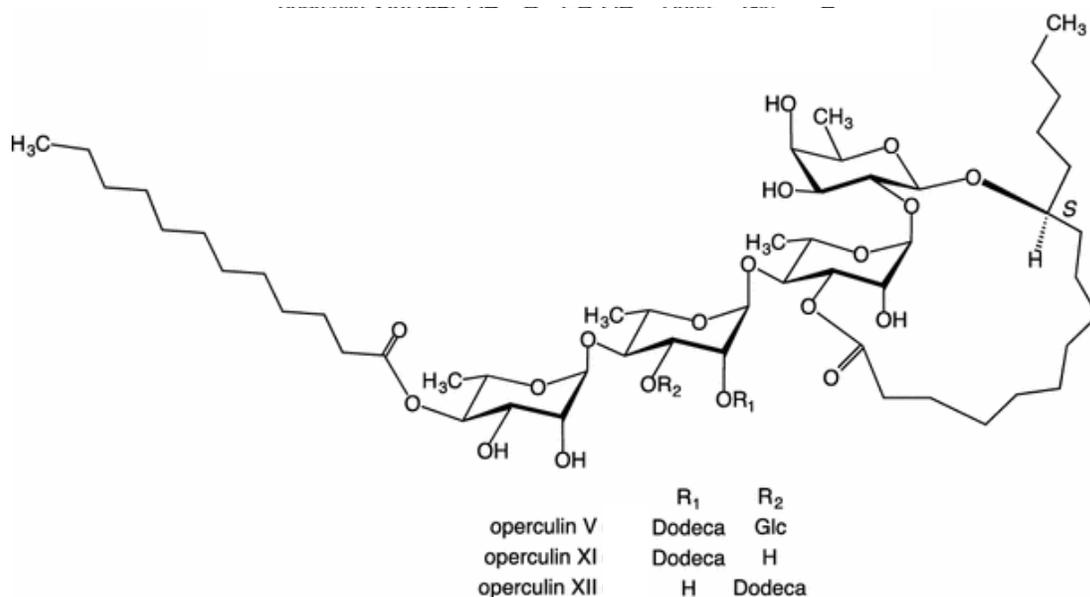


Figura 14. Resinas glicosídicas aisladas de *O. macrocarpa* (continuación).

En las figuras **13** y **14** se ilustran las estructuras de las resinas glicosídicas que han sido aisladas de la “jalapa brasileña de flores blancas” (*O. macrocarpa*). Como se puede apreciar, las diferencias estructurales entre los compuestos son muy sutiles; la posición de lactonización en el núcleo oligosacárido puede ocurrir en la posición C-2 o C-3 de la primera unidad sacárida de ramnosa (Rha). Para la obtención de estas resinas intactas, la fracción de jalapina se fraccionó mediante cromatografía en columna abierta con un soporte de fase reversa (C-18), seguido del empleo de columnas preparativas de octilsilano y usando como método de purificación el reciclaje por HPLC (Ono et al., 1990; Ono et al., 1991).

La elucidación estructural se realizó gradualmente, iniciando con la identificación de los núcleos saponificados, peracetilados y metilados, y prosiguiendo con el análisis a través de RMN 1D y 2D de la estructura intacta perteneciente a los componentes individuales (Ono, 2017).

De la raíz de jalapa de la India (*O. turpethum*) también se han aislado y caracterizado resinas glicosídicas intactas (Ding, Jiang et al., 2012). El equipo de investigadores chinos, encabezados por el Dr. Ding, aislaron en primera instancia, los ácidos glicosídicos

resultantes de la saponificación del extracto crudo de jalapina. De este análisis se obtuvieron tres ácidos mayoritarios, los ácidos turpéticos A, B y C (**Figura 15**).

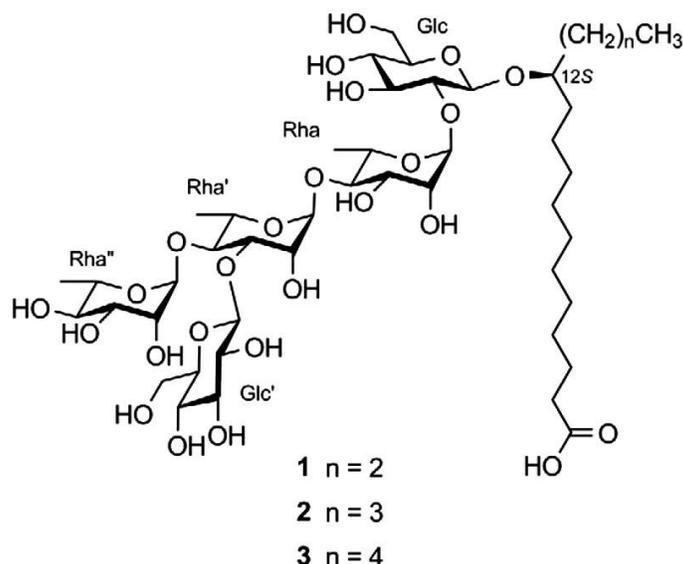


Figura 15. Estructuras de los ácidos turpéticos A-C.

La diferencia entre estos compuestos radica en el largo de la cadena alifática de la aglicona: el ácido turpético A tiene una cadena de C_{15} , mientras que el B una cadena de C_{16} y el ácido C una cadena de C_{17} . La estructura oligosacárida general de estos ácidos glicosídicos está relacionada con los ácidos aislados por Ono en 1989; sin embargo, los ácidos turpéticos son derivados de los ácidos (12S)-monohidroxilados penta, hexa y heptadecanoico, mientras que los operculínicos son derivados del ácido (11S)-hidroxihexadecanoico.

Sólo dos resinas glicosídicas intactas fueron aisladas y elucidadas estructuralmente como macrolactonas de un pentasacárido acilado (**Figura 16**). Este proceso fue posible una vez que se determinaron las estructuras de los núcleos oligosacáridos hidrolizados, debido a la superposición de las señales en los espectros de 1H y ^{13}C RMN.

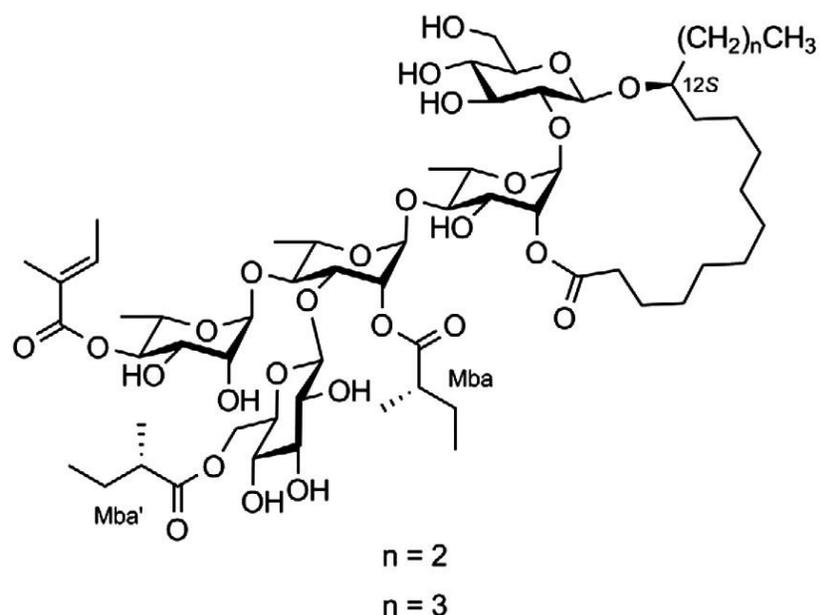


Figura 16. Resinas glicosídicas de *O. turpethum*.

De la “batata de purga”, especie sobre la que este trabajo versa (*O. hamiltonii*), se han identificado núcleos pentasacáridos inéditos derivados de los ácidos 11S y 12S hidroxilados (Jiménez-Bárceñas, 2018; González Pozos, 2018). A partir del extracto saponificado (**Figura 17**) se aislaron tres ácidos glicosídicos conocidos: los ácidos operculínicos A y B (pentasacáridos del ácido 11-hidroxihexadecanoico) y el ácido turpético C (pentasacárido del ácido 12-hidroxiheptadecanoico). También, se obtuvieron y caracterizaron tres ácidos glicosídicos novedosos mediante el empleo de las técnicas de RMN y EM (**cuadro 3**). El análisis estructural permitió identificar la misma secuencia de carbohidratos descrita para los ácidos operculínicos A y C en dos de ellos; sin embargo, su aglicona se identificó como el ácido 12-hidroxiheptadecanoico. El último de estos compuestos presentó el núcleo oligosacárido del ácido operculínico A con el ácido 12-hidroxiheptadecanoico como la aglicona (**Figura 18**).

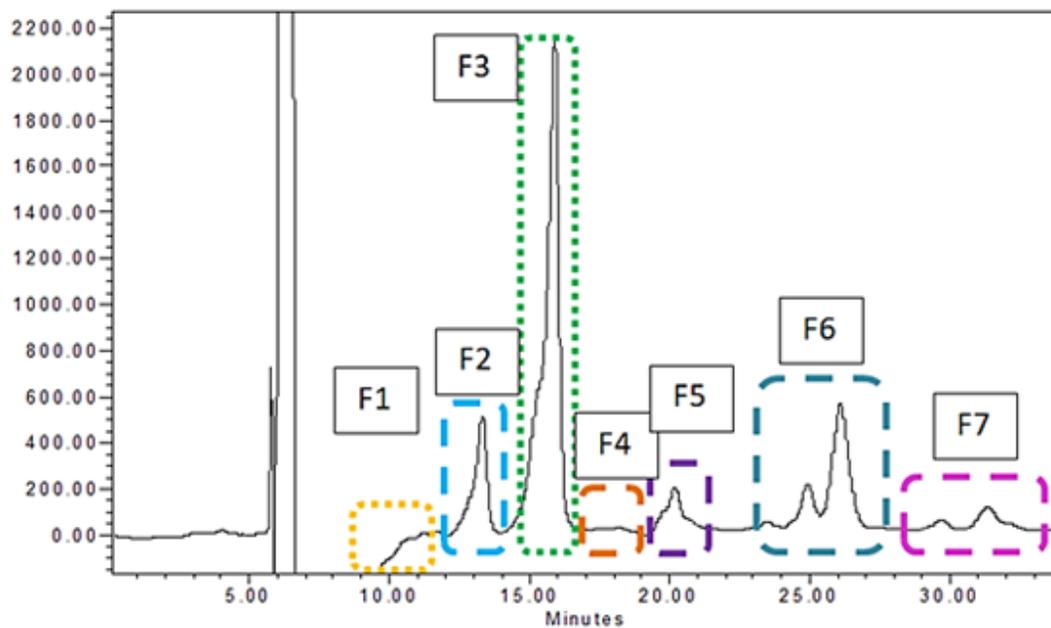


Figura 17. Perfil cromatográfico del extracto saponificado de *O. hamiltonii*.

Cuadro 3. Datos espectrométricos de los eluatos detectados.

t_R (min)	ESIMS $[M+Na]^+$ m/z	Derivado peracetilado: Fórmula Molecular
13.0 (F2)	1603.64565	Ácido operculínico B: $C_{72}H_{108}O_{38}$
15.5 (F3)	1545.63928	Ácido operculínico A: $C_{70}H_{106}O_{36}$ (Figura 18 A)
20.5 (F5)	1617.65308	Ácido operculínico B + CH_2 : $C_{73}H_{110}O_{38}$
26.2 (F6)	1559.65173	Ácido operculínico A + CH_2: $C_{71}H_{108}O_{36}$ (Figura 18B)
31.5 (F7)	1573.66748	Ácido operculínico A + $2 \times CH_2$: $C_{72}H_{110}O_{36}$ (Figura 18C)

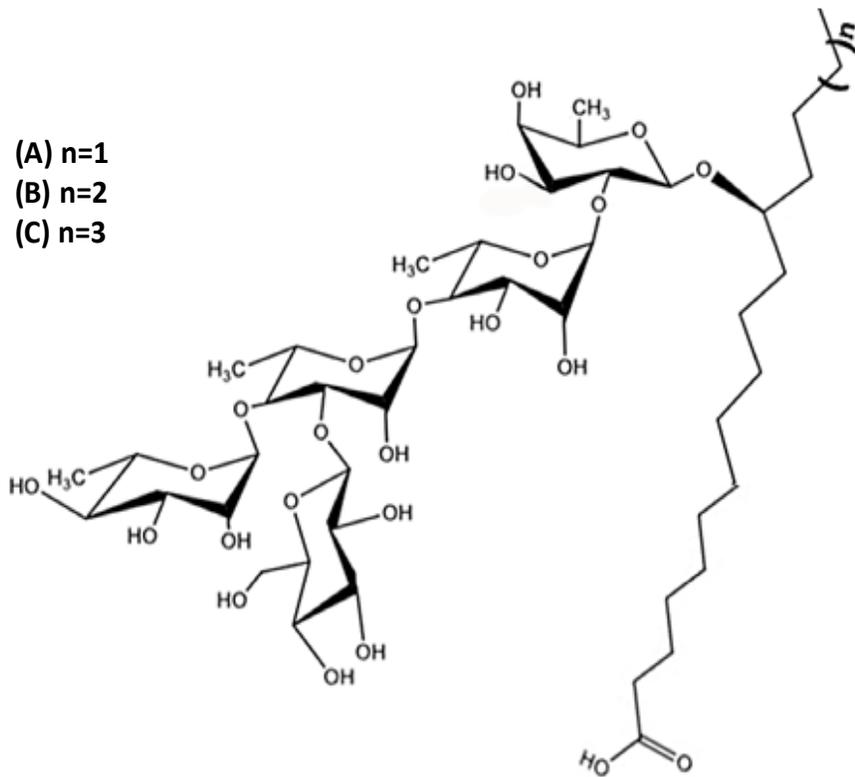


Figura 18. Núcleos oligosacáridos minoritarios constitutivos de las resinas glicosídicas de la jalapa brasileña (*O. hamiltonii*) donde A) presenta una aglicona de C₁₆ (ácido 12S-hidroxihexadecanoico); el compuesto B) una cadena de C₁₇ (ácido 12S-hidroxiheptadecanoico); y el compuesto C) una aglicona de C₁₈ (ácido 12S-hidroxiocetadecanoico).

De acuerdo con la naturaleza química de las resinas glicosídicas que las caracteriza por ser moléculas anfipáticas, el aislamiento y la purificación de éstas no es una tarea sencilla, debido a que siempre están presentes en forma de mezclas complejas de homólogos que tienen el mismo núcleo oligosacárido, pero con mínimas diferencias ya sea en el largo de la cadena de las porciones alifáticas esterificantes o en los sitios de acilación en el núcleo oligosacárido (Pereda-Miranda et al., 2002; 2010). Por lo tanto, los métodos tradicionales para el aislamiento y la purificación de productos naturales, tales como el reparto líquido-líquido, la cromatografía en capa fina y cromatografía en columna abierta, usando como soporte gel de sílice, intercambio iónico y filtración en gel (sephadex), resultan ser técnicas inapropiadas (Pereda-Miranda et al., 2010).

Desde los inicios de su creación, cerca de los años sesenta, la técnica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia 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. También, para aquellos compuestos cuyo análisis por medio de técnicas como la cromatografía de gases se encuentra limitado, tal es el caso de algunos polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, entre otros (Snyder & Kirkland, 1979). La técnica de HPLC ofrece una resolución máxima de una mezcla compleja en un tiempo de análisis corto, con la disponibilidad de fases estacionarias (en fase normal y reversa) de partículas porosas pequeñas (< 25 μm) 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 1987, se publicó por primera vez el aislamiento y la purificación de resinas glicosídicas empleando la técnica de HPLC, logrando elucidar la estructura de cuatro lipotetrasacáridos acilados: las orizabinas I-IV (Noda et al., 1987). Este trabajo demostró que, debido a la complejidad estructural de las resinas glicosídicas, se requiere el empleo de técnicas cromatográficas y métodos espectroscópicos modernos de alta resolución (como las técnicas de HPLC y RMN) para lograr la purificación total y la caracterización estructural de los constituyentes individuales presentes en las resinas de las convolvuláceas.

El éxito en la purificación (> 99%) de los glicolípidos constitutivos de las resinas glicosídicas empleando HPLC, se debe primordialmente al uso de la técnica conocida como “corte de núcleo”, seguida del “reciclaje de pico” (Bah & Pereda-Miranda, 1997; Pereda-Miranda & Hernández-Carlos, 2002). Esta última técnica requiere del empleo de una válvula de reciclaje que permite la reintroducción en la columna cromatográfica de la muestra problema tantas veces como sea necesario y, de esta forma, se incrementa el número de platos teóricos mejorando la resolución de los picos en análisis. El objetivo del reciclaje es el de incrementar la eficiencia de la separación mientras se mantiene al mínimo la distorsión del pico. Además, una de las principales ventajas es que no se requiere nuevo disolvente para cada periodo del reciclaje. El procedimiento finaliza cuando se observa una señal como

un pico de comportamiento gaussiano, sin la presencia de picos minoritarios como indicativos de impurezas (**Figura 19**) (Pereda-Miranda & Hernández-Carlos, 2002). Esta técnica se emplea para el aislamiento y la purificación de diferentes tipos de productos naturales incluyendo enantiómeros, diastereoisómeros, epímeros, isómeros posicionales y compuestos estructuralmente relacionados con tiempos de retención similares (Sidana & Joshi, 2013) y ha permitido la purificación de numerosos oligosacáridos de resinas glicosídicas, tal es el caso de las tricolorinas (Bah & 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 (Escobedo-Martínez et al., 2010), los purginósidos y las purginas (Castañeda-Gómez y Pereda-Miranda, 2011), entre otros.

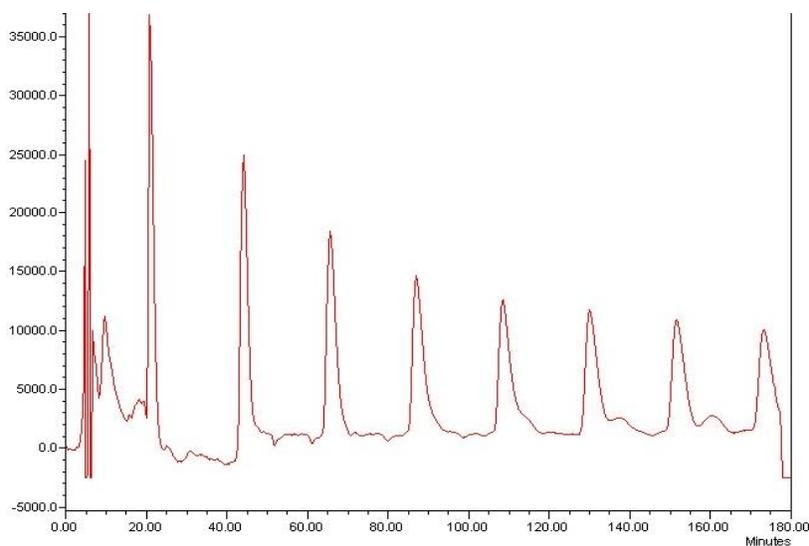


Figura 19. Ejemplo de un cromatograma generado mediante la técnica de reciclaje.

2.5 Elucidación estructural.

Como se mencionó en el inciso 2.3.1.2, para llevar a cabo la elucidación estructural de las resinas glicosídicas se requiere del empleo de métodos degradativos (reacciones de derivatización), así como técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución.

2.5.1 Métodos degradativos.

Son reacciones químicas que se usan con el fin de romper de manera paulatina la estructura compleja y generar moléculas más pequeñas y, así, simplificar la elucidación estructural al identificar las diferentes porciones de la molécula. Una de estas reacciones es la hidrólisis alcalina (saponificación) del extracto obtenido a partir del material vegetal, con la que se logran obtener los ácidos orgánicos que esterifican al núcleo oligosacárido y la apertura, según sea el caso, del ciclo que forma la macrolactona. Los productos de hidrólisis solubles en la fase orgánica se someten a una reacción de derivatización para formar el éster metílico y se analizan por CG acoplada a EM (Pereda Miranda et al., 2010). El ácido glicosídico soluble en agua se recupera mediante extracción con *n*-butanol.

2.5.2 Métodos no degradativos.

El empleo de técnicas espectroscópicas como RMN y EM-AR son herramientas muy efectivas para la elucidación estructural de los lipooligosacáridos sin la necesidad de utilizar técnicas que degraden el producto original.

A partir de la generación de los perfiles de RMN ^1H y ^{13}C de los productos intactos y de sus ácidos glicosídicos, se obtiene información acerca de la estructura del núcleo oligosacárido constitutivo, como la identificación del número y tipo de unidades sacáridas. Al recurrir a las técnicas bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY y ROESY), y heteronucleares (HSQC y HMBC), se asigna la conectividad de cada uno de los constituyentes dentro de la molécula (Pereda-Miranda et al., 2010).

3. JUSTIFICACIÓN.

Las resinas glicosídicas de la familia de las convolvuláceas representan una fuente potencial para la búsqueda de nuevas sustancias químicas con posible aplicación terapéutica y agroquímica debido a su amplia gama de actividades biológicas, tal es el caso de sus propiedades purgantes, fotoinhibidoras, citotóxicas y antimicrobianas. El aislamiento y la purificación, así como la elucidación estructural de las resinas glicosídicas, ha representado un reto para los investigadores químicos debido a su complejidad estructural y propiedades anfipáticas que dificultan su purificación mediante técnicas cromatográficas convencionales. En este contexto, resulta útil el desarrollo de nuevos métodos analíticos que permitan una alta eficiencia al momento del aislamiento, la purificación y la elucidación estructural de estos compuestos para que funjan como marcadores químicos que permitan la diferenciación entre las especies que conforman los complejos de estas plantas medicinales. Sólo de esta manera se podrá validar su uso etnomédico adjudicando sus propiedades terapéuticas a los metabolitos perfectamente caracterizados y así autenticar el contenido químico que se comercialice en cada muestra.

4. HIPÓTESIS

El extracto obtenido por medio de una mezcla proporcional entre etanol y diclorometano a partir de la droga cruda de la jalapa brasileña presenta un alto contenido de resinas glicosídicas biodinámicas que permitirán su aislamiento y purificación a una escala que facilite su posterior elucidación estructural mediante técnicas espectroscópicas como la RMN y así ampliar el conocimiento sobre la diversidad estructural de estos principios y reconocer los requerimientos estructurales para su actividad como inhibidores de las bombas de eflujo en células tumorales.

5. OBJETIVOS.

5.1 Objetivo general.

Establecer un método analítico en HPLC para la logar la óptima separación y purificación de las resinas glicosídicas mayoritarias presentes en el extracto obtenido con una mezcla de CH_2Cl_2 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:1) de las raíces pulverizadas de la jalapa brasileña. Emplear técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución para la caracterización estructural de los componentes purificados.

5.2. Objetivos específicos.

-Realizar un fraccionamiento primario con el fin de reducir la complejidad de la mezcla obtenida a partir del extracto orgánico. Encontrar las condiciones instrumentales a escala analítica en HPLC para la obtención de los perfiles cromatográficos de las fases que contengan las resinas glicosídicas obtenidas del extracto orgánico.

-Extrapolar las condiciones analíticas a escalas preparativas en HPLC con el fin de separar y purificar los componentes químicos presentes en las fracciones en el extracto orgánico.

-Hacer uso de técnicas como la RMN (1D y 2D) y la EM para la elucidación estructural de los compuestos mayoritarios purificados.

6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

6.1 Métodos cromatográficos.

El fraccionamiento primario del extracto orgánico se realizó mediante CCA. Para ello, se empleó una columna de vidrio de 60 cm de largo por 15 cm de diámetro, empacada con gel sílice 60, de tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, Merck. Como fase móvil se emplearon los disolventes: hexano, diclorometano, acetona, metanol, y mezclas proporcionales entre estos de mayor polaridad.

Con el fin de identificar las fracciones que contenían los compuestos de interés, éstas se analizaron a través CCF, usando cromatoplasmas metálicas recubiertas con gel sílice F₂₅₄ (Merck) y un sistema de elución que consistió en una mezcla de acetona-metanol (9:1). Como agente cromógeno se utilizó una solución de sulfato cérico diluido en ácido sulfúrico y se calentaron las placas a 80 °C en una parrilla de calentamiento para ser reveladas.

Se empleó HPLC con la intención de separar y purificar los compuestos de interés identificados en las fracciones obtenidas del extracto. El equipo que se empleó tanto para generar los perfiles como para separar y purificar los compuestos, consta de un sistema de liberación de disolventes 600 E (Waters) con una válvula para la recirculación de la muestra y un detector de índice de refracción modelo 410 (Waters) integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466, Dell). El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de la información cromatográfica fueron operados a través del software Empower 2 (Waters).

6.2 Material vegetal.

El material vegetal corresponde a una muestra comercial que consistía de las raíces pulverizadas de *O. macrocarpa* adquiridas bajo el nombre de jalapa (“batata de purga”) 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 esta especie (Michelin Carvalho et al., 2010).

6.3 Preparación del extracto orgánico.

Se pesó un total de 868.5 g de la muestra comercial y se sometió a un proceso de maceración exhaustiva con una mezcla de disolventes CH_2Cl_2 - $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (1:1). El extracto se llevó a sequedad al vacío para su posterior análisis.

6.4 Fraccionamiento primario del extracto orgánico.

El fraccionamiento primario del extracto (30 g) se llevó a cabo haciendo uso de la técnica en CCA. La columna se empacó con 200 g de gel de sílice y como fase móvil se emplearon las mezclas de disolventes enumeradas en el **cuadro 4**.

Inicialmente, la elución se llevó a cabo con hexano, obteniéndose cuatro eluatos de 50 mL cada uno. Posteriormente, la elución se continuó incrementando la polaridad de la fase móvil con mezclas entre CH_2Cl_2 - Me_2CO , Me_2CO - MeOH en diferentes proporciones. Las fracciones se analizaron mediante CCF para establecer la complejidad preliminar de cada fracción (**Cuadro 4**).

Cuadro 4. Fraccionamiento primario.

Eluato	Disolvente	Proporción	Clave
1	Hexano	100	F0
2	CH ₂ Cl ₂ - Me ₂ CO	8:2	F1
3	CH ₂ Cl ₂ - Me ₂ CO	1:1	F2
4	Me ₂ CO - CH ₂ Cl ₂	8:2	F3
5	Me ₂ CO	100	F4
6	Me ₂ CO - MeOH	8:2	F5
7	Me ₂ CO - MeOH	1:1	F6
8	MeOH - Me ₂ CO	8:2	F7
9	MeOH	100	F8

6.5 Separación y purificación de las resinas glicosídicas.

6.5.1 Obtención de perfiles cromatográficos a escala analítica.

Mediante CCF se eligieron las fracciones que contenían los compuestos de interés. Se seleccionó la fracción F4 tomando en cuenta que, de acuerdo a su polaridad (Ono et al., 1992; 1991; Noda et al., 1987; 1992), podría contener resinas glicosídicas inéditas.

Para encontrar las condiciones instrumentales a escalas analíticas que permitieran la óptima resolución de los picos presentes en la muestra, se realizaron una serie de experimentos (modo isocrático) variando las proporciones de la fase móvil (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Condiciones instrumentales en escala analítica de los ensayos realizados.

Ensayo	Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo	Concentración de la muestra	Volumen de inyección
1	C ₁₈ (4.6 × 250 mm) Waters Symmetry®	CH ₃ CN 100	0.4 mL/min	10 mg/ 100 µL	20 µL
2	C ₁₈ (4.6 × 250 mm) Waters Symmetry®	CH ₃ CN:H ₂ O 9:1	0.4 mL/min	10 mg/ 100 µL	20 µL
3	C ₁₈ (4.6 × 250 mm) Waters Symmetry®	CH ₃ CN:H ₂ O 4:1	0.4 mL/min	10 mg/ 100 µL	20 µL
4	C ₁₈ (4.6 × 250 mm) Waters Symmetry®	CH ₃ CN:H ₂ O 17:3	0.4 mL/min	10 mg/ 100 µL	20 µL

6.5.2 Purificación de los compuestos mayoritarios.

Con base en los perfiles obtenidos a escala analítica, se concluyó que las condiciones que mostraban una mejor resolución fueron las establecidas en el ensayo 4. Con la intención de separar y purificar la mayor cantidad de muestra posible, las condiciones en escala analítica se extrapolaron a condiciones preparativas con la siguiente ecuación.

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

Donde F_p = flujo a nivel preparativo; F_a = flujo a nivel analítico; L_p = longitud de la columna preparativa; L_a = longitud de la columna analítica; d_p = diámetro interno de la columna preparativa; d_a = diámetro interno de la columna analítica.

Se hizo uso de la técnica “corte de núcleo” para separar los compuestos y la técnica de “reciclaje” para purificarlos (Pereda Miranda & Hernández-Carlos, 2002).

6.6 Determinación de constantes físicas y propiedades espectroscópicas.

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Jones sin corrección. Los experimentos de RMN ^1H y ^{13}C se registraron en un equipo Varian Innova operando a una frecuencia de 400 MHz para ^1H y 100 MHz para ^{13}C . Se empleó piridina deuterada (piridina- d_5) como disolvente y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm utilizando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS).

6.7 Determinación de propiedades espectrométricas.

Cada compuesto se analizó por UPLC-MS para determinar su masa molecular mediante infusión directa empleando la técnica de ionización por electrospray en un equipo Waters Acquity UHPLC-H class system (Waters) acoplado a un espectrómetro de masas tipo cuadrupolo simple SQD2 ajustado para coleccionar datos entre valores de m/z de 150 y 2000. El voltaje para ambos modos de ionización positivo y negativo fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador a 25 bar. Las muestras se disolvieron en MeOH para obtener una concentración final de 1 mg/mL. Se determinó el peso molecular mediante los valores de m/z para las especies $[\text{M}+\text{Na}]^+$ y $[\text{M}-\text{H}]^-$ en los espectros generados.

6.8. Derivatización del Pico F4P7.

6.8.1 Reacción de saponificación.

Se pesaron 15 mg del pico F4P7 y se adicionaron 5 mL de KOH 5%. La mezcla se mantuvo en reflujo en un baño de aceite a 95 °C durante 3 h. Se ajustó el pH a 5 con HCl 1N y se extrajo con diclorometano (3 × 25 mL). La fracción orgánica se analizó mediante CG-EM empleando un equipo marca Thermo-Electron con una columna DB-5MS, 5%-fenilmetilpolisiloxano (30 m × 0.25 mm, 0.1 μm), como fase estacionaria, y He como fase móvil, a una velocidad lineal de 30 cm/s, isotérmico a 50 °C durante 4 min y con un gradiente lineal de 40° C/min hasta 300° C, manteniendo la temperatura final durante 20 minutos. Las condiciones para el análisis de EM fueron: energía de ionización 70 eV, temperatura de la fuente de ionización 250° C, temperatura de la interface 270° C, rango de masa/carga

registrado 45-600 uma. Estas condiciones permitieron la identificación de un pico con t_R 8.01 min: $[M]^+$ 200 (9; $C_{12}H_{24}O_2$), 183 (2), 171 (15), 157 (38), 143 (9), 129 (45), 115 (22), 101 (15), 85 (30), 73 (100), 60 (68), 57 (30), 55 (30). Este proceso se realizó para el pico F4P4 (10 mg) y el análisis de la fracción orgánica permitió la detección de un pico con t_R 7.4 min: $[M]^+$ 172 (5; $C_{10}H_{20}O_2$), 155 (1), 143 (8), 129 (50), 115 (12), 112 (8), 87 (16), 73 (100), 60 (90), 57 (32), 55 (30)

La fase acuosa resultante de la saponificación, de cada uno de los dos picos tratados, se sometió individualmente a extracciones con *n*-butanol (3 × 250 mL). La fracción orgánica se lavó con agua (2 × 50 mL). Finalmente, se evaporó la fracción orgánica obtenida con ayuda de una bomba de alto vacío, obteniéndose 5.0 mg para el pico F4P4 y 8.0 mg para el pico F4P7. Posteriormente, los productos de saponificación se peracetilaron.

6.8.2 Reacción de acetilación.

En forma individual, se disolvieron 5.0 mg del producto saponificado del pico F4P4 y 8.0 mg del derivado del pico F4P7 en 1 mL de piridina y 2 mL de anhídrido acético. Las mezclas se dejaron en agitación a temperatura ambiente durante 48 hrs. Se adicionaron 30 mL de agua destilada y 50 mL de acetato de etilo y se dejaron en agitación por 5 minutos. Se separaron las fases en un embudo de separación y se efectuaron dos extracciones sucesivas con 30 mL de acetato de etilo. Las fases orgánicas se trataron con HCl 1N (2 × 50 mL), seguida de un tratamiento con una solución saturada de $NaHCO_3$ (2 × 40 mL). Por último, estas mezclas se lavaron con agua destilada (1 × 40 mL), se secaron con Na_2SO_4 anhidro y se concentraron a presión reducida, obteniéndose 3.5 mg del derivado peracetilado del ácido glicosídico de F4P4 y 6.9 mg del producto acetilado de F4P7.

Ácido operculínico A peracetilado: Sólido amorfo blanco; p.f. 105-109 °C; $[\alpha]_D = -40$ (c 0.14, MeOH); RMN 1H y ^{13}C (**Cuadro 9, Anexos**); HRESIMS (modo positivo) m/z 1545.63928 $[M + Na]^+$ (calculada para $C_{70}H_{106}O_{36}Na$ requiere 1545.63560).

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

7.1 Preparación del extracto orgánico.

De los 868.5g de muestra que fueron sometidos a maceración exhaustiva, se obtuvieron 48.8g de extracto orgánico seco.

7.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico.

Del fraccionamiento primario se obtuvieron ocho fracciones de interés que, de acuerdo con la coloración generada mediante la aplicación del agente cromógeno (**Figura 20**), podrían contener resinas glicosídicas. Los rendimientos y las claves de cada una de estas fracciones se enlistan en el **cuadro 6**.

Cuadro 6. Rendimientos del fraccionamiento primario del extracto

Clave	Peso (g)
F1	1.9491
F2	3.6021
F3	4.1375
F4	4.1375
F5	5.165
F6	3.3566
F7	4.7627
F8	1.1321

Cada una de las fracciones se eluyó en una placa de aluminio recubierta de gel de sílice, usando como fase móvil una mezcla de acetona y metanol en una proporción 9:1. Se usó como referencia a la tricolorina A (**Figura 20**).

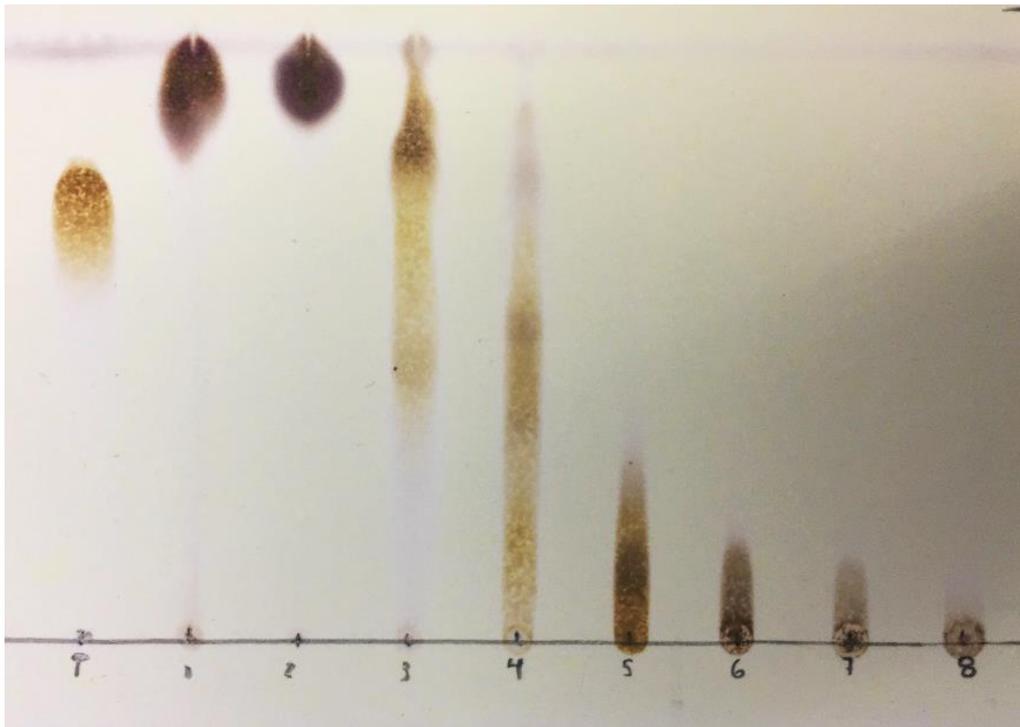


Figura 20. Placa cromatográfica de las fracciones F1-F8, usando como referencia la tricolorina A, resina glicosídica mayoritaria del “queiebraplatos” (*I. tricolor*).

7.3 Aislamiento de las resinas glicosídicas mediante HPLC.

7.3.1 Obtención de los perfiles cromatográficos a escala analítica.

Se eligió analizar la mezcla que constituía la fracción F4 mediante HPLC para obtener los perfiles cromatográficos y así poder establecer las condiciones que propiciarán la resolución del cromatograma. Con base en los perfiles obtenidos, se concluyó que las condiciones analíticas que permitían la mejor resolución de la muestra constaban de: una columna Waters Symmetry® C-18 (4.6 × 250 mm, 5 μ); fase móvil: CH₃CN:H₂O (17:3); flujo: 0.4 mL/min; detector: índice de refracción; volumen de inyección de la muestra: 20 μ L (1 mg/ μ L) (**Figura 21**).

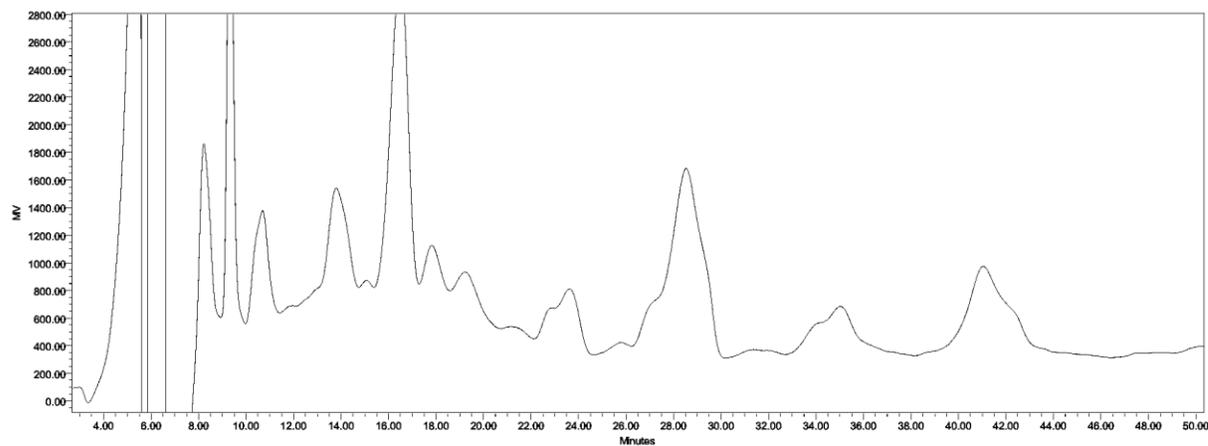


Figura 21. Fase móvil: CH₃CN:H₂O (17:3); Flujo: 0.4 mL/min.

7.3.2 HPLC a escala preparativa.

Las condiciones instrumentales analíticas, que resultaron óptimas para la resolución de la muestra en el perfil cromatográfico (Ver sección 6.5.1), se extrapolaron a condiciones preparativas con el fin de aislar los componentes individuales que se encontraban en esta fase. Las condiciones finales resultaron ser: columna Waters Symmetry® C-18 (19 x 300 mm, 7 μ); fase móvil: CH₃CN:H₂O (17:3); flujo: 8.00 mL/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 1024); volumen de inyección: 500 μL (50 mg/500 μL en metanol).

Tras haber realizado 20 inyecciones (500 μL [0.1mg/μL]) de la muestra problema (F4) y, después de haber cortado cada uno de los picos como se muestra en la **Figura 22**, se lograron obtener once fracciones de una complejidad menor. En el **Cuadro 7** se especifican las cantidades obtenidas de cada una de las eluatos colectados.

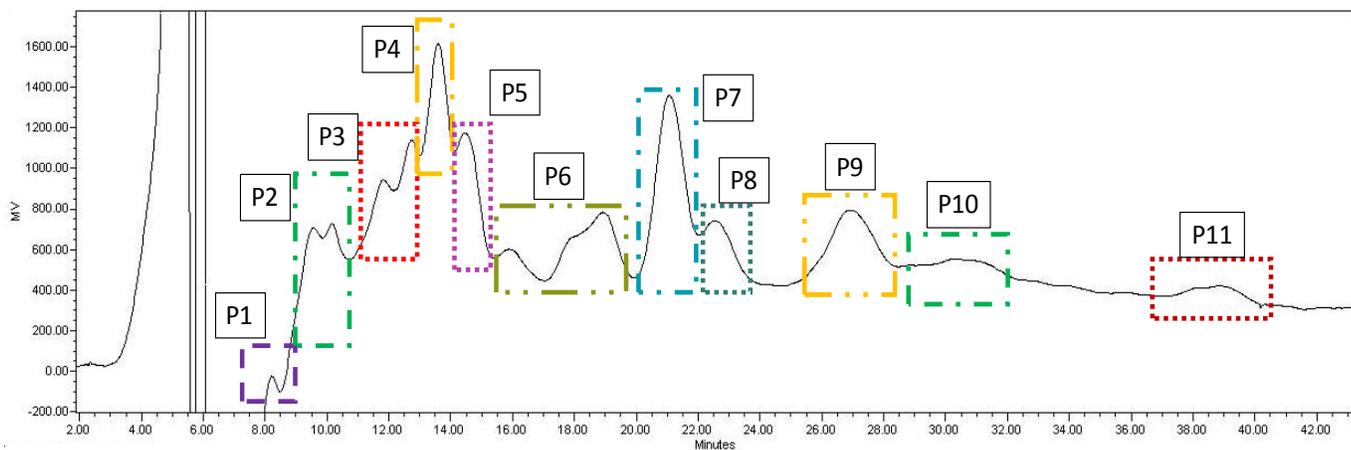


Figura 22. Perfil cromatográfico a escala preparativa donde se muestran los picos aislados mediante la técnica “corte de núcleo”.

Cuadro 7. Rendimientos del fraccionamiento de F4.

Pico	t_R (min)	Cantidad (mg)
P1	8.4	329.4
P2	10.3	20.4
P3	12.5	16.3
P4	13.2	16.9
P5	14.6	10.7
P6	15.0-19.8	22.6
P7	21.2	17.2
P8	22.5	12.8
P9	26.8	12.1
P10	31.2	12.4
P11	37.6-40.0	20.1

7.4 Purificación y elucidación estructural.

7.4.1 Purificación de las resinas glicosídicas.

Las fracciones etiquetadas como F4P7 y F4P4 se sometieron en su totalidad a las técnicas descritas en el punto anterior con la intención de obtener el componente mayoritario purificado de cada una de las fracciones. Este proceso se llevo a cabo en un equipo de HPLC a nivel semipreparativo bajo las condiciones instrumentales siguientes: columna C-18 Waters SymmetryPrep® (19 × 150 mm, 7 μ); fase móvil: CH₃CN:H₂O (17:3); flujo 4.00 mL/min; detector: índice de refracción Waters 2440; volumen de inyección: 500 μ L (0.1mg/ μ L). La técnica de rasurado de pico permitió la eliminación de homólogos que se encuentran en menor proporción con respecto al pico mayoritario (**Figuras 23 y 24**). Este procedimiento permitió la separación de los componentes mayoritarios para cada una de las fracciones analizadas. El **cuadro 8** presenta una comparación entre algunas constantes físicas y las condiciones iniciales empleadas en la purificación de los compuestos individuales.

Cuadro 8. Rendimientos en HPLC y constantes físicas de los compuestos P4 y P7.

	P4	P7
Cantidad reciclada	16.9 mg	17.2 mg
Número de ciclos empleados	9	7
Cantidad obtenida	8 mg	16 mg
Punto de fusión	95-98 °C	118-120 °C
$[\alpha]_D^{22}$ (c 0.01, MeOH)	-16.7	-51.0

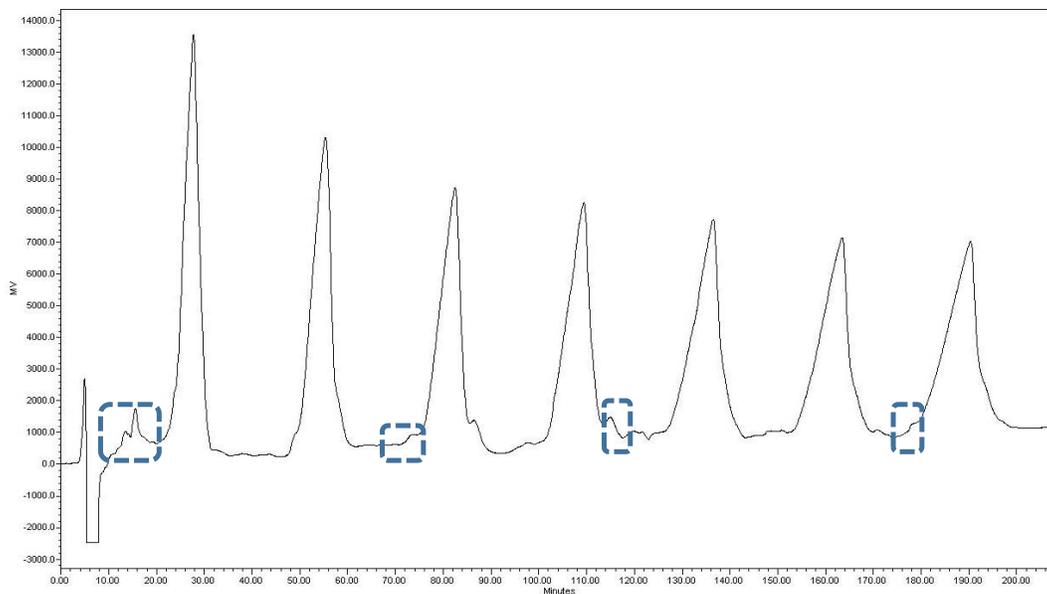


Figura 23. Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave F4P7, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.

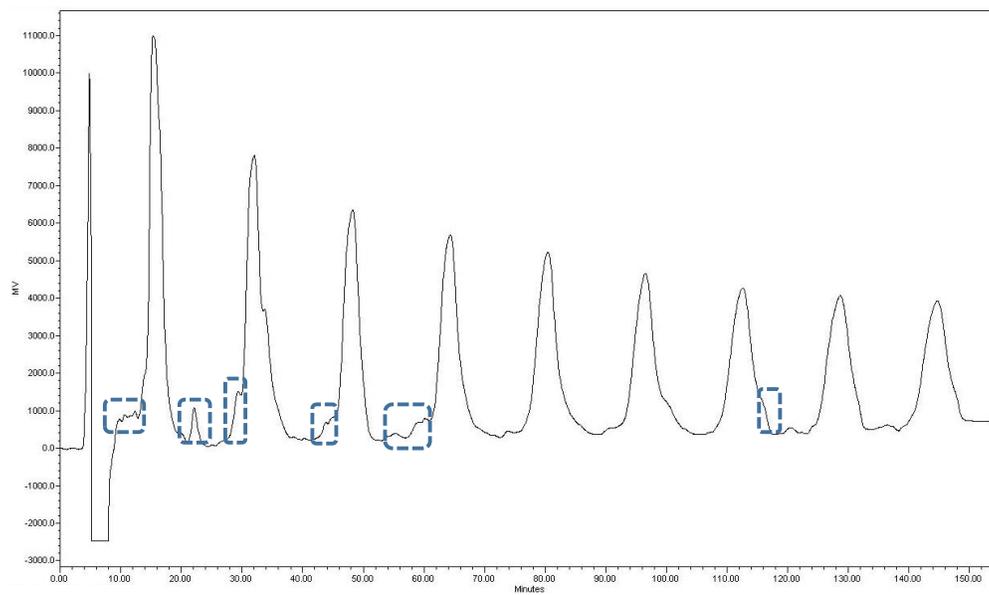


Figura 24. Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave F4P4, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.

7.4.2 Elucidación estructural de los compuestos mayoritarios.

7.4.2.1 Elucidación del núcleo oligosacárido.

Los derivados saponificados y peracetilados de los compuestos F4P4 y F4P7 fueron cromatográficamente idénticos (t_R 15.5 min) por lo que se reunieron y se analizaron mediante RMN 1H y ^{13}C con la intención de confirmar la identidad del núcleo oligosacárido del producto intacto. Los espectros registrados para este compuesto fueron comparados con los descritos para el derivado peracetilado del ácido operculínico A (**Figura 25**) previamente caracterizado en las resinas en las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa (Castañeda-Gómez; 2011).

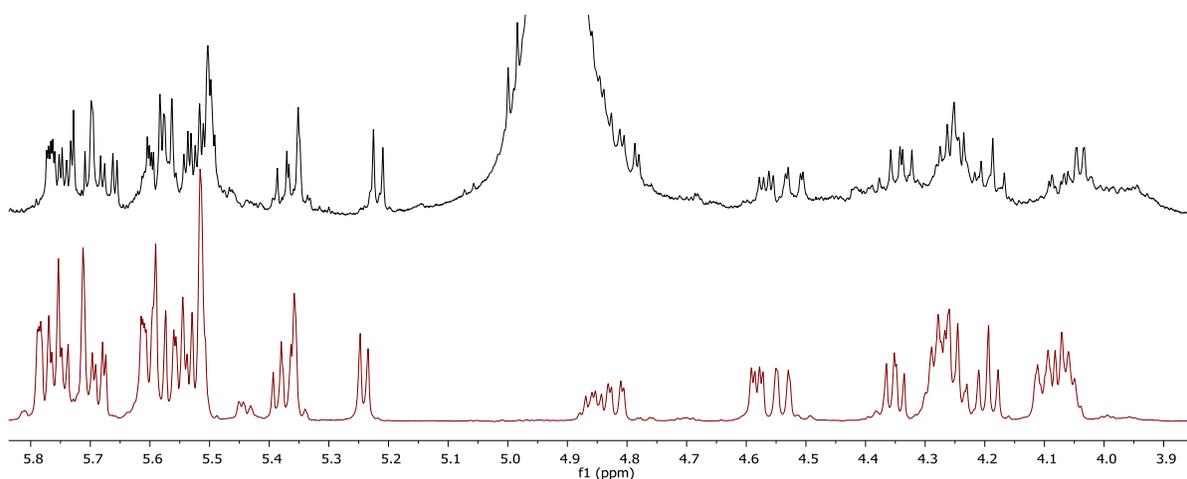


Figura 25. Comparativo entre los espectros de RMN 1H del derivado saponificado peracetilado del compuesto F4P7 (trazo inferior) y del derivado peracetilado del ácido operulínico A previamente caracterizado en las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa. (trazo superior).

Se observaron cinco señales de protones anoméricos en la región entre δ_H 5.26–5.71 ppm (**Figura 26**) que se encuentran correlacionando con cinco señales de carbono entre δ_C 98.5 y 100.8 ppm (**Figura 27**), interacciones confirmadas por HSQC. De acuerdo a los patrones de acoplamiento observados para los protones de las unidades monosacáridas, se logró

establecer su naturaleza. De esta forma, la señal desplazada a δ_H 4.99 posee un patrón de acoplamiento como un doblete ($^3J_{H-H} = 7.5$ Hz) que es característico de la D- fucosa. Adicionalmente, la señal a δ_H 5.22 se presenta en forma de un doblete ($^3J_{H-H} = 7.5$ Hz) con el desplazamiento químico característico de una unidad de D-glucosa. Finalmente, las señales centradas en 5.35, 5.50 y 5.70 ppm se presentaron como singuletes anchos generados por los protones anoméricos de tres unidades de L-ramnosa. Otra característica importante fue el número de señales dobles observadas entre 1.4-1.7 ppm y que corresponden a los protones de los grupos metilo de las 6-desoxihexosas. Así, cuatro dobletes fueron observados en esta región indicando la presencia de cuatro metilpentosas en el núcleo pentasacárido (**Figura 26**). Con la ayuda de las técnicas COSY y TOCSY, se logró resolver la asignación de las señales para los metilos centrados entre δ_H 4.0-6.0 ppm y que son atribuibles a cada unidad monosacárida.

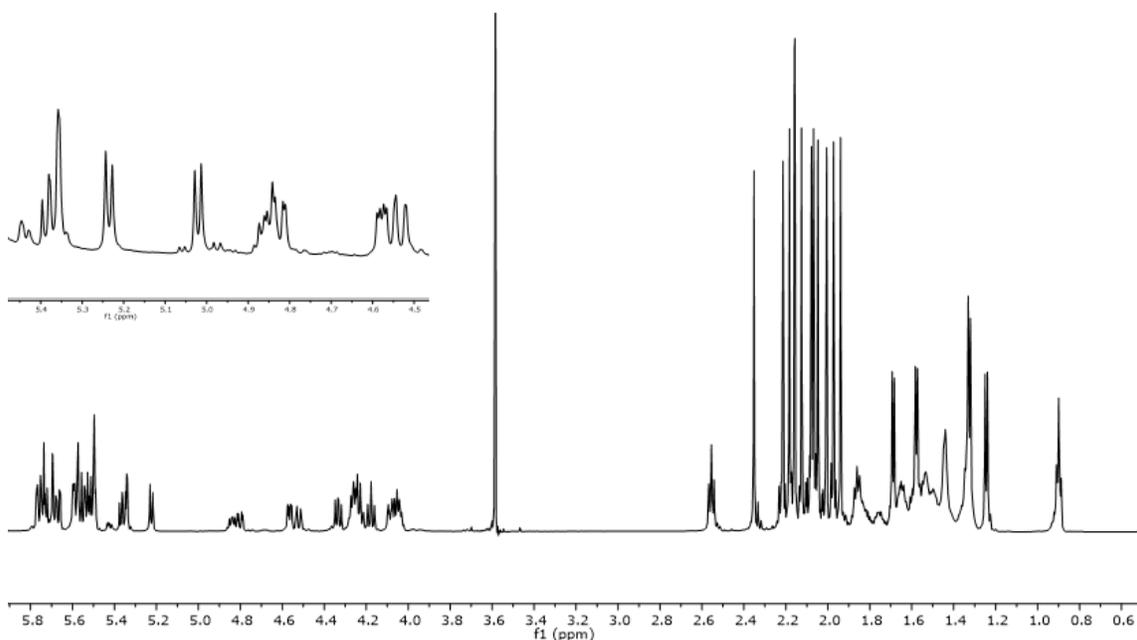


Figura 26 Espectro de RMN ¹H del ácido operculínico A peracetilado (800 MHz, C₅D₅N, con supresión de H₂O, δ_H 5.00; expansión 500 MHz, sin supresión de H₂O). Señal centrada en 3.58 ppm corresponde a MeOH.

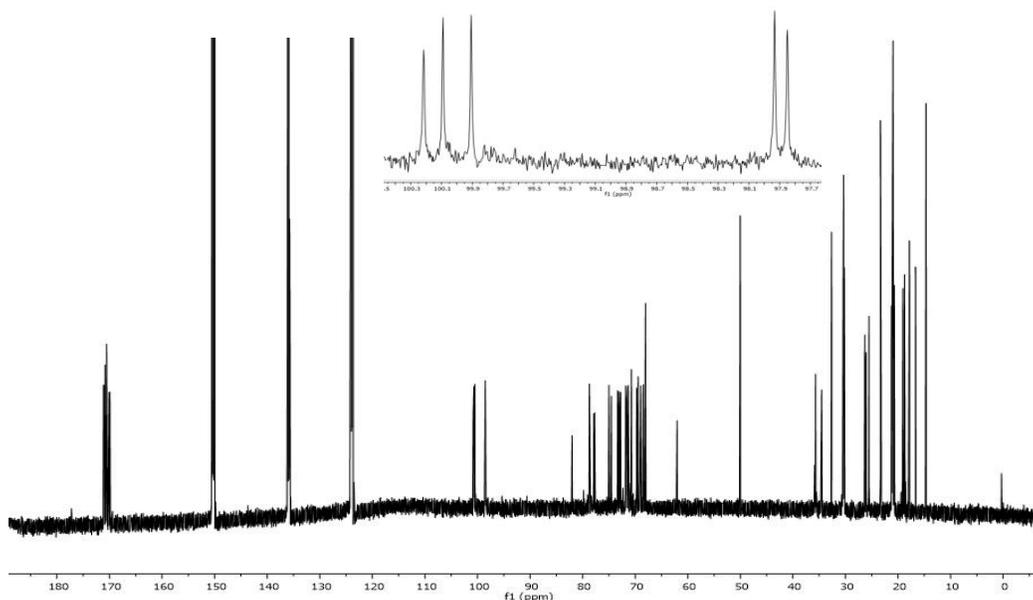


Figura 27. Espectro de RMN ^{13}C del ácido operculínico A peracetilado (200 MHz). Señal de MeOH (δ_{C} 49.0).

A través de los patrones de acoplamiento ($J_{\text{H-H}}$) observados en cada unidad monosacárida se lograron confirmar los tres tipos de azúcares presentes como D-fucosa, D-glucosa y L-ramnosa. El procedimiento de asignación se inició con la identificación de las cinco señales anoméricas y su correlación con las señales observadas a través de los cuadros de conectividad en el espectro COSY. La identificación de estas señales se confirmó mediante TOCSY. De esta manera, se realizaron las secuencias de interacciones vecinales restantes: H₂-H₃, H₄-H₅ y H₅-H₆ en cada unidad monosacárida. Las señales mejor resueltas y diagnósticas fueron observadas para los protones H₂ y H₅ de fucosa (fuc), H₄ de ramnosa (ram), H₅ de la segunda y la tercera unidad de ramnosa (ram', ram'') y las señales H₂, H₅, H_{6a} y H_{6b} de la unidad de glucosa. Por lo tanto, de los cinco azúcares que constituyen el núcleo pentasacárido, cuatro de ellos corresponden a metilpentosas o 6-desoxihexosas: tres unidades de L-ramnosa y una unidad de D-fucosa. La D-glucosa fue la única hexosa que se encontró constituyendo el núcleo pentasacárido. La correspondencia entre cada una de las resonancias protónicas con su átomo de carbono geminal se realizó a través del experimento HSQC. Así, 21 señales localizadas en la región del espectro de ^{13}C entre δ 60–80 ppm correspondieron a los carbonos oxigenados y diferentes a las cinco señales diagnósticas de los carbonos anoméricos entre δ 98–101 ppm. El **Cuadro 9 (Anexos)** resume

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. Al comparar las constantes espectroscópicas obtenidas con lo previamente descrito en la literatura, se pudo identificar a este derivado como el ácido operculínico A (**Figura 28**), previamente aislado de las partes aéreas de *I. purga* (Castañeda-Gómez y Pereda-Miranda, 2011). Este análisis preliminar también permitió identificar la naturaleza de la aglicona que corresponde al ácido (11S)-hidroxihexadecanoico (ácido jalapínico), el ácido graso que con mayor frecuencia se encuentra en las resinas glicosídicas (Pereda-Miranda et al., 2010). El ácido operculínico A se caracterizó, por primera vez, en la especie *I. operculata* (*Operculina macrocarpa*), de donde deriva la nomenclatura trivial que identifica a los núcleos glicosídicos de las resinas glicosídicas de la jalapa brasileña (Ono et al., 1990).

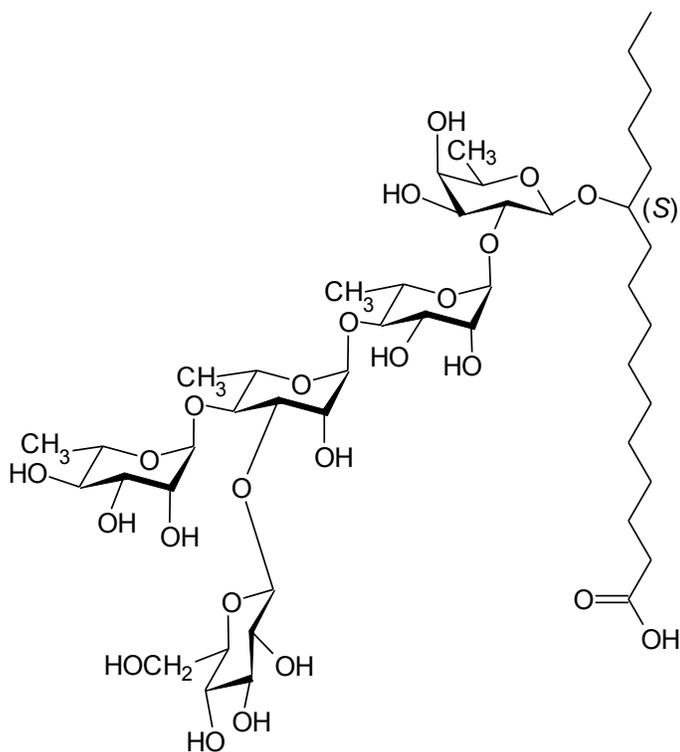


Figura 28. Estructura del ácido operculínico A.

7.4.2.2 Elucidación de los constituyentes intactos.

El análisis inicial de los espectros de RMN ^1H reveló información crucial para la elucidación de las estructuras de ambos componentes purificados. En la **Figura 29** se muestra un comparativo entre los espectros de cada compuesto en la región comprendida entre δ_{H} 3.5 y 6.4 ppm que corresponde a la región oligosacárida de las moléculas intactas F4P4 y F4P7 en análisis.

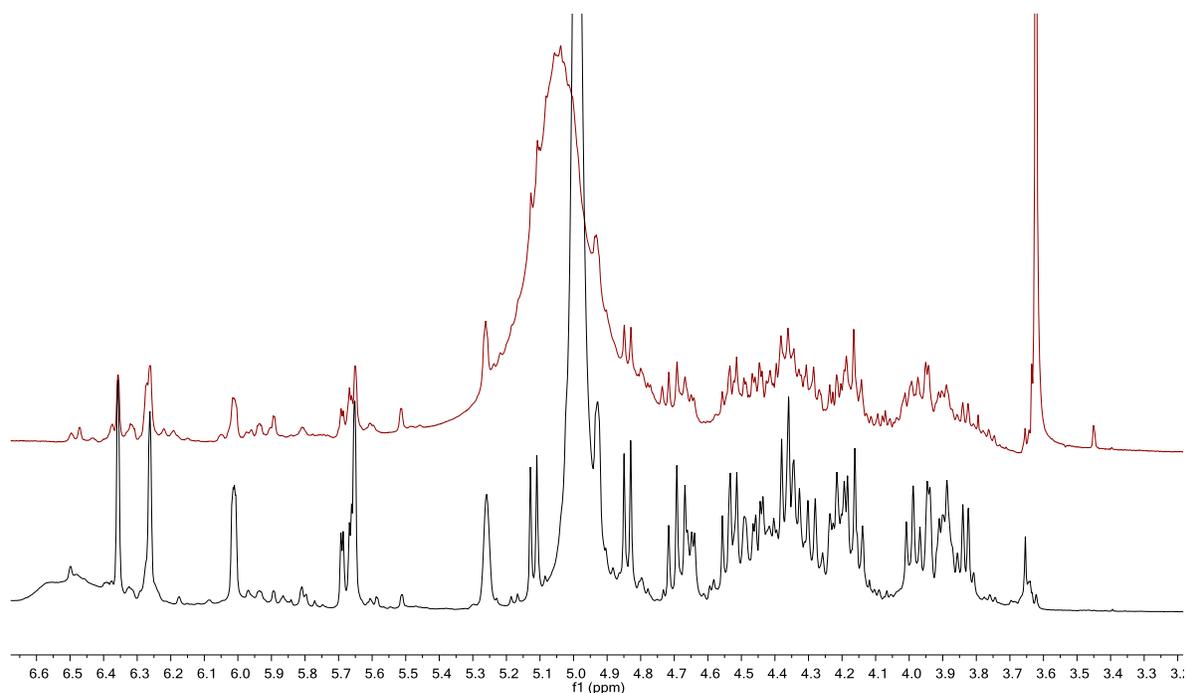


Figura 29. Comparación entre los espectros de RMN ^1H de los compuestos F4P4 (trazo superior) y F4P7 (trazo inferior).

Con base en la comparación entre los desplazamientos químicos de los hidrógenos en la porción hidrofílica de cada molécula, se concluyó que el núcleo oligosacárido, el ácido operculínico A (**Figura 28**), es idéntico en ambos compuestos, por lo que la diferencia entre su tiempo de retención (**Cuadro 7**) radica únicamente en la porción alifática que se encuentra esterificando alguna de las unidades monosacáridas.

El análisis por espectrometría de masas brindó información puntual acerca de las diferencias sutiles entre ambos compuestos. En el **Cuadro 10** se incluyen las especies

registradas mediante ionización suave detectadas en electrospray, tanto en el modo positivo como en el modo negativo (**Figuras 30 y 31**) para cada uno de los compuestos purificados y que permitió el cálculo de su fórmula molecular.

Cuadro 10. Especies iónicas detectadas y fórmula moleculares calculadas para F4P4 y F4P7 mediante ESI (baja resolución).

Especie	F4P4 (<i>m/z</i>)	F4P7 (<i>m/z</i>)
[M + Na] ⁺	1177.73	1205.82
[M – H] [–]	1153.66	1181.73
Fórmula calculada	C ₅₆ H ₉₈ O ₂₄	C ₅₈ H ₁₀₂ O ₂₄

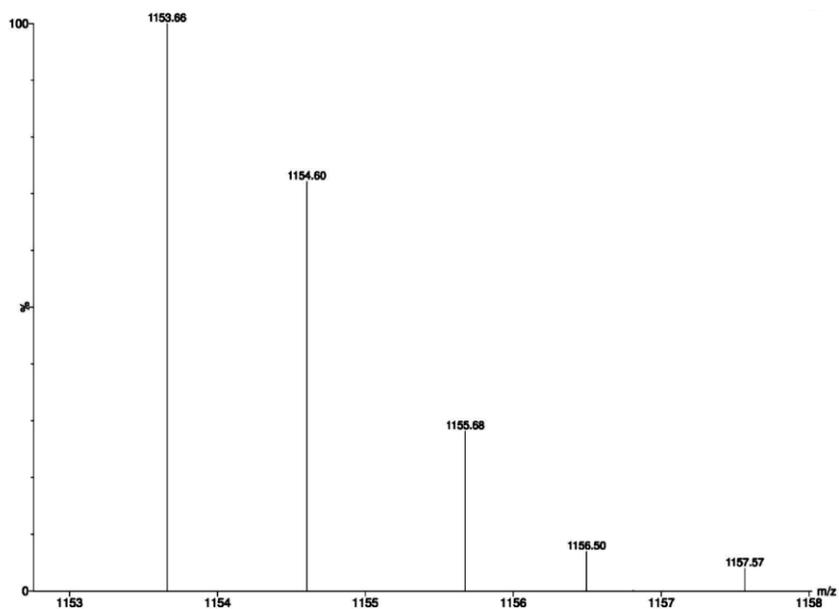


Figura 30. Distribución isotópica y abundancias relativas para el ión [M – H][–] que se genera por la desprotonación de la molécula F4P4 [C₅₆H₉₈O₂₄][–] mediante ESI en modo negativo.

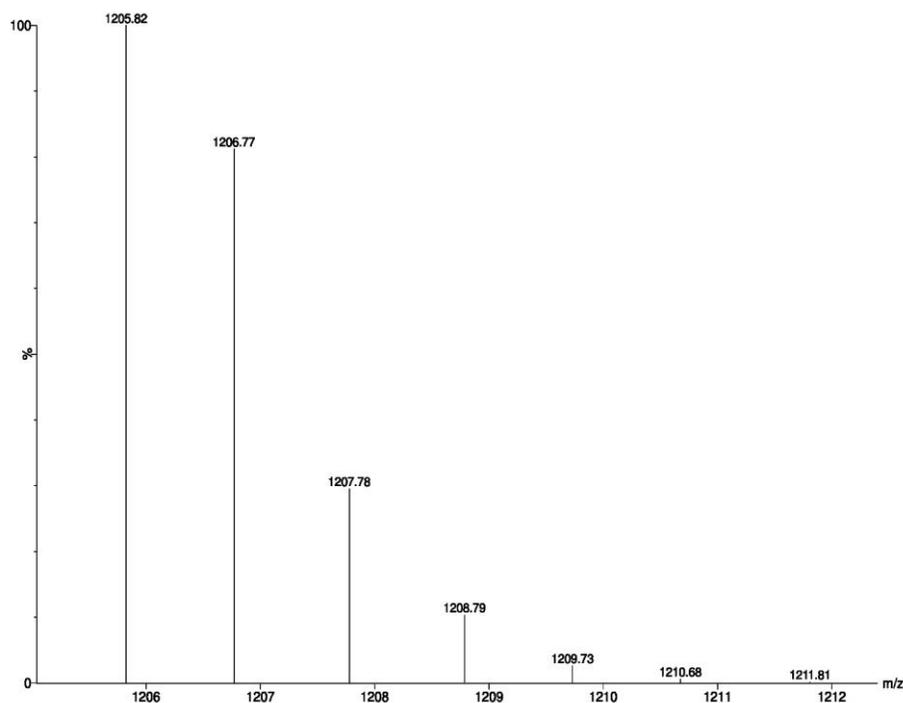


Figura 31. Distribución isotópica y abundancias relativas para el ión $[M + Na]^+$ que se genera por la adición de sodio a la molécula F4P7 $[C_{58}H_{102}O_{24}Na]^+$ mediante ESI en modo positivo.

El análisis de la espectrometría de masas de ambos compuestos coincide con la propuesta que postula una diferencia estructural (28 Da) entre el compuesto F4P7 ($C_{58}H_{102}O_{24}$) y el compuesto F4P4 ($C_{56}H_{98}O_{24}$) y que radica en el largo de la cadena alifática esterificante. Por otra parte, mediante RMN ^{13}C se confirmó que ambos compuestos comparten el mismo núcleo oligosacárido constitutivo el cual corresponde al ácido operculínico A. Trabajos previos han demostrado que éste es el núcleo oligosacárido mayoritario en las resinas de la jalapa brasileña (Jiménez-Bárceñas, 2018; Gónzales-Pozos, 2018) (**Figura 28**).

El largo de la cadena del ácido acilante se determinó por eliminación de sus señales al realizar la comparación entre los espectros de RMN ^{13}C entre el ácido operculínico A (acetilado) y del compuesto F4P7 (**Figura 32**) a partir de la zona centrada entre δ_c 23-36 ppm; en esta región, se cuentan trece señales para metilenos las cuales corresponden a la aglicona de 16 carbonos en el ácido operculínico. Los tres carbonos restantes corresponden al carbonilo, al metilo terminal y al metino C-11 en donde se encuentra el enlace O-

glicosídico entre la cadena alifática y el núcleo oligosacárido. Por otro lado, en el espectro de RMN ^{13}C del compuesto F4P7, se identificaron veintitrés señales en esta misma zona, de las cuales trece que corresponden al núcleo oligosacárido y las diez señales restantes corresponden a los metinos del ácido orgánico acilante; de esta manera, se determinó que la porción esterificante se trata del dodecanoilo, en congruencia con los resultados del análisis de CG-EM del residuo soluble (EMIE: m/z $[\text{M}]^+$ 200, $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$) en la fase orgánica de la saponificación del Pico F4P7. El compuesto puro F4P7 se analizó mediante RMN para la elucidación de su estructura molecular (**Figura 33** y **Figura 34**).

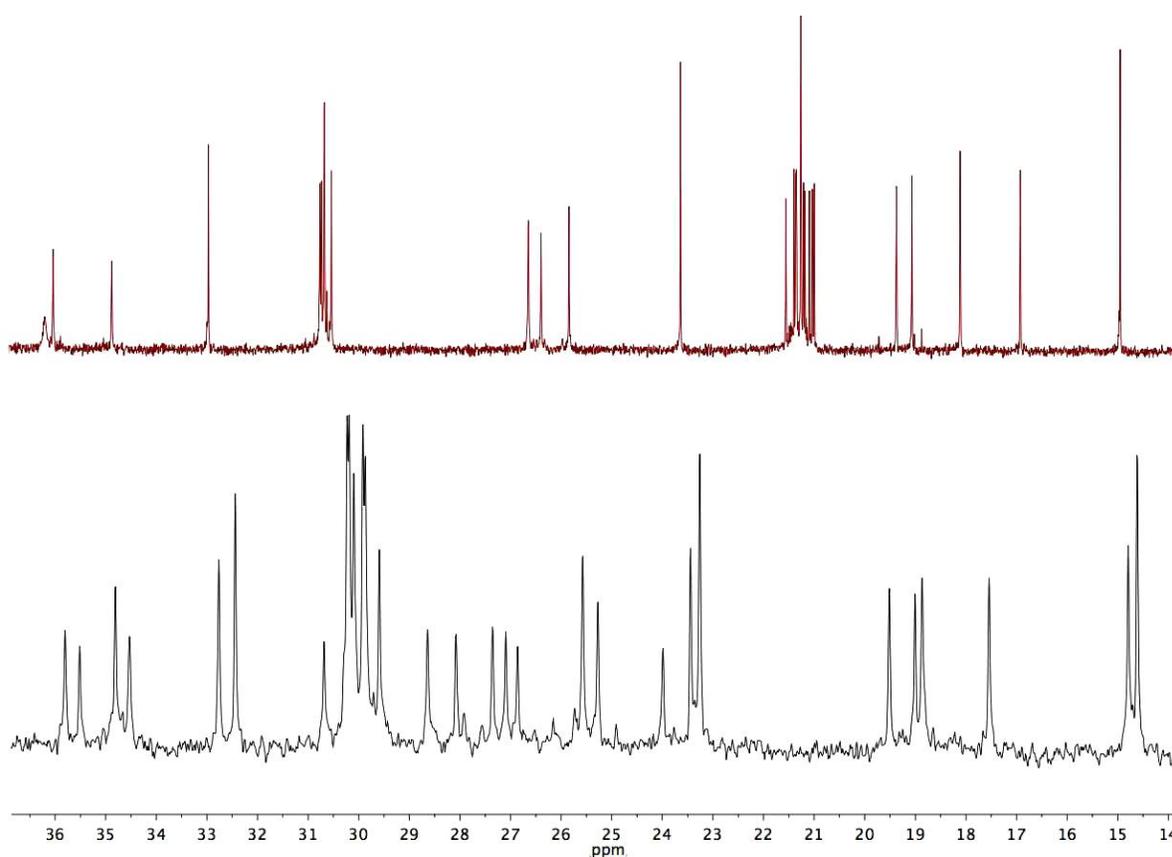


Figura 32. Comparativo entre espectros de RMN ^{13}C del ácido operculínico A (trazo superior en rojo) y del compuesto F4P7 intacto (trazo inferior en negro).

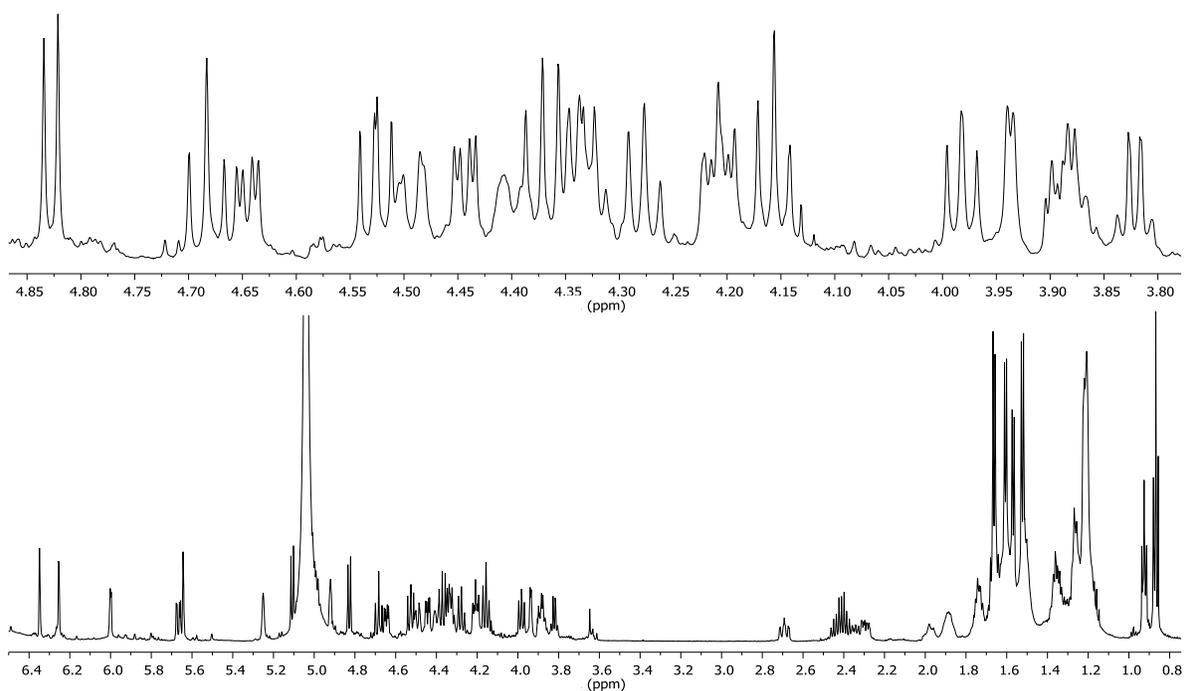


Figura 33. Espectro de RMN ^1H del compuesto F4P7 (400 MHz, piridina- d_5).

En la región comprendida entre δ_{H} 0.8–1.0, se encuentran dos tripletes que corresponden a los metilos de las agliconas (macrolactona y éster acilante), luego, en la región comprendida entre δ_{H} 1.4-1.7, se observan cuatro dobletes que permiten establecer que este compuesto contiene cuatro metilpentosas, las cuales resultaron ser: tres ramnosas y una fucosa, en congruencia con la estructura del núcleo oligosacárido, el ácido operculínico A. En la región entre δ_{H} 5.0 – 6.4, aparecen las señales que corresponden a los hidrógenos enlazados a carbonos anoméricos y a las posiciones de lactonización y esterificación, respectivamente.

En el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 34**), la zona que comprende los valores de δ_{C} entre 10 y 40 ppm, se encuentran las señales que corresponden a los carbonos alifáticos, tanto de la macrolactona como del éster alifático. Entre los valores de δ_{C} 60 y 110 ppm, aparecen las

señales correspondientes a los carbonos que conforman las unidades de carbohidratos; dentro de esta zona, se encuentran cinco señales desplazadas a campos bajos en comparación con las otras, las cuales se adjudicaron a los carbonos anoméricos de cada una de las cinco unidades de azúcar. Debido a que esta resina está compuesta por cuatro metilpentosas (**Figura 28**), se concluyó que la quinta señal anomérica corresponde a una hexosa, la glucosa. Las dos señales más desplazadas corresponden a los carbonos de los carbonilos, pertenecientes a la macrolactona (δ_c 173.7) y al éster (δ_c 174.99).

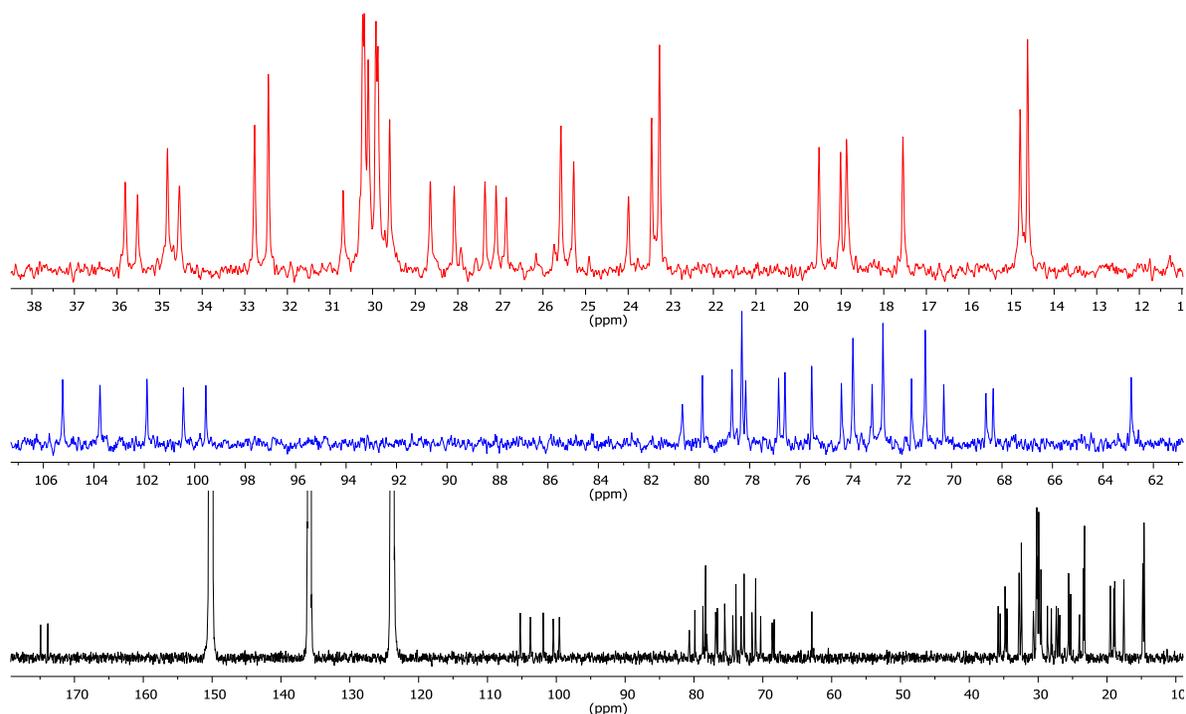


Figura 34. Espectro de RMN ¹³C de la resina aislada y purificada de la fase F4P7 (100 MHz, piridina-d₅). En rojo se muestra los carbonos correspondientes a la porción alifática y las señales azules corresponden a carbonos que forman parte de los azúcares.

Con base en las correlaciones observadas en el espectro HSQC, entre los carbonos anoméricos con sus respectivos hidrógenos, se identificó la naturaleza de las dos señales adicionales más desprotegidas del núcleo oligosacárido y que no corresponden a los hidrógenos enlazados a carbonos anoméricos; éstas se adjudicaron a las posiciones tanto de lactonización (ramnosa H-3), como de esterificación (ramnosa' H-2). A partir de las

señales identificadas como anoméricas (H-1) se trazó la correlación para cada unidad sacárida con ayuda del espectro COSY (**Figura 35**), identificando el cuadro de conectividad para cada señal que forma parte del mismo núcleo piranósido.

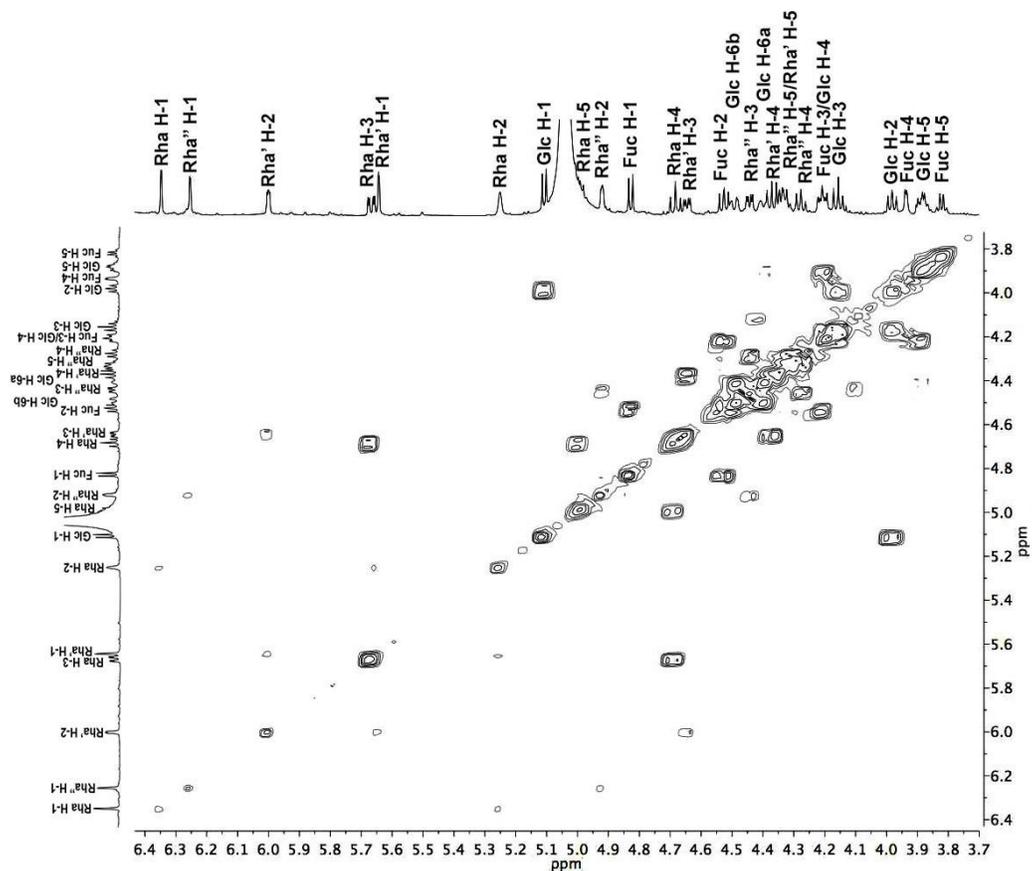


Figura 35. Espectro COSY de la porción oligosacárida del compuesto F4P7.

Una vez establecidas las conectividades para cada unidad monosacárida, el espectro TOCSY confirmó las correlaciones para cada unidad sacárida asignada (**Figura 36**).

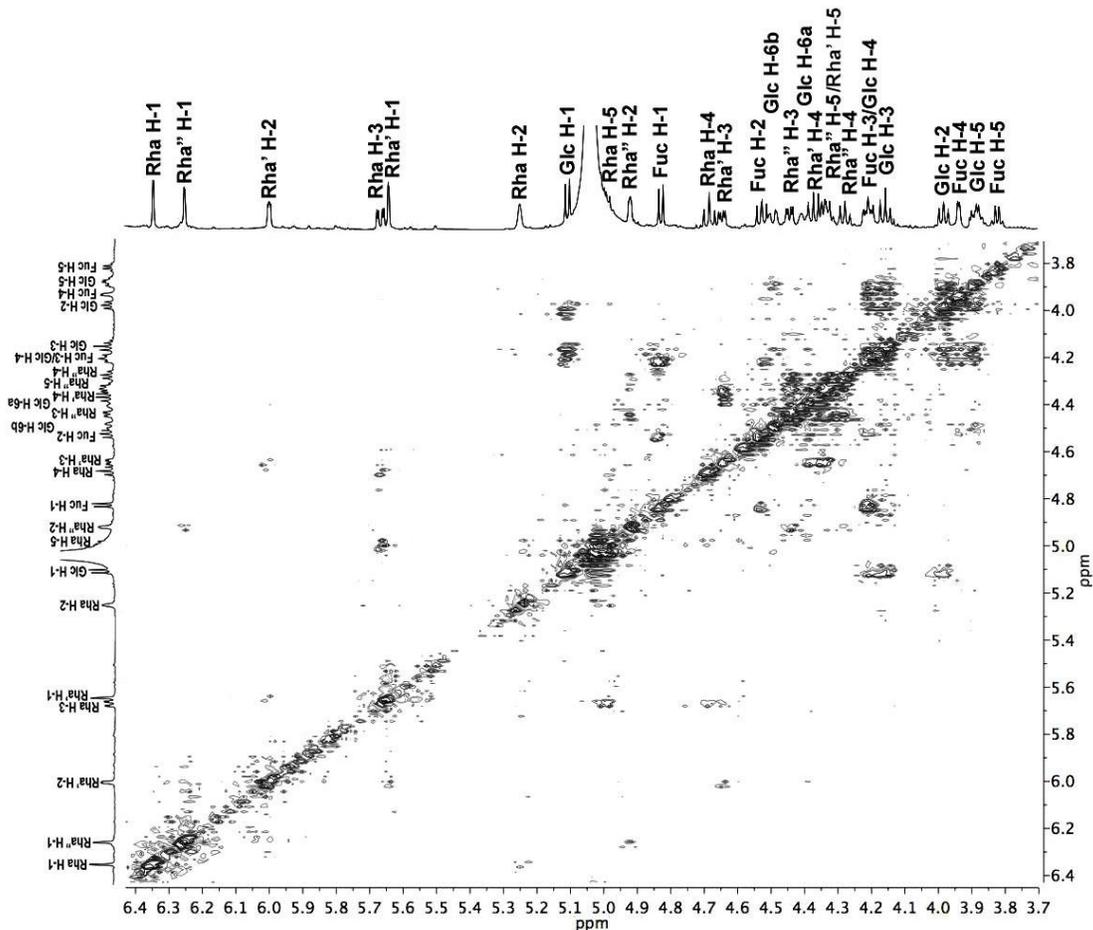


Figura 36. Espectro TOCSY de la porción oligosacárida del compuesto F4P7.

La correspondencia de cada señal en el espectro de RMN ^1H con su respectivo átomo de carbono se llevó a cabo mediante el análisis del espectro de dos dimensiones ($^1J_{\text{CH}}$) HSQC (**Figura 37**). De esta manera, se identificaron 25 señales dentro de la zona del espectro de ^{13}C comprendida entre δ_{C} 60–85 ppm como los metinos que conforman cada una de las unidades monosacáridas, además de las señales correspondientes a los carbonos anoméricos. Las siguientes correlaciones fueron identificadas para las señales anoméricas: Fuc-1 (δ_{H} 4.83, δ_{C} 101.9), Rha-1 (δ_{H} 6.35, δ_{C} 100.5), Rha'-1 (δ_{H} 5.64, δ_{C} 99.6), Rha''-1 (δ_{H} 6.26, δ_{C} 103.8) y Glc-1 (δ_{H} 5.11, δ_{C} 105.3).

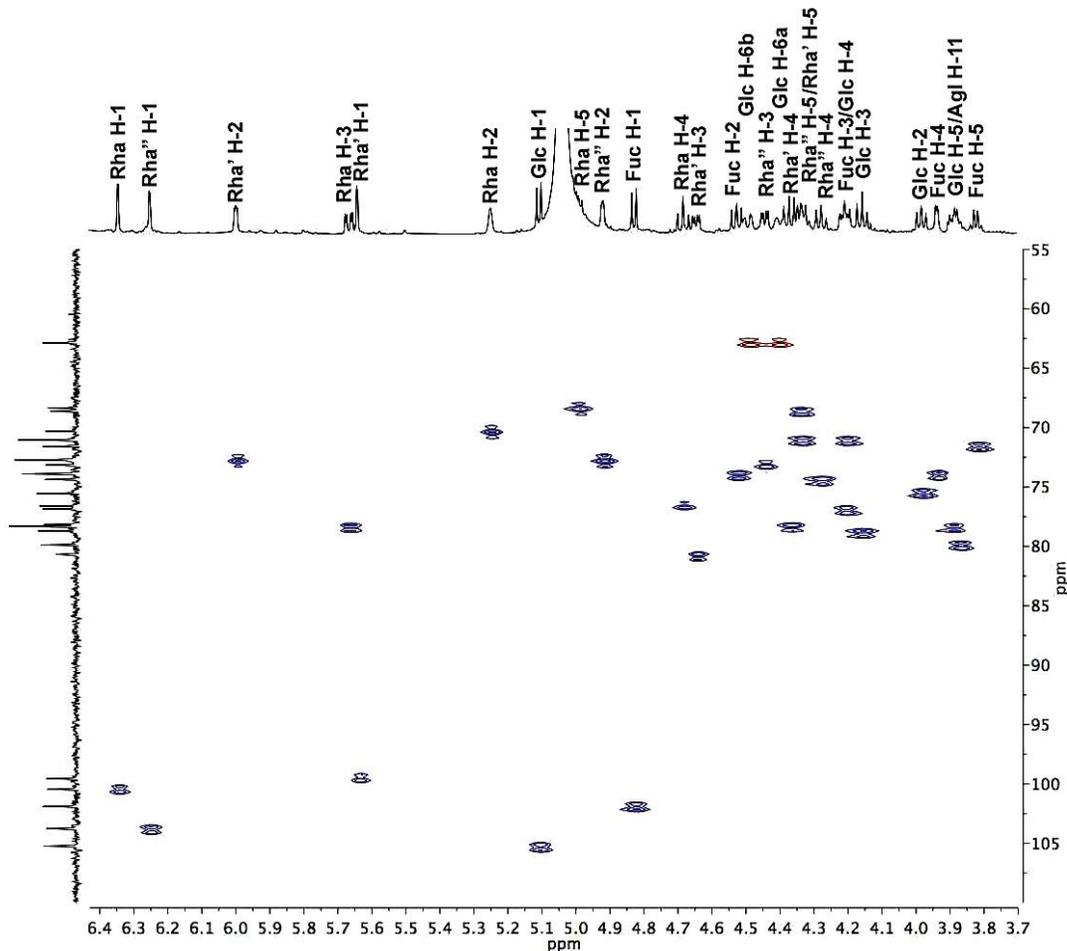


Figura 37. Espectro HSQC de la porción oligosacárida del compuesto F4P7.

La secuencia de glicosilación se estableció mediante el análisis de las interacciones $^3J_{CH}$ registradas en el experimento de dos dimensiones HMBC (**Figura 38**). Posteriormente, se observaron las siguientes conectividades $^{2,3}J_{CH}$ interpiranosídicas claves en el experimento HMBC de P7 (figura S22, Anexo). Se observaron los siguientes cuadros de conectividad: (a) entre AgI C-11 (δ_C 79.9) y Fuc H-1 (δ_C 4.83); (b) Rha C-1 (δ_C 100.5) y Fuc H-2 (δ_H 4.53); (c) Rha' C-1 (δ_C 99.6) y Rha H-4 (δ_C 4.68); (d) Rha'' C-1 (δ_C 103.8) y Rha' H-4 (δ_H 4.37); (e) Glc H-1 (δ_H 5.11) y Rha' C-3 (δ_C 80.7).

De esta misma forma y, exceptuando las señales más desplazadas en el espectro de RMN ^1H que corresponden a hidrógenos anoméricos, se establecieron las posiciones de lactonización y esterificación.

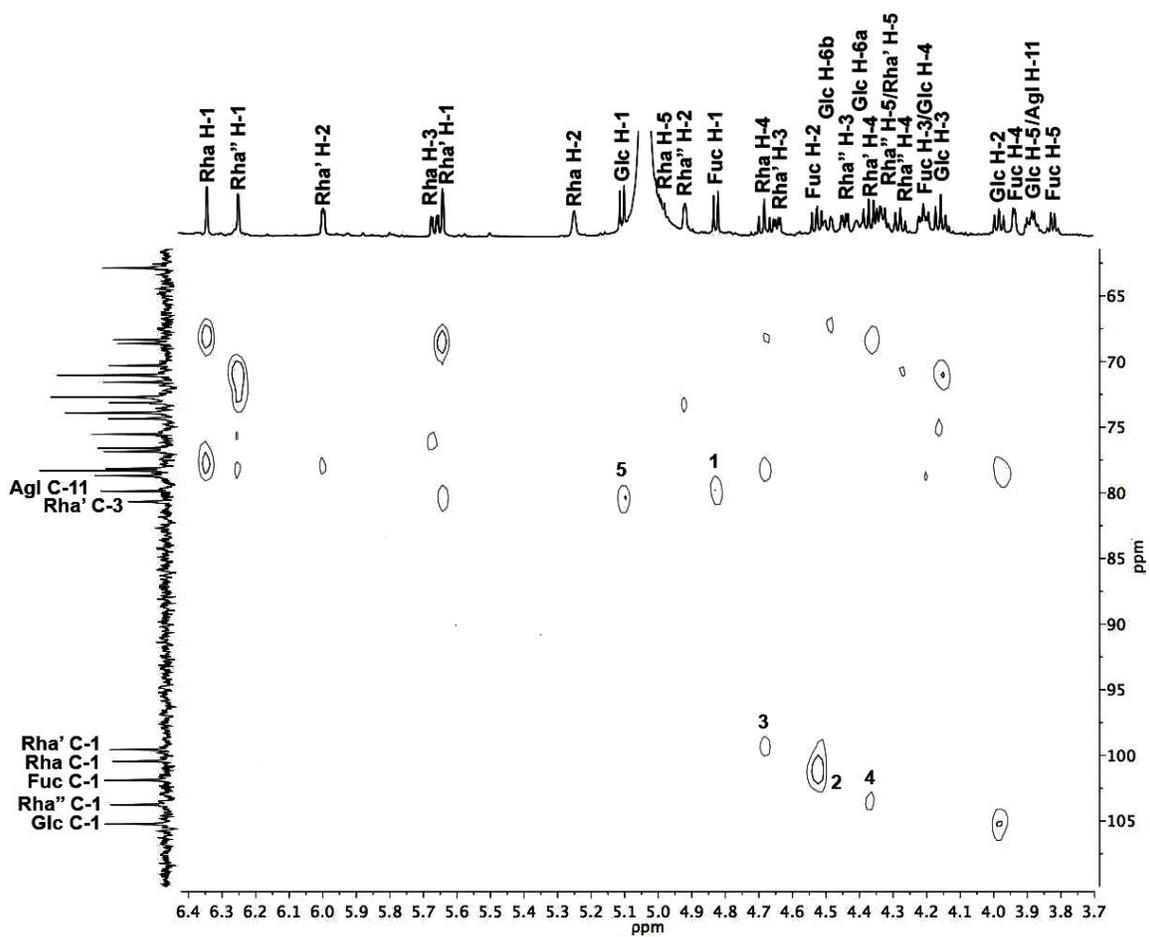


Figura 38. Espectro HMBC de la porción oligosacárida del compuesto F4P7 donde se indica la secuencia de glicosilación. Asignaciones: **1)** AgI C-11/Fuc H-1; **2)** Rha C-1/Fuc H-2; **3)** Rha' C-1/Rha H-4; **4)** Rha'' C-1/Rha' H-4; **5)** Glc H-1/Rha' C-3.

Por lo tanto, la estructura del pico F4P7 se caracterizó como el éster intramolecular del ácido 11(*S*)-hidroxihexadecanoico (jalapínico) 11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-*n*-dodecanoil)- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido, 1,3-éster (Figura 39).

En el **Cuadro 11** se enlistan 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 de la resina glicosídica purificada de la fracción F4P7 y que son idénticos a los registrados para la fracción F4P4.

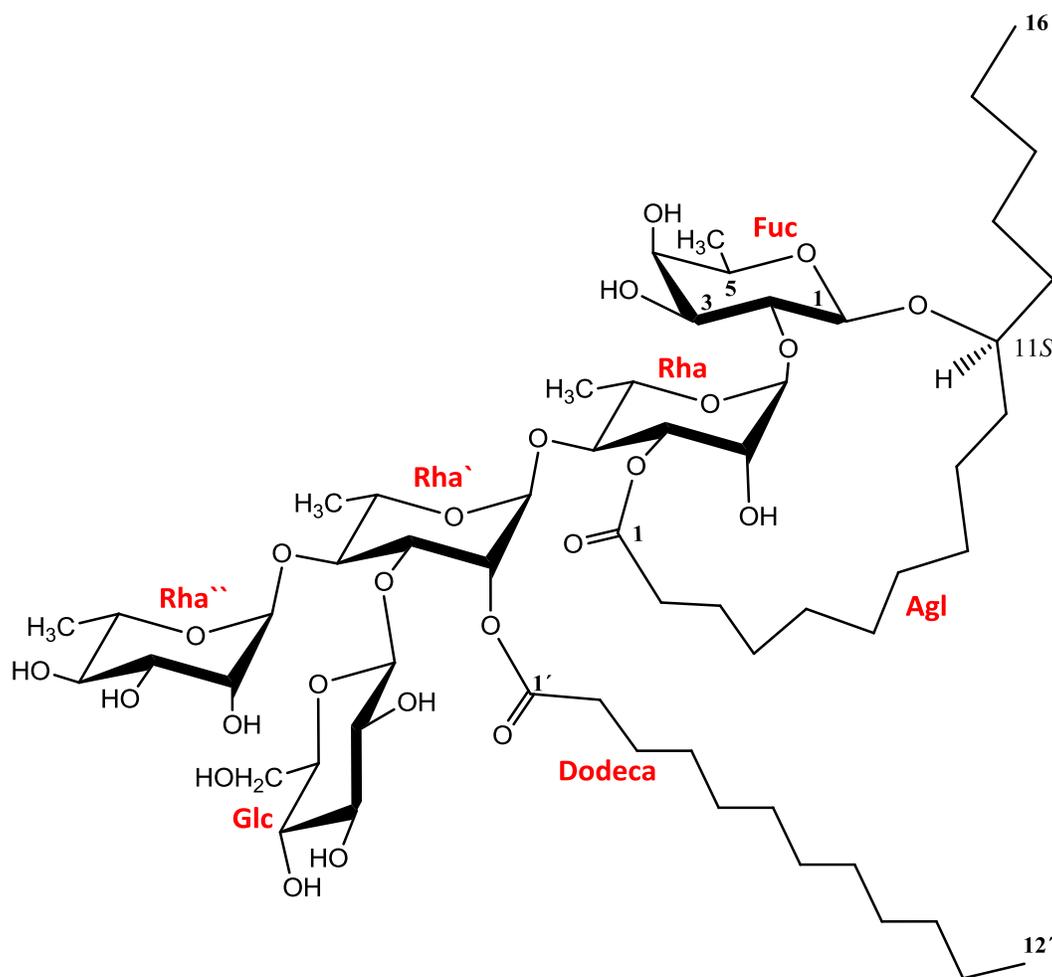


Figura 39. Estructura del compuesto mayoritario aislado de la fracción F4P7.

El mismo análisis espectroscópico se empleó para caracterizar el compuesto F4P4, del cual no se obtuvieron las cantidades suficientes para generar un espectro de RMN ^{13}C 1D, sin embargo, los espectros heteronucleares 2D registrados (**Ver anexos**) permitieron llegar a la estructura que se muestra a continuación (**Figura 40**) y que se caracterizó como el éster intramolecular del ácido 11(*S*)-hidroxihexadecanoico 11-*O*- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-*O*-[α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 4)-*O*-(2-*O*-*n*-decanoil)- α -L-ramnosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- α -L-ramnopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-fucopiranosido, 1,3-éster.

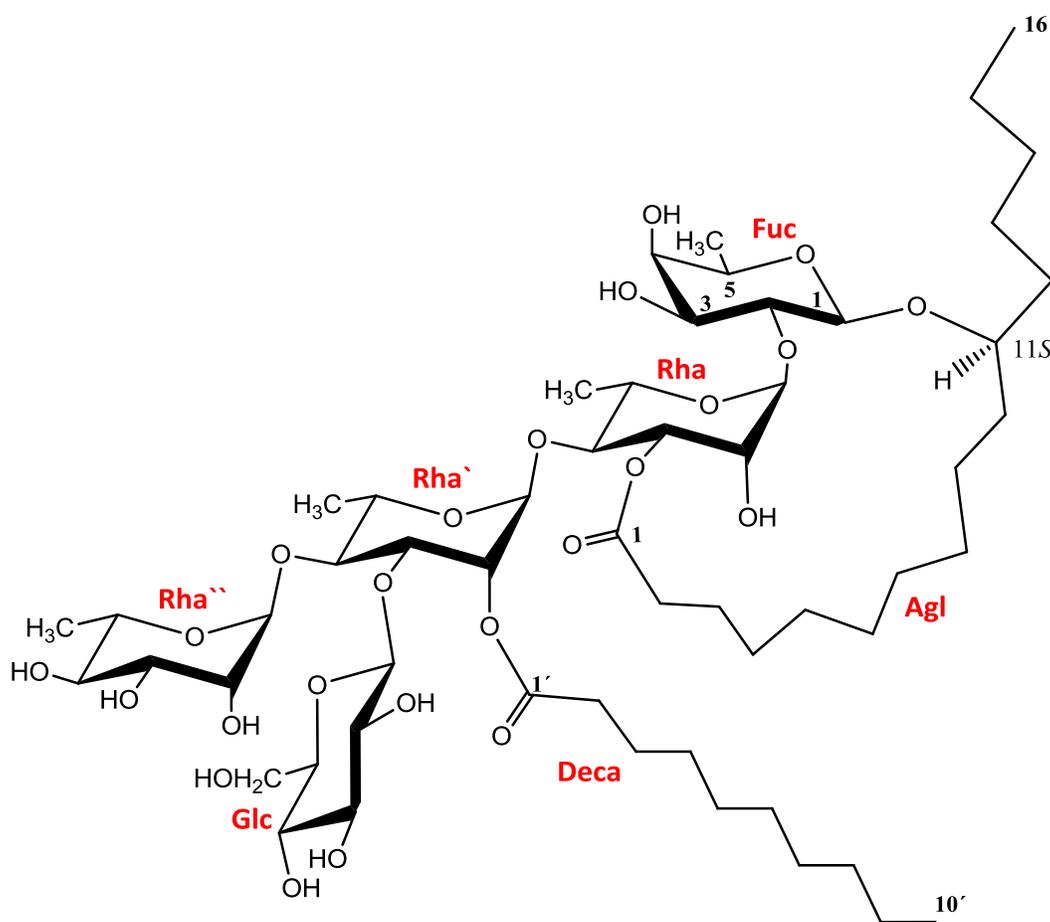


Figura 40. Estructura del compuesto mayoritario aislado de la fracción F4P4.

Cuadro 11. Constantes espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) del compuesto F4P7y F4P4.

Posición	F4P7		F4P4	
	^1H – NMR	^{13}C – NMR	^1H – NMR	^{13}C – NMR
	δ_{H} en ppm, multi., (J en Hz)	δ_{C} en ppm	δ_{H} en ppm, multi., (J en Hz)	δ_{C} en ppm
Fuc-1	4.83 d (7.8)	101.9	4.83 d (7.8)	101.9
2	4.53 dd (9.5, 7.8)	73.9	4.52 dd (9.3, 7.9)	73.9
3	4.21 dd (9.5, 3.5)	76.9	4.21 dd (9.3, 3.5)	76.9
4	3.94 brd (3.5)	75.6	3.94 brd (3.5)	75.6
5	3.82 q (6.4)	71.6	3.83 q (6.4)	71.6
6	1.52 d (6.4)	17.5	1.53 d (6.4)	17.5
Rha-1	6.35 d (1.2)	100.5	6.35 d (1.2)	100.5
2	5.25 (br s)	70.3	5.25 (br s)	70.3
3	5.67 dd (3.0, 9.9)	78.2	5.67dd (2.8, 9.9)	78.2
4	4.68 dd (9.6, 9.6)	76.7	4.69 dd (9.7, 9.7)	76.7
5	4.99 dq (9.6, 5.9)*	68.4	5.00 *	68.4
6	1.57 d (5.9)	19.5	1.57 d (6.2)	19.5
Rha'-1	5.64 d (1.4)	99.6	5.64 d (1.4)	99.6
2	6.00 dd (1.6, 2.9)	72.8	6.00 dd (1.4, 3.0)	72.8
3	4.64 dd (8.7, 3.7)	80.7	4.66 dd (8.8, 3.6)	80.7
4	4.37 dd (9.2, 9.2)	78.3*	4.36 dd (8.8, 8.8)	78.3*
5	4.33 dq (9.2, 6.0)	68.7	4.33 dq (8.8, 5.8)	68.7
6	1.66 d (6.0)	18.9	1.67 d (5.8)	18.9
Rha''-1	6.25 d (1.3)	103.8	6.26 d (1.3)	103.8
2	4.92 dd (3.3, 1.2)	72.8	4.92 *	72.8
3	4.44 dd (8.7, 3.3)	73.3	4.45 dd (3.3, 8.6)	73.3
4	4.28 dd (8.7, 9.1)	74.5	4.29 dd (8.6, 9.1)	74.5
5	4.34 dq (9.1, 6.0)	71.1*	4.36 dq (9.1, 5.7)	71.1*
6	1.61 d (6.0)	19.0	1.61 d (5.7)	19.0
Glc-1	5.11 d (7.3)	105.3	5.11 d (7.3)	105.3
2	3.98 dd (7.4, 8.6)	75.6	3.99 dd (7.4, 8.6)	75.6
3	4.16 dd (8.6, 9.0)	78.8	4.17 dd (8.6, 9.0)	78.8
4	4.21 dd (9.0, 9.0)	71.1*	4.21 dd (9.0, 9.0)	71.1*
5	3.89 ddd (9.0, 5.5, 3.0)	78.3*	3.89 (9.0, 5.5)	78.3*
6a	4.40 dd (11.5, 5.5)	62.9	4.41 dd (11.5, 5.5)	62.9
6b	4.49 dd (11.5, 3.0)		4.49 dd (11.5, 3.0)	
Agl-1	-	173.7	-	173.4
2a	2.29 ddd (14.0, 7.0, 3.0)	34.6	2.29 ddd (14.0, 7.0, 3.0)	34.6
2b	2.69 ddd (14.0, 10.0, 2.5)		2.69 ddd (14.0, 10.0, 2.5)	
10a	1.64 m	24.0	1.64 m	24.0
10b	1.89 m		1.89 m	
11	3.87 m	79.9	3.87 m	79.9
12a	1.74, m	26.9	1.74, m	26.9
12b	1.61 m		1.61 m	
13	1.51 m	27.1	1.51 m	27.1
14	1.67 m	25.2	1.67 m	25.2
15	1.26 m	23.3	1.26 m	23.3
16	0.87 t (7.11)	14.6	0.86 t (7.14)	14.6
Est – 1'	-	174.9	-	174.2
2'	1.89m 1.97m	35.4	1.89m 1.97 m	35.4
3'-11'(9')	1.15 – 1.28 m	30.2 – 32.1	1.15 – 1.28 m	30.2 – 32.1
12'(10')	(Dod-12) 0.93 t (7.11)	14.8	(Dec-10) 0.93 t (7.14)	14.8

*Señales intercambiables.

8. CONCLUSIONES.

Se preparó el extracto orgánico a partir del preparado comercial compuesto de las raíces crudas de la jalapa y se fraccionó mediante CCA obteniéndose ocho fracciones primarias.

Se optimizó un método en HPLC en escala analítica con una columna C-18 en fase reversa para para la separación eficiente de los constituyentes mayoritarios en las fracciones primarias. Estas condiciones se escalaron a nivel preparativo para la purificación de los compuestos presentes en las fracciones F4P4 y F4P7.

Se empleó la técnica de “corte de núcleo” en conjunto con la técnica de “reciclaje de pico” para purificar los compuestos mayoritarios en estas fracciones.

Haciendo uso de las técnicas de RMN y EM, se elucidó la estructura molecular de los compuestos F4P4 y F4P7. Este análisis permitió identificar dos resinas glicosídicas novedosas, las cuales tienen como núcleo constitutivo al ácido operculínico A macrolactonizado en la posición C-3 de la segunda unidad sacárida y la única diferencia estructural entre ambos principios radica en el largo de la cadena alifática perteneciente al ácido orgánico esterificante, es decir, el ácido decanoico para el compuesto químico F4P4 y el ácido dodecanoico para la muestra F4P7. Ambos productos F4 y F7 difieren de las operculinas XIII y XIV (**Figura 13**), aisladas de *O. macrocarpa* por Ono y su equipo de colaboradores (1992), en la posición de lactonización en la primera unidad de ramnosa y, por lo tanto, representan isómero de posición ya que las operculinas previamente descritas se lactonizan en la posición C-2 de la primera unidad de ramnosa.

9. BIBLIOGRAFÍA.

- Austin, D. F. (1973). The American Erycibeae (*Convolvulaceae*): Maripa, Dicrasontyles, and Lysiostyles. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 60, 306-412.
- Austin, D. F., Huáman, Z. (1996). A synopsis of Ipomoea (*Convolvulaceae*) in the Americas. *International Association for Plant Taxonomy* 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., Pereda Miranda, R. (1997). Isolation and Structural Characterization of New Glycolipid Ester Type. *Tetrahedron* 53, 9007-9022.
- Bah, M., Pereda-Miranda, R. (1996). Detailed FAB-mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individuals oligosaccharides from the resins of Ipomoea tricolor (*Convolvulaceae*). *Tetrahedron* 52, 13063.
- Bah, M., Chérigo, L., Cardoso, A., Fragoso-Serrano, M., Hammond, B., Pereda-Miranda, R. (2007). Intrapilosins I-VII, Pentasaccharides from the Seed of *Ipomoea intrapilosa*. *Journal of Natural Products* 70, 1153-115.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2016). Jalapinoside II, a bisdesmoside resin glycoside, and related glycosidic acids from the officinal jala root (*Ipomoea purga*). *Phytochemistry Letters* 17, 85-93.
- Castañeda Gómez, J., Pereda Miranda, R. (2011). Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (*Ipomoea purga*). *Journal of Natural Products* 74, 1148-1153.
- Costa, A. (2014, Febrero 12). *Natureza Bela*. Retrieved from <http://www.naturezabela.com.br/search/?q=batata+de+purga>

- Cunha, G. H., Fechine, F. V., Santos, L. K., Pontes, A. V., Oliveira, J. C., Moraes, M. O., Bezerra, F. A., Moraes, M. E. (2011). Efficacy of the tincture of jalapa in the treatment of functional constipation: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Contemporary Clinical Trials* 32, 153-159.
- Daló, N., Moussatché, H. (1978). Acción tóxica de las plantas del género *Ipomoea*. *Rev Universidad Centro Occidental* 6, 25-39.
- Ding, W., Jiang, Z.-H., Wu, P., Xu, L., & Wei, X. (2012). Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry* 81, 165-174.
- Evans, W. C. (2010). *Trease and Evans Pharmacognosy*. London: Saunders; pp 100-105.
- Fang, X.-T. L., Wei-Shuo. (2006). *Medicinal chemistry of bioactive natural products*. Beijing: Wiley Interscience; pp 30-35
- Gomes, A., da Silva, P., Soares, S., da Silva, C. E., Gallão, M. I., Germani, R., Ricardo, N. (2009). Isolation and physico-chemical and rheological characterisation of the Brazilian jalap starch (*Operculina tuberosa* Meisn.). *Carbohydrate Polymers* 77,: 885-890.
- González Pozos, L. (2018). *Purificación mediante HPLC y elucidación estructural de un pentasacárido del ácido 12-hidroxiocetadecanoico de la jalapa brasileña (Ipomoea hamiltonii)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México.
- Hoffman, A. (1971). Teonanácatl and Ololiuqui, two ancient magic drugs of Mexico. *Bullet of Narcotics*, 3-14.
- Jiménez-Bárceñas, N. R. (2018). *Aplicación de la cromatografía de líquidos en la resolución de los ácidos glicosídicos mayoritarios de la jalapa brasileña*. Tesis de Maestría. Facultad de química, UNAM, México.
- Linajes, A., Rico Gray, V., Carrión, G. (1994). Traditional Productios System of the Root of Jalapa, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, Mexico. *Economic Botany* 48, 84-89.

- Mabberley, D. J. (2008). *The plant book*. Cambridge: Cambridge University Press;
- Matos, F. (1997). *O formulário fitoterápico do Prof. Dias da Rocha*. Fortaleza: UFC Edições.
- Meira, M., Silva, E. P., David, J. M., David, J. P. (2012). Review of the genus *Ipomoea*: traditional. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22, 682-713.
- Michelin, D., Gandolfo Finati, S. C., Silva Sacramento, L. V., Vilegas, W., Nunes Salgado, H. (2010). Controle de qualidade de raiz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb., Convolvulaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20, 18-22.
- Monardes, N. (1990). *Herbolaria de las Indias. Historia Natural del Nuevo Mundo*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México; pp 96-111.
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1987). Resin Glycosides I. Isolation and Structure Elucidation of Orizabin I, II, III and IV, genuine Resin Glycosides from the root of *Ipomoea Orizabensis*. *Tetrahedron* 43, 3889 - 3902.
- Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992). Resin Glycosides. XV. Simonins I-V, Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the Root of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40, 3163 - 3168.
- 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*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39, 3209-3213.
- Ono, M. (2017). Resin glycosides from Convolvulaceae plants. *Journal of Natural Medicine* 71, 591-604.
- Ono, M., Fujimoto, 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 Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40, 1400-1403.

- Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1991). Resin Glycosides. XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII, New Ether-Soluble Resins Glycosides of Rhizoma Jalapae Braziliensis (Root of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39, 2534-2539.
- Ono, M., Nishi, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1990). Resin Glycosides. IX. Operculins I, II, V and VIII, New Ether-Soluble Resin Glycosides of Rhizoma Jalapae Braziliensis (the Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 2986-2991.
- Pereda Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* 58, 3145-3154.
- Pereda Miranda, R., Castañeda Gómez, J., Rosas Ramírez, D. (2010). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. (A. D. Kinghorn, O. H. Columbus, & J. Kobayashi, Eds.) Springer-Verlag: New York; Vol. 92, Chapter, 79-123.
- Pereda Miranda, R., Fragoso Serrano, M., Escalante Sánchez, E., Hernández Carlos, B. (2006). Profiling of the Resin Glycoside Content of Mexican Jalap Roots with Purgative Activity. *Journal of Natural Products* 69, 1460-1466.
- Pereda, R. M., Bah, M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 111-131.
- Planchon, L., Bretin, P. (1937). *Précis de matière médicale*. Paris: Librairie Maloine.
- Rosas-Ramírez, D., Escalante-Sánchez, E., Pereda-Miranda, R. (2011). Batatins III-VI, glycolipid ester-type dimers from *Ipomoea batatas* *Phytochemistry* 72, 773-780.
- Sidana, J., Joshi, L. K. (2013). Recycle HPLC: a powerful tool for the purification of natural products. *Chromatography Research International* 2013, 100-108.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. USA: John Wiley & sons, INC., pp 100-105.

- Staples, G., Er, E. (2011, Septiembre 30). *Convolvulaceae Unlimited*. Retrieved from <http://convolvulaceae.myspecies.info/content/operculina-hamiltonii-0>
- Steiner, U., Leistner, E., (2018). Ergot Alkaloids and their Hallucinogenic Potential in Morning Glories. *Planta Medica* 84, 751-758.
- Taber, W., Vinig, L., Heacock, R. (1963). Clavine and lysergic acid alkaloids in varieties of morning glory. *Phytochemistry* 2; 65-70.
- Wilkin, P. (1999). A Morphological Cladistic Analysis of the Ipomoceae (Convolvulaceae). *Kew Bulletin* 54, 853-876.
- Ximenes dos Santos, L. K., da Cunha, G. H., Vagnaldo Fachine, F., Vieira Pontes, A., Costa de Oliveira, J., Frota Bezerra, F. A., Amaral de Moraes, M. E. (2012). Toxicology and safety of the tincture of *Operculina alata* Urb. in patients with functional constipation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences* 48, 469-476.

10 ANEXOS

Cuadro 9. Constantes espectroscópicas (RMN ^1H y ^{13}C) del ácido operculínico A peracetilado.

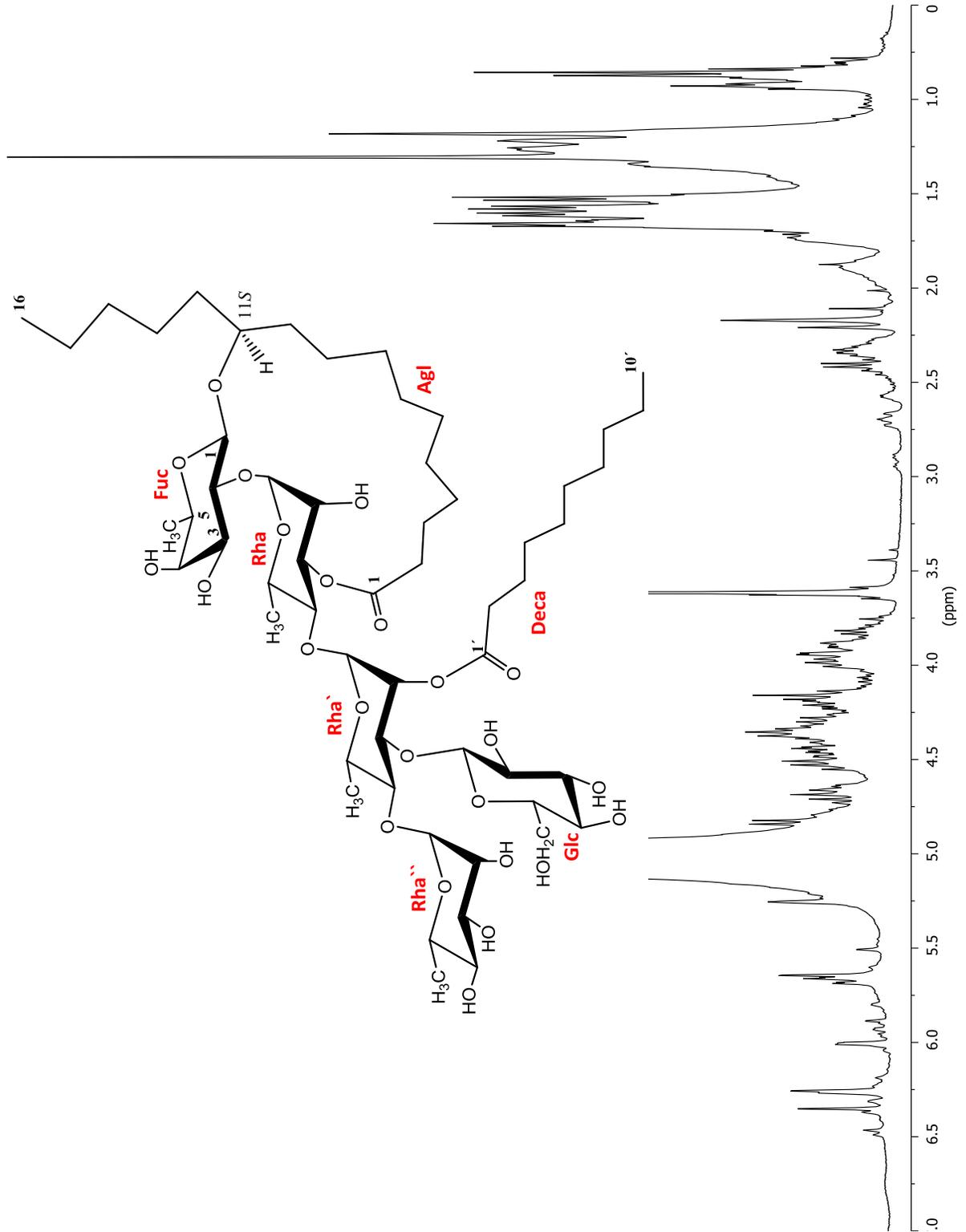
Posición	δ H	δ C
Fuc-1	4.99 d (7.5)	99.9
2	4.34 dd (9.5, 7.5)	73.9
3	5.50 dd (9.5, 3.0)	68.4
4	5.53 d (3.0)	72.2
5	4.04 dd (6.5, 0.5)	68.8
6	1.24 d (6.5)	16.0
Rha-1	5.50 <i>brs</i>	97.8
2	5.60 dd (3.0, 1.5)	70.7
3	5.74 dd (9.5, 2.5)	71.0
4	4.19 dd (10.0, 9.5)	81.4
5	4.84 dq (9.5, 6.5)	67.4
6	1.69 d (6.0)	18.2
Rha'-1	5.35 <i>brs</i>	100.2
2	5.53 m	71.2
3	4.56 dd (8.0, 3.5)	77.1
4	5.50 m*	68.4
5	4.25 dd (6.0, 10)	77.2
6	1.57 d (5.5)	18.5
Rha''-1	5.70 <i>brs</i>	97.9
2	5.77 dd (3.5, 1.5)	70.1
3	5.67 dd (10.5, 3.5)	69.1
4	5.57 m	70.7
5	4.26 dd (10, 6.5)	67.4
6	1.32 d (6.5)	17.2
Glc-1	5.22 d (7.5)	100.1
2	5.37 t (9.5)	72.3
3	5.73 t (9.5)	72.7
4	5.50 t (9.5)	74.4
5	4.08 ddd (10.5, 3.0, 3.0)	72.5
6a	4.51 dd (12.5, 2.5)	61.4
6b	4.80 dd (12.5, 3.5)	
Jal-1		174.1
2	2.37 t (7.5)	33.9
11	4.0-4.1 m	78.1
16	0.90 t (7.0)	14.1

Datos registrados a 500 MHz para RMN ^1H y a 200 MHz para RMN ^{13}C en $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$. 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 ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC). Abreviaciones: Fuc = fucosa, Rha = ramnosa, Glc = glucosa, jal = 11-hidroxihexadecanoilo.

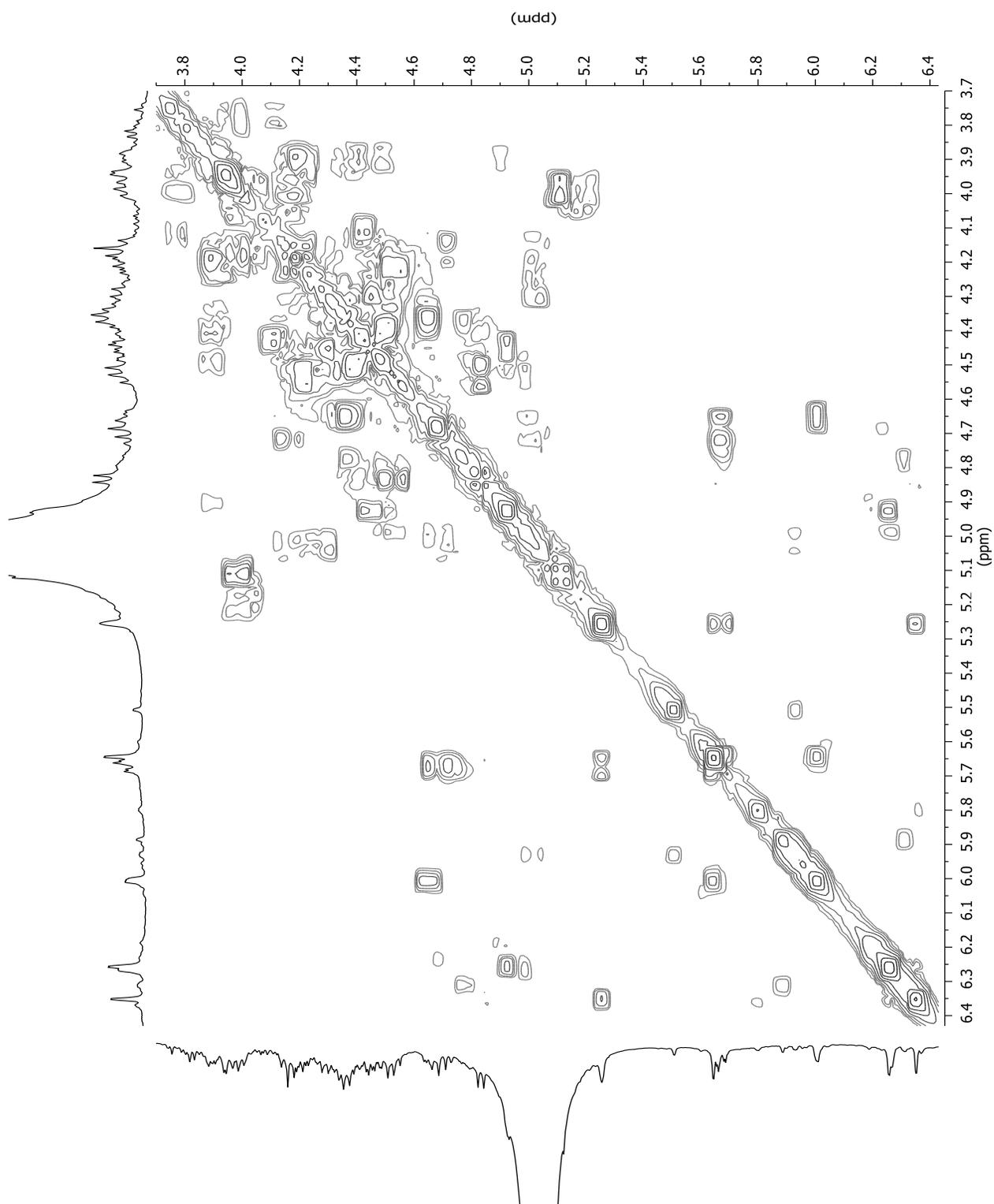
10. ANEXOS

10.1 Espectros RMN en una y dos dimensiones del compuesto F4P4

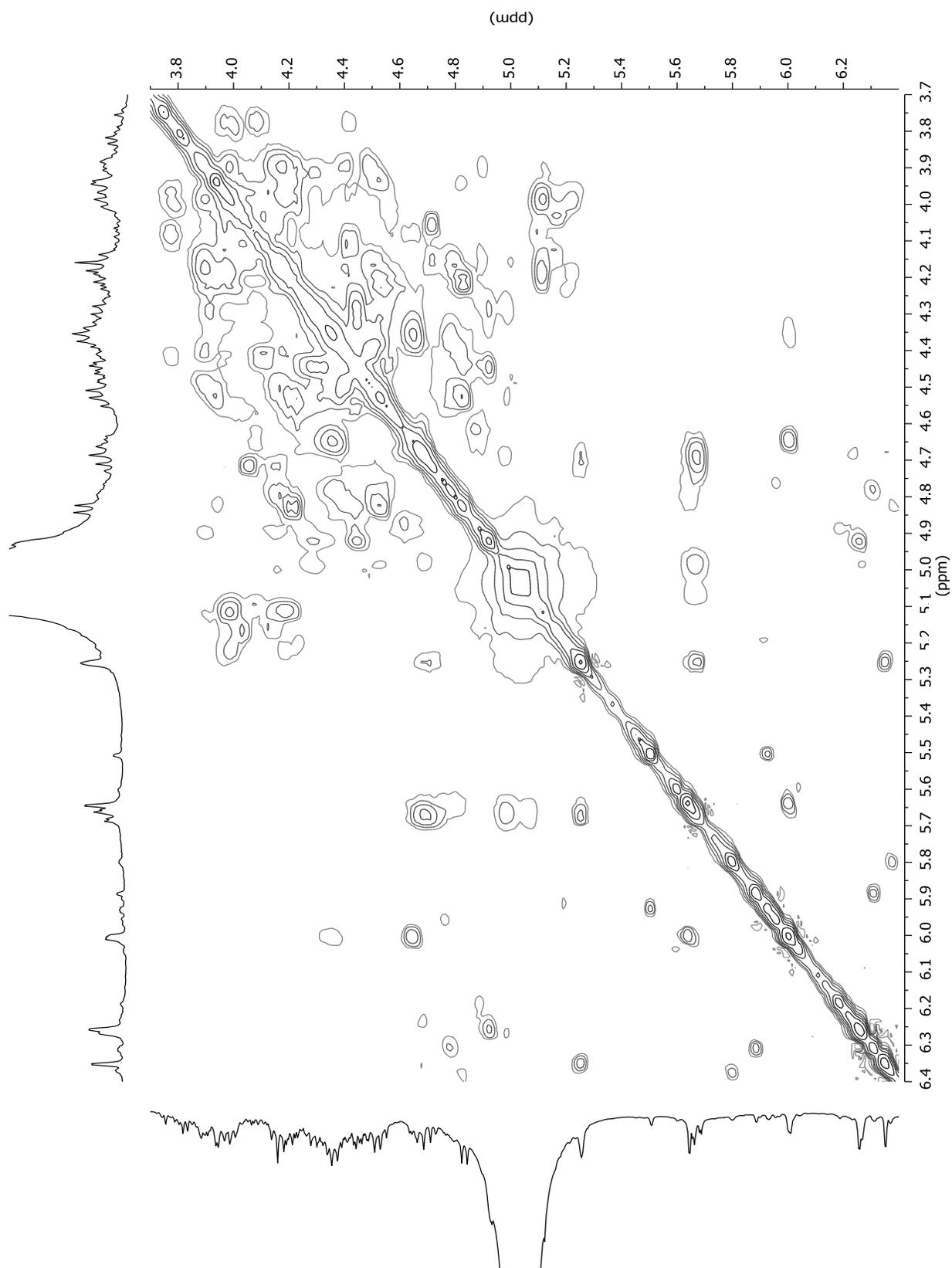
Espectro de RMN ^1H del compuesto F4P4 (piridina- d_5 , 600 MHz)



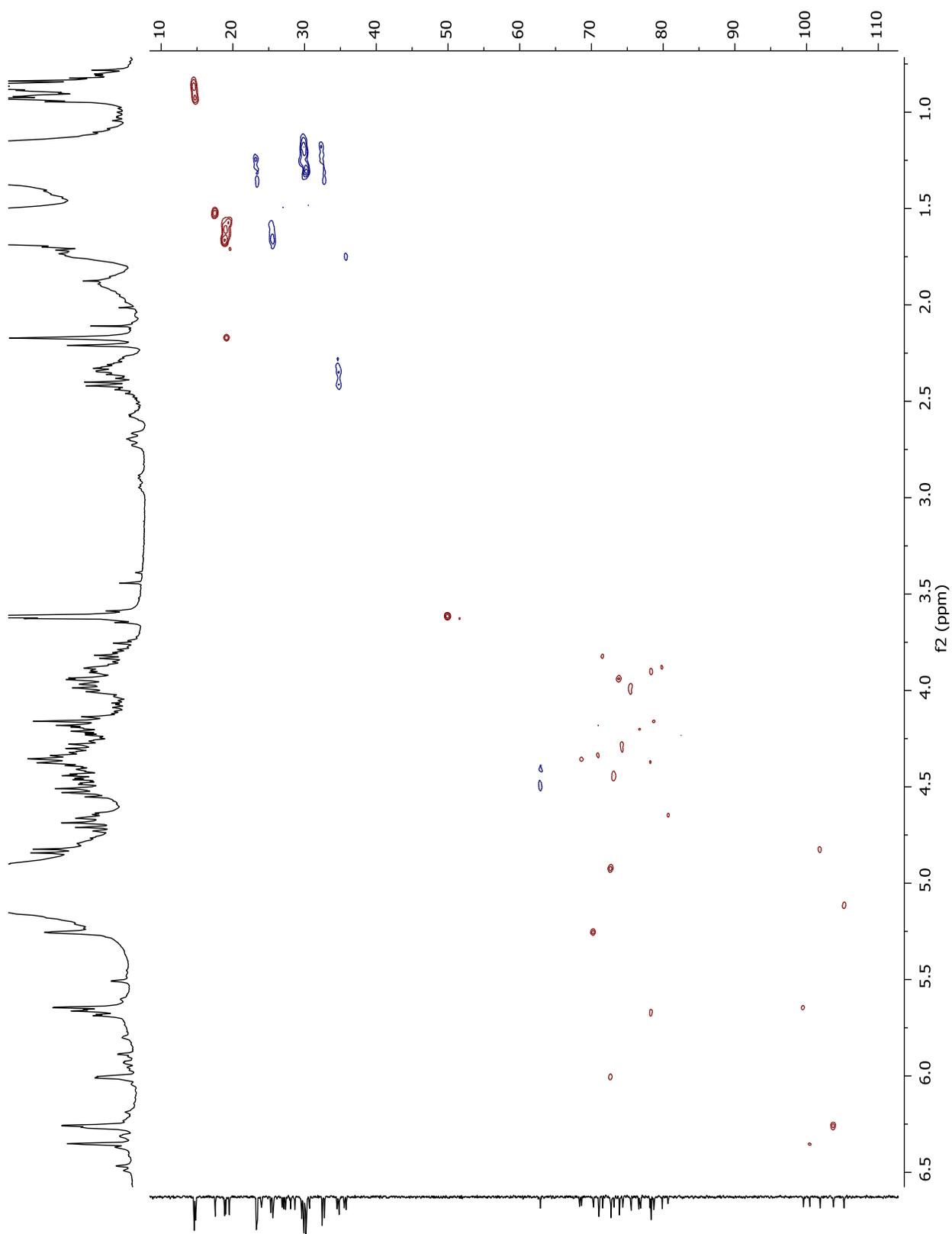
Espectro COSY del compuesto F4P4 (piridina- d_5 , 600 MHz)



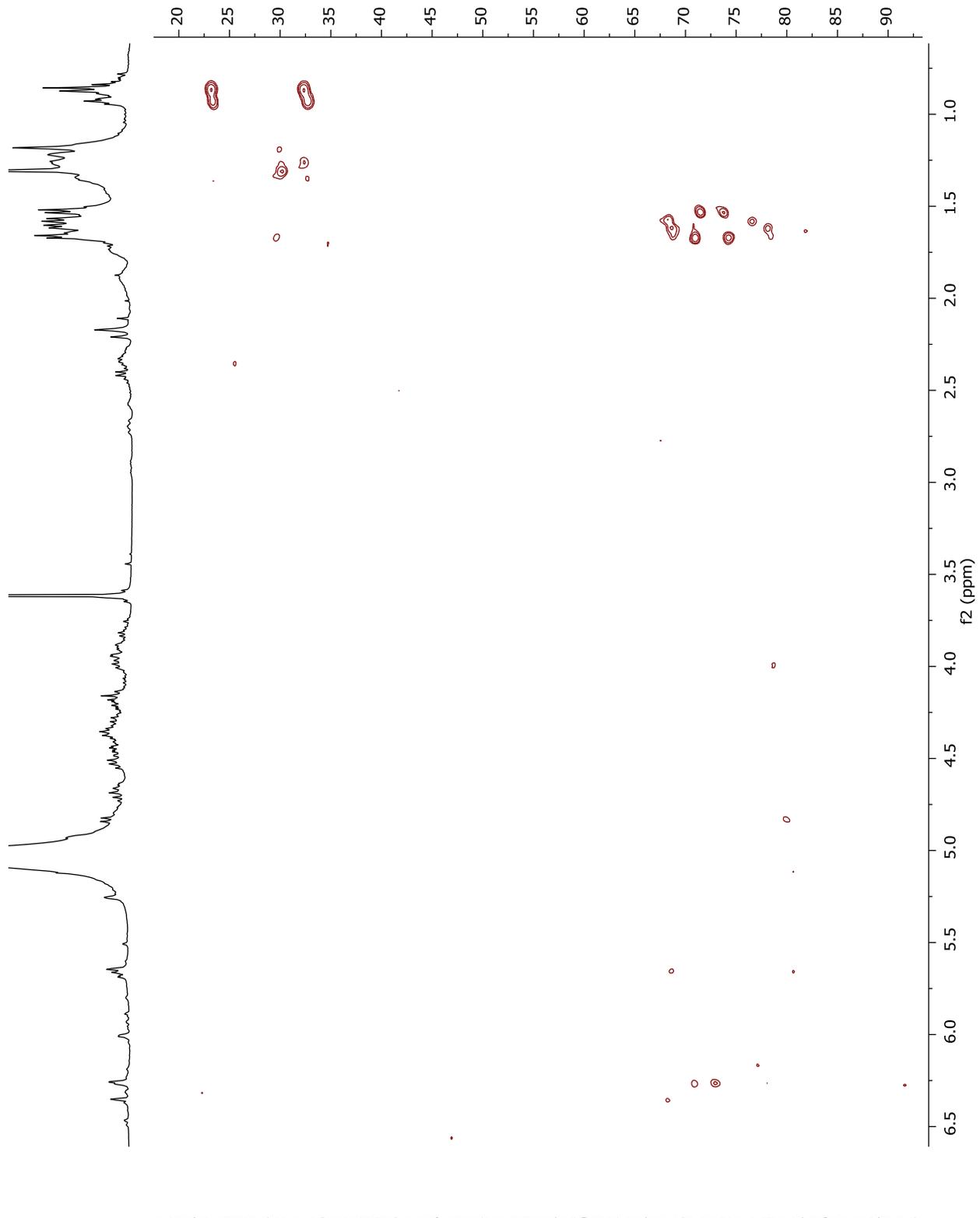
Espectro TOCSY del compuesto F4P4 (piridina-*d*₅, 600 MHz)



Espectro HSQC del compuesto F4P4 (piridina-*d*₅, 600 MHz)

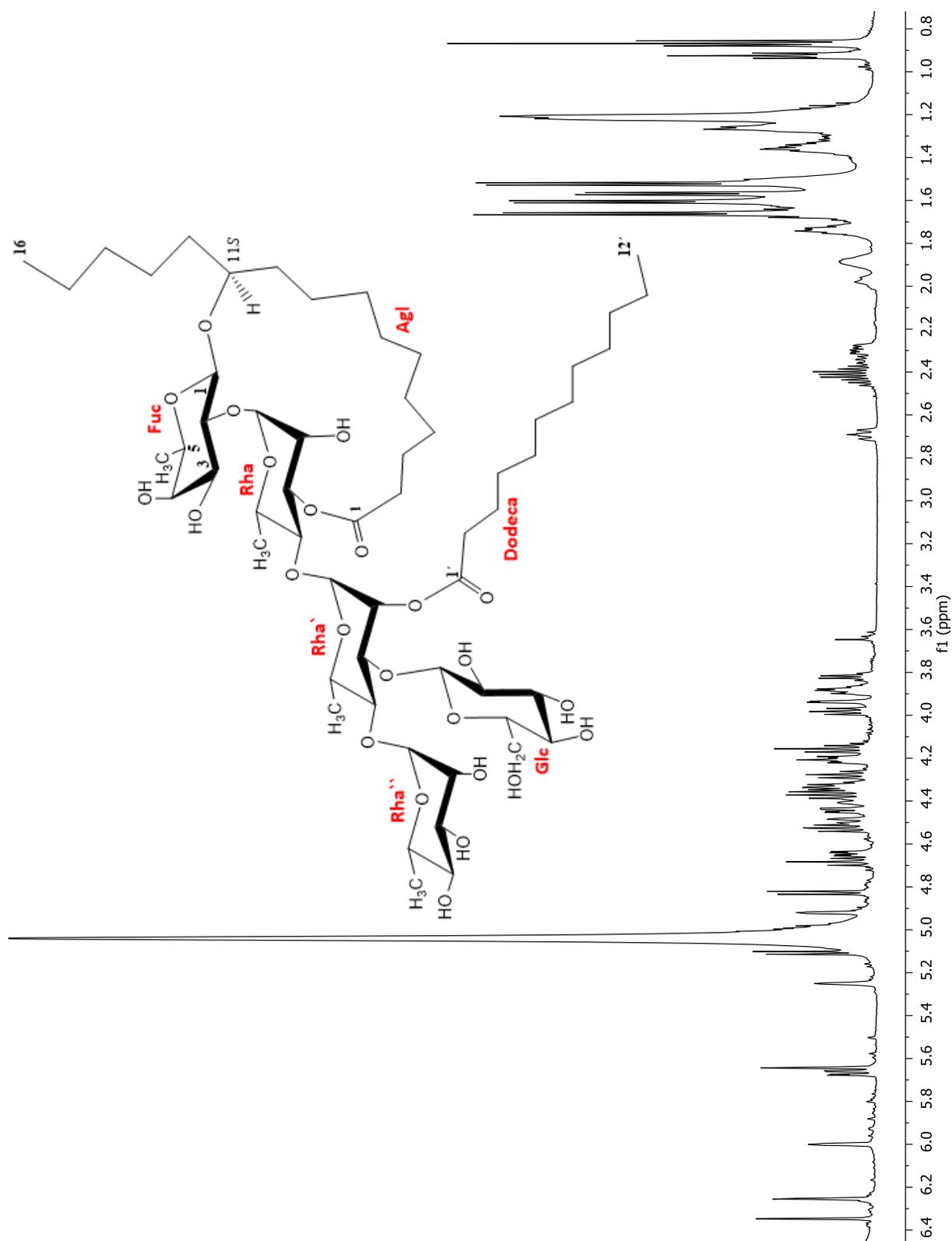


Espectro HMBC del compuesto F4P4 (piridina-*d*₅, 600 MHz)

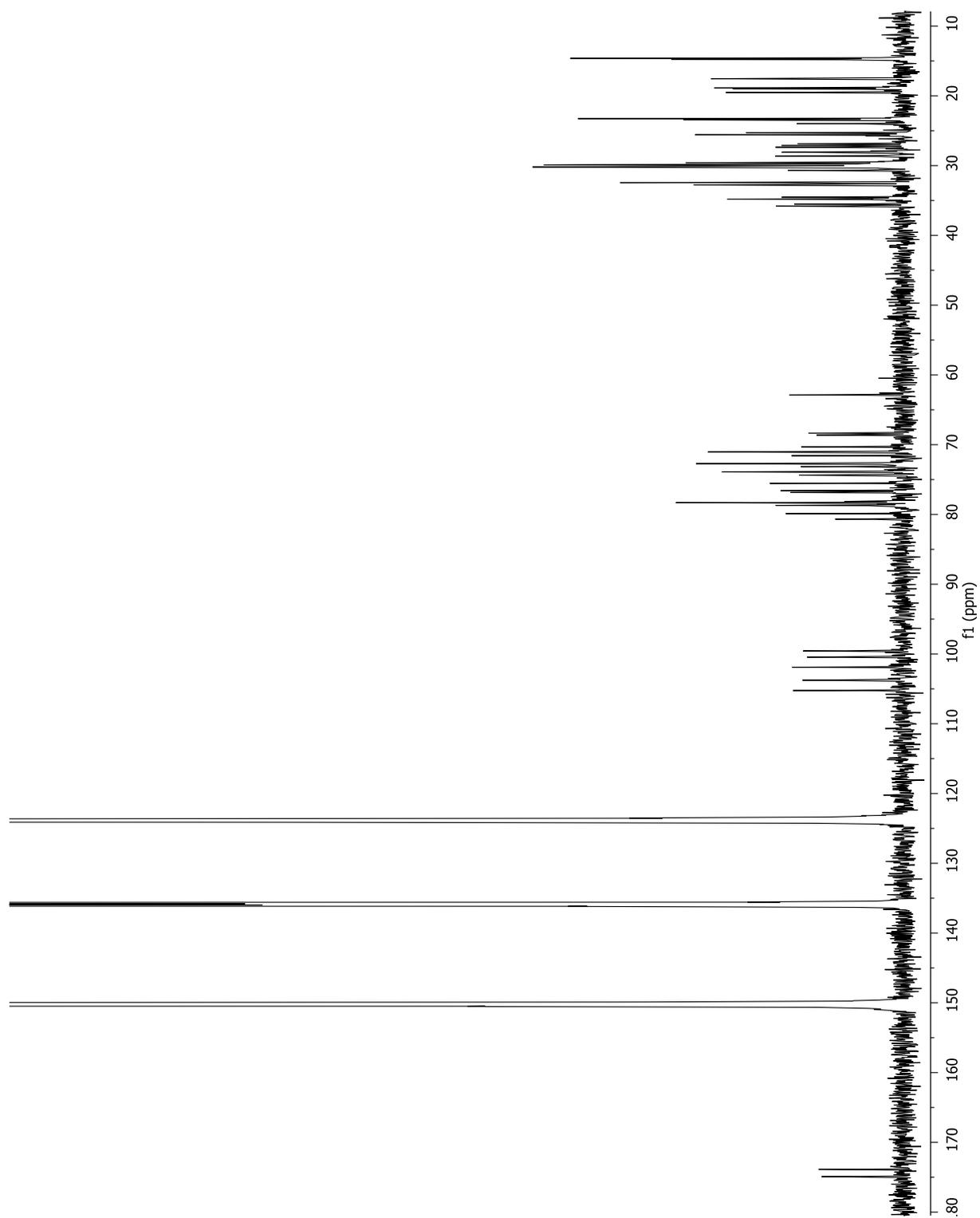


10.2 Espectros RMN en una y dos dimensiones del compuesto F4P7

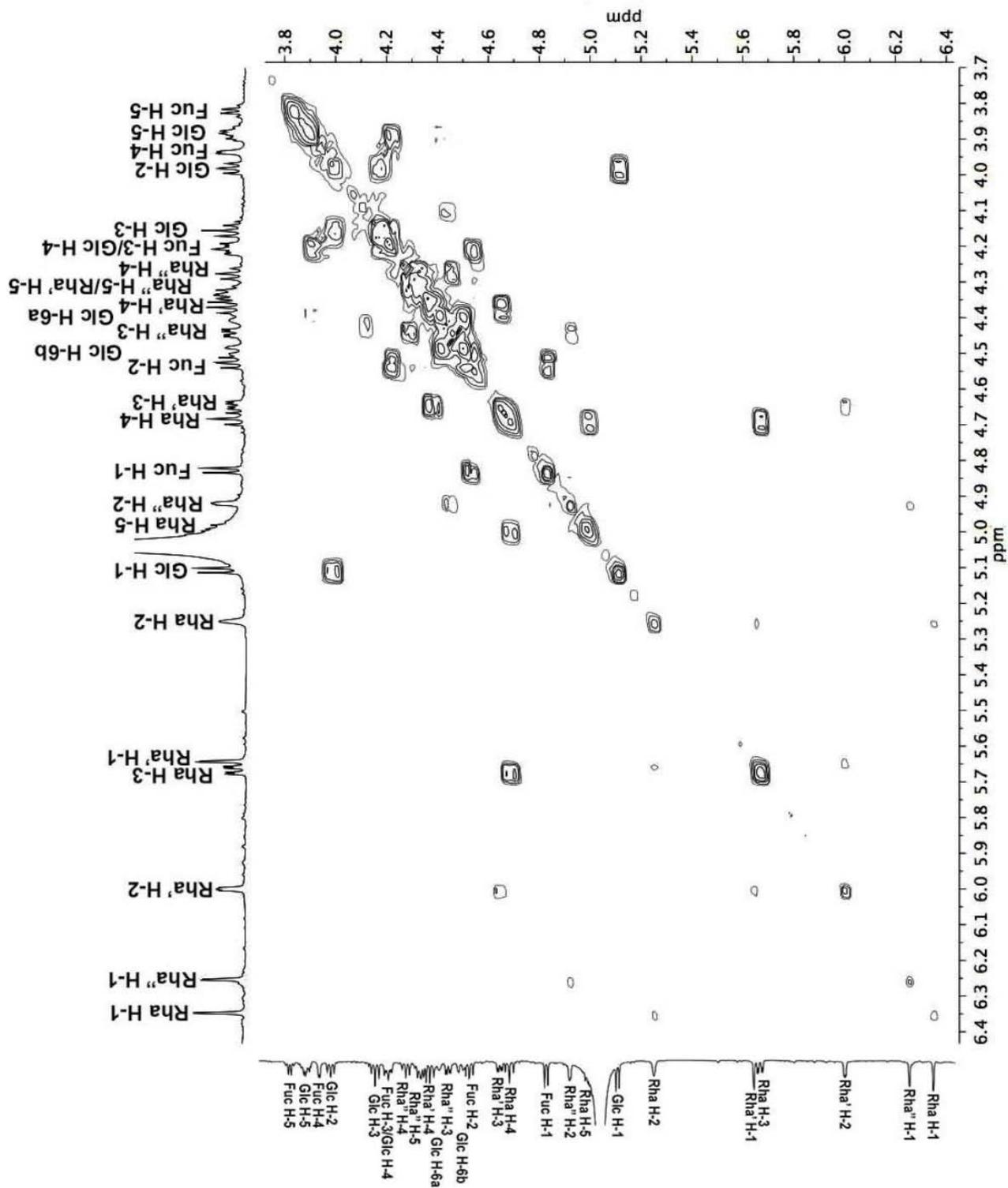
Espectro de RMN ^1H del compuesto F4P7 (piridina- d_5 , 600 MHz)

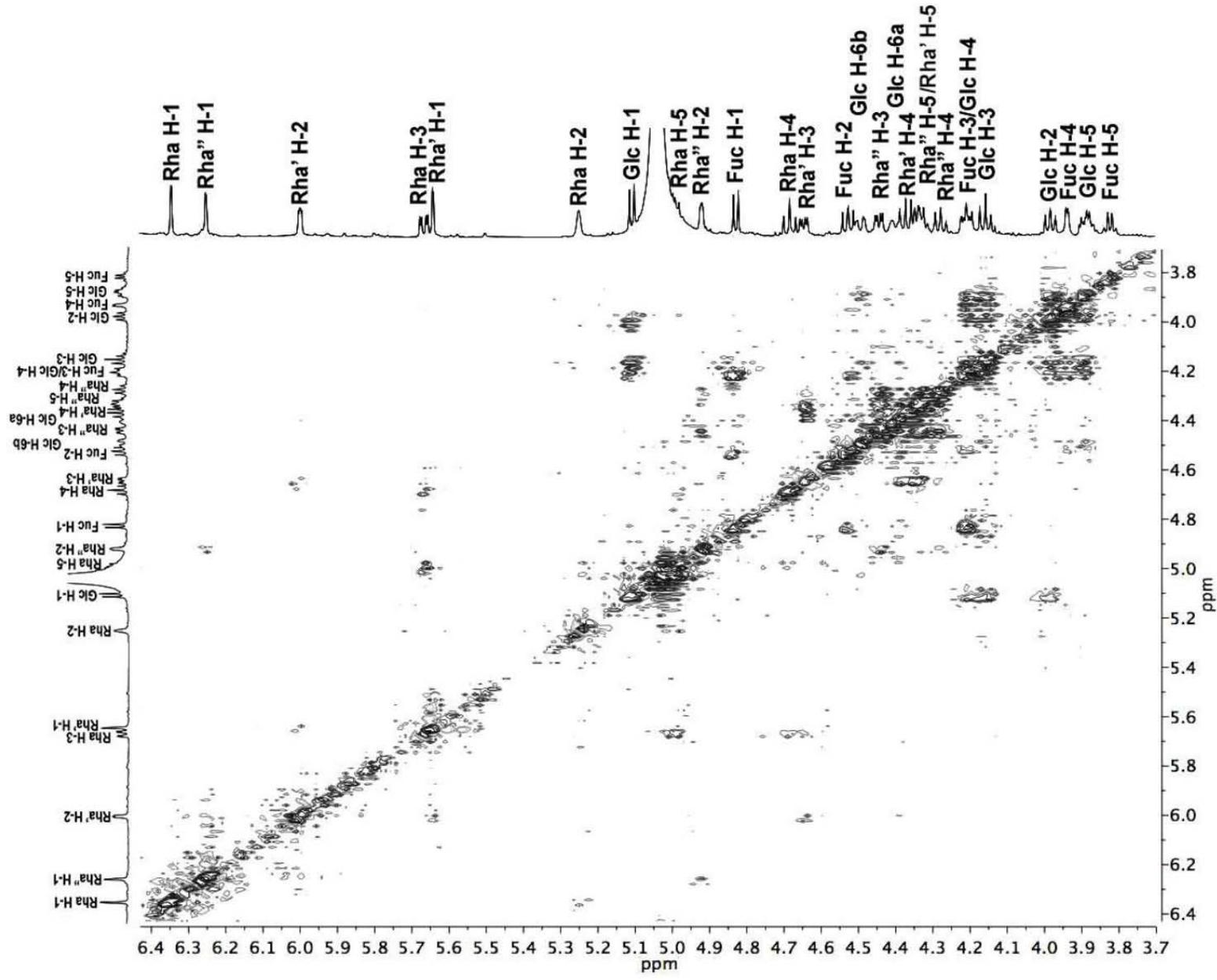


Espectro de RMN ^{13}C del compuesto F4P7 (piridina- d_5 , 600 MHz)

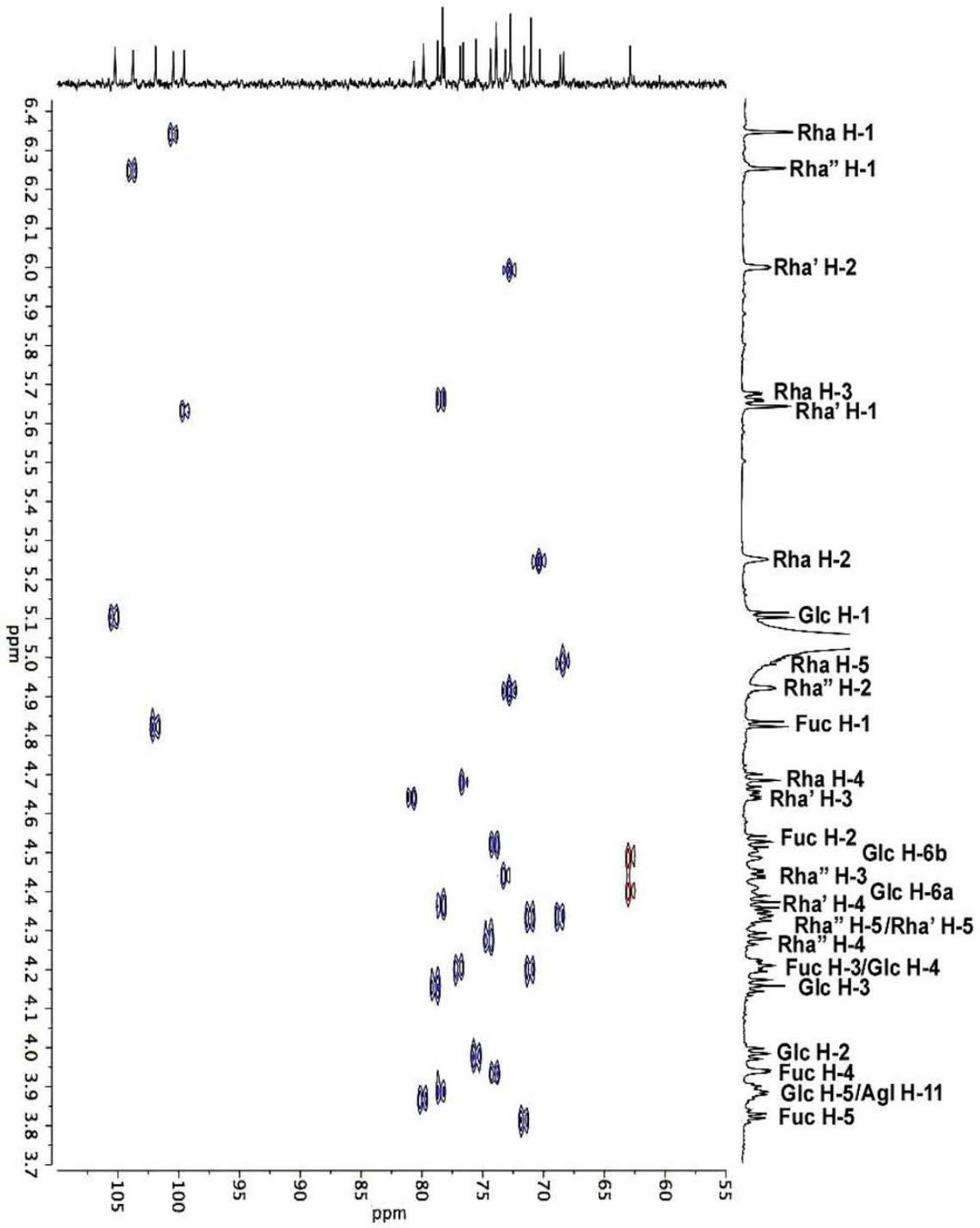


Espectro COSY del compuesto F4P7 (piridina-*d*₅, 600 MHz).



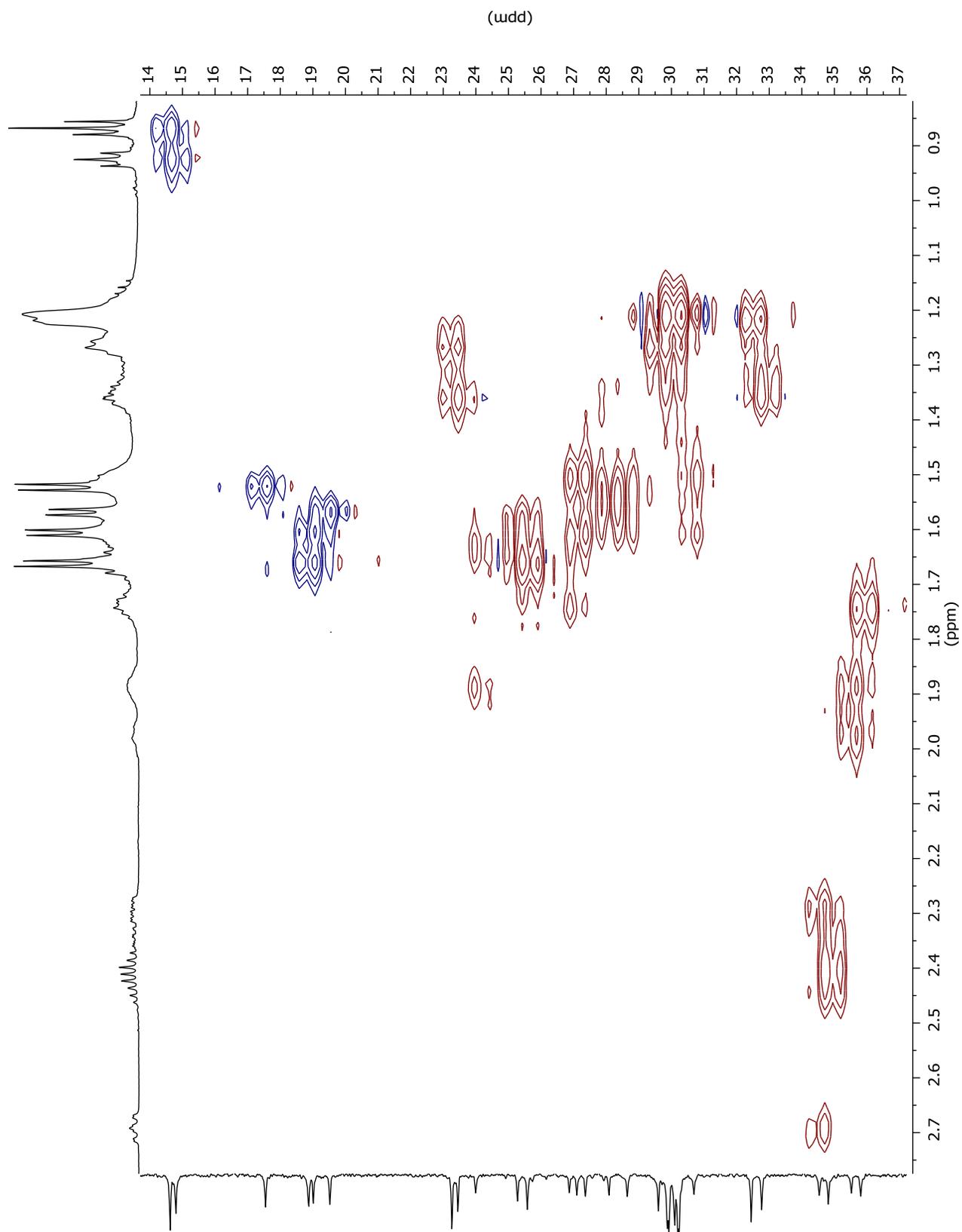


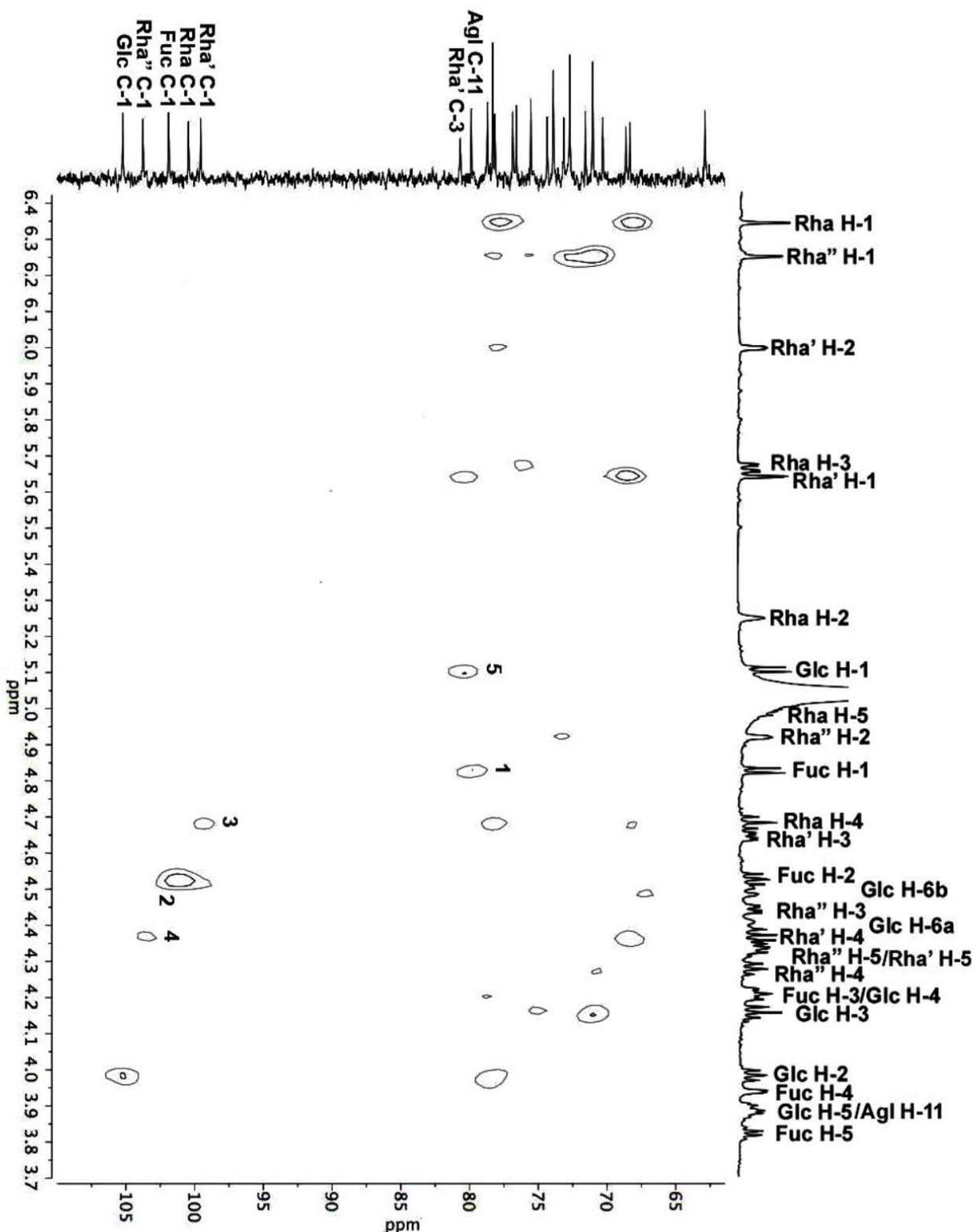
Espectro TOCSY del compuesto F4P7 (piridina-*d*₅, 600 MHz).



Espectro HSQC del compuesto F47 (piridina-*d*₅, 600 MHz).

Ampliación del espectro HSQC del compuesto F4P7 (piridina- d_5 , 600 MHz).





Espectro HMBBC del compuesto F4P7 (piridina-*d*₅, 600 MHz). Asignaciones: véase página 69.