



## **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

### **PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS**

“Purificación mediante HPLC y caracterización estructural de un lipotetrasacárido constitutivo de las resinas glicosídicas de *Operculina hamiltonii*”

### **TESIS**

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q.F.B. Pedro de Jesús Flores Tafoya

Tutor: Dr. Rogelio G. Pereda Miranda  
Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM

Ciudad Universitaria, Ciudad de México, enero de 2020.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

<b>Presidente</b>	Dr. José Federico del Río Portilla
<b>Vocal</b>	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
<b>Vocal</b>	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
<b>Vocal</b>	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
<b>Secretario</b>	Dr. José Alberto Rivera Chávez

### **Lugar 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, bajo la asesoría del Dr. Rogelio G. Pereda Miranda.

Los resultados derivados de esta investigación se presentaron en:

La 15ª Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales Dr. Juan Rogelio Aguirre Rivera del 22 al 25 de mayo de 2019, San Luis Potosí, SLP, México.

## **AGRADECIMIENTOS**

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

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación y la beca otorgada (CVU: 887571).

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 (M. en C. Nayeli López Balbiaux y M. en C. Rosa Isela del Villar Morales) y de espectrometría de masas (Q. Georgina Duarte Lisci).

A la Dra. Rosineide Costa Simas (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil) por la obtención de los espectros de masas de alta resolución.

A la Dra. Suzana Guimarães Leitão (Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil) por los registros de RMN (900 MHz) así como por la identificación del material vegetal objeto de estudio.

A los miembros del jurado por las observaciones realizadas y sus sugerencias para el mejoramiento del escrito.

A la Dra. Mabel Fragoso Serrano por sus comentarios y ayuda en la realización de este trabajo.

Al Dr. Rogelio G. Pereda Miranda por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por todas las observaciones y enseñanzas a lo largo de mi formación académica.

## RESUMEN

*Operculina hamiltonii* (G.Don) D.F. Austin & Staples es una planta oriunda de Brasil que se utiliza con fines terapéuticos en la medicina tradicional, y entre sus usos principales destaca su acción purgante, de ahí proviene su nombre común en portugués como la “batata de purga”. La comercialización de esta raíz es muy frecuente en los mercados locales, donde se pueden obtener productos fitofarmacéuticos en forma de tinturas y ralladuras de la droga cruda seca.

La presente disertación comprende el aislamiento y la elucidación estructural de una resina glicosídica novedosa presente en el extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (1:1) obtenido de las raíces secas de la droga cruda en estudio. La purificación se llevó a cabo mediante cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) en fase reversa, empleando las técnicas de corte de núcleo y de reciclaje de pico, mientras que la elucidación estructural se realizó a través del análisis de los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN) y de ionización por electronebulización (EM-ESI). También, se llevaron a cabo reacciones degradativas (hidrólisis básica y ácida) y de derivatización (silylación) con el objetivo de simplificar la elucidación estructural de las agliconas y determinar la posición de acilación en el núcleo tetrasacárido del ácido jalapινόico (11 S-hidroxihexadecanoico), que corresponde al ácido operculínico C, el cual está constituido por tres unidades de L-ramnosa y una de D-fucosa.

Se demostró que este glicolípido corresponde a una macrolactona intramolecular en la posición C-2 de la segunda unidad monosacárida (la unidad interna de ramnosa) con un patrón de acilación desconocido en la literatura, teniendo como los residuos de ácidos grasos (agliconas) a dos ésteres de cadena lineal, el ácido *n*-hexadecanoico en la parte más externa de la molécula (la posición C-4 de la unidad de ramnosa), y el ácido *n*-decanoico, en su porción interna y vecinal a la posición de lactonización. Esta molécula representa el primer ejemplo de una resina glicosídica tetrasacárida en la familia de las convolvuláceas con el ácido *n*-hexadecanoico como residuo acilante.

## ABSTRACT

*Operculina hamiltonii* (G.Don) D.F. Austin & Staples is a native Brazilian medicinal plant widely used for its purgative and laxative properties, and from which its vernacular name is derived in the Portuguese language (“batata de purga”). Its commercialization is extensive in the Brazilian local markets, where a great number of phytopharmaceutical products, such as tinctures and other preparations to treat gastrointestinal illness are sold.

This work describes the isolation and structural elucidation of a novel resin glycoside present in the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH (1:1) extract obtained from the dried-root drug. The purification was carried out by RP-HPLC, using the “core-cutting, peak-shaving”, and “peak-recycling” techniques, meanwhile the structural elucidation was performed through the combination of spectroscopic and spectrometric techniques such as nuclear magnetic resonance (1D and 2D NMR experiments) and mass spectrometry under electrospray ionization (MS-ESI). A series of degradative reactions (alkaline and acid hydrolysis) along with derivatizations (silylation) were carried out to simplify the elucidation task of the aglycones and to determine their position of acylation in the tetrasaccharide core –the known operculinic acid C–, which is formed by three units of L-rhamnose and one of D-fucose with jalapinic acid (11*S*-hydroxyhexadecanoic), as the aglycone.

It was possible to conclude that the natural product represented a macrolactone of operculinic acid C with two acylating residues, *n*-hexadecanoic and *n*-decanoic acids; the longest residue was located in the outer face at the C-4 position of the external rhamnose unit; while the second residue was placed at the most internal part of the molecule, vicinal to the position of lactonization. This glycolipid represents the first example of a tetrasaccharide-based resin glycoside derived from a member of the morning glory family with *n*-hexadecanoic acid as an acylating residue.

## ÍNDICE

	Pág
I. ÍNDICE DE FIGURAS .....	1
II. ÍNDICE DE CUADROS .....	4
III. LISTA DE ABREVIATURAS .....	5
1. INTRODUCCIÓN. ....	7
2. ANTECEDENTES. ....	12
2.1 La familia Convolvulaceae. ....	12
2.2 El género <i>Ipomoea</i> : hábitat, usos y propiedades. ....	13
2.2.1 El género <i>Ipomoea</i> y las raíces de jalapa en México y Brasil. ....	13
2.2 <i>Operculina hamiltonii</i> : especie sinonímica del género <i>Ipomoea</i> . ....	16
2.3 Resinas glicosídicas. ....	19
2.3.1 Naturaleza química de las resinas glicosídicas. ....	19
2.3.2 Descubrimiento de las resinas glicosídicas. ....	21
2.3.3 Técnicas utilizadas para el aislamiento de las resinas glicosídicas. ....	21
2.3.4 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas. ....	22
2.3.5 Biogénesis de las resinas glicosídicas. ....	27
2.4 Resinas glicosídicas y derivados de especies de <i>Operculina</i> . ....	29
3. JUSTIFICACIÓN. ....	31
4. HIPÓTESIS. ....	32
5. OBJETIVOS. ....	32
5.1. Objetivo general. ....	32
5.2 Objetivos específicos. ....	32
6. DESARROLLO EXPERIMENTAL. ....	33
6.1 Métodos cromatográficos. ....	33
6.2 Material vegetal. ....	33
6.3 Preparación del extracto orgánico. ....	33
6.4 Fraccionamiento primario del extracto orgánico. ....	34
6.5 Aislamiento de las resinas glicosídicas. ....	34
6.5.1 Obtención de perfiles cromatográficos a nivel analítico. ....	34
6.5.2 Aislamiento de los componentes a nivel preparativo. ....	34
6.7 Determinación de propiedades espectrométricas. ....	35
6.8 Derivatización del pico de interés. ....	36
6.8.1 Saponificación. ....	36
6.9 Análisis de carbohidratos. ....	37

6.9.1 Hidrólisis ácida.....	37
7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	39
7.1 Aislamiento de las resinas glicosídicas.....	39
7.1.1 Obtención de perfiles cromatográficos a nivel analítico. ....	39
7.1.2 Aislamiento a nivel preparativo. ....	39
7.2 Determinación de propiedades espectrométricas.....	42
7.3 Análisis de carbohidratos.....	44
7.4 Elucidación estructural por RMN del ácido glicosídico. ....	45
8. CONCLUSIONES.....	60
9. PERSPECTIVAS.....	61
10. BIBLIOGRAFÍA. ....	62
11. ANEXOS .....	68
10.1 Espectros de RMN del ácido glicosídico aislado (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> )....	68
10.2 Espectros de RMN del producto natural aislado (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ). ...	73

## I. ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Convolvulácea ( <i>Ipomoea purpurea</i> ) mostrando el crecimiento característico de enredadera.....	12
<b>Figura 2.</b> A) Sistema de producción tradicional de jalapa en Veracruz; B) Ilustración de la jalapa en el trabajo “Historia Natural” de Juan Navarro (UNAM, 1801); C) Raíces ahumadas (oscuras) y frescas (claras) de jalapa; D) Ejemplo de raíces secas de jalapa ofrecidas de manera comercial. (Pereda-Miranda et al., 2010). .....	15
<b>Figura 3.</b> Distribución geográfica de las dos variedades de <i>Operculina hamiltonii</i> . .....	17
<b>Figura 4.</b> <i>Operculina hamiltonii</i> : frutos secos, flores amarillas y hojas hastadas en forma de una punta de jabalina. ....	18
<b>Figura 5.</b> Estructura de una resina glicosídica hipotética. En negro se observa la porción hidrofílica conformada por tres unidades de L-ramnosa y una de D-fucosa. En rojo se observa la porción hidrofóbica, en este caso conformada por un ácido decanoico esterificando la posición C-3 de la ramnosa interna y una macrolactona de 16 átomos de carbono unida en las posiciones C-2 de ramnosa interna con su grupo carbonilo y en C-1 de fucosa se establece el enlace glicosídico.....	20
<b>Figura 6.</b> Esquema general de la reacción de siliación.....	23
<b>Figura 7.</b> Ejemplos de ácidos glicosídicos con nombres asociados a sus fuentes de aislamiento. ....	24
<b>Figura 8.</b> Espectro de masas en modo negativo (EM/EM-ESI) de la muestra de batatina I.....	25
<b>Figura 9.</b> Tricolorina A en estado sólido: A) Los cristales en la interfase de agua y una mezcla de aceite mineral y etanol mediante el método de difusión inversa de vapor para proteínas; B) Celda unitaria que muestra la presencia de cuatro moléculas de conformación independiente y dieciocho moléculas de agua (representadas como esferas) en la celda unidad asimétrica; C) Alternancia de las caras hidrófila (núcleo de tetrasacárido) e hidrofóbicaa (aglicina macrocíclica) donde las moléculas de agua median el contacto entre dos bicapas de glicolípido (Lira-Ricárdez y Pereda-Miranda, 2019).....	28

<b>Figura 10.</b> Estructuras tetrasacáridas con el núcleo del ácido operculínico C.....	29
<b>Figura 11.</b> A) Estructura del ácido operculínico J. B) Estructura de los ácidos operculínicos H e I. AO, ácido operculínico; R, sustituyente. (Lira-Ricárdez et al, 2019).....	30
<b>12.</b> Esquema general de la reacción de metilación con diazometano para los ácidos carboxílicos. ....	37
<b>Figura 13.</b> Espectro del derivado sililado del éster metílico correspondiente al ácido 11-hidroxihexadecanoico liberado mediante la saponificación del pico F3P9 ( $t_R$ 14.5 min). ....	38
<b>Figura 14.</b> Perfil cromatográfico a nivel analítico de la F-3.....	39
<b>Figura 15.</b> Perfil cromatográfico a nivel preparativo de la F-3. Se pueden observar los once picos que componen dicha fracción, mismos que se procesaron con la técnica de “corte núcleo”. ....	40
<b>Figura 16.</b> Reciclaje del pico F3P9. En rojo se muestran las partes que fueron eliminadas durante este proceso y en color verde se indica el pico recolectado. .	41
<b>Figura 17.</b> Conjunto isotópico del ion $[M - H]^-$ obtenido mediante EM-ESI en modo de ionización negativo.....	43
<b>Figura 18.</b> Espectro de masas mediante ESI en modo de ionización negativo, donde se muestran los picos correspondientes a los aductos de sodio ( $[M + Na]^+ m/z$ 879.45272) y potasio ( $[M + K]^+ m/z$ 895.42622). ....	44
<b>Figura 19.</b> Cromatogramas de los azúcares sililados obtenidos a partir de la hidrólisis ácida del ácido glicosídico constitutivo del pico F3P9. ....	45
<b>Figura 20.</b> Espectro de RMN $^1H$ (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del ácido glicosídico constitutivo del pico P3F9. Entre corchetes se ilustra una expansión para la porción del espectro en la cual se encuentran las señales correspondientes a los protones anoméricos.....	47
<b>Figura 21.</b> Espectro de RMN $^{13}C$ (225 MHz, piridina- $d_5$ ) del ácido glicosídico constitutivo del pico F3P9.....	47
<b>Figura 22.</b> Espectro COSY (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del ácido glicosídico. Las correlaciones encontradas se muestran por medio de cuadros de conectividad en distinto color. ....	48

<b>Figura 23.</b> Espectro TOCSY para el ácido glicosídico. En línea negra punteada se muestra el ejemplo de correlación para la fucosa. ....	49
<b>Figura 24.</b> Espectro HSQC (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) del ácido glicosídico. ....	50
<b>Figura 25.</b> Espectro HMBC (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) del ácido glicosídico. Las correlaciones se indican con flechas en negro. ....	50
<b>Figura 26.</b> Estructura del ácido operculínico C. ....	51
<b>Figura 27.</b> Conjunto isotópico en modo positivo de la especie catiónica observada [M + MeOH + H] <sup>+</sup> . ....	52
<b>Figura 28.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) del producto minoritario completo y con ampliación de la zona de señales de carbohidratos y posiciones de esterificación, en zona superior. ....	53
<b>Figura 29.</b> Experimento COSY (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) del producto minoritario en donde se muestran las interacciones encontradas a través de cuadros de conectividad, para los distintos monosacáridos que conforman el núcleo oligosacárido. ....	54
<b>Figura 30.</b> Espectro TOCSY (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) para el producto F3P9. En línea negra punteada se muestra el ejemplo de correlación para la fucosa. ....	55
<b>Figura 31.</b> Espectro HSQC (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) del producto F3P9. ....	56
<b>Figura 32.</b> Espectro de HMBC (900 MHz, piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> ) del producto minoritario. Las correlaciones observadas se señalan con flechas negras. ....	57
<b>Figura 33.</b> Estructura de la resina glicosídica aislada. ....	58

## II. ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Relación de las sinonimias de <i>Operculina hamiltonii</i> a lo largo de la historia.....	16
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Operculina hamiltonii</i> . .....	17
<b>Cuadro 3.</b> Relación de los eluatos recolectados con sus tiempos de retención y masa obtenida a partir del fraccionamiento en HPLC preparativo de la muestra F3. ....	41
<b>Cuadro 4.</b> Análisis isotópico para la determinación de la fórmula molecular $C_{40}H_{71}O_{19}$ del anión $[M - H]^-$ de la molécula saponificada. ....	43
<b>Cuadro 5.</b> Relación de desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento (J en Hz) de RMN para los productos aislados. ....	46
<b>Cuadro 6.</b> Análisis isotópico para la determinación de la fórmula molecular $C_{67}H_{123}O_{22}$ del catión $[M + MeOH + H]^+$ generado por el producto natural F3P9 mediante ionización por electronebulización en modo positivo. ....	52

### III. LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
2D	Dos dimensiones
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
COSY	Correlation spectroscopy
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
dq	Doble cuarteto
EM	Espectrometría de masas
ESI	Ionización mediante electronebulación
Fuc	Fucosa
HMBC	Heteronuclear multiple bond correlation
HSQC	Heteronuclear single quantum correlation
HPLC	High performance liquid chromatography
I.R.	Índice de refracción
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
MHz	Mega Hertzios
Piridina-d <sub>5</sub>	Piridina deuterada
Ram	Ramnosa
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia magnética nuclear de carbono trece
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de protón
t	Triplete
TMS	Tetrametilsilano

TOCSY

$t_R$

uma

$[M + H]^+$

$[M - H]^-$

$\delta$

Total correlation spectroscopy

Tiempo de retención

Unidad de masa atómica

Catión de la molécula protonada

Anión de la molécula desprotonada

Desplazamiento químico

## 1. INTRODUCCIÓN.

El uso de plantas para el tratamiento de distintos padecimientos se conoce desde la era del hombre de Neandertal, que habitó Europa y partes del oeste de Asia hace unos 300 000 – 24 000 años atrás, gracias a una serie de estudios paleoantropológicos y de metagenómica realizados por Hardy y colaboradores (2012). La medicina tradicional, que incluye la medicina china, la ayurvédica de la India, la yunani persa-árabe y diversas formas de medicina indígena, emplea terapias que involucran el empleo de hierbas, partes de animales y materiales inorgánicos que se han utilizado y desarrollado a partir de prácticas empíricas durante milenios. Dicho conocimiento se ha transmitido de viva voz a lo largo de la historia de la civilización humana y por medio de documentos escritos creados por las principales culturas en el mundo (Houghton, 1995).

La evidencia más antigua de este hecho, se encuentra plasmada en las losas de arcilla de Napur (antigua Mesopotamia), las cuales involucran a más de 250 plantas, tales como la amapola (*Papaver rhoeas* L.), el beleño (*Hyoscyamus niger* L.) y la mandrágora (*Mandragora officinalis* Mill.). Por su parte, los chinos difundieron la información a través del libro *Pen T'sao*, el primer compendio de *Materia Medica* de China (2500 a.C.), donde se mencionan al menos 1500 drogas herbolarias documentadas en las 50 ediciones revisadas de este libro, muchas de las cuales se utilizan hoy en día (Hou, 1977). Los Libros Sagrados de los Vedas describieron las propiedades medicinales de especias como el clavo (*Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry), la pimienta (*Piper nigrum* L.) y la nuez moscada (*Myristica fragrans* Houtt.); mientras que la civilización egipcia aportó uno de los documentos más relevantes para el desarrollo de la medicina moderna, el *Papiro de Ebers* (1550 a.C.), en donde se mencionan alrededor de 800 prescripciones, así como la utilidad terapéutica de 700 sustancias de origen vegetal, animal y mineral entre las que se destaca las especies de plantas de la granada (*Punica granatum* L.), el ricino (*Ricinus communis* L.), el aloe (*Aloe vera* L. Burm f.), el ajo (*Allium sativum* L.) y el higo (*Brachiaria jubata* (Fig. & De Not.) Stapf), entre otras (von Klein, 1905). *De Materia Medica* (*Acerca de la Materia Medicinal* en español) es una obra en cinco volúmenes escrita por Dioscórides alrededor del año 65 d.C. y precursora de

la farmacopea moderna. En el prefacio se describe el objetivo de la obra: "sobre la preparación, propiedades y pruebas de drogas". El texto describe unas 600 plantas medicinales conocidas en la antigüedad clásica, unos 90 minerales y alrededor de 30 sustancias de origen animal. A diferencia de otras obras clásicas, este libro tuvo una enorme difusión en la Edad Media tanto en su original griego como en otras lenguas, tales como el latín y el árabe. Este compendio es considerado como el predecesor de los libros sobre hierbas (libros florísticos) o "herbarios" de uso entre los siglos XVI y XIX (Leonti et al., 2009). En esta obra, destaca la descripción de la escamonia, un líquido gomoso-resinoso obtenido por incisiones de la raíz de escamonea, *Convolvulus scammonia* L. (Gunther, 1968), una enredadera perteneciente a la familia Convolvulaceae, nativa de la región mediterránea oriental y conocida por sus propiedades como purgante drástico que incide en el intestino delgado (Al-Snafi, 2016).

Otro documento, de estructura similar y de gran importancia para nuestro país, es el Códice de la Cruz-Badiano (*Libellus de medicinalibus indorum herbis*, 1552). Este herbario es el primer libro escrito en latín por indígenas del nuevo mundo sobre plantas curativas de la Nueva España en el siglo XVI, en el cual se mencionan 224 especies autóctonas de la flora mexicana que los aztecas utilizaban como remedios para tratar diversas enfermedades -contiene 185 ilustraciones- (de la Cruz, 1991). También, el códice incluye algunas medicinas de origen no vegetal, como ceniza, cuernos de venado, cabellos y dientes de cadáver. Entre las plantas en el *Libellus* destacan las familias botánicas Asteraceae (margaritas) y Fabaceae (leguminosas), como sucede en las floras de la medicina tradicional de todo el mundo (Bye y Linares, 2013). Éste menciona también cinco especies vegetales de la familia de las convolvuláceas; tres de las cuales han sido perfectamente identificadas como pertenecientes al género *Ipomoea*: *I. batatas* (L.) Lam. (*tlacacamohltli*; camote), *I. stans* Cav. (*tlaquilin*; tumbavaqueros) e *I. purga* (Wender.) Hayne (*huelicpahtli*; raíz de jalapa), en cuyas ilustraciones se reconocen fácilmente las características anatómicas de estas plantas herbáceas con crecimiento en forma de enredaderas, flores en forma de embudo y raíces tuberosas grandes (camotes). Su uso como purgantes en la época prehispánica, y que fue consignado en el códice, continúa en

la actualidad, de donde proviene el nombre científico de *I. purga* para el *huelicpahtli*, la verdadera raíz de jalapa (Pereda-Miranda et al., 2006).

Antes del siglo XX, la medicina europea constituía una forma de medicina tradicional, cuyo formidable arsenal de medicamentos derivaba de productos naturales, principalmente plantas y partes vegetales de la región mediterránea, pero con adiciones significativas de Oriente Medio, Asia y las Américas. Sin embargo, hoy en día, la medicina tradicional y la terapia de medicamentos herbolarios constituyen un componente muy significativo de la atención médica moderna para la mayoría de la población mundial (Süntar, 2019). En 2005, la Organización Mundial de la Salud esbozó su importancia en términos de gasto y uso tanto en los países en desarrollo, como en los países desarrollados, constatando que en África hasta el 80% de la población recurrió a los métodos vernáculos locales de curación, mientras que el 42% de aquellos encuestados, en los Estados Unidos, habían buscado formas alternativas o tradicionales de atención de la salud al menos una vez (OMS, 2005). Los productos y prácticas de la medicina tradicional contemporánea se suelen utilizar en todo el mundo como complemento de la prestación de servicios de salud locales, lo que hace de la medicina tradicional un fenómeno verdaderamente global para determinar y facilitar el acceso a prácticas y productos inocuos (OMS, 2014). La importancia de la medicina tradicional en el mundo en desarrollo y su creciente popularidad en los países industrializados, como los miembros de la Comunidad Europea y los Estados Unidos, ha despertado el interés de la industria farmacéutica y de la comunidad científica de investigación biomédica mundial, que han tratado de capitalizar el conocimiento contenido en estas prácticas tradicionales vernáculas (Gertsch, 2009). El reconocimiento por parte de la academia de los beneficios de la fitoterapia ha permitido el desarrollo de la investigación en productos naturales de origen vegetal y microbiano con el fin de aislar los compuestos bioactivos (Mata et al., 2019). Una fuente obvia y rica de información sobre estos productos reside en las terapias tradicionales de medicación (Süntar, 2019). Al menos el 25% -y probablemente más- de los medicamentos actuales derivan de plantas y se ha encontrado que los medicamentos de origen vegetal son eficaces en el tratamiento del cáncer, como lo

son: el taxol (*Taxus brevifolia* Nutt.), la vincristina, la vinblastina (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don) y la podofilotoxina (*Podophyllum peltatum* L.), *inter alia*, para el VIH como el calanólido A (*Calophyllum lanigerum* var. *austrocoriaceum*) y para el paludismo como la quinina (*Cinchona officinalis* L.) y la artemisinina (*Artemisia annua* L.), tanto que algunas empresas farmacéuticas han dirigido su investigación básica en esta área (Balunas, 2005; Gertsch, 2009). Hay más de 20 000 especies de plantas utilizadas en medicamentos tradicionales en todo el mundo que pueden ser "reservorios de nuevos medicamentos potenciales". Estos factores han dado lugar a la "bioprospección" (Gertsch, 2009), la idea de que se pueden encontrar nuevos fármacos mediante el estudio de la medicina herbolaria y la fitoterapia en las sociedades contemporáneas (Gu et al., 2014).

Debido a esto, surgió el interés por conocer a los responsables de los efectos curativos de las plantas medicinales. Así, se iniciaron las primeras investigaciones químicas en la era moderna (principios del siglo XIX), con el aislamiento de la morfina a partir del opio (*Papaver somniferum* L.) en 1803, lo que daría la pauta para la obtención de otros alcaloides como la cocaína (*Erythroxylum coca* Lam.) y la quinina, *inter alia* (Busse, 2006). Estos productos naturales de origen vegetal, llamarían la atención e inspirarían las mentes de los químicos más prominentes de la época tanto por su complejidad estructural, así como por sus características fisicoquímicas, impulsando así el desarrollo de nuevos principios activos (Balunas, 2005; Atanasov, 2015). Si bien el progreso de la biología molecular y la química combinatoria logró desplazar a los productos naturales como las principales fuentes de descubrimiento y generación de fármacos, éstos han tenido un resurgimiento en tiempos recientes gracias al advenimiento de las ciencias ómicas (McColl et al., 2019). Ejemplo de esto, es el caso de la quinina, la cual ha demostrado que en combinación con algunas tetraciclinas como la doxiciclina resulta más eficaz para tratar el paludismo que incluso otros productos naturales como la artemisina y sus derivados semisintéticos (Hoffman et al., 2011). De igual manera, análogos de la colchicina y derivados semisintéticos con una elevada actividad citotóxica contra células malignas, prometen ser las futuras terapias contra el cáncer (Kumar et al., 2017).

Este interés por descubrir nuevos principios activos provenientes particularmente de la flora, es aún mayor en los países megadiversos como Brasil (Calderon et al., 2009) y México (Mata et al., 2019). Tal es el caso de la familia Convolvulaceae, la cual se encuentra distribuida ampliamente en estas regiones y, desde tiempos remotos, ha sido utilizada con fines ornamentales, nutricionales, y medicinales. En especial el género *Ipomoea*, contiene especies de uso extendido por los pobladores de las zonas rurales y urbanas. Recientemente, se comprobó que estas propiedades están asociadas a un alto contenido de resinas glicosídicas o glicorresinas (Pereda-Miranda et al., 2010). Estos constituyentes son los principios activos de la escamonia, la resina de la escamonea (*C. scammonia*) descrita por Dioscórides y que fue el principal purgante utilizado en Europa desde la época precristiana hasta mediados del siglo XVI cuando se introdujo la raíz de jalapa mexicana (*I. purga*). Los tubérculos de esta planta fueron las drogas crudas 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 más moderados. La demanda comercial de la jalapa a mediados del siglo XX disminuyó debido al uso de otros laxantes derivados de la cáscara de semillas de *Plantago ovata* Forssk. (las fibras de algunos miembros del género *Plantago*) y las hojas del sen (*Senna alexandrina* Mill.), así como la dominación del mercado mundial por los productos herbolarios que se componen de resinas de la jalapa brasileña, *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. y *O. hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples (Lira-Ricárdez et al., 2019).

La presente disertación versa sobre el aislamiento y la caracterización estructural de una resina glicosídica o glicolípido novedoso que se obtuvo de una de las fracciones lipofílicas del extracto soluble en CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (1:1) de las raíces pulverizadas de la jalapa brasileña (*O. hamiltonii*). El aislamiento se llevó a cabo por medio de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), mientras que la caracterización estructural se realizó empleando la combinación de técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas por ionización mediante electronebulización (EM-ESI), en conjunto con degradaciones químicas.

## 2. ANTECEDENTES.

### 2.1 La familia Convolvulaceae.

Esta familia de plantas tropicales comprende alrededor de 1 650 especies, siendo el género *Ipomoea* el más importante con unas 600-700 especies, algunas de las cuales se comparten con otros géneros como el *Operculina* (20 spp). Una característica particular de las especies herbáceas de las convolvuláceas es su crecimiento en forma de enredaderas, del cual se derivó el nombre de la familia, i.e. del latín *convolvere* (enrollarse) (**Figura 1**), siendo considerada como una familia de plantas parásitas para cultivos como el café (Meira et al., 2012; Osorio et al., 2018).



**Figura 1.** Convolvulácea (*Ipomoea purpurea*) mostrando el crecimiento característico de enredadera.

Otro notable atributo es la presencia de células secretoras de glicorresinas en los tejidos foliares y florales, semillas y en el peridermo de raíces tuberosas. Entre los metabolitos secundarios que pueden contener las convolvuláceas se encuentran los alcaloides derivados de la ornitina, el tropano, triptófano, fenilpropanoides, terpenoides, pirrolizidinas, ácidos grasos y derivados como las resinas glicosídicas (Eich, 2008; Pereda-Miranda et al., 2010).

## 2.2 El género *Ipomoea*: hábitat, usos y propiedades.

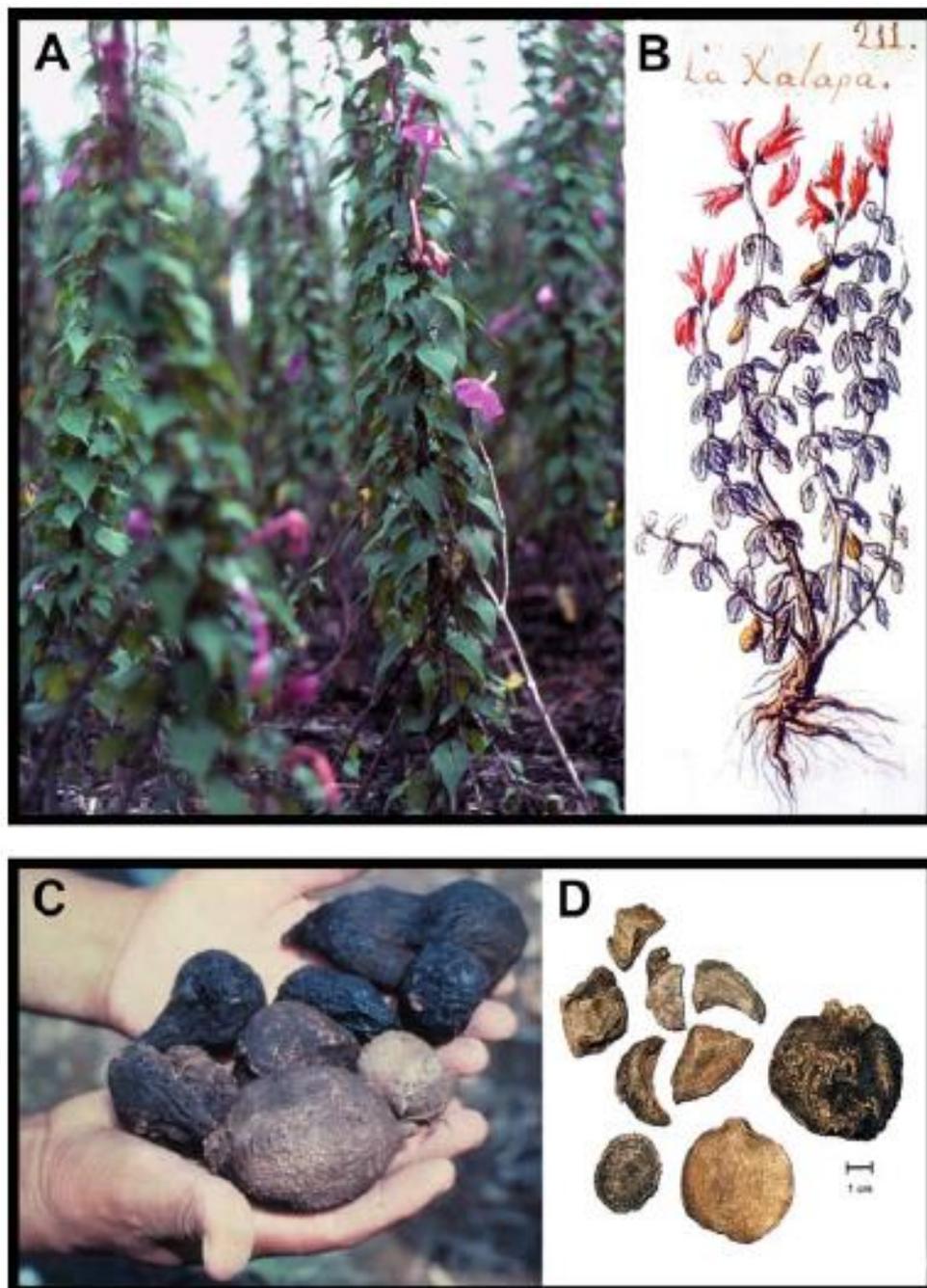
Este género se distribuye en las zonas tropicales de manera preponderante, aunque algunas especies se han adaptado a zonas templadas (*I. squamosa*). Su distribución se da a lo largo del continente americano, principalmente en Centro y Sur América, y en algunas partes tropicales de África. Este género se ha usado con propósitos nutricionales como en el caso del camote (*I. batatas*) y el kangkong (*I. aquatica*), agronómicos para el control de plagas (*I. tricolor* Cav.), ceremoniales, religiosos (*I. corymbosa* e *I. violaceae*) o decorativos (*I. alba* e *I. purpurea*) y medicinales para provocar la evacuación (*I. purga*). Entre sus actividades biológicas más destacadas se encuentran las propiedades analgésicas, espasmolíticas, antimicrobianas, hipotensivas, psicomiméticas y anticancerígenas (Cao et al., 2005; Meira et al., 2012).

### 2.2.1 El género *Ipomoea* y las raíces de jalapa en México y Brasil.

La relación que existe entre este género y nuestro país data desde hace siglos; ya que los aztecas utilizaban las semillas de *I. corymbosa* e *I. violaceae* como alucinógenos, que eran conocidas como *ololiuhqui* y *tlitliltzin*, en el idioma náhuatl, respectivamente, debido al contenido de alcaloides del ergot biosintetizados por hongos endófitos del género *Periglandula*, que viven en asociación en los tejidos de estas convolvuláceas (Steiner, 2018). En la actualidad, los indígenas mazatecos conservan esta tradición chamánica (Schultes, 1973). De igual manera, los médicos aztecas (*tíciitl*) empleaban raíces tuberosas de convolvuláceas conocidas como “*cacamotli tlanquiloni*” como un remedio purgante. Este complejo de plantas medicinales incluía a las siguientes especies: *I. purga*, *I. stans*, *I. orizabensis*, *I. jalapa*, principalmente y todas eran usadas como laxantes. Tales propiedades serían reconocidas por los colonizadores españoles, quienes más tarde incorporarían estas especies en la medicina galénica del siglo XVI europea. Debido a esto se generaron vínculos económicos importantes entre América y Europa, siendo el principal, la exportación de la llamada “raíz de Michoacán o ruibarbo de las Indias” (*I. purga*) (**Figura 2**), la cual se nombró en honor a la provincia de la

Nueva España, donde se encontró por primera vez. Posteriormente, estos colonos le darían el nombre vernáculo de “raíz de jalapa” haciendo alusión a la zona tropical de Xalapa en el Estado de Veracruz, donde se le halló en abundancia. Otra especie encontrada en Veracruz es la falsa jalapa (*I. orizabensis*), la cual se ha utilizado como un adulterante o sustituto de la especie oficial, *I. purga*. Otro tipo de tubérculos purgantes introducidos al comercio mundial son las jalapas brasileñas del género *Operculina*, originalmente clasificadas como miembros de *Ipomoea*: *O. macrocarpa* (*I. operculata*) y *Operculina hamiltonii* (*I. alulata*) (Pereda-Miranda et al., 2006).

Los productos fitofarmacéuticos de las jalapas brasileñas se presentan en forma de extractos alcohólicos líquidos, ralladuras de raíz y resinas secas que se consumen individualmente o en combinación con otros ingredientes para modificar el efecto terapéutico purgante o laxante. Estos productos se comercializan ampliamente en el norte y el noreste del territorio brasileño, destacándose el extracto hidroalcohólico fabricado por la Industria Sobral (Lira-Ricárdez et al., 2019). Por otra parte, los remedios caseros se preparan como una decocción, normalmente de una sección de 2 cm de la raíz por litro de agua. Las drogas crudas catárticas se derivan de las raíces que son ricas en resinas glicosídicas (10-18%) y provocan movimientos peristálticos en el intestino. Estos glicolípidos biodinámicos han demostrado la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana celular y el transporte tanto de cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), como de aniones ( $\text{Cl}^-$ ), que podría desencadenar un desequilibrio en la homeostasis celular a través de su actividad como formadores de poros en el intestino delgado (Pereda-Miranda et al. 2009). Éste podría ser el mecanismo de acción para la actividad catártica de las jalapas actuando como laxantes osmóticos, que causan un aumento en la eliminación de agua y los movimientos peristálticos del intestino, a través de una disminución de la expresión de la acuaporina 3 en las células del colon y la activación de las vías del factor nuclear proinflamatorio  $\text{NF-}\kappa\text{B}$  y la ciclooxigenasa-2 (Zhu et al. 2019).



**Figura 2.** A) Sistema de producción tradicional de jalapa en Veracruz; B) Ilustración de la jalapa en el trabajo *“Historia Natural”* de Juan Navarro (UNAM, 1801); C) Raíces ahumadas (oscuras) y frescas (claras) de jalapa; D) Ejemplo de raíces secas de jalapa ofrecidas de manera comercial. (Pereda-Miranda et al., 2010).

## 2.2 *Operculina hamiltonii*: especie sinonímica del género *Ipomoea*.

Esta especie endémica de Brasil se conoce en portugués con los nombres populares de “batatão”, “batata de purga”, “jalapa brasileira”, “jalapa”, “raíz-do-jeticucu” y “mechoacã” (“mechoacam”). Su nombre científico oficial es *Operculina hamiltonii* (G.Don) D.F. Austin & Staples desde 1983, aunque a lo largo de la historia ha mantenido varias sinonimias con otros géneros relacionados como *Convolvulus* e *Ipomoea* (**Cuadro 1**). Existen dos variedades o subespecies, *O. hamiltonii* var. *hamiltonii* y *O. hamiltonii* var. *mucronata*, siendo la primera, la más distribuida en Centroamérica, las Antillas y el norte de Suramérica, en la cuenca del río Amazonas (**Figura 3**). La información taxonómica sobre esta especie se presenta en el **Cuadro 2**.

**Cuadro 1.** Relación de las sinonimias de *Operculina hamiltonii* a lo largo de la historia.

### **Año**   **Sinonimia**

1794	<i>Convolvulus triqueter</i> Vahl
1819	<i>Ipomoea triquetra</i> (Vahl) Roem. & Schult.
1838	<i>Ipomoea hamiltonii</i> G. Don
1844	<i>Ipomoea alulata</i> Miq.
1845	<i>Ipomoea pterodes</i> Choisy <i>Ipomoea ampliata</i> Choisy
1869	<i>Operculina altissima</i> Meisn. <i>Operculina pterodes</i> (Choisy) Meisn.
1894	<i>Opercuina triquetra</i> (Vahl) Hallier f.
1901	<i>Operculina pterodes</i> f. <i>pubescens</i> Pilger
1902	<i>Operculina alata</i> Urb.
1906	<i>Operculina ampliata</i> (Choisy) House
1981	<i>Operculina alata</i> var. <i>pubescens</i> (Pilger) O'Donell
1983	<i>Operculina hamiltonii</i> (G.Don) D.F. Austin & Staples



**Figura 3.** Distribución geográfica de las dos variedades de *Operculina hamiltonii*.

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

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

*Operculina hamiltonii* es una planta trepadora perenne de raíz tuberosa y tallo alado. Las partes leñosas más viejas son estriadas en espiral con un diámetro de al menos 5 mm. Las hojas son hastadas, tienen pecíolos que pueden ser alados o estriados midiendo de 8-35 mm de largo. Por su parte, las flores son axilares, solitarias; los pedúnculos pueden ser angulados o estriados y en ocasiones alados con un largo de 33-80 mm. Posee dos brácteas lanceoladas a ovaladas; su ápice es agudo a atenuado, y cuando está seco es de color marrón rojizo, con 7-16 mm de largo y 3-6.5 mm de ancho; pedicelos, clavados o angulados, glabros de 15-25 mm de largo; sépalos ampliamente ovados a suborbiculares basalmente obtusas a agudas, de márgenes delgados a membranosos, con ápices redondeados, obtusos o agudos de color marrón rojizo en estado seco de 23-30 mm de largo y 16-21 mm de ancho; su corola es campanulada de color amarillo claro; de estambres con filamentos que comprenden de 2/3 a 3/4 partes de su longitud. Sus frutos se encuentran en una cápsula operculada, septada conformada por dos cámaras, en las cuales puede haber de una a dos semillas de 15-20 mm de diámetro (**Figura 4**) (Austin, 1983). Dentro del complejo medicinal denominado como la raíz de jalapa brasileña, el color de las flores permite diferenciar a las dos especies que los conforman. Así, la jalapa brasileña con flores blancas corresponde a la especie oficial identificada como *O. macrocarpa*, en tanto que la especie sucedánea de amplio comercio en el norte y noreste brasileño corresponde a la especie de flores amarilla, *O. hamiltonii* var. *hamiltonii* (Moreno-Velasco, 2019).

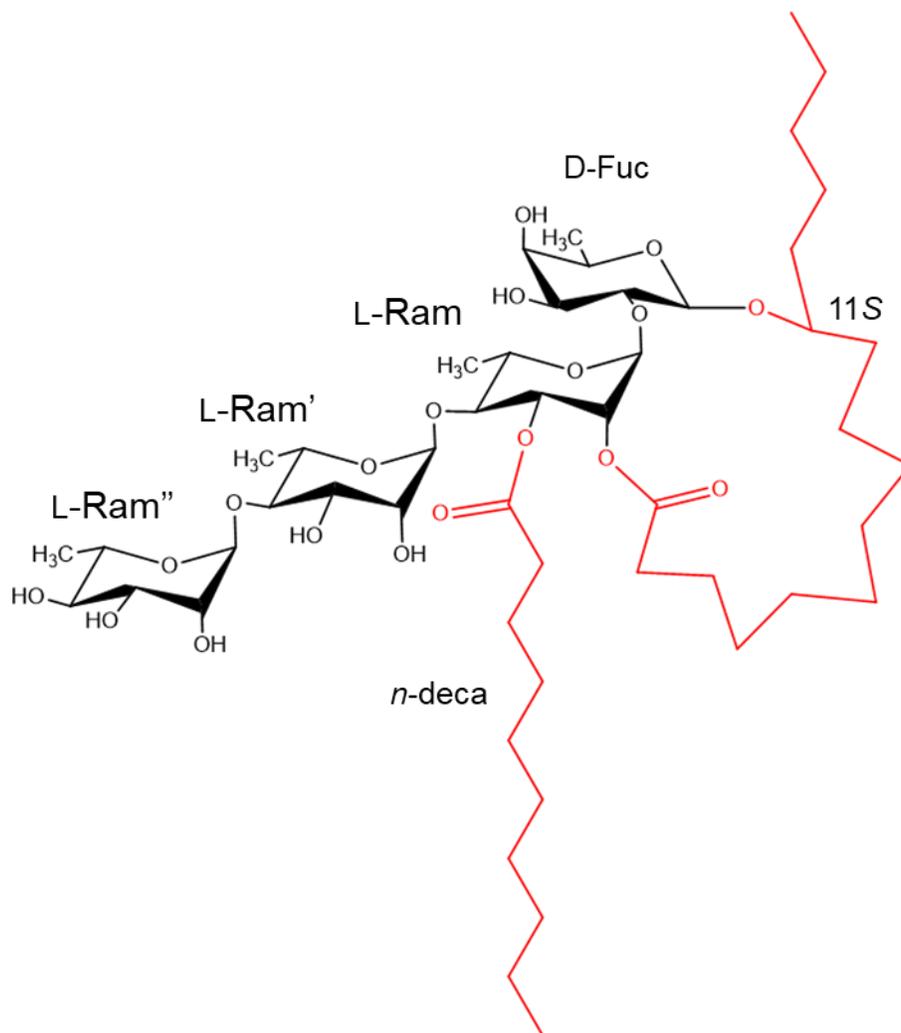


**Figura 4.** *Operculina hamiltonii*: frutos secos, flores amarillas y hojas hastadas en forma de una punta de jabalina.

## 2.3 Resinas glicosídicas.

### 2.3.1 Naturaleza química de las resinas glicosídicas.

Estos metabolitos secundarios únicos y de gran distribución dentro de la familia de las convolvuláceas se definen químicamente como derivados glicosilados de ácidos grasos de 14 o 16 átomos de carbono mono o dihidroxilados. Éstas tienen una porción hidrofóbica conformada por agliconas de ácidos grasos y una hidrofílica (**Figura 5**), la cual puede contener hasta siete unidades de azúcares (ácidos hederofólicos) (Gualteros-Montaña, 2019); lo anterior les confiere la capacidad de anfipaticidad. Entre las unidades sacáridas que podemos encontrar se encuentra la D-glucosa y epímeros de hexosas (D-fucosa, L-ramnosa, D-quinovosa, D-xilosa) en forma de piranosas. Estos azúcares se unen a sus fragmentos de aglicona por medio de un enlace O-glicosídico ya sea de manera lineal o ramificada. Entre los sustituyentes de tipo éster que se encuentran frecuentemente unidos a los núcleos oligosacáridos, están los ácidos alifáticos de cadena corta como el acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2*S*)-metilbutírico (mba), 3-metilbutírico (3-mba), (-)-(2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nílico, nla), los ácidos tíglicos (tga), arilalquílicos como el ácido *E*-cinámico, y ácidos grasos saturados con diferente largo de cadena como los ácidos *n*-hexanoico (hexa) o caproico, *n*-octanoico (octa) o caprílico, *n*-decanoico (deca) o cáprico, *n*-dodecanoico (dodeca) o láurico, *n*-hexadecanoico (hexadeca) o palmítico, *n*-octadecanoico (octadeca) o esteárico y *n*-eicosanoico (eicosa) o ácido araquídico. En un principio, las resinas se clasificaron con base en su solubilidad en éter como jalapinas (solubles) y convolvulinas (insolubles). Las jalapinas tienen como característica particular que la presencia de una macrolactona constituida por el ácido glicosídico hidroxilado o aglicona, mientras que las que pertenecen al grupo de las convolvulinas tienen pesos moleculares más elevados, lo que podría ser resultado de oligómeros de ácidos glicosídicos (Pereda-Miranda, 2010) y, en su mayoría, son especies acíclicas de oligómeros de seis y siete unidades sacáridas (Lira-Ricárdez et al., 2019).



**Figura 5.** Estructura de una resina glicosídica hipotética. En negro se observa la porción hidrofílica conformada por tres unidades de L-ramnosa y una de D-fucosa. En rojo se observa la porción hidrofóbica, en este caso conformada por un ácido decanoico esterificando la posición C-3 de la ramnosa interna y una macrolactona de 16 átomos de carbono unida en las posiciones C-2 de ramnosa interna con su grupo carbonilo y en C-1 de fucosa se establece el enlace glicosídico.

### **2.3.2 Descubrimiento de las resinas glicosídicas.**

El uso tradicional de diversas especies de convolvuláceas en todo el mundo como remedios purgantes y los hallazgos farmacológicos sobre las propiedades laxantes de las especies con mayor comercio internacional, como las jalapas mexicanas (*I. purga* e *I. orizabensis*), en conjunto con el advenimiento de las técnicas de alta eficiencia como la cromatografía de líquidos, permitieron su purificación en cantidades suficientes para establecer su estructura molecular mediante el empleo de la resonancia magnética nuclear (RMN). Desde el aislamiento de las orizabinas I-IV en 1987 (Noda et al, 1987), hasta la fecha se han aislado y caracterizado más de 250 resinas (Pereda-Miranda et al., 2010; Lira-Ricardez, 2019). En conjunto con las dos especies mencionadas de *Ipomoea*, *C. scammonia* y *O. macrocarpa* representan las drogas crudas más importantes en términos de contenido de glicorresinas (Eich, 2008).

### **2.3.3 Técnicas utilizadas para el aislamiento de las resinas glicosídicas.**

Prácticamente desde el aislamiento de las orizabinas en 1987 por Noda y col. (Noda et al, 1987), la técnica más utilizada para purificar resinas glicosídicas y derivados es la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC por sus siglas en inglés) en conjunto con otras como la cromatografía en columna abierta (CCA), con el objetivo de eliminar residuos de poco interés basados en su polaridad. Además, se ha empleado la cromatografía en capa fina (CCF) para el análisis de las fracciones provenientes del pretratamiento de limpieza de las resinas crudas (Kitakawa et al., 1988; Gualteros-Montaño, 2019). Por sí sola, la HPLC otorga la máxima resolución en un tiempo de análisis relativamente corto por el tamaño de partícula  $< 25 \mu\text{M}$ , con un tamaño de poro que va desde los 60-130 Å y una gran variedad de fases estacionarias. Algunos de los retos técnicos para lograr la purificación individual de los constituyentes presentes en las mezclas complejas de resinas glicosídicas son el desarrollo de un método analítico en donde se encuentren los factores más favorables tales como la fase móvil, el modo de elución (isocrático o en gradiente) y la carga máxima de muestra que ingresa al equipo,

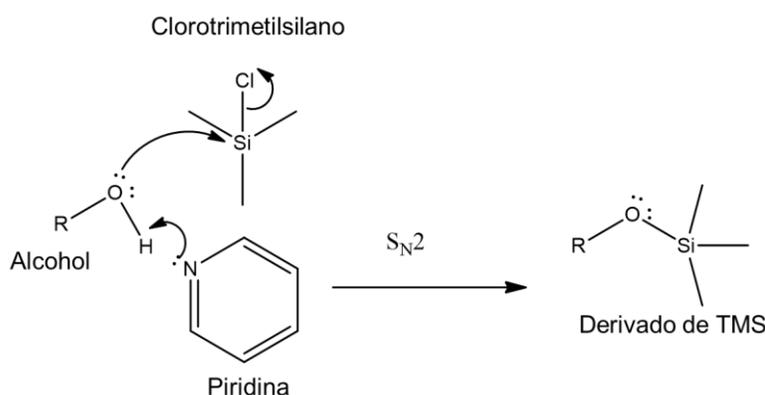
tanto la fase normal como la reversa (C<sub>8</sub>, C<sub>18</sub>, ciano, fenilo y amino). Aunque también se ha intentado usarla como único método de purificación (Okabe et al., 1971); sin embargo, se ha demostrado que esta estrategia no resulta totalmente conveniente cuando se desea obtener los componentes de forma individual. Otras estrategias empleadas para la purificación son la cromatografía en columna abierta (CCA) y de baja presión utilizando gel de sílice, Sephadex®, intercambio iónico, y filtración en gel. Éstas se han usado para el pretratamiento (“clean-up”) del extracto crudo original para eliminar pigmentos y grasas. Hoy en día, las técnicas de “corte de núcleo” y “reciclaje de pico” mediante HPLC, usadas solas o en combinación, han permitido el aislamiento de las glicorresinas de manera eficiente y con un grado de pureza superior al 99%. El mecanismo de estas técnicas radica en la reinyección de la muestra al sistema de HPLC tantas veces como se requiera mediante el acoplamiento de una válvula de reciclaje. Así, se aumenta el número de platos teóricos de la fase estacionaria para la separación de la muestra, permitiendo la resolución de los componentes traslapados (Pereda-Miranda et al., 2010).

#### **2.3.4 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas.**

La elucidación estructural de estas moléculas complejas, se lleva a cabo mediante la combinación de métodos químicos degradativos y técnicas espectroscópicas como la RMN y espectrométricas como la espectrometría de masas (EM). Uno de los métodos más empleados es la hidrólisis alcalina (saponificación) que produce la liberación de los ácidos esterificantes (solubles en la fase orgánica), los cuales se analizan por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por impacto electrónico (CG-EM-IE), y la apertura de la macrolactona, generando así el correspondiente ácido glicosídico (soluble en la fase acuosa) que se analiza mediante métodos suaves de ionización como el bombardeo atómico rápido (FAB) o la ionización por electronebulización (ESI). Si este ácido, se somete a condiciones de hidrólisis ácida, se obtiene el ácido graso hidroxilado (fase orgánica) correspondiente a la aglicona y las unidades sacáridas constitutivas del oligómero (fase acuosa). Las primeras nociones a cerca de estos derivados glicolipídicos y su aislamiento sucedió en 1844, cuando se encontró que la porción

insoluble en éter de *I. purga* (parte convolvulínica), tenía características glicosídicas, lo que orientaba a que ésta podría degradarse mediante una hidrólisis ácida en una disolución alcohólica. Hasta la década pasada, se conocían alrededor de 53 ácidos glicosídicos, muchos de los cuales poseen nombres triviales basados en las designaciones populares de plantas de las cuales se han obtenido (**Figura 6**), resulta lógico pensar que en la actualidad esta cantidad ha sido superada (Pereda-Miranda et.al, 2010).

El tamaño de la cadena, así como las posiciones exactas de hidroxilación de la aglicona se determinan por CG-EM-IE del éster metílico o derivados con el clorotrimetilsilano (TMSCl). Las unidades sacáridas se convierten en sus derivados volátiles mediante el tratamiento con TMSCl (sililación) (**Figura 7**) y subsecuente análisis por CG-EM. Para evitar la anomerización proveniente de la hidrólisis ácida, se recomienda la funcionalización a través de la mercaptalación del aldehído o bien con L-cisteína, para formar las correspondientes tiazolidinas y garantizar por este método la configuración absoluta, ambos procedimientos seguidos de la sililación para el análisis mediante CG-EMIE (Lira-Ricárdez et al., 2019). Los monosacáridos se pueden detectar también por HPLC usando una columna analítica para carbohidratos (Pereda-Miranda et al., 2010).

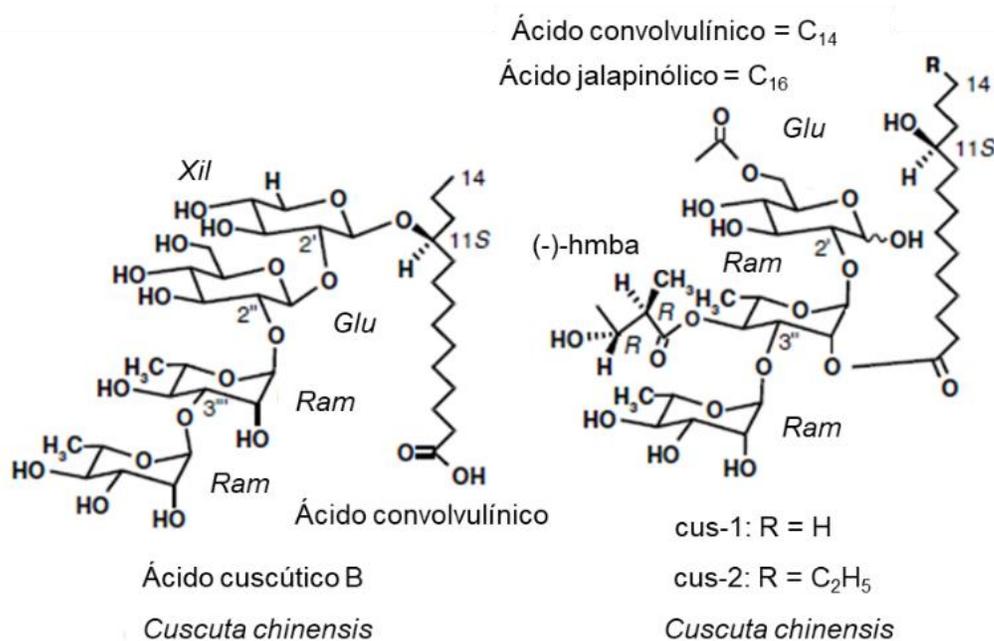


**Figura 6.** Esquema general de la reacción de sililación.

### 2.3.4.1 Espectrometría de masas.

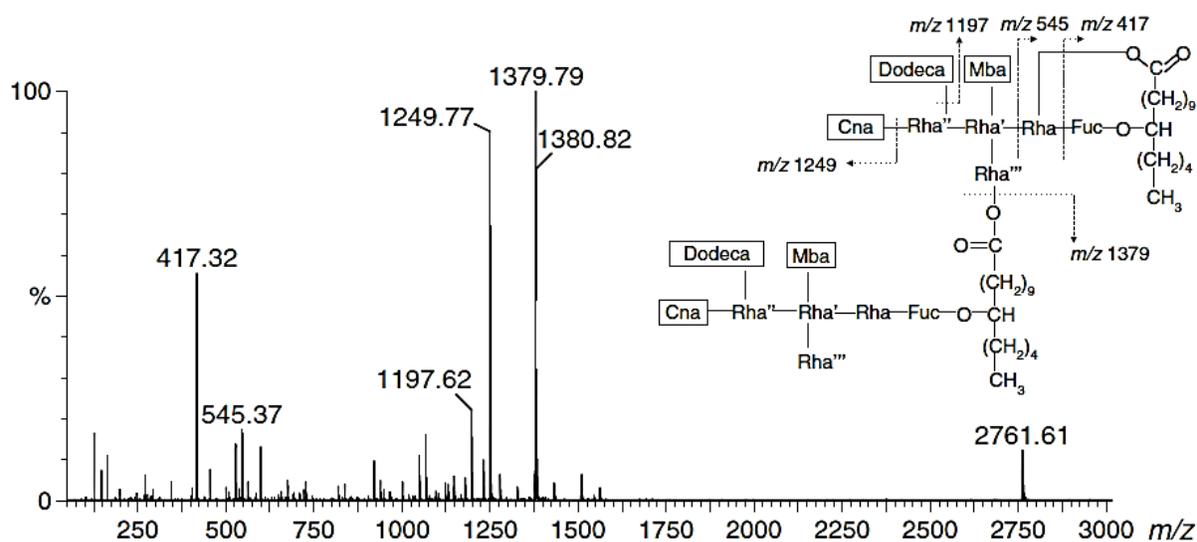
De forma natural las resinas son sólidos polares cuyos puntos de fusión se encuentran por encima de los 100°C, esto las hace moléculas no volátiles, difíciles de vaporizar, incluso cuando presentan hasta cuatro sustituyentes de tipo acilo. Debido a lo anterior, se prefieren métodos suaves de ionización como FAB y ESI que permiten la producción, emisión y disipación constante de las especies aducto protonadas  $[M + H]^+$ , o cationizadas  $[M + Na]^+$  en el modo de detección de iones positivo, o de las especies desprotonadas aniónica  $[M - H]^-$  en el modo negativo.

La calidad del análisis de masas depende tanto del pH, que muchas veces se encuentra regulado por trazas de HCl o ácido fórmico en ESI, como de la fuerza iónica de la matriz en FAB, la cual puede incrementarse por impregnación de la muestra analizada con disoluciones metanólicas de  $NH_4SCN$ , NaCl, NaOAc o  $HCO_2NH_4$ , lo que genera  $[M + H]^+$ ,  $[M + Na]^+$  y  $[M + NH_4]^+$  o aniones como  $[M + SCN]^-$  y  $[M - Cl]^-$  (Pereda-Miranda, et al., 2010).



**Figura 7.** Ejemplos de ácidos glicosídicos con nombres asociados a sus fuentes de aislamiento.

En la **Figura 8**, se ilustra un espectro de masas en modo negativo correspondiente a la muestra de la batatina I purificada del camote (*I. batatas*), donde se detectaron los siguientes picos: el anión  $[M - H]^-$  ( $m/z$  2761.61); el fragmento  $[M/2 - H]^-$  ( $m/z$  1379.79) que corresponde a la ruptura del dímero mediante la fragmentación del enlace tipo éster, provocando la escisión de la estructura dimérica; los fragmentos que surgen por las eliminaciones de los de ácidos grasos esterificantes (e.g.,  $m/z$  1249 y  $m/z$  1197); y, por último, las rupturas de los enlaces glicosídicos (e.g.,  $m/z$  545 y  $m/z$  417) (Escalante-Sánchez & Pereda-Miranda, 2007).



**Figura 8.** Espectro de masas en modo negativo (EM/EM-ESI) de la muestra de batatina I.

### 2.3.4.2 Resonancia magnética nuclear.

En la RMN  $^1\text{H}$  de los oligosacáridos, se producen patrones complejos, debido a un solapamiento dentro de la región  $\delta_{\text{H}}$  3.0-4.5, mismo que puede resolverse mediante el empleo de disolventes que aumenten la dispersión de las señales como la piridina- $d_5$ . El análisis estructural se puede llevar a cabo como se menciona a continuación: **1)** Mediante la estimación de las unidades sacáridas con el reconocimiento de los protones anoméricos en la región comprendida entre  $\delta_{\text{H}}$  4.4-6.5 (señales diagnósticas); además de realizar la medición de las constantes de acoplamiento ( $J$ ), las cuales difieren para cada azúcar; por ejemplo, ramnosa (1.0-3.0 Hz), fucosa (7.0-8.0 Hz), glucosa y quinovosa (8.0-9.0 Hz). En RMN  $^{13}\text{C}$ , se sugiere identificar las señales anoméricas en la región comprendida entre  $\delta_{\text{C}}$  98-105. **2)** Identificación de los monosacáridos constitutivos, a través de técnicas como COSY y TOCSY, con lo que se permite la asignación de los valores de  $\delta_{\text{H}}$  para cada átomo de hidrógeno unido a un átomo de C en cada unidad monosacárida mediante el experimento HSQC. Se aconseja el análisis de la región con  $\delta_{\text{H}}$  1.1-1.3, puesto que se puede obtener información sobre las señales dobles de los grupos metilos de los monosacáridos 6-desoxihexosas (fucosa, quinovosa y ramnosa). **3)** Caracterización de la configuración anomérica: en el caso de las D-piranosas, la conformación de  $^4\text{C}_1$ , el anómero- $\alpha$  aparece a un campo bajo en comparación con el anómero- $\beta$  (Brito-Arias, 2007). También, es importante notar la diferencia entre las  $J$  de las orientaciones axial y ecuatorial de los protones anoméricos vecinales, teniéndose para la orientación axial una  $J = 7-8$  Hz, para la orientación axial-ecuatorial,  $J = 4$  Hz, y para la ecuatorial-ecuatorial  $J = < 2$  Hz. **4)** Determinación de la secuencia de glicosilación: los sitios de glicosilación se pueden identificar por comparación de los espectros de hidrógeno de los oligosacáridos nativos y peracetilados; ya que la acilación de los  $-\text{OH}$  origina un desplazamiento a campos bajos de las señales de los hidrógenos geminales sustituidos, mientras que los hidrógenos  $\alpha$  involucrados de manera directa en el enlace de acilación no se ven afectados en gran medida. Los experimentos más utilizados para llevar a cabo esta tarea son HMBC ( $^3J_{\text{CH}}$ ), NOESY y ROESY (efecto *Overhauser* interresidual) (Pereda-Miranda et al., 2010).

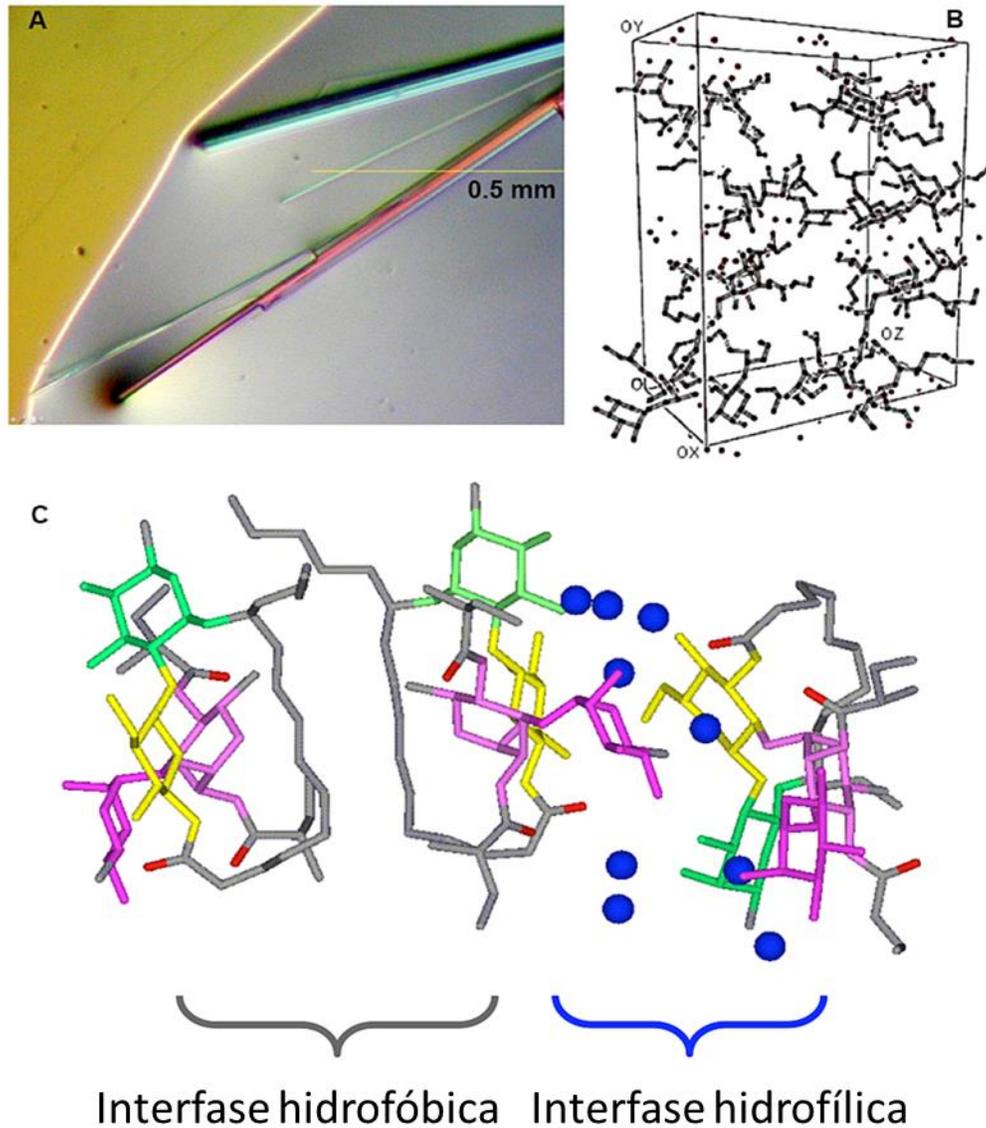
#### **2.3.4.3 Otros métodos de elucidación.**

La cristalografía de rayos X se considera como la técnica de caracterización más completa para determinar los arreglos atómicos y la configuración de los carbohidratos. Sin embargo, tiene una gran limitante ya que requiere que la muestra adquiera un empacamiento geométrico uniforme para generar una celda cristalina en estado sólido, condición que los oligosacáridos no cumplen debido a su flexibilidad conformacional alrededor de los enlaces glicosídicos (Lira- Ricárdez & Pereda-Miranda, 2019).

La única resina glicosídica, que ha logrado caracterizarse por esta técnica, es la tricolorina A. En dicho análisis, fue posible establecer cuatro conformaciones de la tricolorina A, así como el tipo de reparto entre las fases hidrofóbicas e hidrofílicas de las cuatro unidades tetrasacáridas en la celda cristalina unitaria que ocluyó dieciocho moléculas de agua (Rencurosi et al., 2004). Los cristales se obtuvieron en la interfase entre el agua y una mezcla de aceite mineral y etanol mediante el método de difusión inversa de vapor. En la celda unitaria, se observó una alternancia entre la porción hidrofílica (núcleo de tetrasacárido) y la región hidrofóbica (aglicona macrocíclica) donde las moléculas de agua ocluidas median el contacto entre las dos bicapas formadas los glicolípido (**Figura 9**). La subestructura macrocíclica de la tricolorina A se logró cristalizar mediante el derivado disacárido 4,6-O-benziliden- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)-(3,4-O-isopropiliden)- $\beta$ -D-fucopiranósido (Lehmann et al., 2000).

#### **2.3.5 Biogénesis de las resinas glicosídicas.**

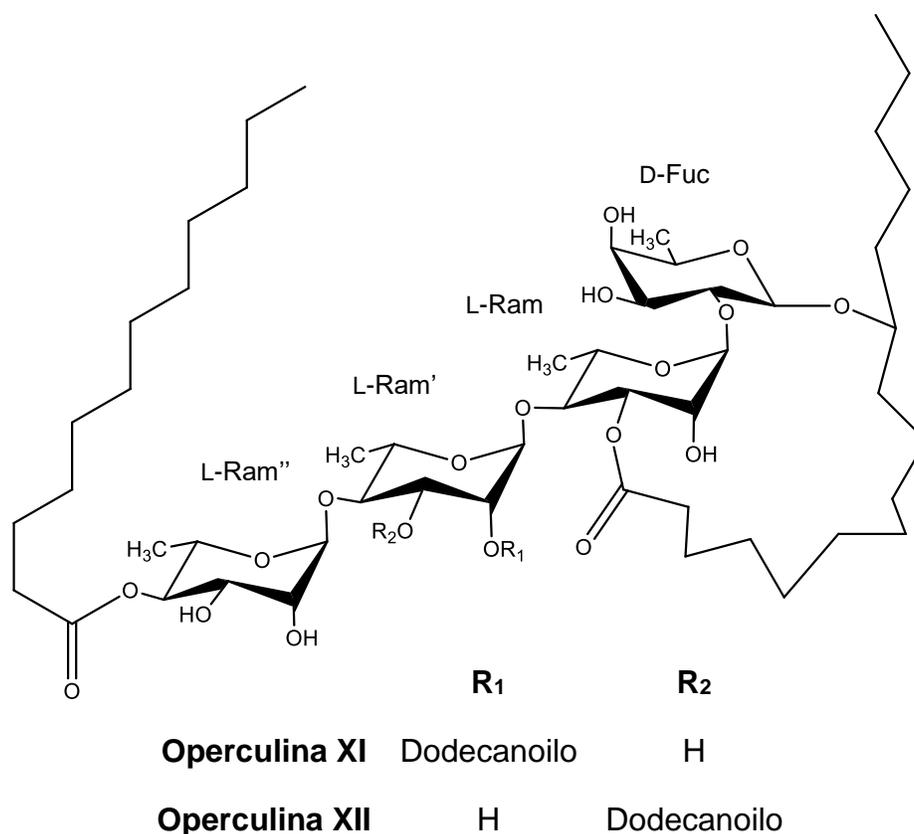
De acuerdo con Langenheim (2003), las resinas glicosídicas pertenecen a la clase de resinas misceláneas; las cuales corresponden a un grupo especial de metabolitos secundarios que son biosintetizados mediante la combinación de varias rutas metabólicas. De manera general, los componentes de las resinas incorporan productos del metabolismo primario derivados del ciclo de Krebs como los ácidos grasos y los carbohidratos. También, incorporan unidades de tipo fenólico (ácido cinámico) y terpenoide (e.g., los ácidos isobutírico, metilbutírico y nílico, entre otros).



**Figura 9.** Tricolorina A en estado sólido: A) Los cristales en la interfase de agua y una mezcla de aceite mineral y etanol mediante el método de difusión inversa de vapor para proteínas; B) Celda unitaria que muestra la presencia de cuatro moléculas de conformación independiente y dieciocho moléculas de agua (representadas como esferas) en la celda unidad asimétrica; C) Alternancia de las caras hidrófila (núcleo de tetrasacárido) e hidrofóbica (aglicina macrocíclica) donde las moléculas de agua median el contacto entre dos bicapas de glicolípido (Lira-Ricárdez y Pereda-Miranda, 2019).

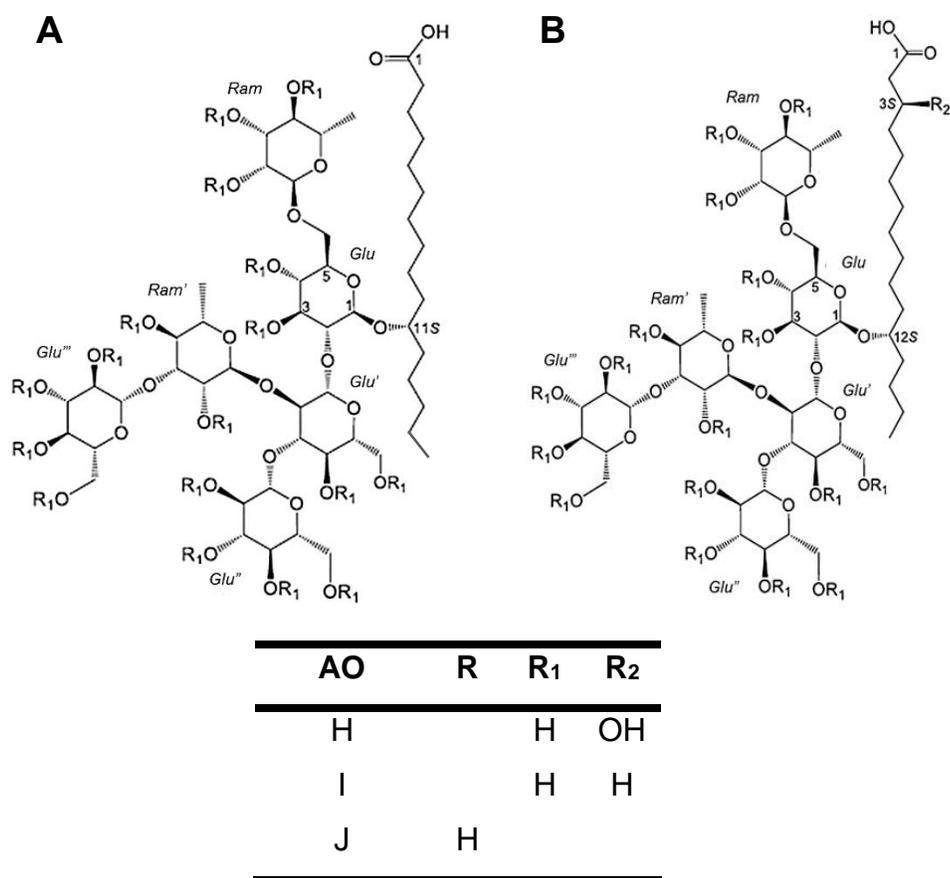
## 2.4 Resinas glicosídicas y derivados de especies de *Operculina*.

Las primeras resinas intactas aisladas de este género, denominadas como operculinas I-XVIII, se obtuvieron en 1989 a partir de la especie *O. macrocarpa*, dentro de las cuáles existen diferencias estructurales en la posición de lactonización en la primera unidad de ramnosa (entre las posiciones C-2 y C-3) y en las posiciones de esterificación de sus núcleos pentasacáridos y tetrasacáridos. La hidrólisis alcalina de estos productos naturales produjo los denominados ácidos glicosídicos A-F (Ono et al., 1989, 1990). En la **Figura 10**, se ilustran las operculinas XI y XII con un núcleo tetrasacárido y que representan los únicos glicolípidos estructuralmente relacionados con el compuesto caracterizado en la presente disertación. El sitio de lactonización de estos compuestos macrocíclicos del ácido operculínico C se estableció en la posición C-3 de la ramnosa interna.



**Figura 10.** Estructuras tetrasacáridas con el núcleo del ácido operculínico C.

Recientemente, Lira-Ricárdez y colaboradores (2019) lograron el aislamiento de un par de ácidos glicosídicos novedosos, los ácidos operculínicos I y J (**Figura 11**), cuya base oligosacárida corresponde a la del ácido operculínico H. A partir de la jalapa de la India, *O. turpethum* (L.) Silva Manso, se han aislado tres ácidos glicosídicos derivados del ácido operculínico A como los ácidos turpéticos A-C, cuya única diferencia radica en el largo de la cadena alifática de la aglicona con C-15 a C-17 carbonos (Ding et al, 2012). En cuanto a la especie *O. hamiltonii* var *hamiltonii*, se han identificado tres núcleos pentasacáridos inéditos a partir del extracto saponificado, dos de los cuales, tienen la misma secuencia de glicosilación que el ácido operculínico A, pero con un largo diferente para la aglicona (C<sub>17</sub> y C<sub>18</sub>) (González-Pozos, 2018).



**Figura 11.** A) Estructura del ácido operculínico J. B) Estructura de los ácidos operculínicos H e I. AO, ácido operculínico; R, sustituyente. (Lira-Ricárdez et al, 2019).

### 3. JUSTIFICACIÓN.

El género *Ipomoea* (Convolvulaceae) representa una fuente importante de resinas glicosídicas, las cuales pueden servir como nuevos agentes terapéuticos y agroquímicos debido a sus propiedades purgantes, citotóxicas e inhibidoras del crecimiento vegetal. Dada su complejidad constitutiva, se requiere del uso de técnicas acopladas a sistemas de separación cada vez más eficientes para su aislamiento y purificación. Una herramienta que ha demostrado ser una alternativa eficaz para la purificación de este tipo de compuestos es la técnica de “corte de núcleo” y “reciclaje de pico” mediante HPLC, la cual permite el aislamiento de las resinas con una pureza cercana al 99%. La aplicación de dicha técnica permite obtener cantidades a nivel preparativo de estos constituyentes ( $\geq 5$  mg) para que se logre su completa caracterización, en conjunto con la aplicación de técnicas analíticas instrumentales, como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear y la espectrometría de masas. De igual manera, se pretende enriquecer el conocimiento sobre la diversidad estructural de las nuevas posibles entidades presentes en la especie de estudio (*O. hamiltonii*). La presente disertación forma parte de la investigación química de las dos especies purgantes que constituyen el complejo de la raíz de jalapa brasileña en curso en la Facultad de Química: *O. macrocarpa* (Lira-Ricárdez et al., 2019) y *O. hamiltonii* var. *hamiltonii* (Moreno-Velasco, 2019).

## 4. HIPÓTESIS.

El extracto (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>: EtOH, 1:1) de la droga cruda de la jalapa brasileña de flores amarillas contiene resinas glicosídicas novedosas minoritarias, las cuales sólo podrán purificarse a través de la técnica de “corte de núcleo” y “reciclaje de pico”. El pico F3P9 purificado mediante HPLC será analizado mediante RMN y EM para evidenciar su naturaleza química y comprobar que representa una nueva entidad glicolípida constitutiva de las resinas glicosídicas de la planta medicinal en estudio (*Operculina hamiltonii*).

## 5. OBJETIVOS.

### 5.1. Objetivo general.

Purificar resinas glicosídicas novedosas minoritarias presentes en la fracción CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO (1:4) del extracto CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (1:1) de jalapa la brasileña de flores amarillas mediante el empleo de HPLC y caracterizarlas por medio de técnicas espectrométricas y espectroscópicas de alta resolución.

### 5.2 Objetivos específicos.

- I. Establecer las condiciones a nivel analítico en HPLC para su escalamiento a nivel preparativo y lograr el aislamiento de los constituyentes individuales.
- II. Purificar los componentes minoritarios utilizando las técnicas de “corte de núcleo” y “reciclaje de pico” a partir de los eluatos obtenidos en HPLC.
- III. Elucidar la estructura molecular de los compuestos minoritarios intactos purificados por medio de las técnicas de RMN y EM.
- IV. Obtener tanto el ácido glicosídico constitutivo de la resina intacta, así como los ácidos esterificantes por medio de reacciones degradativas de saponificación y determinar así su peso molecular a través de EM.
- V. Establecer la posición de hidroxilación de la aglicona empleando la reacción de sililación por medio de CG-EM.

## 6. DESARROLLO EXPERIMENTAL.

### 6.1 Métodos cromatográficos.

El fraccionamiento primario del extracto orgánico se realizó por CCA. Se utilizó una columna de vidrio de 60 cm de largo por 15 cm de ancho, la cual se empacó con gel de sílice 60 y se eluyó con distintos disolventes siguiendo un patrón creciente de polaridad (hexano, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Me<sub>2</sub>CO, MeOH). El desarrollo de las separaciones se monitoreo mediante CCF de cada una de los eluatos obtenidos, para lo cual, se usaron cromatoplasas cubiertas gel de sílice y fluoresceína (F<sub>254</sub>). El sistema de elución utilizado fue Me<sub>2</sub>CO:MeOH (9:1). Las placas cromatográficas se revelaron utilizando una disolución de sulfato cérico con ácido sulfúrico y calentamiento.

La purificación de los componentes se realizó en un equipo de HPLC con liberación de disolventes 600 E (Waters) aditado con una válvula de reciclaje de muestra y un detector de índice de refracción (modelo 410, Waters), el cual se encuentra acoplado a una computadora (OptiPlex 360, DELL) que emplea el programa Empower 2 (Waters).

### 6.2 Material vegetal.

La materia prima se obtuvo de manera comercial en el Mercado 2000, Santarém, Pará, Brasil, el 28 de septiembre de 2015, la cual consiste de las raíces pulverizadas de la jalapa brasileña (“bata de purga”). La Dra. Suzana Leitão (Facultad de Farmacia de Río de Janeiro, Brasil) realizó la identificación del material vegetal mediante la comparación de sus características anatómicas microscópicas con las descritas para *O. hamiltonii* (Michelin et al., 2010).

### 6.3 Preparación del extracto orgánico.

La muestra comercial (865.5 g) fue sometida a un proceso de maceración exhaustivo con una mezcla de disolventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:EtOH (1:1). El extracto resultante se filtró y llevó a sequedad para su posterior tratamiento (Moreno-Velasco, 2019).

## 6.4 Fraccionamiento primario del extracto orgánico.

El proceso de fraccionamiento se realizó mediante CCA. Este fraccionamiento se describió con anterioridad y para el presente estudio se utilizó la fracción F-3 (2.75 g; CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>:Me<sub>2</sub>CO, 1:4) (Moreno-Velasco, 2019).

## 6.5 Aislamiento de las resinas glicosídicas.

### 6.5.1 Obtención de perfiles cromatográficos a nivel analítico.

La fracción **F-3** se seleccionó con base en el perfil cromatográfico obtenido en CCF, el cual mostró una composición diferente a la fracción **F-4** estudiada previamente y de la que se aislaron dos resinas glicosídicas novedosas (Moreno-Velasco, 2019). Las condiciones cromatográficas a nivel analítico seleccionadas se determinaron con base al mismo estudio previo: Fase estacionaria, columna C18; fase móvil, CH<sub>3</sub>CN: H<sub>2</sub>O (9:1); 0.5 mL/min; concentración de la muestra, 10 mg/100 μL; volumen de inyección, 20 μL. El pico de interés (F3P9, t<sub>R</sub> 20.9 min; 27.3 mg) se purificó como se describe a continuación.

### 6.5.2 Aislamiento de los componentes a nivel preparativo.

Las condiciones de análisis para emplear la técnica de “corte de núcleo” y “reciclaje de pico” a nivel preparativo se determinaron resolviendo la siguiente ecuación:

$$F_p = F_a \times \left(\frac{L_p}{L_a}\right) \left(\frac{d_p^2}{d_a^2}\right) \quad \text{y} \quad M_p = M_a \times \left(\frac{L_p}{L_a}\right) \left(\frac{d_p^2}{d_a^2}\right)$$

donde:  $F_p$ , flujo de elución en columna preparativa;  $F_a$ , flujo de elución en columna analítica;  $M_p$ , cantidad de muestra máxima por inyección en la columna preparativa;  $M_a$ , cantidad de muestra máxima por inyección en la columna analítica;  $L_p$ , longitud de la columna preparativa;  $L_a$ , longitud de la columna analítica;  $D_p$ , diámetro de columna preparativa;  $D_a$ , diámetro de columna analítica.

Las condiciones encontradas a partir de la extrapolación de los criterios analíticos fueron las siguientes: columna Waters Symmetry® C-18 (19 x 300 mm, 7 μ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (17:3); flujo: 8 mL/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 1024); volumen de inyección: 500 μL (50 mg/500 μL en metanol).

**Compuesto F3P9:** sólido blanco (17.8 mg); punto de fusión: 110-112 °C;  $[\alpha]^{22}_{589}$  -61.3,  $[\alpha]_{578}$  -63.5,  $[\alpha]_{546}$  -71.6,  $[\alpha]_{436}$  -117.4,  $[\alpha]_{365}$  -175.8 (c 0.3, MeOH).

## 6.6 Determinación de constantes físicas y propiedades espectroscópicas.

Los experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  fueron registrados en un equipo Bruker que operó con una frecuencia de 900 y 225 MHz para  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ , respectivamente. Para preparar las muestras se utilizó piridina deuterada (piridina- $d_5$ ) y los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) se expresaron en partes por millón (ppm), utilizando la señal interna del tetrametilsilano (TMS) como referencia. Por su parte, los puntos de fusión fueron obtenidos en un aparato Fisher-Jones sin corrección. Las rotaciones ópticas se obtuvieron en un polarímetro modelo Perkin-Elmer 341, utilizando metanol como disolvente (1 mL) y una celda con un 1 dm de diámetro.

## 6.7 Determinación de propiedades espectrométricas.

La masa, tanto del ácido glicosídico como del producto natural, se obtuvo por infusión directa en un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap XL Hybrid FT (Thermo Fisher Scientific) equipado con una fuente de ionización por electrospray (Electrospray Finnigan Ion Max). Cada muestra (1 mg) se disolvió en 1 mL de MeOH y 250  $\mu\text{L}$  se diluyeron con 100  $\mu\text{L}$  de MeOH:H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) que contenía 0.1% de ácido fórmico para mejorar el proceso de ionización. La muestra (150  $\mu\text{L}$ ) se inyectó directamente en el espectrómetro en el modo iónico positivo y negativo a un flujo de 5 mL/min. El voltaje para ambos modos fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador a 25 bar. Cada muestra se analizó en el modo de exploración completa utilizando un rango de  $m/z$  100–3000. 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 (Lira-Ricárdez et al., 2019).

El análisis de los derivados silylados y de los ácidos esterificantes, se realizó en un equipo acoplado de GC-EM (Perkin Elmer) con las siguientes características: modelo, GC CLARUS 680-MS CLARUS SQ8C; columna capilar, HP-5MS 30 m  $\times$  0.25 mm  $\times$  0.25 mm (Agilent Technologies Inc.); analizador de masa, cuadrupolar;

gas acarreador, helio (1 mL/min); temperatura del inyector, 300°C; programa de temperatura del horno, 100 °C (5 min), 20 °C/min hasta 300 °C (10 min); tipo de inyección, split (relación 1:20); volumen de inyección, 1  $\mu$ L; retraso de encendido del filamento, 4 min; intervalo de masas (modo scan), 33-500 u; temperatura de la cámara de ionización, 200 °C; temperatura de la línea de transferencia, 250 °C; voltaje de ionización, 70 eV.

## 6.8 Derivatización del pico de interés.

### 6.8.1 Saponificación.

El pico de interés (P9, 15 mg) fue sometido a una hidrólisis alcalina en 5 mL de una disolución de KOH al 5 %, en un reflujo a 95 °C bajo agitación constante por cuatro horas. Se ajustó el pH de la mezcla de reacción resultante con una disolución de HCl 1 N; posteriormente, se realizaron extracciones con CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3  $\times$  5 mL). La fase acuosa fue sometida a extracciones con *n*-BuOH (3  $\times$  5 mL); posteriormente, se lavó la fase butanólica con agua (3  $\times$  5 mL) y se llevó a sequedad obteniéndose un sólido (8.2 mg).

**Ácido operculínico C:** sólido blanco; punto de fusión: 118-120 °C;  $[\alpha]^{22}_{589}$  -48.3,  $[\alpha]_{578}$  -50.4,  $[\alpha]_{546}$  -57.4,  $[\alpha]_{436}$  -93.9,  $[\alpha]_{365}$  -142.2 (c 0.2, MeOH).

La fracción orgánica original se concentró a presión reducida y se analizó en un equipo de CG-EM (Thermo-Electron) con una columna DB-5MS (5% fenilmetilpolisiloxano, 30 m  $\times$  0.25 mm, 0.1  $\mu$ m), como fase estacionaria, y He como fase móvil a una velocidad lineal de 30 cm/s; isotérmico a 50°C durante cuatro minutos y usando un gradiente lineal de 40°C/min hasta 300°C, manteniendo la temperatura final por 20 minutos. Por su parte, las condiciones de EM fueron las siguientes: energía de ionización, 70 eV; temperatura de la fuente de ionización, 250 °C; y rango de *m/z* registrado, 45-600 uma (Pereda-Miranda et al., 2006). Estas condiciones permitieron la identificación de los ácidos grasos que esterifican al núcleo oligosacárido como:

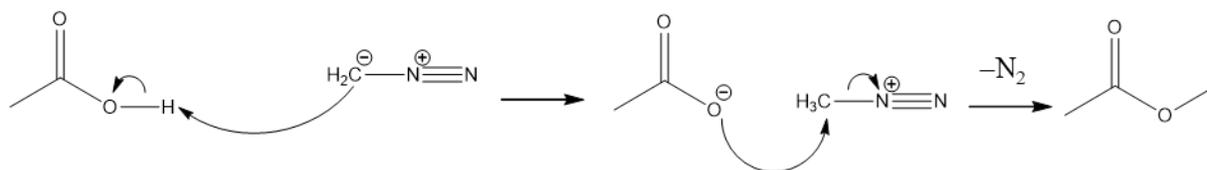
1) Ácido *n*-decanoico ( $t_R$  8.90 min):  $m/z$   $[M]^+$  172 (2), 155 (3), 143 (12), 129 (62), 115 (15), 112 (12), 87 (20), 73 (100), 60 (90), 57 (40), 55 (45), 43 (30), 41 (35), 39 (6);

2) Ácido *n*-hexadecanoico ( $t_R$  10.42 min):  $m/z$   $[M]^+$  256 (0.03), 239 (0.04), 213 (0.4), 200 (15), 183 (2), 171 (18), 157 (40), 143 (10), 129 (48), 115 (20), 101 (15), 85 (33), 73 (100), 60 (80), 57 (30), 55 (47), 43 (44), 41 (30).

## 6.9 Análisis de carbohidratos.

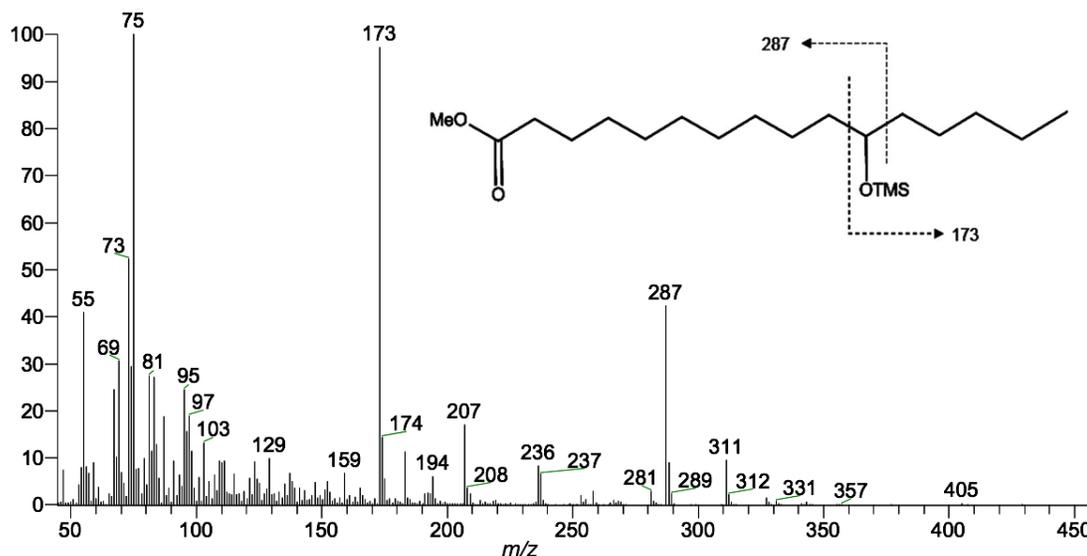
### 6.9.1 Hidrólisis ácida.

El producto de saponificación, ácido operculínico C (5 mg), se disolvió con 5 mL de HCl 4N en un matraz bola. La mezcla se calentó a 90 °C en reflujo y con agitación constante durante 2 horas. Posteriormente, la reacción se diluyó con 5 mL de agua y se sometió a una extracción con éter etílico (3 × 5 mL). La fase acuosa se neutralizó usando KOH 1N y se extrajo con *n*-BuOH (3 × 5 mL). La fase butanólica resultante se lavó con agua (5 × 5 mL) y se concentró bajo presión reducida para producir una mezcla de carbohidratos que se metiló con una solución de  $CH_2N_2/(C_2H_5)_2O$  en un baño de hielo (**Figura 12**). Posteriormente, se evaporó el disolvente y los residuos se trataron con el reactivo SIGMA SIL-A (0.1 mL), a una temperatura de 70°C por 5 minutos.



**12.** Esquema general de la reacción de metilación con diazometano para los ácidos carboxílicos.

La mezcla de reacción se analizó mediante CG-EM-IE (70 eV). Estas condiciones permitieron la identificación del pico con  $t_R$  14.5 min como el derivado sililado del éster metílico del ácido 11-hidroxihexadecanoico:  $m/z$  287 (45,  $[C_{12}H_{22}O_3TMS]^+$ ) y 173 (95,  $[C_6H_{12}OTMS]^+$ ). La **Figura 13** ilustra el espectro de masas generado mediante CG-EM-IE (70 eV) y el cromatograma obtenido para este derivado sililado (Lira-Ricárdez et al., 2019).



**Figura 13.** Espectro del derivado sililado del éster metílico correspondiente al ácido 11-hidroxihexadecanoico liberado mediante la saponificación del pico F3P9 ( $t_R$  14.5 min).

### 6.9.2 Sililación.

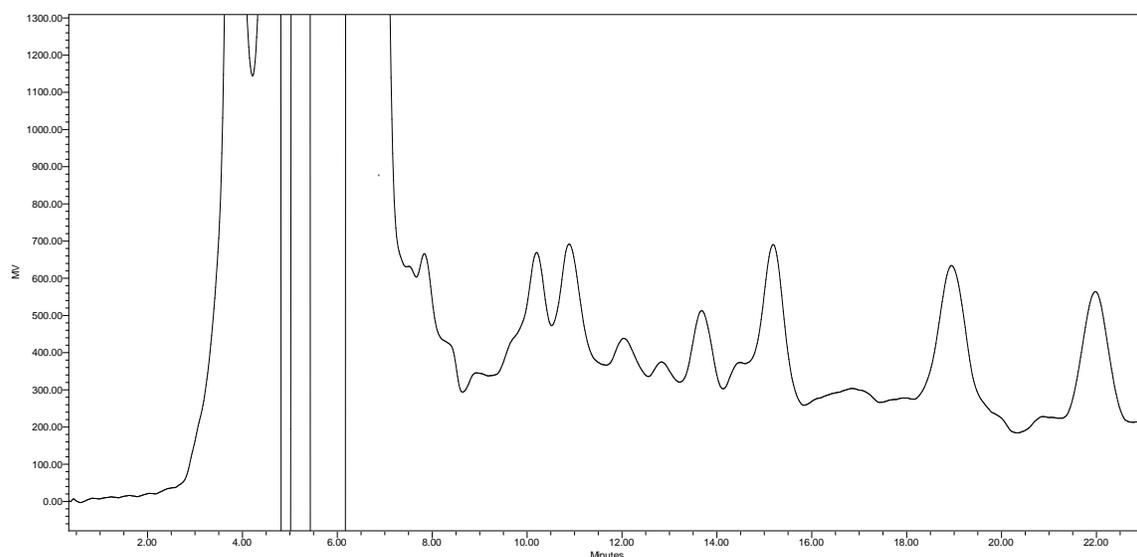
La sililación de la mezcla de azúcares (1 mg) se realizó con el reactivo SIGMA SIL-A (0.1 mL) a una temperatura de 70 °C durante 5 minutos. Se prepararon los derivados O-sililados de los estándares L-ramnosa y D-fucosa (0.5 mg cada uno), utilizando el mismo procedimiento experimental. El análisis mediante CG-EM-IE se describió previamente (Véase, sección 6.7). Los tiempos de retención registrados para los estándares de carbohidratos utilizados fueron: L-ramnosa ( $t_R$  6.17 min); D-fucosa ( $t_R$  7.0 min).

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 7.1 Aislamiento de las resinas glicosídicas.

#### 7.1.1 Obtención de perfiles cromatográficos a nivel analítico.

Con las condiciones de trabajo establecidas, se obtuvo el perfil analítico ilustrado en la **Figura 14**. En este cromatograma se puede observar la presencia de varios picos mayoritarios, mismos que se conservaron en el cromatograma generado a partir de las condiciones a nivel preparativo (Moreno-Velasco, 2019).

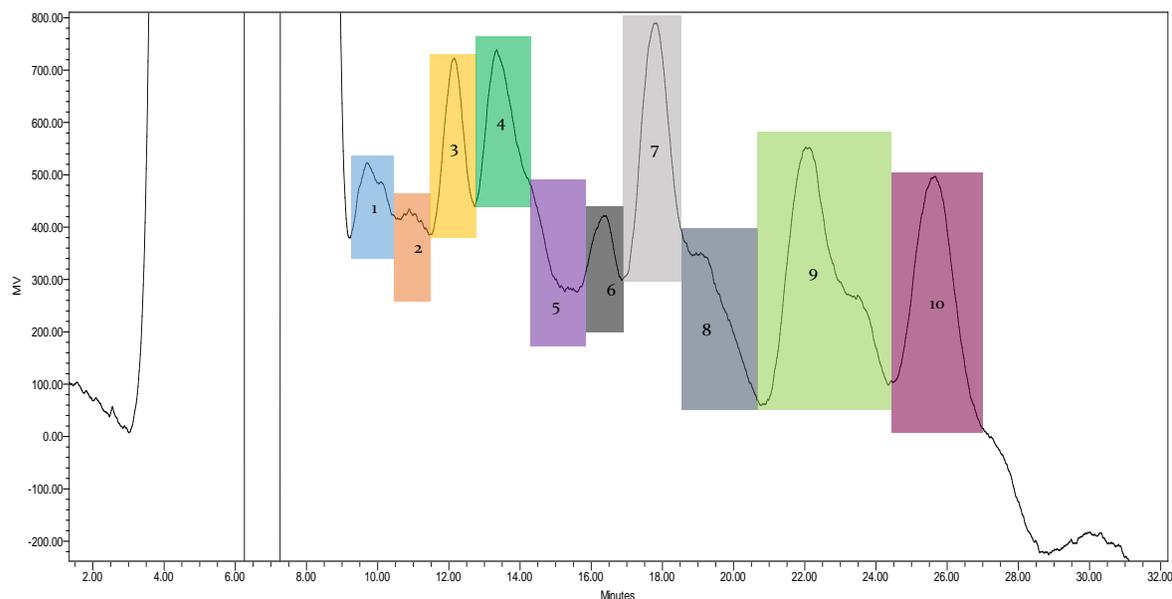


**Figura 14.** Perfil cromatográfico a nivel analítico de la F-3.

#### 7.1.2 Aislamiento a nivel preparativo.

La **Figura 15** muestra el perfil cromatográfico de la F-3 a nivel preparativo. Para todas las subfracciones colectadas, se registraron sus respectivos espectros de RMN  $^1\text{H}$  (piridina- $d_5$ ) con el objetivo de identificar las fracciones que presentaran un nivel de complejidad escaso para poder proceder a su purificación mediante la misma técnica de reciclaje (Pereda-Miranda & Hernández-Carlos, 2002). Sin embargo, todas las fracciones representaron ser mezclas complejas y debido a su rendimiento no permitirían obtener cantidades suficientes ( $> 10$  mg) con un grado

de pureza > 95% para lograr su caracterización estructural, aprovechando la frecuencia de 900 MHz del equipo de RMN utilizado. En el **Cuadro 3** se presentan los rendimientos obtenidos para cada pico procesado bajo la técnica de “corte de núcleo”, así como sus respectivos tiempos de retención ( $t_R$ ).

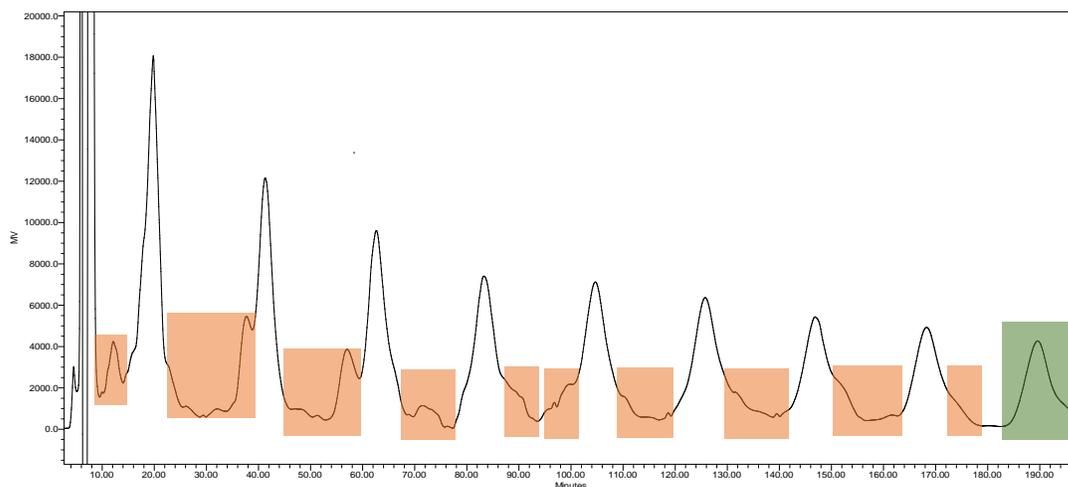


**Figura 15.** Perfil cromatográfico a nivel preparativo de la F-3. Se pueden observar los once picos que componen dicha fracción, mismos que se procesaron con la técnica de “corte núcleo”.

Tras llevar a cabo la técnica de “corte de núcleo” para la F-3, se procedió a purificar el pico identificado como F3P9, bajo la técnica de “reciclaje de pico”, debido a las características espectroscópicas propias de las resinas glicosídicas evidenciadas en la RMN  $^1\text{H}$ . De esta forma, fue posible eliminar las impurezas presentes en este pico seleccionado. La **Figura 16** muestra este proceso, en donde se realizaron un total de ocho ciclos de reciclaje de la muestra para obtener un total de 12.8 mg del eluato F3P9. Con la finalidad de optimizar la pureza de este analito, el total obtenido de este primer ciclo, se sometió a una segunda serie de reciclajes que incluyeron un total de 10 ciclos y proporcionaron una muestra con una pureza superior al 90% (5 mg) para registrar las propiedades físicas de este glicolípido.

**Cuadro 3.** Relación de los eluatos recolectados con sus tiempos de retención y masa obtenida a partir del fraccionamiento en HPLC preparativo de la muestra F3.

Pico	$t_R$ (min)	mg
1	9.3	967.7
2	10.6	50.8
3	11.5	30.6
4	12.8	32.4
5	14.1	18
6	15.7	23.5
7	17.0	33.8
8	18.6	43.3
9	20.9	27.3
10	23.0	40.5



**Figura 16.** Reciclaje del pico F3P9. En rojo se muestran las partes que fueron eliminadas durante este proceso y en color verde se indica el pico recolectado.

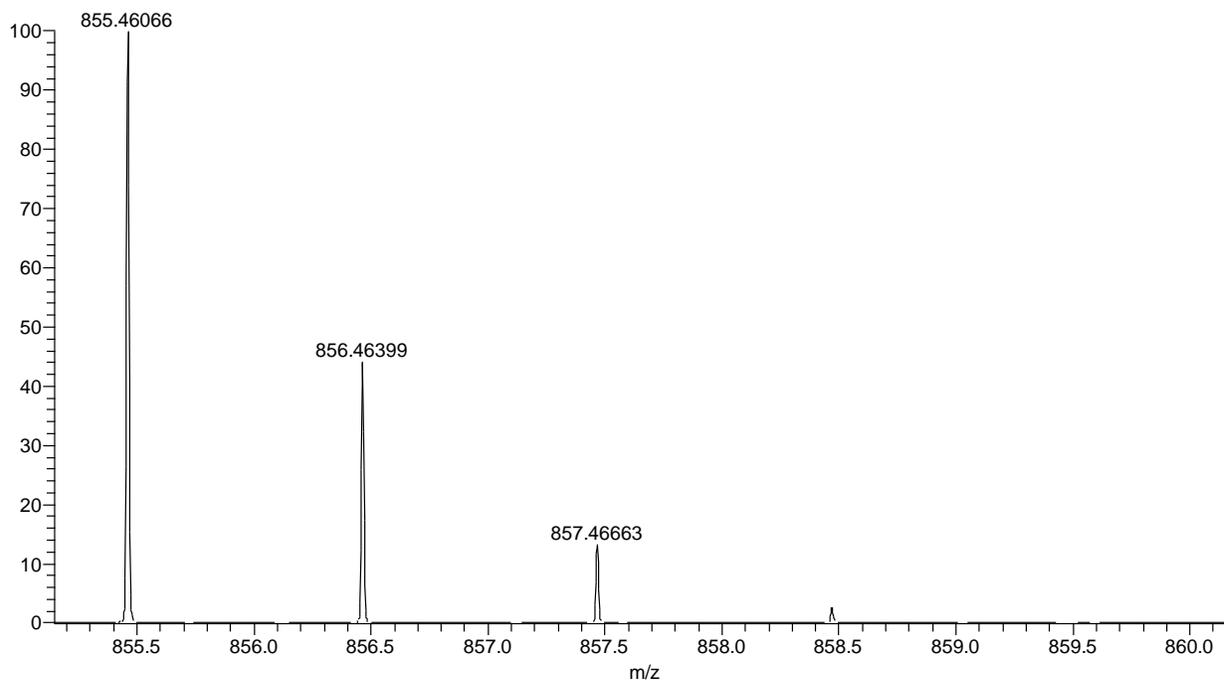
## 7.2 Determinación de propiedades espectrométricas.

El espectro de masas mediante ionización por electronebulización de la molécula saponificada, mostró una molécula desprotonada  $[M - H]^-$ , con un valor de masa-carga ( $m/z$ ) de 855.46066 (**Figura 17**), mismo que se comparó con el valor teórico ( $m/z$  855.459504), encontrándose un error de masa de 1.3 ppm. La fórmula molecular  $C_{40}H_{72}O_{19}$  se estableció a través del análisis isotópico (**Cuadro 4**), en conjunto con la determinación de los grados de insaturación presentes en la molécula. Con esto, se pudo constatar que la molécula posee cinco grados de insaturación, proponiéndose cuatro para los monosacáridos de las unidades de metilpentosas y uno para el enlace doble del carbonilo del ácido. Lo anterior se pudo confirmar utilizando la ecuación que se muestra a continuación:

$$GI = x - \frac{y}{2} + \frac{z}{2} + 1$$

donde:  $GI$ , grados de insaturación (ciclos y enlaces dobles);  $x$ , número de átomos de carbono;  $y$ , número de átomos de hidrógeno; y  $z$ , número de átomos de nitrógeno. La contribución del oxígeno no se consideró para el cálculo.

De igual manera, se llevó a cabo el análisis espectrométrico para identificar los aductos  $[M + \text{álcali}]^+$  (e.g.  $[M + Na]^+$ ,  $[M + K]^+$ ) comunes para este tipo de experimento mediante ionización por electrospray (Demarque et al., 2016). En la **Figura 18** se presentan las señales para los cationes aductos  $[M + Na]^+$  y  $[M + K]^+$ , con valores de  $m/z$  iguales a 879.45272 y 895.42622, respectivamente. El error de masa obtenido para el aducto producido por la cationización con sodio  $[M + Na]^+$  fue de  $-3.7$  ppm, mientras que para el de potasio  $[M + K]^+$  fue de  $-4.1$  ppm; estos valores se encuentran dentro del rango aceptable de medición para la técnica implementada ya que los criterios de la *American Chemical Society* son de un error aceptable de 5 ppm para una masa inferior a 1000 y de una unidad de masa atómica para los compuestos con una masa superior a 1000 (de Laeter et al., 2003).

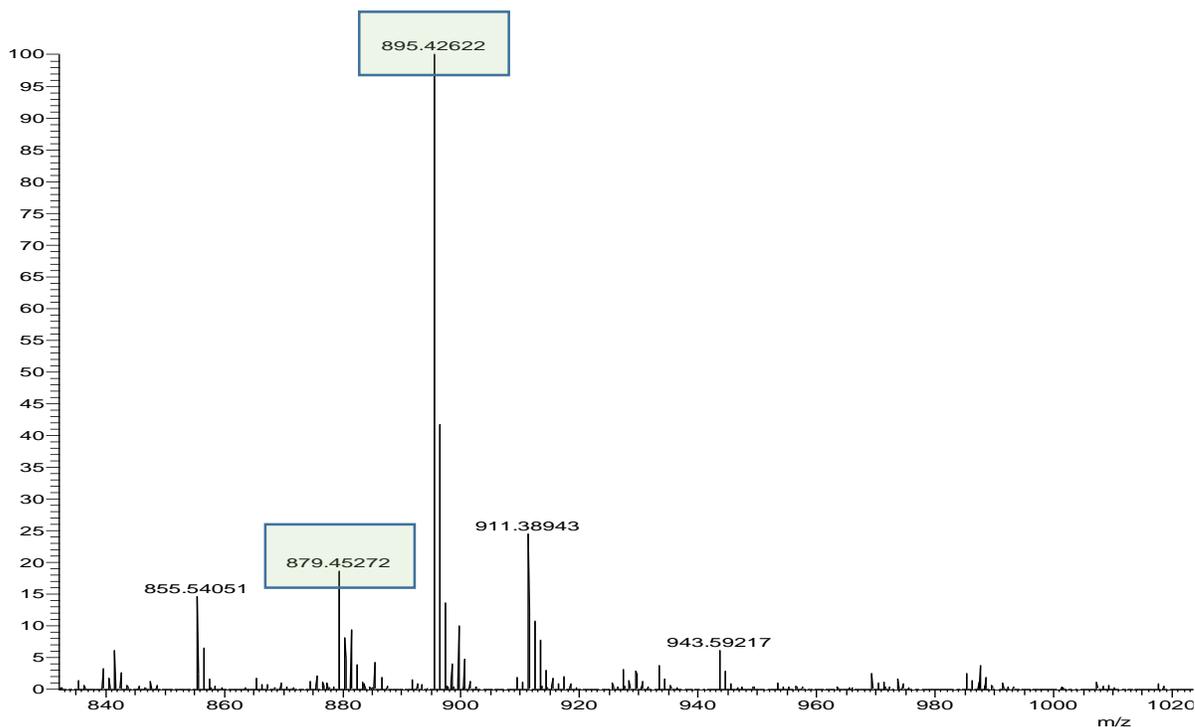


**Figura 17.** Conjunto isotópico del ion  $[M - H]^-$  obtenido mediante EM-ESI en modo de ionización negativo.

**Cuadro 4.** Análisis isotópico para la determinación de la fórmula molecular  $C_{40}H_{71}O_{19}$  del anión  $[M - H]^-$  de la molécula saponificada.

Especie	Valor ( <i>m/z</i> )	AR (%)	AI $C_1$ (%)	$C_n$	$C_{40}$	AI $O_1$ (%)	$O_n$	$O_{19}$
$[M - H]^-$	855	100	100		100	100		
$[M - H + 1]^-$	856	44	1.1	$44/1.1 = 40$		0.04		
$[M - H + 2]^-$	857	13.2			9.4	0.2	$13.2 - 9.4 = 3.8/0.2 = 19$	
$[M - H + 3]^-$	858	1.3			1.3			

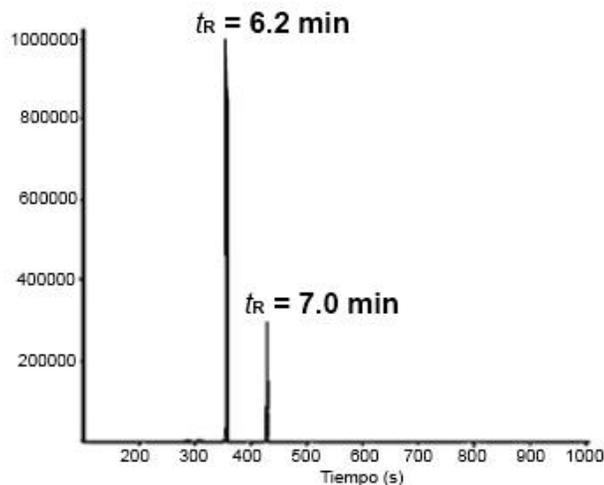
AR, abundancia relativa; AI  $C_1$ , Abundancia isotópica para el carbono; AI  $O_1$ , Abundancia isotópica para el oxígeno. Para establecer el número de átomos de oxígeno, se restó la contribución de dos moléculas de  $^{13}C$  al valor de AR de la especie  $[M - H + 2]^-$ . El número de átomos de hidrógeno se obtiene por la diferencia en peso:  $855 [M - H]^- - 480 - 304 = 71$ .



**Figura 18.** Espectro de masas mediante ESI en modo de ionización negativo, donde se muestran los picos correspondientes a los aductos de sodio ( $[M + Na]^+$   $m/z$  879.45272) y potasio ( $[M + K]^+$   $m/z$  895.42622).

### 7.3 Análisis de carbohidratos.

El análisis por CG-EM-IE de mezcla de azúcares generada por la hidrólisis del ácido glicosídico constitutivo del pico F3P9 mostró las señales correspondientes en el cromatograma para los estándares sililados de D-fucosa ( $t_R$  7.0 min) y de L-ramnosa ( $t_R$  6.17 min). Por lo tanto, se confirmó la naturaleza química de cada una de las unidades sacáridas que conforman el núcleo oligosacárido. Los azúcares constitutivos de L-ramnosa y D-fucosa se detectaron en una relación 3:1, respectivamente, en función de las integrales para cada señal registradas en el cromatograma de la mezcla. En la **Figura 19** se muestra el perfil cromatográfico de la mezcla de azúcares.



**Figura 19.** Cromatogramas de los azúcares sililados obtenidos a partir de la hidrólisis ácida del ácido glicosídico constitutivo del pico F3P9.

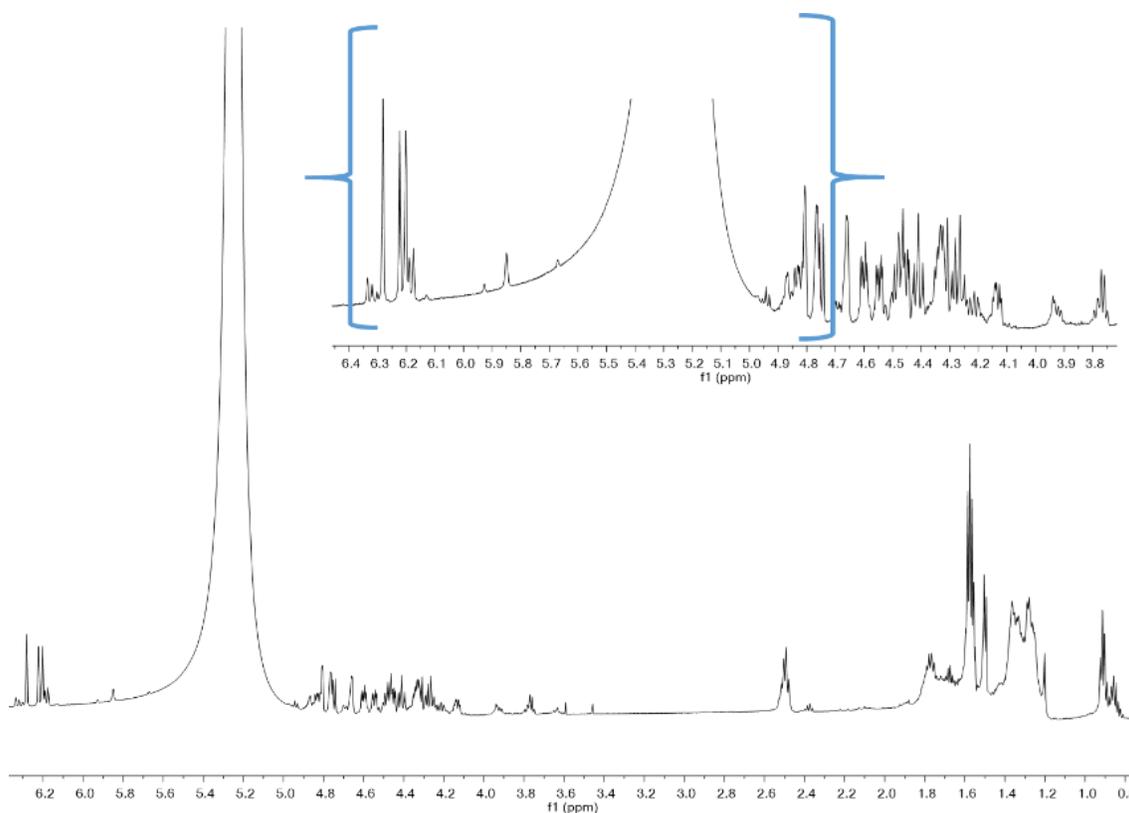
#### 7.4 Elucidación estructural por RMN del ácido glicosídico.

El análisis espectroscópico de RMN  $^1\text{H}$  del ácido derivado de la reacción de saponificación del producto natural reveló la presencia de cuatro señales correspondientes a los protones anoméricos de cada unidad sacárida ( $\delta_{\text{H}}$  4.75-6.40, véase **Cuadro 5**). Entre ellas, la señal centrada en  $\delta_{\text{H}}$  4.75 ( $J = 7.7 \text{ Hz}$ ) se registró como un doblete característico para una unidad de D-fucosa, así también se observaron las señales anoméricas en forma de singuletes anchos situados en  $\delta_{\text{H}}$  6.29 ( $J = 1.2 \text{ Hz}$ ), 6.21 ( $J = 1.5 \text{ Hz}$ ), y 6.23 ( $J = 1.5 \text{ Hz}$ ) para las tres unidades de L-ramnosa (**Figura 20**); esta información coincide con lo descrito por Ono y colaboradores (1989) para el núcleo oligosacárido del ácido operculínico C. También, fue posible identificar cuatro señales correspondientes a los metilos terminales características de las unidades de metilpentosas cuyas señales se observaron entre  $\delta_{\text{H}}$  1.25-1.85. En el espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (**Figura 21**), se observaron las señales correspondientes a los carbonos alifáticos ( $\delta_{\text{C}}$  10-35), así como los carbonos base de oxígeno ( $\delta_{\text{C}}$  60-80) y los carbonos anoméricos ( $\delta_{\text{C}}$  100-105; véase **Cuadro 5**).

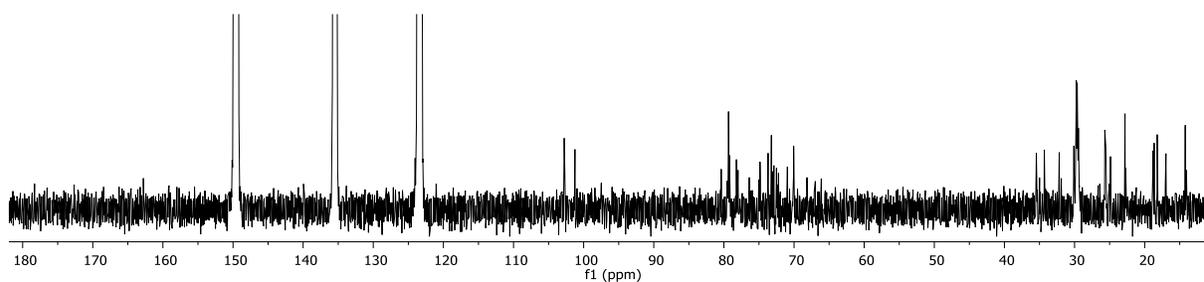
**Cuadro 5.** Relación de desplazamientos químicos ( $\delta$ ) y constantes de acoplamiento ( $J$  en Hz) de RMN para los productos aislados.

Posición	F3P9		Ácido operculínico C	
	$^1\text{H}$ ( $\delta_{\text{H}}$ , mult. J)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ )	$^1\text{H}$ ( $\delta_{\text{H}}$ , mult. J)	$^{13}\text{C}$ ( $\delta_{\text{C}}$ )
Fuc-1	4.76 d (7.8)	101.4	4.75 d (7.7)	101.4
2	4.54 dd (7.8, 9.4)	73.3	4.49 dd (9.4, 7.7)	75.1
3	4.18 dd (9.4, 3.4)	76.6	4.14 dd (9.4, 3.1)	76.6
4	3.93 d (3.4)	73.2	3.94 d (3.56)	73.3
5	3.82 q (6.4)	71.1	3.77 q (6.8)	70.9
6	1.54 d (6.4)	16.7	1.50 d (6.3)	16.6
Ram-1	6.37 d (1.5)	100.0	6.29 d (1.2)	101.4
2	5.27 dd (2.9, 1.5)	69.4	4.66 dd (2.9, 1.2)	72.6
3	5.58 dd (9.8, 2.9)	78.4	4.61 dd (9.0, 3.9)	73.2
4	4.63 dd (9.8, 9.8)	77.5	4.27 dd (9.0, 9.0)	80.5
5	4.98 dq (9.8, 6.0)	67.5	4.86 dq (9.0, 5.8)	67.1
6	1.60 d (6.0)	18.5	1.57 d (5.8)	18.2*
Ram'-1	5.80 d (1.4)	103.1	6.21 d (1.5)	101.3
2	4.56 dd (2.7, 1.4)	77.4	4.77 dd (3.4, 1.5)	77.9
3	4.53 (9.0, 2.7)	77.2	4.53 (9.0, 3.0)	73.2
4	4.38 dd (9.0, 9.0)	67.6	4.42 dd (9.1, 9.1)	79.3
5	4.36 dq (9.0, 5.8)	73.1	4.33 dq (9.1, 6.1)	68.3
6	1.62 d (5.8)	18.4	1.58 d (6.1)	18.2*
Ram''-1	6.23 d (1.2)	103.2	6.23 d (1.5)	103.8
2	4.84 dd (2.6, 1.2)	72.2	4.81 dd (3.1, 1.5)	72.5
3	4.46 dd (9.6, 2.6)	72.9	4.45 dd (9.0, 2.9)	72.6
4	5.83 dd (9.6, 9.6)	75.3	4.22 dd (9.0, 9.0)	73.8
5	4.35 dq (9.6, 6.3)	68.4	4.32 dq (9.0, 6.0)	70.1
6	1.38 d (6.3)	29.3	1.51 d (6.0)	16.6
Ag-1		173.3		175.7
2a	2.14 ddd (14, 7.7, 3.0)	34.4	2.50 t (7.3)	35.4
2b	2.45 ddd (14, 8.6, 2.3)			
10a	1.52 m	30.3		
10b	1.60 m			
11	3.86 m	79.8	3.93 m	78.1
12a	1.31 m	29.8		
12b	1.27 m			
13	1.39 m	27.1		
14	1.61 m	24.2		
15	1.22 m	22.7		
16	0.88 t (7.3)	13.2	0.92 t (7.1)	14.1
Est'-1		173.9		
2'a	1.74 m	24.9		
2'b	1.70 m			
3'-15'(9')	1.17-1.65	29.7-30.4		
16'(10')	1.01 t (7.3)	14.1		

\*Señales sobrepuestas.



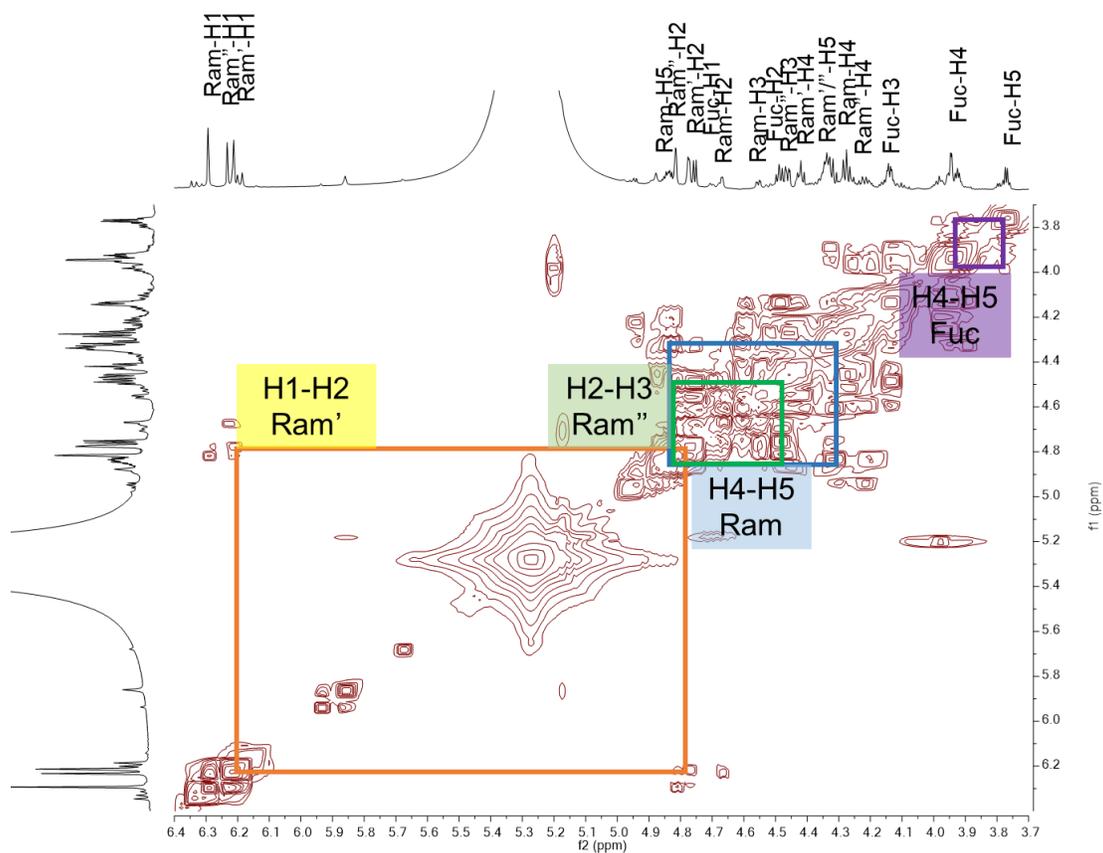
**Figura 20.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del ácido glicosídico constitutivo del pico P3F9. Entre corchetes se ilustra una expansión para la porción del espectro en la cual se encuentran las señales correspondientes a los protones anoméricos.



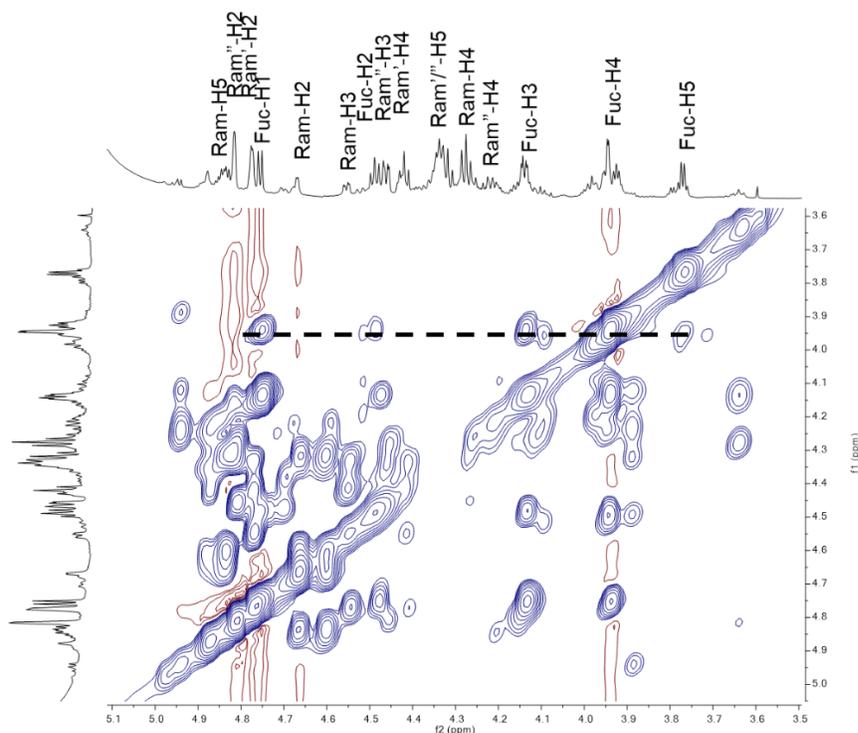
**Figura 21.** Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (225 MHz, piridina- $d_5$ ) del ácido glicosídico constitutivo del pico F3P9.

El análisis mediante el espectro COSY permitió la asignación de cada una de las unidades sacáridas. Para ello, se utilizó como criterio el valor de las  $J$  vecinales, generadas de acuerdo al ángulo diedro existente entre los protones (Pereda-

Miranda et al., 2010). El análisis se inició a partir de cada una de las señales anoméricas y su interacción con la señal H-2 por medio de los patrones de acoplamiento  $^3J_{1,2}$ . Con esto, fue posible establecer las correlaciones vecinales entre los otros protones restantes: H-2/H-3, H-3/H4 y H-4/H5. Por ejemplo, la señal para Ram' H-2 centrada en  $\delta_H$  4.56, y que se muestra en el cuadro de conectividad con líneas de color verde, mostró un cuadro de conectividad con la señal en  $\delta_H$  4.53 (Ram' H-3). Las correlaciones restantes observadas en dicho experimento se ilustran en la **Figura 22**. Por su parte, el experimento TOCSY mostró la interacción del protón anomérico con el sistema de espín completo conformado por las señales restantes (H-1 a H-6) para cada una de las unidades de carbohidrato. En la **Figura 23** se indican las interacciones para la unidad de fucosa.

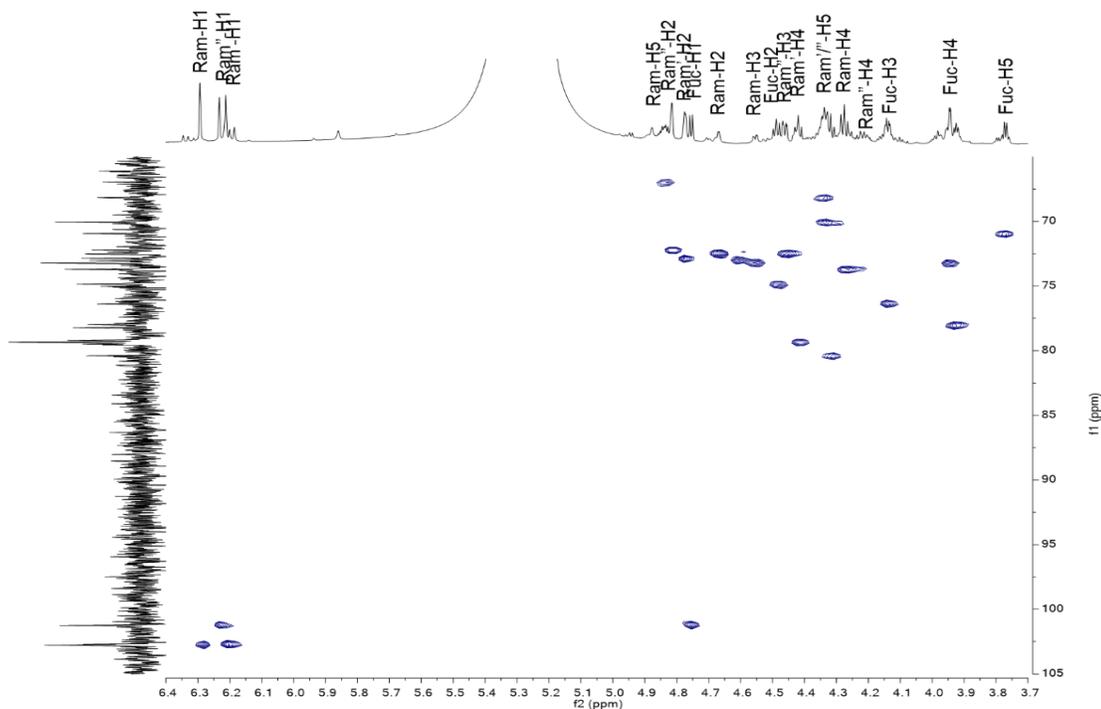


**Figura 22.** Espectro COSY (900 MHz, piridina-d5) del ácido glicosídico. Las correlaciones encontradas se muestran por medio de cuadros de conectividad en distinto color.

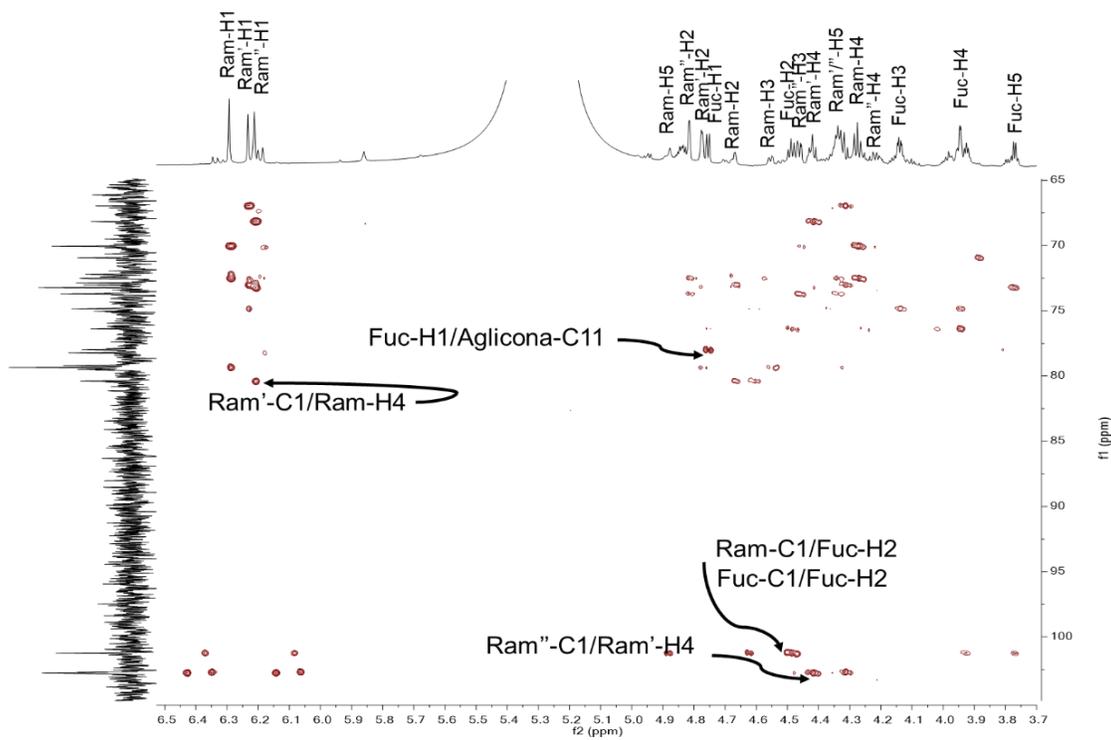


**Figura 23.** Espectro TOCSY para el ácido glicosídico. En línea negra punteada se muestra el ejemplo de correlación para la fucosa.

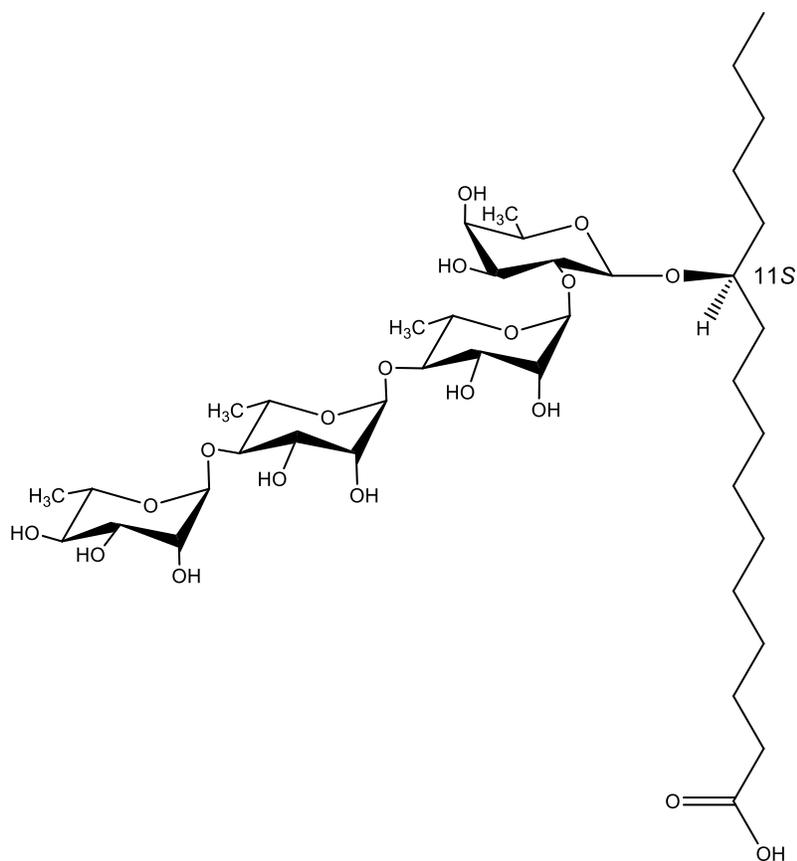
Las relaciones heteronucleares entre los hidrógenos y sus respectivos carbonos, se establecieron inicialmente por el experimento HSQC ( $^1J_{CH}$ ) (**Figura 24**). Se pudieron identificar las interacciones centradas entre  $\delta_C$  95-105 para Fuc-1 ( $\delta_H$  4.75,  $\delta_C$  101.4), Ram-1 ( $\delta_H$  6.29,  $\delta_C$  101.4), Ram'-1 ( $\delta_H$  6.21,  $\delta_C$  101.3), y Ram''-1 ( $\delta_H$  6.23,  $\delta_C$  103.8). A su vez se encontraron las señales atribuibles a los carbonos base de oxígeno de cada azúcar centradas entre los 60-80 ppm (**Cuadro 5**). Por su parte, el análisis del experimento HMBC (**Figura 25**) reveló la presencia de las siguientes conectividades que permitieron determinar la secuencia de glicosilación: Fuc H-1 ( $\delta_H$  4.75)/aglicona C-11 ( $\delta_C$  78.1), Fuc H-2 ( $\delta_H$  4.49)/Ram C-1 ( $\delta_C$  101.4), Ram H-4 ( $\delta_H$  4.27)/Ram' C-1 ( $\delta_C$  101.3), Ram' H-4 ( $\delta_H$  4.42)/Ram'' C-1 ( $\delta_C$  103.8). Con este análisis fue posible corroborar la presencia del ácido operculínico C (**Figura 26**) como el núcleo glicosídico del producto natural aislado F3P9. Las constantes físicas y las propiedades espectroscópicas para el derivado saponificado correspondieron con las descritas por Ono y colaboradores (1989).



**Figura 24.** Espectro HSQC (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del ácido glicosídico.



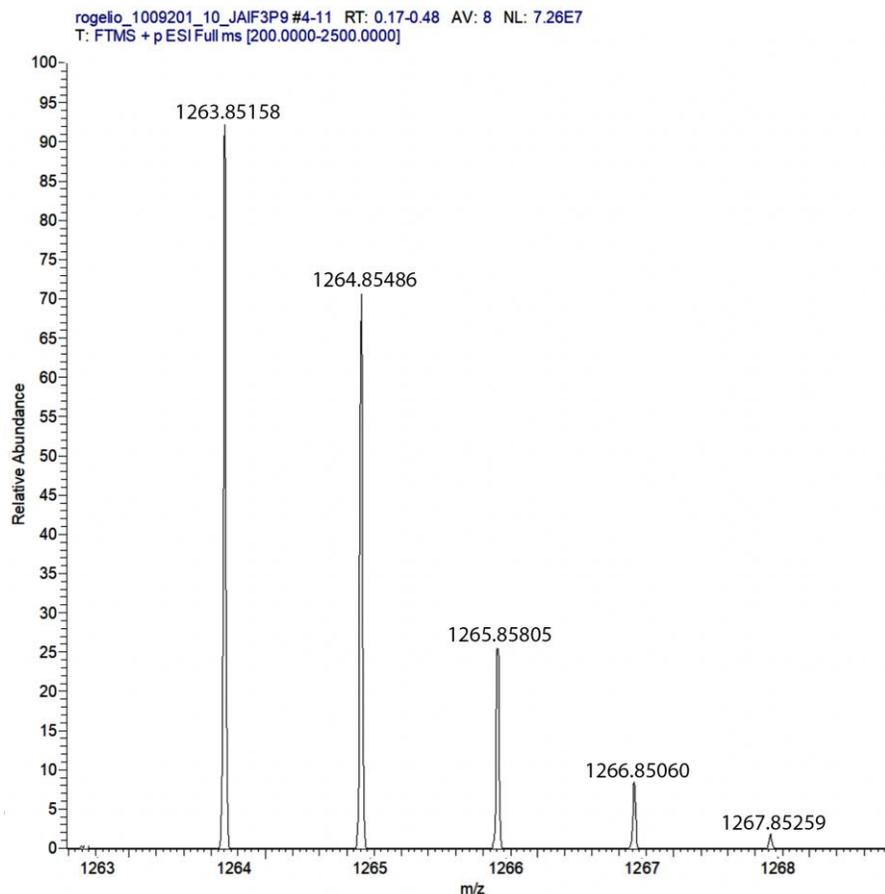
**Figura 25.** Espectro HMBC (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del ácido glicosídico. Las correlaciones se indican con flechas en negro.



**Figura 26.** Estructura del ácido operculínico C.

### 7.5 Elucidación estructural por RMN del componente minoritario.

El estudio espectrométrico mediante ESI en modo positivo del componente minoritario F3P9 no permitió la detección de la molécula protonada  $[M + H]^+$  y, en su lugar, se observó el aducto  $[M + MeOH + H]^+$  que se generó con el disolvente empleado en el análisis para la producción de la corriente de iones (**Figura 27**). Este tipo de aductos  $[M + disolvente + H]^+$  y  $[M + disolvente + metal]^+$ , junto con los conglomerados (*clusters*)  $[2M + H]^+$  y  $[2M + metal]^+$ , son característicos de moléculas con una alta polaridad como el oligosacárido en estudio (Gross, 2017). El aducto  $[M + MeOH + H]^+$  registró un valor de  $m/z$  1263.85158 (Calc.  $C_{67}H_{123}O_{22}$   $m/z$  1263.85514; Error -2.8 ppm) que permitió el cálculo de la fórmula  $C_{66}H_{118}O_{20}$  para el producto natural P3F9 (**Cuadro 6**).



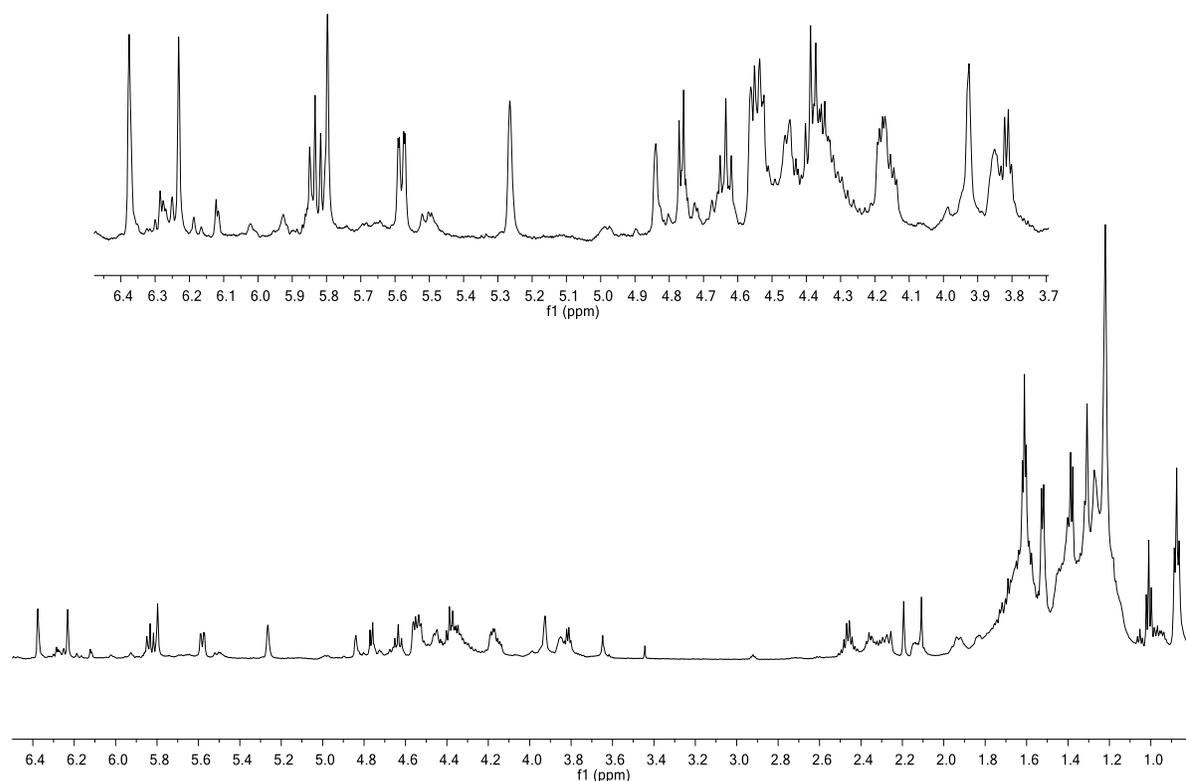
**Figura 27.** Conjunto isotópico en modo positivo de la especie catiónica observada  $[M + \text{MeOH} + \text{H}]^+$ .

**Cuadro 6.** Análisis isotópico para la determinación de la fórmula molecular  $\text{C}_{67}\text{H}_{123}\text{O}_{22}$  del catión  $[M + \text{MeOH} + \text{H}]^+$  generado por el producto natural F3P9 mediante ionización por electronebulización en modo positivo.

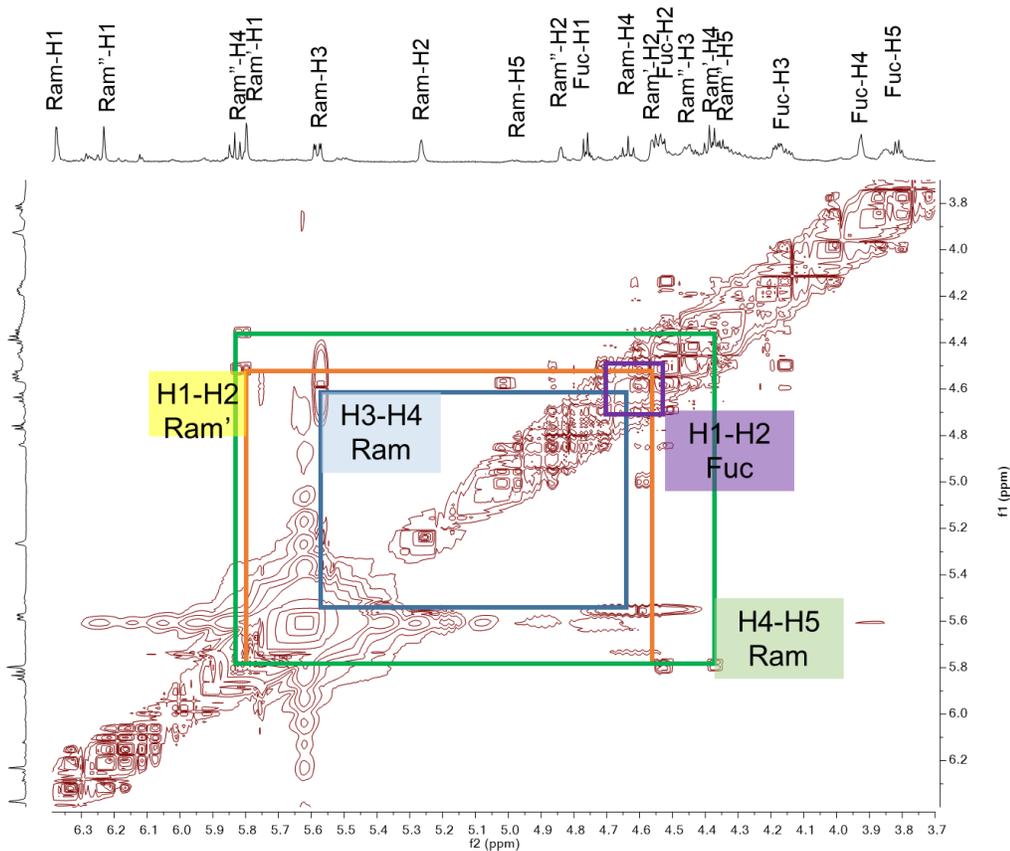
Especie	Valor ( <i>m/z</i> )	AR (%)	AI $\text{C}_1$ (%)	<i>C<sub>n</sub></i> $\text{C}_{67}$	AI $\text{O}_1$ (%)	<i>O<sub>n</sub></i> $\text{O}_{22}$
$[\text{M} + \text{MeOH} + \text{H}]^+$	1263	100	100	100	100	
$[\text{M} + \text{MeOH} + \text{H} + 1]^+$	1264	73.7	1.1	$73.7/1.1 = 67$	0.04	
$[\text{M} + \text{MeOH} + \text{H} + 2]^+$	1265	25.6		21.25	0.2	$25.6 - 21.25 = 4.4/0.2 = 22$

AR, abundancia relativa; AI  $\text{C}_1$ , abundancia isotópica para el carbono; AI  $\text{O}_1$ , abundancia isotópica para el oxígeno.

Al igual que para el ácido glicosídico se realizó el análisis por RMN  $^1\text{H}$  (**Figura 28**) del producto minoritario intacto F3P9. Este experimento mostró las señales correspondientes en forma de tripletes para el grupo metilo terminal de la aglicona que forma la macrolactona y de los ésteres acilantes ( $\delta_{\text{H}}$  0.8-1.0 ppm); también, se observaron cuatro dobletes que corresponden a los protones de los metilos de las cuatro 6-desoxihesosos presentes en la molécula (D-fucosa y tres L-ramnosas) ( $\delta_{\text{H}}$ : 1.4-1.7). Las señales centradas en  $\delta_{\text{H}}$  4.76, 6.37, 5.80 y 6.23 corresponden a los hidrógenos anoméricos de la unidad de D-fucosa ( $J_{1-2} = 7.8$  Hz) y de las tres unidades de L-ramnosa como singuletes anchos, respectivamente. El valor para la multiplicidad de la fucosa concuerda con lo esperado para una interacción de tipo axial-axial y, también, observado en el ácido glicosídico (Arias, 2016).



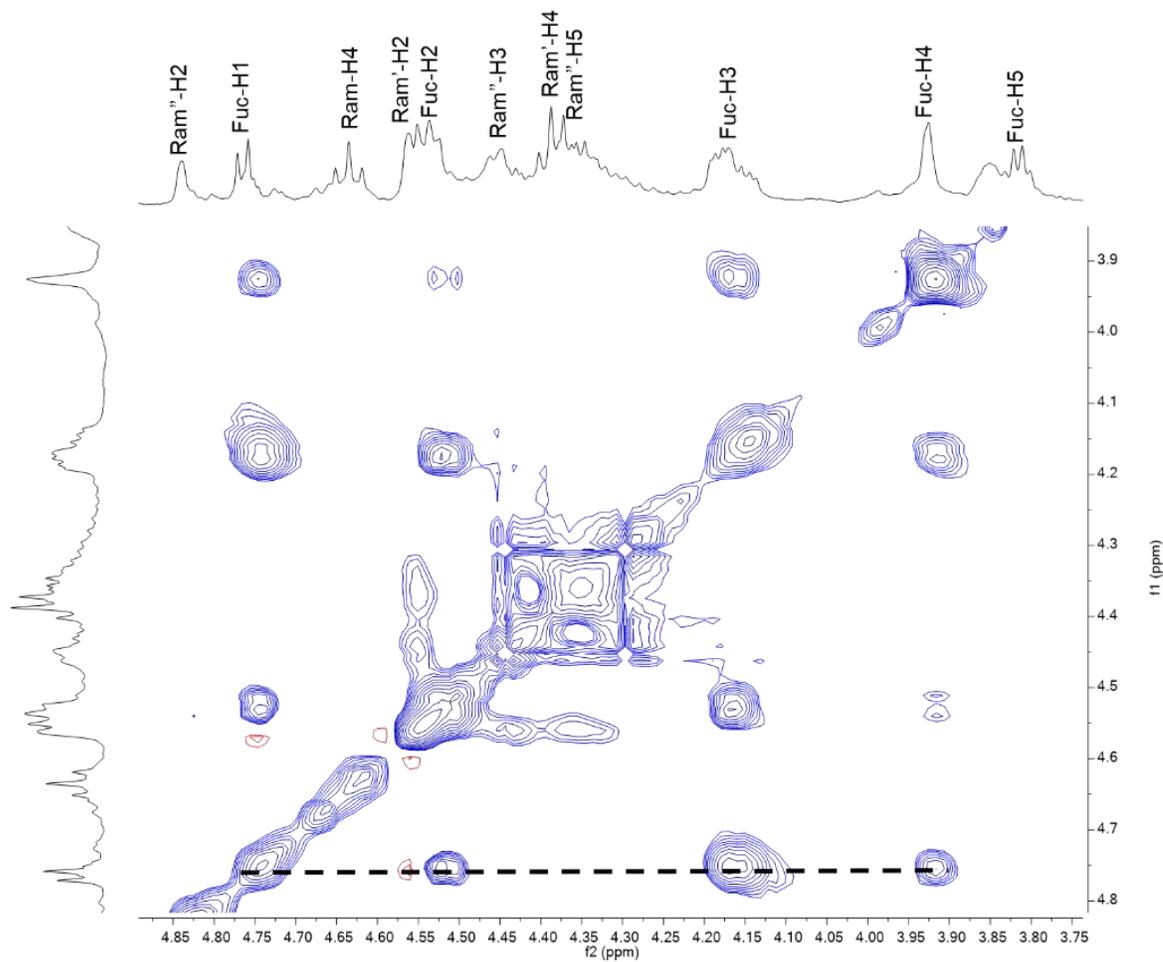
**Figura 28.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del producto minoritario completo y con ampliación de la zona de señales de carbohidratos y posiciones de esterificación, en zona superior.



**Figura 29.** Experimento COSY (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del producto minoritario en donde se muestran las interacciones encontradas a través de cuadros de conectividad, para los distintos monosacáridos que conforman el núcleo oligosacárido.

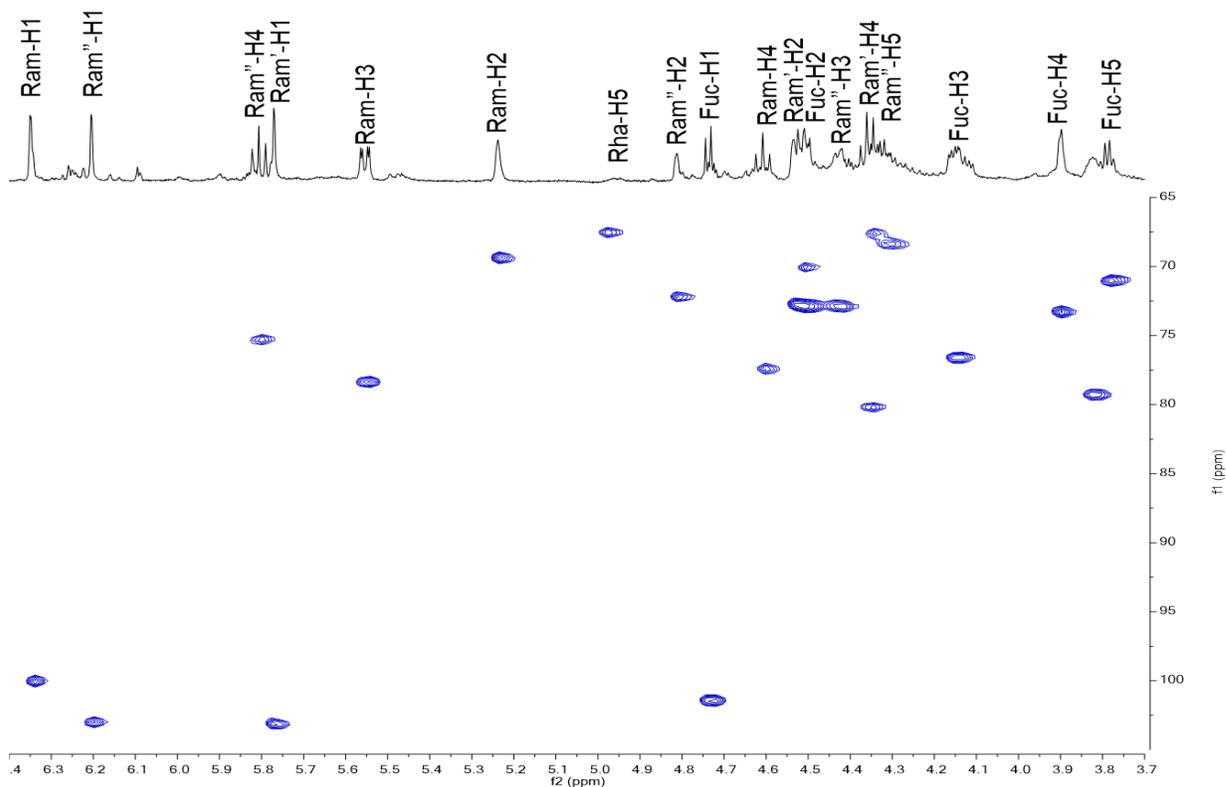
El análisis de los espectros COSY (**Figura 29**) y TOCSY (**Figura 30**) permitió establecer las interacciones entre los hidrógenos de los metinos enlazados para cada unidad sacárida en la región comprendida entre los  $\delta_H$  3.7-6.4. La asignación en el experimento COSY, se realizó de forma similar al análisis anteriormente descrito para el ácido glicosídico, partiendo de la señal del protón anomérico (H-1,  $\delta_H$  4.76) y su interacción con la señal H-2 ( $\delta_H$  4.54), etc. Por ejemplo, la señal de Ram' H-2 con  $\delta_H$  4.56 que se muestra en el cuadro de conectividad con líneas de color verde, se relaciona con la de Ram' H-3 ( $\delta_H$  4.53). Asimismo, fue posible establecer correlaciones vecinales entre los siguientes protones: H-1-H2, H2-H3, y H4-H5 para algunas unidades. Por su parte, el experimento TOCSY (**Figura 30**)

mostró la interacción del protón anomérico con el sistema de espín completo conformado por las señales restantes (H-1 a H-6) del azúcar correspondiente.



**Figura 30.** Espectro TOCSY (900 MHz, piridina-*d*<sub>5</sub>) para el producto F3P9. En línea negra punteada se muestra el ejemplo de correlación para la fucosa.

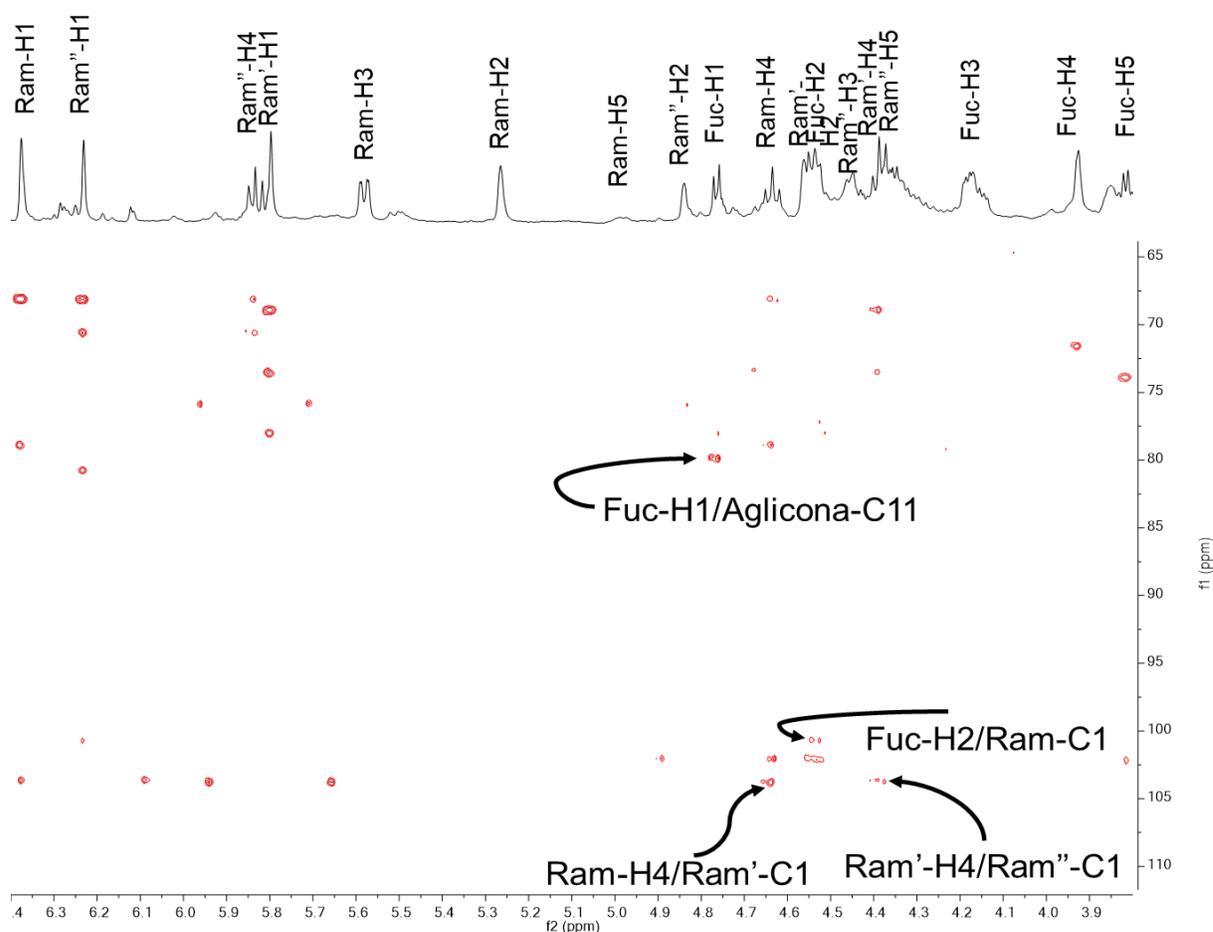
El análisis por RMN  $^{13}\text{C}$  no pudo llevarse a cabo debido a la limitante impuesta por la cantidad de muestra purificada (17.8 mg), después de un segundo ciclo de reciclaje, que proporcionó una puerza superior al 90% (5 mg); sin embargo, los desplazamientos químicos (**Cuadro 5**) se registraron en forma indirecta a través del experimento heteronuclear bidimensional HSQC (**Figura 31**). El análisis de este espectro permitió identificar 17 señales entre  $\delta_{\text{C}}$  60-80 pertenecientes a los carbonos base de oxígeno de cada azúcar y cuatro señales adicionales correspondientes a los carbonos anoméricos encontrados en la ventana entre  $\delta_{\text{C}}$  95-105.



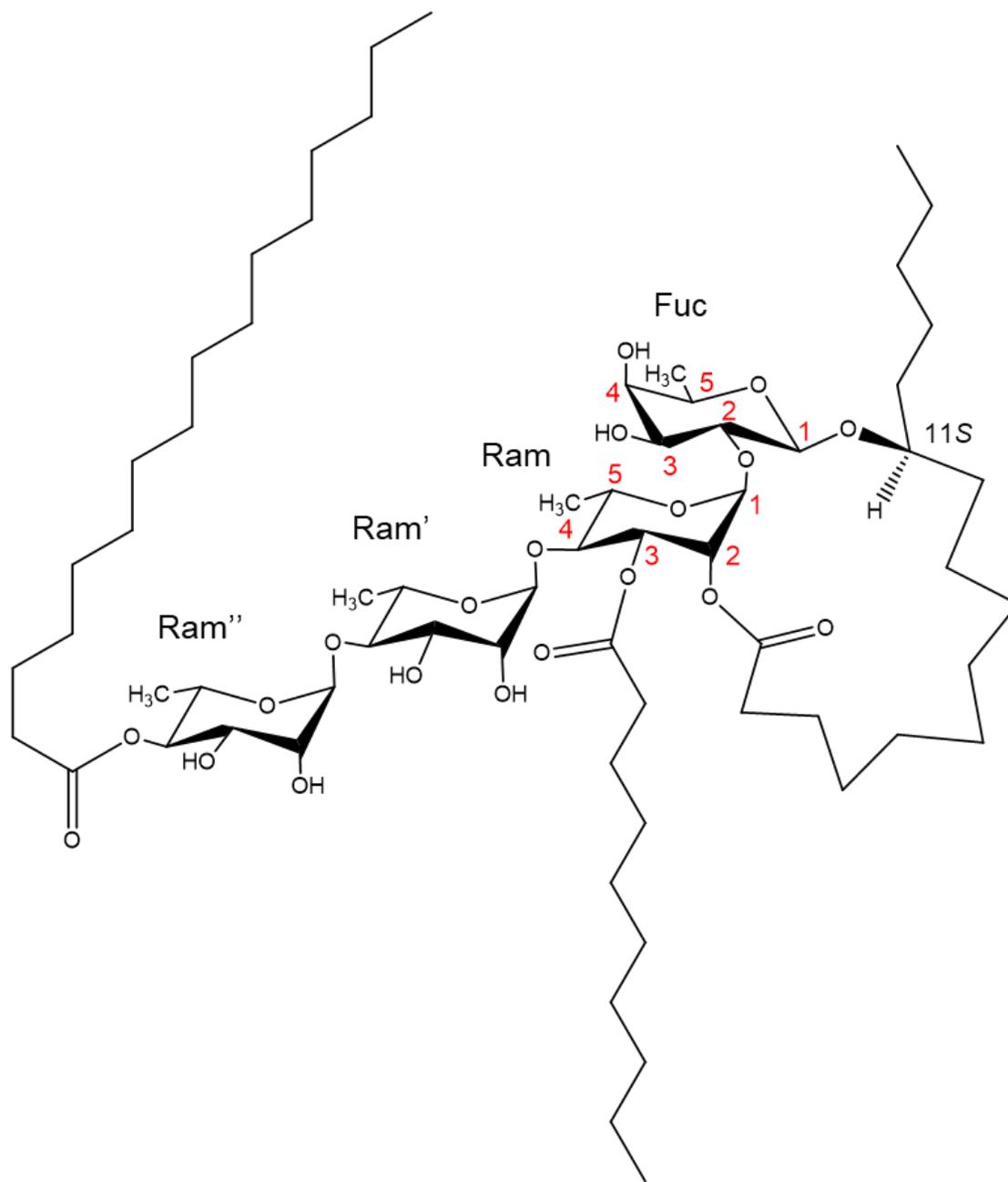
**Figura 31.** Espectro HSQC (900 MHz, piridina- $d_5$ ) del producto F3P9.

Después de esto, se procedió a establecer la secuencia de glicosilación del producto natural por medio del experimento HMBC (**Figura 32**), en el cual fue posible observar las siguientes conectividades: Fuc H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  4.76)/aglicona C-11 (79.4), Fuc H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.54)/Ram C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  100.0), Ram H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4.63)/Ram' C-1 ( $\delta_{\text{C}}$

103.1), Ram' H-4 ( $\delta_H$  4.38)/Ram'' C-1 ( $\delta_C$  103.2). A su vez se encontró la relación para la posición de esterificación en Ram'' H-4 ( $\delta_H$  5.83)/ácido hexadecanoico ( $\delta_C$ -1 173.9). Las correlaciones entre los carbonilos restantes del ácido decanoico presente en la posición Ram H-3 y la de la lactona se encuentran traslapadas en  $\delta_C$  173.4 ppm. Gracias a este análisis espectroscópico se pudo concluir que el producto natural posee la base estructural del ácido glicosídico C, además de sugerir la presencia de dos ésteres acilantes, el ácido *n*-hexadecanoico y *n*-decanoico, con lo que se llegó a la estructura propuesta en la **Figura 33**, identificándose a este producto natural como el éster intramolecular del ácido 11(*S*)-hidrohexadecanoico 11-*O*-(4-*O*-*n*-dodecanoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(3-*O*-*n*-decanoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fucopiranósido éster 1,2''.



**Figura 32.** Espectro de HMBC (900 MHz, piridina-*d*<sub>5</sub>) del producto minoritario. Las correlaciones observadas se señalan con flechas negras.



**Figura 33.** Estructura de la resina glicosídica aislada.

Es importante destacar la similitud estructural que posee el producto natural aislado en el presente trabajo con el de la denominada operculina VI obtenida por Ono y colaboradores (1992). Ambas estructuras poseen el esqueleto base del ácido operculínico C; sin embargo, la diferencia más notable radica tanto en las posiciones

de esterificación y el tipo de éster acilante: para el caso de operculina VI, ésta posee dos ácidos *n*-dodecanoicos en las posiciones Ram" C-4 y Ram' C-2, mientras que la resina glicosídica descrita en el presente trabajo posee dos ácidos, *n*-hexadecanoico también en posición Ram" H-4, y *n*-decanoico en posición Ram H-3. Esta propuesta estructural se basa en la observación de que todas las resinas aisladas, hasta el momento, presentan como un rasgo característico estructural la presencia de los ácidos de mayor longitud en la unidad sacárida externa del núcleo glicosídico, mientras que los de menor longitud se encuentran en la ramnosa interna, tanto en los núcleos tetrasacáridos como en los pentasacáridos (Ono et al., 1990; 1992).

Las enzimas aciltransferasas responsables de la esterificación de los núcleos oligosacáridos en las especies de convolvuláceas y solanáceas son altamente promiscuas en relación a los sustratos acilantes que utilizan (Castañeda-Gómez et al., 2019; Moghe et al., 2017); sin embargo, existe un requerimiento de tipo estérico impuesto por el núcleo macrocíclico oligosacárido que dificulta la esterificación de las posiciones cercanas a la macrolactona y, por esta razón, en estas posiciones sólo se ha descrito la presencia de ácidos grasos de cadenas cortas y medianas (Lira-Ricárdez et al., 2019). Por lo tanto, éste fue el criterio utilizado para la ubicación del residuo de hexadecanoilo en la posición terminal del oligosacárido (Ram" C-4). El compuesto F3P9 representa el primer núcleo oligosacárido con el ácido *n*-hexadecanoico como un residuo acilante en las resinas glicosídicas de las convolvuláceas (Pereda-Miranda et al., 2010). Para comprobar en forma inequívoca el patrón de sustitución propuesto para el pico F3P9, se sugiere el registro de los experimentos de EM mediante la ionización FAB en modo negativo o de disociación inducida por colisión mediante ESI en modo positivo mediante el análisis de la fragmentación observada. En el capítulo 10 (ANEXOS), se presentan todos los espectros de resonancia magnética nuclear correspondientes a las figuras aquí incluidas.

## 8. CONCLUSIONES

1. Por medio de las técnicas de “corte de núcleo” y “reciclaje de pico”, así como con la ayuda de los análisis espectrométrico (EM) y espectroscópico (RMN), se pudo purificar e identificar un producto natural novedoso (F3P9) perteneciente a la clase de las resinas glicosídicas características de las convolvuláceas y que corresponde a los principios responsables de la actividad purgante de la jalapa brasileña de flores amarillas (*O. hamiltonii*).
2. El compuesto F3P9 presenta como núcleo glicosídico al tetrasacárido del ácido jalapínico previamente descrito como el ácido operculínico C, conformado por cuatro unidades de metilpentosas: una D-fucosa y tres L-ramnosas. Este núcleo sólo se ha descrito en tres productos naturales purificados de la jalapa brasileña de flores blancas (*O. macrocarpa*).
3. Se corroboró la estructura macrocíclica para el compuesto F3P9 a través de los experimentos 2D homonucleares y heteronucleares. La macrolactona se estableció en la posición C-2 de la ramnosa interna. Las diferencias significativas para este compuesto incluyen las posiciones de acilación, teniendo como resultado una molécula con dos ésteres acilantes: los ácidos *n*-decanoico y *n*-hexadecanoico (identificado por primera vez como un residuo acilante de una resina glicosídica) en las posiciones Ram C-3 y Ram” C-4, respectivamente.
4. La diversidad química de las resinas glicosídicas presentes en la fracción liposoluble de las raíces de las jalapa brasileña sustenta la presencia de oligómeros de mediano peso molecular, principalmente tetrasacáridos y pensacáridos (tanto acíclicos y cíclicos), divergiendo en la longitud de sus aglicona acilantes, los ácidos decanoico y dodecanoico, principalmente.

## 9. PERSPECTIVAS

1. Purificar los picos F3P7 y F3P10 que presentaron características espectroscópicas en la RMN propias de las resinas glicosídicas, en cantidades suficientes (10 mg), mediante el establecimiento de las condiciones analíticas en HPLC.
2. Caracterizar la estructura molecular de los constituyentes minoritarios adicionales mediante RMN y EM.
3. Evaluar el potencial modulador de los glicolípidos de la jalapa brasileña sobre la glicoproteína-P en células de cáncer mamario resistentes a vinblastina MCF-7/Vin.
4. Las resinas glicosídicas pueden utilizarse para el diseño de novedosos medicamentos que en la terapias combinatorias sean capaces de inhibir la actividad de la P-gp para revertir el fenotipo de la resistencia a fármacos antitumorales y, en consecuencia, potenciar la actividad de los agentes antineoplásicos comerciales. Su desarrollo como potentes inhibidores de la P-gp con una baja citotoxicidad, es un alternativa para superar la interferencia indeseable de esta familia de transportadores presentes en las células de mamíferos y que se expresa en las células malignas bajo exposición a las quimioterapias.

## 10. BIBLIOGRAFÍA.

- Al-Snafi, A.E. (2016) The chemical constituents and pharmacological effects of *Convolvulus arvensis* and *Convolvulus scammonia*. A review. *IOSR Journal of Pharmacy* 6, 64-75.
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Rollinger, J.M. (2015) Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnology Advances* 33, 1582-1614.
- 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.
- Balunas, M.J., Kinghorn, A.D. (2005) Drug discovery from medicinal plants. *Life sciences* 78, 431-441.
- Brito-Arias, M. (2007) *Synthesis and characterization of glycosides*. Springer Science & Business Media.
- Busse, G.D., Triggle, D.J. (2006) *Morphine*. New York: Chelsea House Publishers. pp. 20–21. ISBN 978-1-4381-0211-5.
- Bye, R., Linares, E. (2013) Códice de la Cruz-Badiano: Medicina prehispánica. Primera parte. *Arqueología Mexicana*, Edición Especial 50, pp. 8-91.
- Calderon, L.D.A., Silva-Jardim, I., Zuliani, J.P., Ciancaglini, P., Silva, L.H.P.D., Stábéli, R.G. (2009) Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria. *Journal of the Brazilian Chemical Society* 20, 1011-1023.
- Cao, S., Guza, R.C., Wisse, J.H., Miller, J.S., Evans, R., Kingston, D.G. (2005) Ipomoeassins A– E, Cytotoxic Macrocyclic Glycoresins from the Leaves of *Ipomoea quamosa* from the Suriname Rainforest. *Journal of Natural Products* 68, 487-492.
- Castañeda-Gómez, J, Laviás-Hernández, P, Fragoso-Serrano, M, Lorence, A, Pereda-Miranda, R. (2019) Acylsugar diversity in the resin glycosides from *Ipomoea tricolor* seeds as chemosensitizers in breast cancer cells. *Phytochemistry Letters* 32:77-82

- de Laeter, J.R., Böhlke, J.K., De Bièvre, P., Hidaka, H., Peiser, H.S., Rosman, K.J. R., Taylor, P.D.P. (2003) Atomic weights of the elements. Review 2000 (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry* 75, 683-800.
- de la Cruz, M. (1991) *Libellus de medicinalibus indorum herbis. Manuscrito azteca de 1552. Según traducción latina de Juan Badiano*. Versión española con estudios y comentarios por diversos autores, FCE/Instituto Mexicano del Seguro Social, facsímil, México.
- Demarque, D.P., Crotti, A.E., Vessecchi, R., Lopes, J.L., Lopes, N.P., (2016) Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports* 33, 432-455.
- 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.
- Eich, E. (2008) *Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary metabolites: Biosynthesis, chemotaxonomy, biological and economic significance (a handbook)*. Springer Science & Business Media.
- Escalante-Sánchez, E., Pereda-Miranda, R. (2007) Batatins I and II, ester-type dimers of acylated pentasaccharides from the resin glycosides of sweet potato. *Journal of Natural Products* 70, 1029-1034.
- Gertsch, J. (2009) How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology* 122, 177–183.
- Gu, R., Wang, Y., Long, B., Kennelly, E., Wu, S., Liu, B., Long, C. (2014) Prospecting for bioactive constituents from traditional medicinal plants through ethnobotanical approaches. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 37, 903-915.
- Gualteros-Montañó LK. (2019) *Núcleos oligosacáridos constitutivos de las resinas glicosídicas de Ipomoea hederifolia : aislamiento y elucidación estructural*. (Maestría), Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- González-Pozos L. (2018) *Purificación mediante HPLC y elucidación estructural de un pentasacárido del ácido 12-hidroxiocetadecanoico de la jalapa brasileña*

- (*Ipomoea hamiltonii*). Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Gunther, R. T. (1968) *The Greek Herbal of Dioscorides*; Hafner: New York; pp. 571-572.
- Gross, J.H. (2017) *Mass Spectrometry. A Textbook*; Springer Nature: Cham, Switzerland; p. 767.
- Hardy, K., Buckley, S., Collins, M.J., Estalrich, A., Brothwell, D., Copeland, L., García-Taberner, A., García-Vargas, S., de la Rasilla, M., Lalueza-Fox, C., Huguet, R., (2012) Neanderthal medics? Evidence for food, cooking, and medicinal plants entrapped in dental calculus. *Naturwissenschaften* 99, pp.617-626.
- Hoffman, S.L., Campbell, C.C., White, N.J. (2011) Malaria. In R. L. Guerrant, D. H. Walker, P. F. Weller (Eds.), *Tropical Infectious Diseases: Principles, Pathogens and Practice (Third Edition)*, Chapter 96; pp. 646-675. Edinburgh: W.B. Saunders
- Hou, J.P. (1977) The development of Chinese herbal medicine and the Pen-ts'ao. *The American Journal of Chinese Medicine* 5, 117-122.
- Ji, H.-F., Li, X.-J., Zhang, H.-Y. (2009) *Natural products and drug discovery. EMBO reports* 10, 194-200.
- Kitagawa, I., Shibuya, H., Yokokawa, Y., Baek, N. I., Ohashi, K., Yoshikawa, M., Wariadinata, H. (1988) Structures of merremosides B and D, new antiserotonic resin-glycosides from the tuber of *Merremia mammosa*, an Indonesian folk medicine. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 36, 1618-1621.
- Kumar, A., Sharma, P.R., Mondhe, D.M. (2017) Potential anticancer role of colchicine-based derivatives: an overview. *Anticancer Drugs* 28, 250-262.
- Langenheim, J. H. (2003) *Plant resins: Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany* (No. 620.1924 L275p). Oregon, US: Timber Press.
- Lehmann, C.W., Fürstner, A., Müller, T. (2000) Macrocyclic substructure of tricolorin A—The first crystal structure of a resin glycoside. *Zeitschrift für Kristallographie-Crystalline Materials* 215, 114-117.

- Leonti, M., Casu, L., Sanna, F., Bonsignore, L. (2009) A comparison of medicinal plant use in Sardinia and Sicily—De Materia Medica revisited?. *Journal of Ethnopharmacology* 121, 255-267.
- Lira-Ricárdez, J. (2019) *Ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas de operculina macrocarpa : elucidación estructural y evaluación de su potencial modulador sobre la resistencia a fármacos*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Lira-Ricárdez, J., Pereda-Miranda, R. (2019) Reversal of multidrug resistance by amphiphilic morning glory resin glycosides in bacterial pathogens and human cancer cells. *Phytochemistry Reviews*, en prensa.  
<https://doi.org/10.1007/s11101-019-09631-1>
- Lira-Ricárdez, J., Pereda-Miranda, R., Castañeda-Gómez, J., Fragoso-Serrano, M., Simas, R.C., Leitão, S.G. (2019) Resin Glycosides from the Roots of *Operculina macrocarpa* (Brazilian Jalap) with Purgative Activity. *Journal of Natural Products* 82, 1664-1677.
- Mata, R.; Figueroa, M.; Navarrete, A.; Rivero-Cruz, I. (2019) Chemistry and Biology of Selected Mexican Medicinal Plants. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A. D.; Falk, H.; Gibbons, S.; Kobayashi, J., Asakawa, Y.; Liu, J.-K., Eds.; Springer International: Cham, Switzerland, 2019; Vol. 108, pp 1-142.
- McColl, E.R., Asthana, R., Paine, M.F. and Piquette-Miller, M., 2019. The Age of Omics-Driven Precision Medicine. *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 106, 477-481.
- Meira, M., da Silva, E.P., David, J.M., David, J.P. (2012) Review of the genus *Ipomoea*: traditional uses, chemistry and biological activities. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 22, 682-713.
- Michelin, D.C., Finati, S.C.G., Sacramento, L.V.S., Vilegas, W., Salgado, H.R.N. (2010). Controle de qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 20, 18-22.

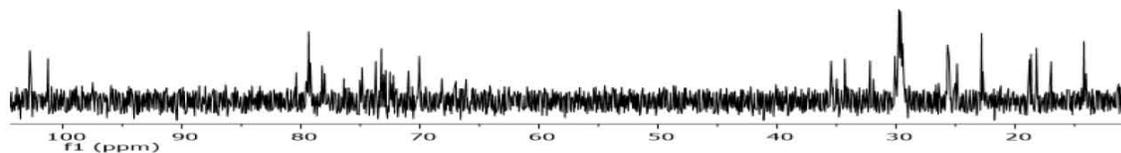
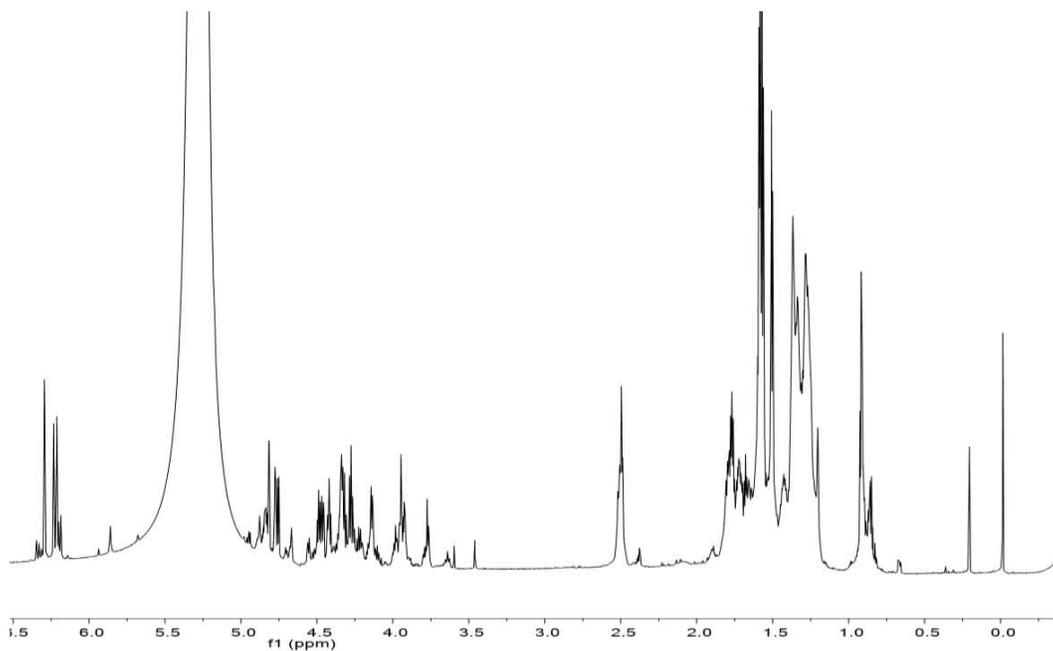
- Moghe, G.D., Leong, B.J., Hurney, S.M., Jones, A.D., Last, R.L. (2017) Evolutionary routes to biochemical innovation revealed by integrative analysis of a plant-defense related specialized metabolic pathway. *eLife* 6, e28468.
- Moreno-Velasco, A. (2019) *Aplicación de técnicas analíticas de alta resolución para la purificación (HPLC) y la caracterización estructural (RMN y EM) de las resinas glicosídicas de Ipomoea alulata*. Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México.
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T., Okabe, M. (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.
- Okabe, H., Koshito, N., Tanaka, K., Kawasaki, T. (1971) Studies on Resin Glycosides. II. Unhomogeneity of "Pharbitic Acid" and Isolation and Partial Structures of Pharbitic Acids C and D, the Major Constituents of "Pharbitic Acid". *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 19, 2394-2403.
- Ono, M., Kubo, K., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1989) Operculin I and II, New Ether-Soluble Resin Glycosides ("Jalapin") With Fatty Acid Ester Groups From *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37, 241-244.
- Ono, M., Nishi, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1990) Resin Glycosides. IX: Operculins I, II, V, VII and VIII, New Ether-Soluble Resin Glycosides of *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (the Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38, 2986-2991.
- 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.
- Osorio, N., Charry, P.A., Rios-Vásquez, E., Castañeda-Gómez, J.F. (2018) Ácidos orgánicos constitutivos de las resinas glicosídicas de tres especies de *Ipomoea* (Convolvulaceae). *Revista ION*, 31, 55-58.

- Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Escalante-Sánchez, E., Hernández-Carlos, B., Linares, E., Bye, R. (2006) Profiling of the Resin Glycoside Content of Mexican Jalap Roots with Purgative Activity. *Journal of Natural Products* 69, 1460-1466. doi: 10.1021/np060295f
- 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, Villatoro-Vera, R, Bah, M, Lorence, A. (2009) Pore-forming activity of morning glory resin glycosides in model membranes. *Rev Latinoamer Quim* 37:144-154.
- Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramirez, D., Castaneda-Gomez, J. (2010) Resin glycosides from the morning glory family. *Fortschr Chem Org Naturst* 92, 77-153.
- Petrovska, B.B. (2012). Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacognosy Reviews* 6, 1-5.
- Schultes, R.E., Hofmann, A. (1973) *The Botany and Chemistry of Hallucinogens*. Springfield: Charles C Thomas; pp. 240–257
- Steiner, U., Leistner, E. (2018) Ergot alkaloids and their hallucinogenic potential in morning glories. *Planta medica* 84, pp.751-758.
- Süntar, I., (2019) Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 1-11.
- von Klein, C.H. (1905) The medical features of the Papyrus Ebers. *Journal of the American Medical Association*, 45(26), pp.1928-1935.
- WHO, 2005. WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization, Geneva.
- Zhu, D., Chen, C., Bai, L., Kong L., Luo, J. (2019) Downregulation of aquaporin 3 mediated the laxative effect in the rat colon by a purified resin glycoside fraction from *Pharbitis Semen*. *Evid-Based Compl Alt*. DOI: 10.1155/2019/9406342.

## 11. ANEXOS

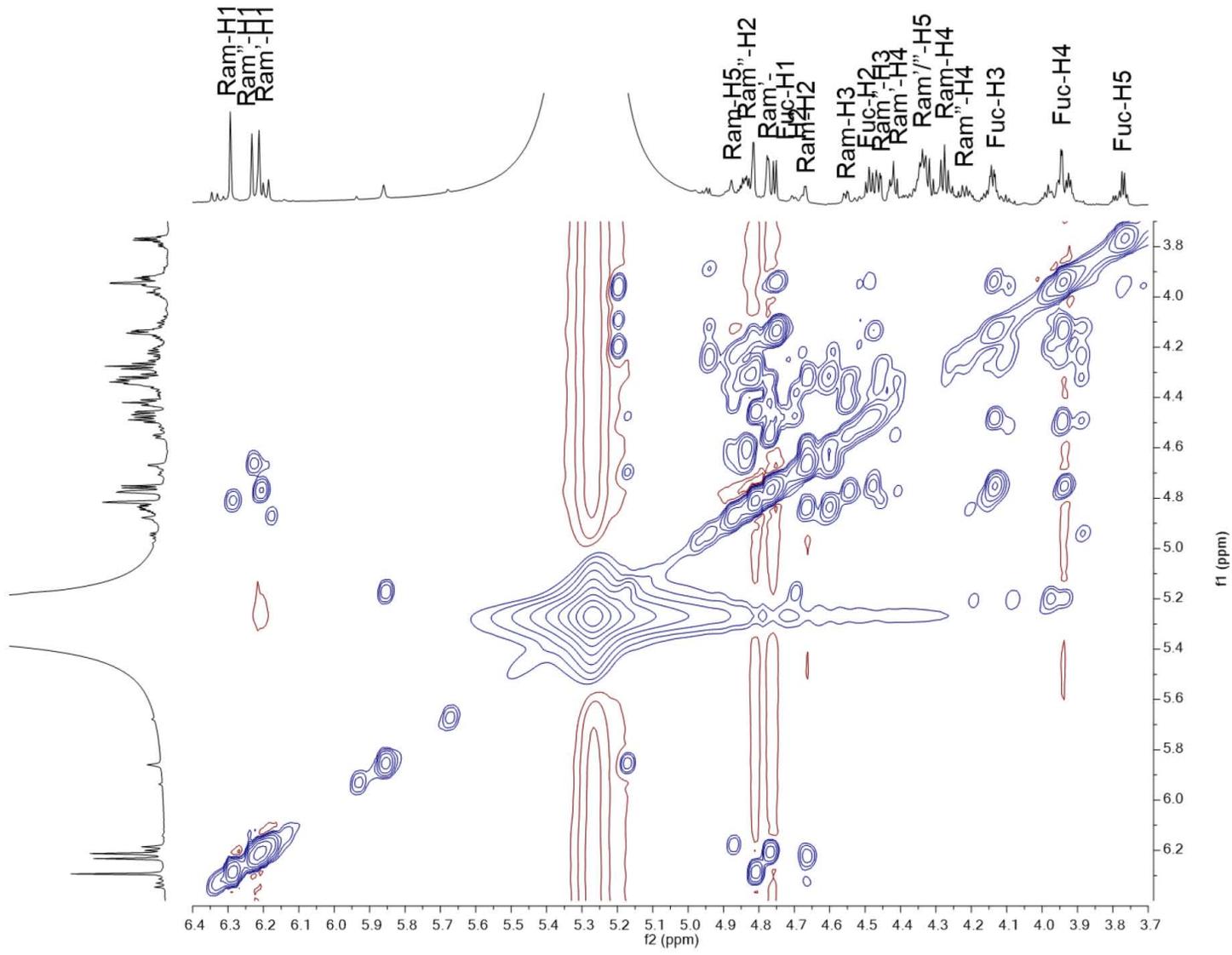
### 10.1 Espectros de RMN del ácido glicosídico aislado (900 MHz, piridina-*d*5).

#### Espectros de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$



# Espectro COSY





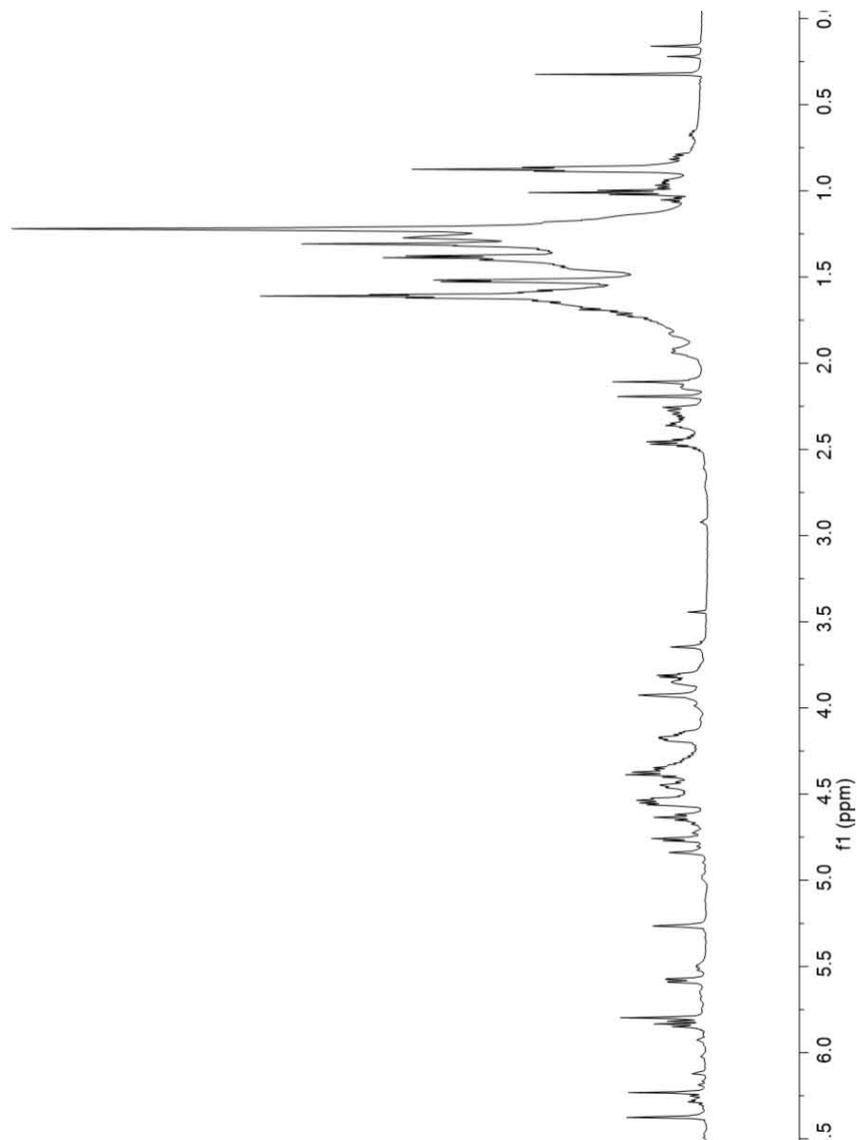
Espectro TOCSY



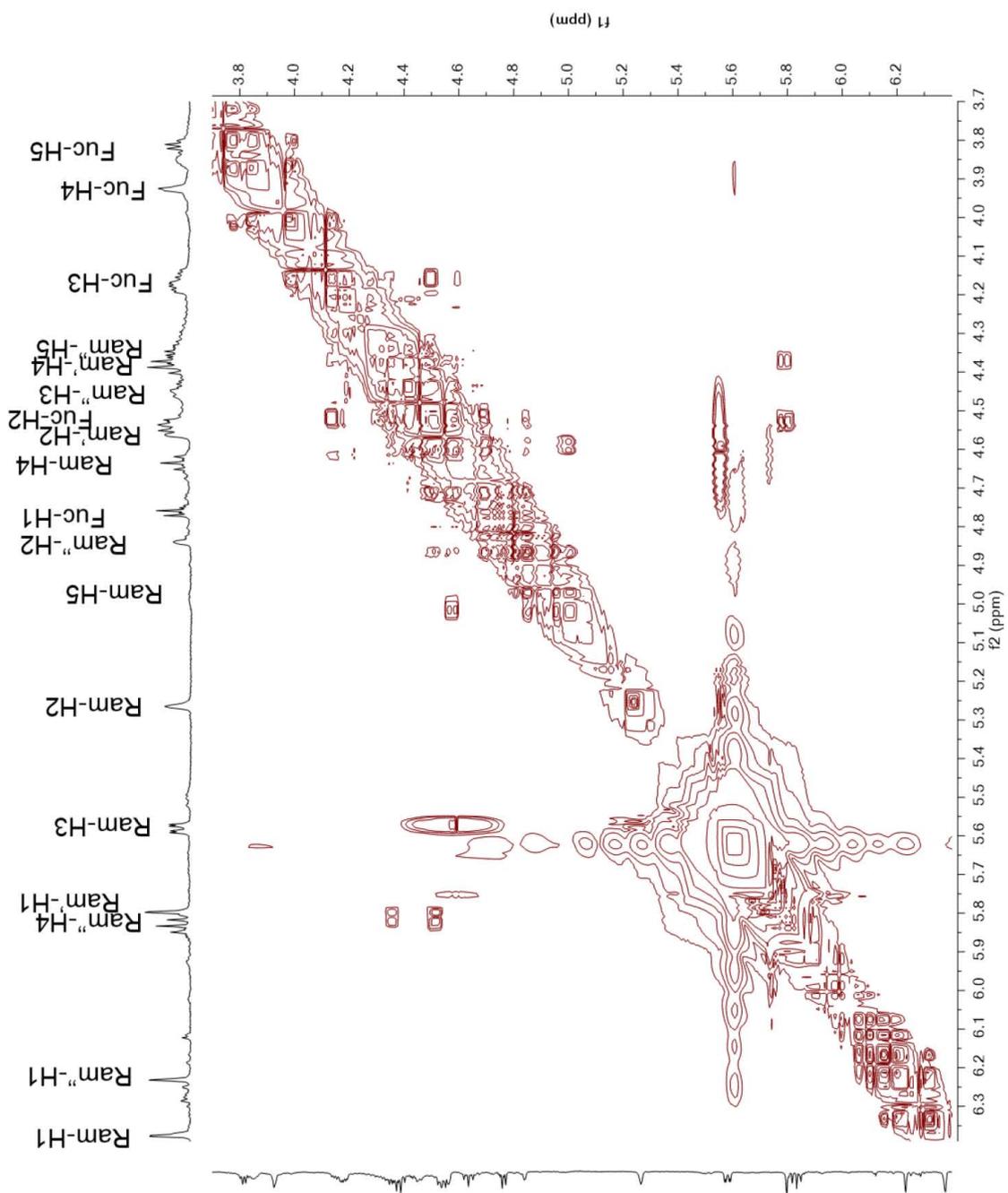


## 10.2 Espectros de RMN del producto natural aislado (900 MHz, piridina-d<sub>5</sub>).

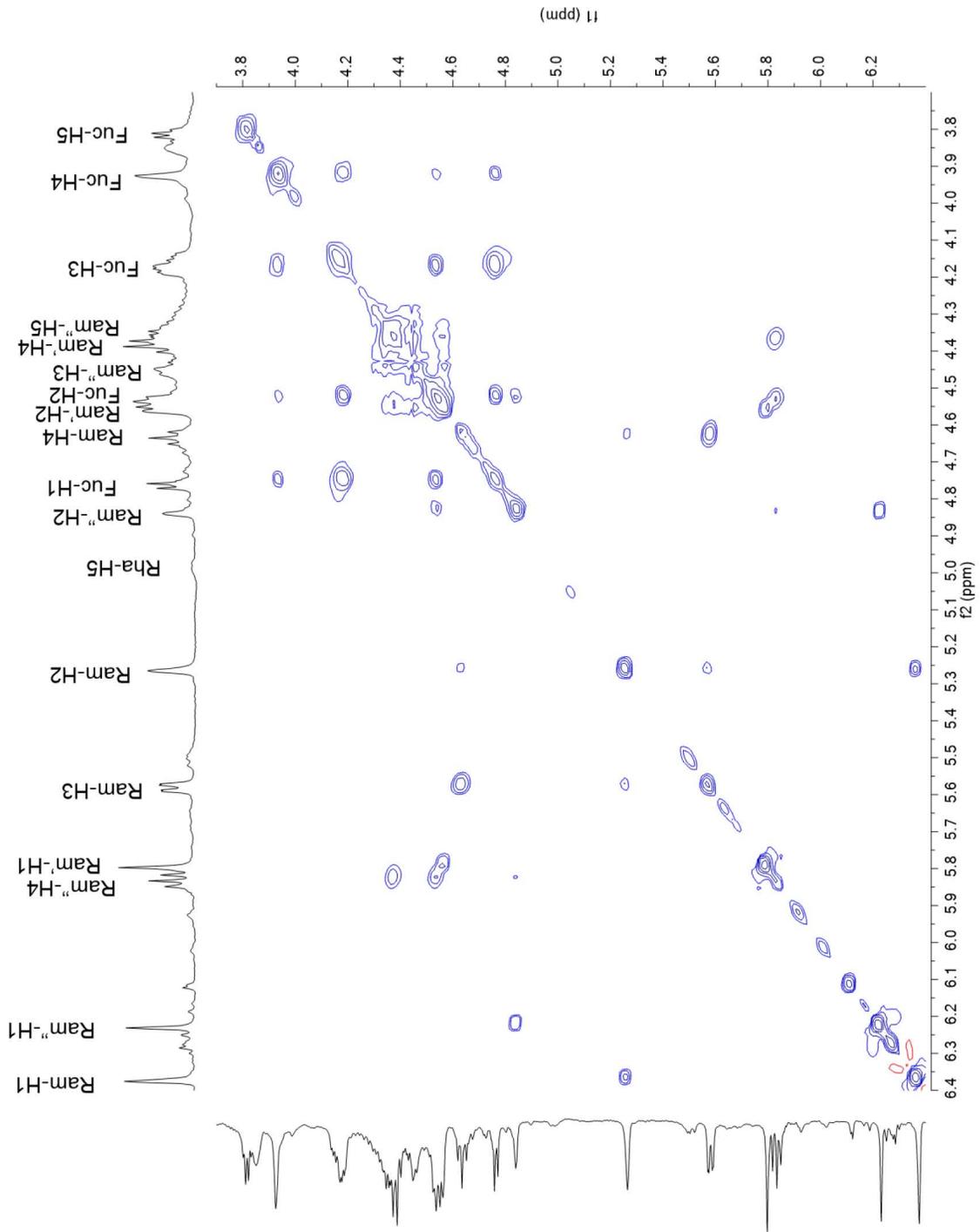
### Espectro de RMN-<sup>1</sup>H



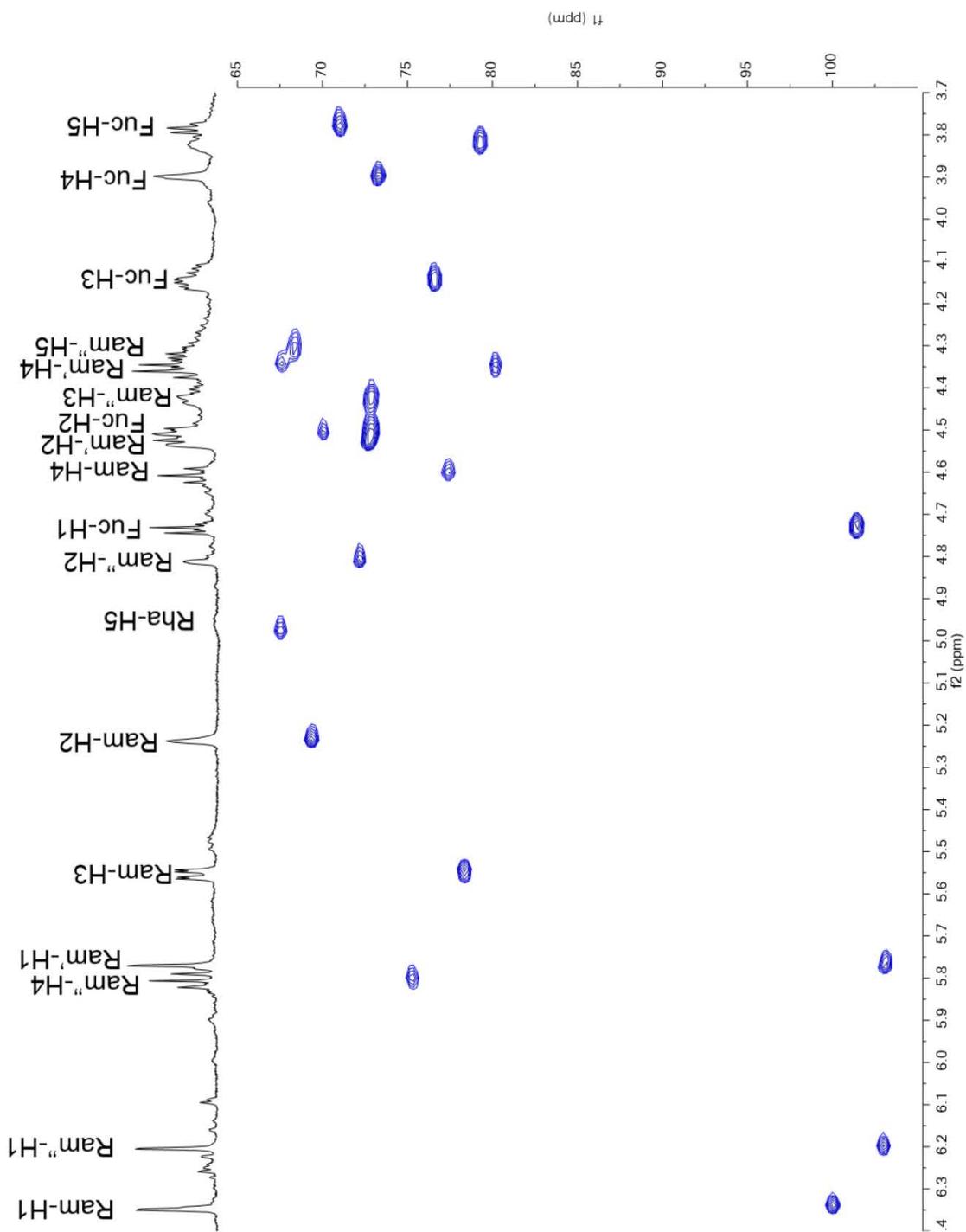
# Espectro COSY



# Espectro TOCSY



# Espectro HSQC



# Espectro HMBC

