



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

Caracterización estructural de las resinas glicosídicas de *Operculina hamiltonii* y su efecto sinérgico con vinblastina en células cancerosas humanas

**TESIS**

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. Armando Moreno Velasco

Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda  
Facultad de Química

Ciudad de México, Mayo 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO.**

<b>Presidente</b>	Dra. Martha Lydia Macías Rubalcava
<b>Vocal</b>	Dr. Alexandre Toshirrico Cardoso Taketa
<b>Vocal</b>	Dr. José Alberto Rivera Chávez
<b>Vocal</b>	Dr. Francisco Elihu Bautista Redonda
<b>Secretario</b>	Dra. Berenice Ovalle Magallanes

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

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

## **Agradecimientos**

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación y la beca otorgada (Número de CVU: 848192) durante el periodo de febrero 2019/enero 2023.

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

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

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

A la Dra. Mabel Fragoso Serrano por la paciencia y la realización de las pruebas biológicas que sin duda son parte fundamental del presente trabajo de investigación.

A los miembros del jurado por las observaciones y el valioso tiempo invertido en los comentarios y críticas para enriquecer el presente trabajo.



Los resultados de este trabajo se publicaron parcialmente en:

Moreno-Velasco, A; Flores-Tafoya, P.J; Fragoso-Serrano, M.; Leitão, S.G; Pereda-Miranda, R. (2022) Resin Glycosides from *Operculina hamiltonii* and their synergism with vinblastine in cancer cells. *Journal of Natural Products* 85:2385-2394.



[pubs.acs.org/jnp](https://pubs.acs.org/jnp)

Article

## Resin Glycosides from *Operculina hamiltonii* and Their Synergism with Vinblastine in Cancer Cells

Armando Moreno-Velasco, Pedro de Jesús Flores-Tafoya, Mabel Fragoso-Serrano, Suzana Guimarães Leitão, and Rogelio Pereda-Miranda\*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00594>



Read Online

y se presentaron en:

**American Society of Pharmacognosy Annual Meeting, July 23 - July 28. 2022  
Charleston Area Convention Center, Charleston, South Carolina, United States.**

## ABSTRACT

*Operculina hamiltonii* is a vine native to the north and northeast region of Brazil, where its roots are traded as a depurative and laxative remedy with the name of Brazilian jalap in traditional medicine. Procedures for the isolation, purification by recycling HPLC, and structure elucidation of six undescribed resin glycosides are presented herein. Two acyclic pentasaccharides of (11*S*)-hydroxyhexadecanoic acid, named hamiltoniosides I and II, were isolated. The pentasaccharide core in these compounds is esterified by one unit of *n*-decanoic or *n*-dodecanoic acid. Additionally, four structural related tetrasaccharide macrolactones were also isolated. The hamiltonins II-IV demonstrated a structural isomeric relation as one residue of acid *n*-dodecanoic esterifies the tetrasaccharide core on a different position in each compound. Hamiltonin V was characterized as a dimeric structure of hamiltonin II and hamiltonin III, as the monomeric units. All the isolated compounds were found to be inactive as cytotoxic agents. However, when they were evaluated (1-25  $\mu\text{M}$ ) in combination with a sublethal concentration of the anticancer agent vinblastine (0.003  $\mu\text{M}$ ), a significant enhancement of the resultant cytotoxicity was produced, mainly multidrug-resistant breast carcinoma epithelial cells MCF-7. Such combined synergistic effect may be beneficial for chemotherapy, making resin glycosides potential candidates for drug repurposing of conventional chemotherapeutic drugs to reduce their side effects.

## RESUMEN

*Operculina hamiltonii* es una planta nativa del norte y el noreste de Brasil, donde sus raíces son comercializadas como remedios depurativos y laxantes bajo el nombre de jalapa brasileña. En el presente trabajo se describen los métodos de aislamiento, purificación con reciclaje en HPLC, y elucidación estructural de seis resinas glicosídicas sin descripción previa. Se aislaron dos compuestos acíclicos en forma de ésteres metílicos, nombrados como hamiltoniósido I y II, los cuales constan de un núcleo oligosacárido compuesto por una fucosa, tres ramnosas y una glucosa. La diferencia estructural entre este par de compuestos radica en el residuo esterificante del núcleo oligosacárido: el ácido *n*-dodecanoico para el hamiltoniósido I y el ácido *n*-decanoico para el hamiltoniósido II. Asimismo, se aislaron cuatro resinas glicosídicas novedosas, las hamiltoninas II-IV que corresponden a isómeros estructurales difiriendo en la posición de esterificación del residuo del ácido *n*-dodecanoico sobre el núcleo tetrasacárido compuesto por una fucosa y tres ramnosas. Por último, se elucidó la estructura de un dímero producto de la condensación de las hamiltoninas II y III. Se comprobó que todos los compuestos aislados son inactivos como agentes citotóxicos. Sin embargo, cuando fueron evaluados (1-25  $\mu\text{M}$ ) en combinación con una concentración subletal del agente anticancerígeno vinblastina (0.003  $\mu\text{M}$ ), se produjo un incremento significativo en la citotoxicidad, especialmente para las células resistente del carcinoma de mama MCF-7. Tal efecto sinérgico puede ser benéfico en la quimioterapia, haciendo a las resinas glicosídicas candidatas potenciales para su uso en terapias combinatorias con los agentes terapéuticos ya aprobados y reducir sus efectos secundarios.

## Índice

I. Lista de figuras.....	1
II. Lista de cuadros.....	4
III. Lista de abreviaturas.....	5
1. Introducción.....	7
2. Antecedentes .....	9
2.1 Familia Convolvulaceae .....	9
2.2. Las convolvuláceas purgantes .....	10
2.3 El género <i>Operculina</i> y las jalapas brasileñas .....	14
2.3.1 Jalapa de flores blancas: <i>Operculina macrocarpa</i> .....	18
2.3.2 Jalapa de flores amarillas: <i>Operculin hamiltonii</i> .....	18
2.3.3 Preparados fitoterapéuticos.....	20
2.4. Resinas glicosídicas .....	22
2.4.1 Naturaleza química .....	22
2.4.2 Métodos de purificación.....	25
2.4.3 Elucidación estructural .....	30
2.4.4 Diversidad estructural.....	31
2.4.5 Resinas glicosídicas de <i>Operculina</i> .....	36
2.5 Importancia biológica .....	44
2.5.1 Efecto modulador sobre la MDR .....	45
3. Justificación .....	48
4. Hipótesis.....	48
5. Objetivos. ....	49
5.1 Objetivo general .....	49
5.2 Objetivos específicos .....	49
6. Metodología experimental.....	50
6.1 Métodos cromatográficos .....	50
6.2 Material vegetal.....	50
6.3 Preparación del extracto orgánico.....	51
6.4 Fraccionamiento primario de los extractos .....	52
6.5 Separación, purificación y caracterización de las resinas glicosídicas.....	53
6.5.1 Obtención de los perfiles cromatográficos a escala analítica y extrapolación a escala preparativa .....	53
6.5.2 Determinación de constantes físicas y propiedades espectroscópicas....	53
6.6 Evaluación biológica de las resinas glicosídicas.....	53
7. Resultados y discusión .....	56
7.1 Preparación del extracto orgánico.....	56
7.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico .....	56
7.3 Obtención de los perfiles cromatográficos a escala analítica y preparativa.	61
7.4 Purificación de las resinas glicosídicas .....	64
7.5 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas .....	69

7.5.1 Caracterización de los núcleos oligosacáridos .....	69
7.5.2 Caracterización de los compuestos individuales .....	70
7.6 Pruebas biológicas de las resinas glicosídicas .....	98
7.6.1 Pruebas de citotoxicidad .....	98
7.6.2 Pruebas de sinergismo con vinblastina.....	99
8. Conclusiones.....	103
9. Bibliografía .....	105
10. Anexos.....	113
11. Artículo.....	149

## I. Lista de Figuras

<b>Figura 1.</b> La glicoproteína-P .....	7
<b>Figura 2.</b> Elementos morfológicos de la familia Convolvulaceae .....	9
<b>Figura 3.</b> Escultura azteca de Xochipilli.....	10
<b>Figura 4.</b> Algunas de las especies pertenecientes a la raíz de jalapa .....	11
<b>Figura 5.</b> Folio 32 del manuscrito De la Cruz Badiano .....	13
<b>Figura 6.</b> Principales características morfológicas del fruto de <i>Operculina</i> .....	15
<b>Figura 7.</b> Corolas infundibuliformes o acampanuladas de las flores de las especies de <i>Operculina</i> .....	16
<b>Figura 8.</b> Distribución del complejo brasileño de plantas medicinales conocido como la raíz de jalapa .....	17
<b>Figura 9.</b> Principales características morfológicas de <i>Operculina hamiltonii</i> .....	20
<b>Figura 10.</b> Raíz de jalapa brasileña y sus productos herbolarios .....	21
<b>Figura 11.</b> Ejemplos representativos de los glicolípidos de especies vegetales .....	23
<b>Figura 12.</b> Diversidad estructural de las resinas glicosídicas de <i>Ipomoea purga</i> .....	24
<b>Figura 13.</b> Estructura química de las orizabinas I-IV.....	26
<b>Figura 14.</b> Separación de productos naturales mediante reciclaje en HPLC .....	27
<b>Figura 15.</b> Comparación de los sistemas de HPLC preparativos equipados con una columna de fase estacionaria uniforme de tamaños de partículas pequeñas de 5 a 20 $\mu\text{m}$ .....	28
<b>Figura 16.</b> Purificación mediante HPLC en fase reversa (C-18) de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas glicosídicas de la batatilla roja .....	30
<b>Figura 17.</b> Estructura macrocíclica de las woodrosinas I y II de <i>Ipomoea tuberosa</i> .....	31
<b>Figura 18.</b> Estructuras de las agliconas descritas en las resinas glicosídicas .....	32
<b>Figura 19.</b> Establecimiento de la configuración para el ácido 8 <i>R</i> -hidroxidodecanoico esterificante de la murocoidina X .....	33
<b>Figura 20.</b> Estructuras de los grupos acilantes descritos en las resinas glicosídicas ....	34
<b>Figura 21.</b> Ácido exogónico, un componente de la resina de la jalapa brasileña que también esterifica a sus oligosacáridos, existe como un equilibrio epimérico de cuatro estereoisómeros .....	35
<b>Figura 22.</b> Estructuras de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas glicosídicas de la jalapa brasileña de flores blancas .....	36

<b>Figura 23.</b> Resinas glicosídicas macrocílicas purificadas de <i>Operculina macrocarpa</i> ..	37
<b>Figura 24.</b> Resinas glicosídicas aisladas de <i>O. macrocarpa</i> .....	38
<b>Figura 25.</b> Estructuras del ácido operculínico H y sus derivados esterificados .....	39
<b>Figura 26.</b> Estructuras de los ácidos operculínicos I-J de <i>O. macrocarpa</i> .....	40
<b>Figura 27.</b> Estructuras de los ácidos turpéticos A-C .....	41
<b>Figura 28.</b> Resinas glicosídicas de <i>Operculina turpethum</i> .....	42
<b>Figura 29.</b> Resolución mediante HPLC de las resinas glicosídicas derivatizadas de <i>Operculina hamiltonii</i> .....	43
<b>Figura 30.</b> Núcleos oligosacáridos minoritarios constitutivos de las resinas glicosídicas de la jalapa brasileña.....	44
<b>Figura 31.</b> Esquema general de los transportadores ABC y las distintas conformaciones que ocurren durante la extrusión de fármacos fuera del citoplasma celular .....	46
<b>Figura 32.</b> Muestra comercial de raíces pulverizadas de la jalapa brasileña, batata de purga o jalapa en polvo. Producto adquirido vía internet en el sitio de la tienda de alimentos naturales Mercadão Natural, São Paulo, SP, Brasil.....	51
<b>Figura 33.</b> CCF del fraccionamiento primario del extracto orgánico. Carriles: T = tricolorina A, control de polaridad; 1-8 = fracciones F1-F8 generadas durante el fraccionamiento.	57
<b>Figura 34.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la fracción F4 rica en resinas glicosídicas .....	57
<b>Figura 35.</b> CCF del fraccionamiento primario del extracto orgánico. Carriles: T = tricolorina A, control de polaridad; 1-7 = fracciones F1-F7 generadas durante el fraccionamiento	58
<b>Figura 36.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la fracción F6 rica en resinas glicosídicas .....	58
<b>Figura 37.</b> CCF del fraccionamiento primario del extracto orgánico.....	59
<b>Figura 38.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la fracción F6, rica en resinas glicosídicas .....	59
<b>Figura 39.</b> CCF del fraccionamiento primario de la fracción soluble en CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> . .....	60
<b>Figura 40.</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la fracción F9 .....	60
<b>Figura 41.</b> Perfil cromatográfico a escala preparativa de la fracción F4, donde se muestran los picos aislados mediante la técnica “corte de núcleo” .....	61
<b>Figura 42.</b> Perfil cromatográfico en fase preparativa de la fracción F9 .....	63
<b>Figura 43.</b> Macrolactonas pentasacáridas purificadas de la raíz de jalapa .....	64
<b>Figura 44.</b> Hamiltonina I (JF3P9) .....	65

<b>Figura 45.</b> Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave JF4P5, mediante las técnicas de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico” .....	66
<b>Figura 46.</b> Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave JF4P9, mediante las técnicas de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico” .....	67
<b>Figura 47.</b> Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave BPF9P8, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico” .....	68
<b>Figura 48.</b> Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave BPF9P10, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico” .....	68
<b>Figura 49.</b> Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave F9P11, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico” .....	69
<b>Figura 50.</b> Comparación entre los espectros de RMN <sup>1</sup> H de los compuestos F4P5 (trazo superior) y F4P9 (trazo inferior).....	70
<b>Figura 51.</b> Espectro de alta resolución en modo positivo generado mediante ESI por el hamiltoniósido I (F4P5) mostrando la distribución isotópica y las abundancias relativas para el conjunto isotópico del ión aducto con sodio [C <sub>57</sub> H <sub>10</sub> 2O <sub>25</sub> Na] <sup>+</sup> .....	72
<b>Figura 52.</b> Espectro de alta resolución en modo positivo generado mediante ESI por el hamiltoniósido II (F4P9) mostrando la distribución isotópica y las abundancias relativas para el conjunto isotópico del ión aducto con sodio [C <sub>59</sub> H <sub>106</sub> O <sub>25</sub> Na] <sup>+</sup> .....	73
<b>Figura 53.</b> Comparación de los espectros de RMN <sup>13</sup> C en piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> en la región correspondiente a los desplazamientos químicos para la aglicona (δ 15-36) de JF4P7 (batatinósido IX; A), JF4P9 (hamiltoniósido I; B) y de JF4P5 (hamiltoniósido II, C)...	74
<b>Figura 54.</b> Comparativo entre espectros de RMN <sup>13</sup> C del ácido operculínico A (trazo superior en rojo) y del compuesto F4P7 intacto (trazo inferior en negro) .....	76
<b>Figura 55.</b> Espectro heteronuclear 1H ( <sup>2,3</sup> J <sub>CH</sub> ) (HMBC) del hamiltoniósido I (F4P9) con alta resolución 1D <sup>1</sup> H (700 MHz) y <sup>13</sup> C (175 MHz) proyecciones en piridina- <i>d</i> <sub>5</sub> .....	77
<b>Figura 56.</b> Estructura química del compuesto F4P9 (hamiltoniósido I) .....	78
<b>Figura 57.</b> Estructura química del compuesto F4P5 (hamiltoniósido II).....	79
<b>Figura 58.</b> Comparación entre los espectros de RMN <sup>1</sup> H de los compuestos BPF9P10 (negro), BPF9P828 (rojo), BPF9P816 (azul) y BPF9P11 (verde).....	81
<b>Figura 59.</b> Comparación entre los espectros de RMN <sup>13</sup> C de los compuestos BPF9P10 (negro), BPF9P828 (rojo), BPF9P816 (azul) y BPF9P11 (verde).....	82



<b>Figura 60.</b> Espectro de EM-ESI en modo positivo de BPF9P811 .....	85
<b>Figura 61.</b> Espectro COSY del compuesto BPF9P10 .....	86
<b>Figura 62.</b> Espectro TOCSY de la región oligosacárida del compuesto BPF9P10 .....	87
<b>Figura 63.</b> Espectro HSQC de la región oligosacárida del compuesto BPF9P10 .....	88
<b>Figura 64.</b> Espectro HMBC de la porción oligosacárida del compuesto BPF9P10 donde se indica la secuencia de glicosilación.....	89
<b>Figura 65.</b> Estructura del compuesto BPF9P816 (hamiltonina II) .....	90
<b>Figura 66.</b> Estructura del compuesto BPF9P828 (hamiltonina III) .....	92
<b>Figura 67.</b> Estructura del compuesto BPF9P10 (hamiltonina IV).....	94
<b>Figura 68.</b> Estructura del compuesto BPF9P11 (hamiltonina V).....	96
<b>Figura 69.</b> Gráfico de la inhibición del crecimiento de la línea celular multirresistente MCF-7/Vin.....	99
<b>Figura 70.</b> Visualización microscópica de la línea celular resistente MCF-7/Vin después de 48 horas de ensayo .....	101
<b>Figura 71.</b> Estructuras de las ipomoeasinas A-F y datos de citotoxicidad (CI <sub>50</sub> ) contra la línea celular de cáncer de ovario humano (A2780).....	102

## II. Lista de cuadros.

<b>Cuadro 1</b> Lista de sinonimias para <i>O. macrocarpa</i> (Staples, 2020) .....	19
<b>Cuadro 2</b> Lista de sinonimias de <i>O. hamiltonii</i> (Staples, 2020) .....	20
<b>Cuadro 3</b> Muestras analizadas .....	51
<b>Cuadro 4</b> Fases móviles usadas en los fraccionamientos primarios.....	53
<b>Cuadro 5</b> Rendimientos del fraccionamiento primario de todas las muestras .....	57
<b>Cuadro 6</b> Rendimientos del fraccionamiento de JF4 .....	63
<b>Cuadro 7</b> Rendimiento del fraccionamiento de la fracción JF9 .....	64
<b>Cuadro 8</b> Rendimientos del reciclaje en HPLC y constantes físicas .....	67
<b>Cuadro 9</b> Rendimientos del reciclaje en HPLC y constantes físicas .....	68
<b>Cuadro 10</b> Especies iónicas detectadas y fórmulas moleculares calculadas para F4P5 y F4P9 mediante ESI-MS. ....	72
<b>Cuadro 11</b> Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) de los compuestos F4P5 y F4P9 .....	81
<b>Cuadro 12</b> Especies iónicas detectadas y fórmulas moleculares calculadas para los compuestos aislados de batata de purga mediante ESI .....	85
<b>Cuadro 13</b> Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) de la hamiltonina II (BPF9P816) ( $\delta_H$ en ppm, multiplicidades, <i>J</i> en Hz). ....	92
<b>Cuadro 14</b> Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) de la hamiltonina III (BPF9P828) ( $\delta_H$ en ppm, multiplicidades, <i>J</i> en Hz). ....	94
<b>Cuadro 15</b> Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) de la hamiltonina IV (BPF9P10) ( $\delta_H$ en ppm, multiplicidades, <i>J</i> en Hz). ....	96
<b>Cuadro 16</b> Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup> H y <sup>13</sup> C) de la hamiltonina V (BPF9P11). ( $\delta_H$ en ppm, multiplicidades, <i>J</i> en Hz) .....	98
<b>Cuadro 17</b> Citotoxicidad de las resinas glicosídicas.....	99
<b>Cuadro 18</b> Ensayo de sinergismo de la vinblastina con las resinas glicosídicas sin actividad citotóxica intrínseca.....	101

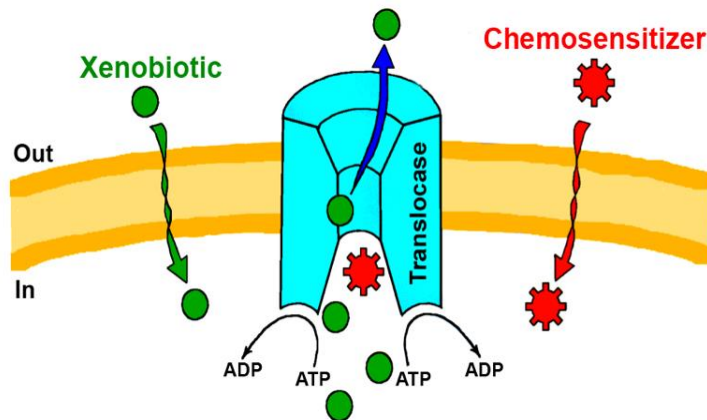
### III. Lista de abreviaturas.

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

<b>piridina-<i>d</i><sub>5</sub></b>	Piridina deuterada
<b>Rha</b>	Ramnosa
<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	Resonancia magnética nuclear de carbono 13
<b>RMN <sup>1</sup>H</b>	Resonancia magnética nuclear protónica
<b>t</b>	Triplete
<b>TMS</b>	Tetrametilsilano
<b>TOCSY</b>	Espectroscopía de correlación homonuclear total
<b>t<sub>R</sub></b>	Tiempo de retención
<b>uma</b>	Unidad de masa atómica
<b>[M + H]<sup>+</sup></b>	Catión de la molécula protonada
<b>[M - H]<sup>-</sup></b>	Anión de la molécula desprotonada
<b>δ</b>	Desplazamiento químico

## 1. INTRODUCCIÓN

Las resinas glicosídicas de la familia de las convolvuláceas son glicolípidos anfipáticos, también conocidos como azúcares acilados o glicolípidos, conformados por un núcleo oligosacárido, una macrolactona y residuos volátiles esterificando al núcleo oligosacárido (Pereda-Miranda, 2010) que han demostrado ser moduladores de las bombas de eflujo relacionadas con el fenotipo de la resistencia múltiple a fármacos (MDR) en células procariontas (Pereda-Miranda et al., 2006) y eucariotas (Figuroa-González et al., 2012). La MDR, que puede ser intrínseca o adquirida, es una de las principales defensas a vencer de las células neoplásicas para el tratamiento satisfactorio con la quimioterapia. La MDR no es un fenómeno restringido a un sólo tipo de células y aproximadamente el 40% de los carcinomas que ocurren en los humanos desarrollan resistencia a los agentes quimioterapéuticos (Emran et al., 2022). Una alternativa que ha sido empleada para revertir la MDR en células cancerígenas es el uso de moduladores de los sistemas transportadores, e.g., la glicoproteína-P en células de mamíferos y noradrenalina-A en microorganismos los cuales se unen a estas proteínas, modificando su conformación tridimensional activa y provocando la inhibición de la extrusión de los xenobióticos fuera del citoplasma celular (Lira-Ricárdez & Pereda-Miranda, 2020) (Fig. 1).



**Figura 1.** La glicoproteína-P, una proteína de eflujo localizada en la membrana celular dependiente de ATP, es una translocasa que tiene una distribución tisular amplia en el cuerpo humano. La expresión de la Gp-P conduce a una disminución de la acumulación intracelular de numerosos agentes quimioterapéuticos. Eventualmente, la efectividad de estos medicamentos disminuye, así como la toxicidad de cualquier otro xenobiótico. Los inhibidores o moduladores del transportador ABC, también conocidos como quimiosensibilizadores, se pueden usar en combinación con medicamentos quimioterapéuticos. Imagen tomada de: (Lira-Ricárdez & Pereda-Miranda, 2020)

Un grupo de moduladores que ha sido estudiado en años recientes son los fitofármacos, moléculas aisladas a partir de extractos naturales con resultados alentadores para inhibir la acción de la Gp-P y entre los que destacan diversos polifenoles de naturaleza flavonoide, fenilpropanoides de tipo lignano, entre otros. Dentro de este contexto de investigación, se exploró el efecto modulador de treinta y cinco oligosacáridos de las convolvuláceas sobre la Gp-P en la línea celular multirresistente a agentes antineoplásicos (vinblastina, podofilotoxina y adriamicina, entre otros) derivada del carcinoma de mama humano (MCF-7/Vin) (Figueroa-González et al., 2011). Todos los glicolípidos evaluados mostraron una modulación de la susceptibilidad a la vinblastina de 1 a >1500 veces en un rango de concentraciones de 1 a 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y permitió la selección de cuatro compuestos para determinar mediante experimentos de captación, acumulación intracelular y eflujo de rodamina 123 que las resinas glicosídicas son un sustrato de Gp-P; así, la mururoidina V (Figueroa-González, et al., 2011), la purgina II (Castañeda-Gómez, et al., 2013), el jalapínosido A (Bautista, Fragoso-Serrano, et al., 2014) y el albinósido III (Cruz-Morales, et al., 2016) resultaron potentes agentes de reversión en ensayos *in vitro*. La disminución en la expresión de la Gp-P mediada por la mururoidina V y la purgina II se detectó por inmunofluorescencia y medida por citometría de flujo después de incubar los compuestos de prueba con un anticuerpo monoclonal anti Gp-P. Se demostró mediante estos experimentos que las resinas glicosídicas son un sustrato de las bombas de extrusión en células de mamíferos (Lira-Ricárdez & Pereda-Miranda, 2020).

Por lo tanto, las resinas glicosídicas pueden utilizarse para el diseño de fármacos novedosos que en las terapias combinatorias sean capaces de inhibir la actividad de la Gp-P para revertir el fenotipo de la resistencia a fármacos antitumorales y, en consecuencia, potenciar la actividad de los agentes antineoplásicos comerciales (Pagadala, et al., 2017). Su desarrollo como potentes inhibidores de la Gp-P con una baja citotoxicidad, es una alternativa para superar la interferencia indeseable de esta familia de Gp-Ps presente en las células de mamíferos y que se expresa en las células malignas bajo exposición a las quimioterapias.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Familia Convolvulaceae

La familia Convolvulaceae es una familia bastante diversa que comprende plantas trepadoras, hierbas y arbustos (raramente arbóreos) perteneciente al orden Solanales. Esta familia incluye 59 géneros y aproximadamente 1,900 especies, distribuidas en todo el mundo, especialmente en regiones templadas y tropicales (Simoes & Staples, 2017). El nombre de esta familia deriva del latín *convolvere* que significa entrelazado y hace referencia a su forma de crecimiento característico de las plantas trepadoras, en donde sus tallos volubles se entrelazan en torno a un soporte (Pereda & Bah, 2003; Pereda-Miranda et al., 2010).

Las especies de esta familia son generalmente herbáceas con tallos con frecuencia volubles con un crecimiento de lianas o enredaderas sus hojas son simples sin estípulas, poseen flores cuyos pétalos se encuentran soldados en una corola tubulosa o embudada y cáliz con cinco sépalos libres. El androceo está constituido por cinco estambres soldados al tubo de la corola. Su fruto casi siempre forma una cápsula (**Figura 2**) (Staples & Brummitt, 2007).



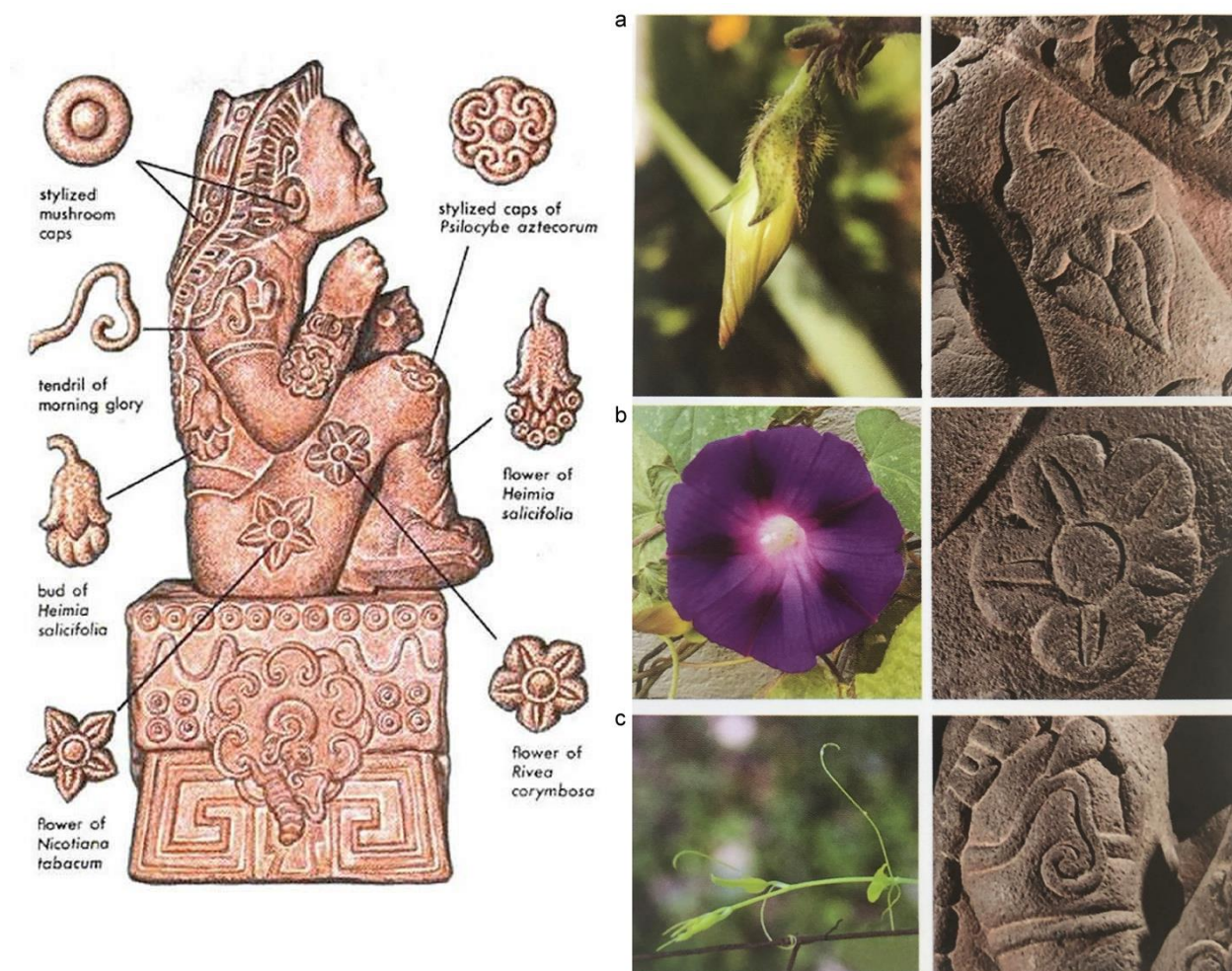
**Figura 2.** Elementos morfológicos característicos de la familia de las convolvuláceas. Flores con una corola acampanada, hojas simples y guías o tallos volubles propios de una enredadera. Imagen tomada de: (Staples & Brummitt, 2007).

La clasificación actual establecida para la familia Convolvulaceae (Staples & Brummitt, 2007; Stevens, 2001) se basa en un análisis filogenético molecular basado en códigos de barras de DNA para marcadores de genes de cuatro regiones de cloroplastos: *rbcL*, *atpB*, *psbE-J* operon, y *trnL-trnF* intron/espaciador. Este análisis permitió el reconocimiento de 23 tribus que también se caracterizaron desde el punto de vista morfológico (Stefanovic et al., 2002).



## 2.2 Las convolvuláceas purgantes

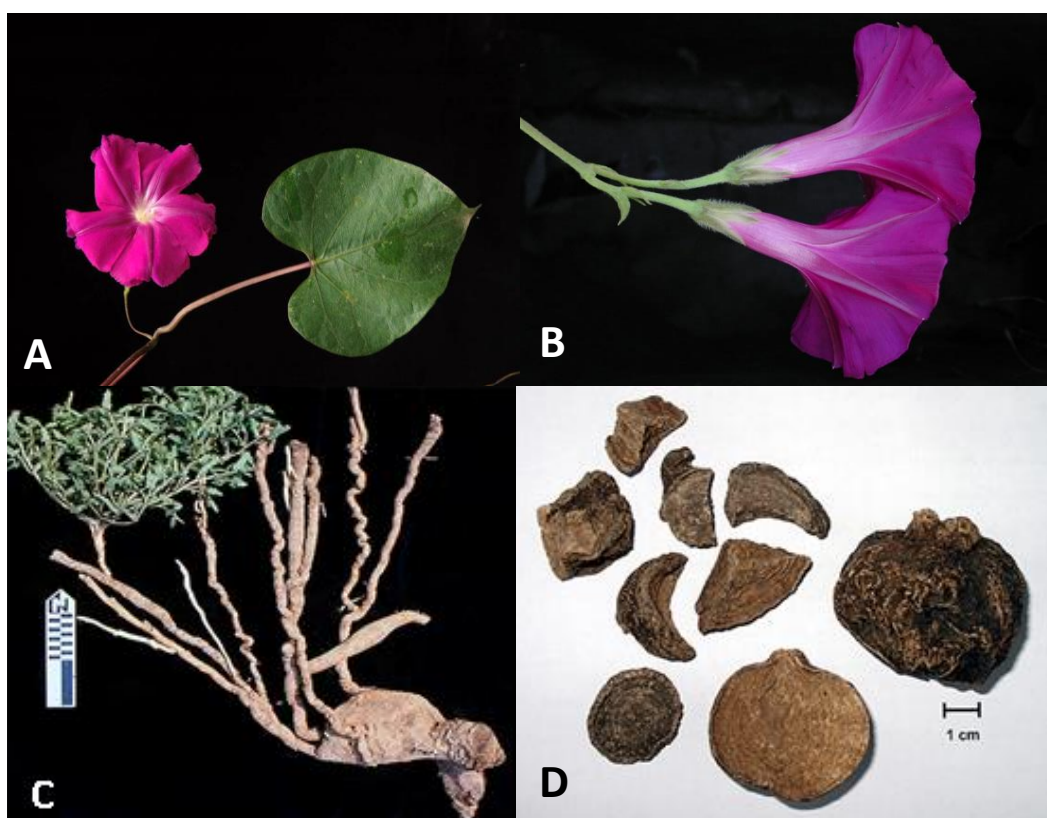
El uso de las especies representativas de la familia Convolvulaceae, endémicas de la región mesoamericana están relacionadas íntimamente con el desarrollo cultural y etnomédico de sus culturas nativas. Tal es el caso del *ololiuhqui* (*Rivea corymbosa* L. e *Ipomoea tricolor* Cav.), nombre náhuatl de las semillas de estas convolvuláceas, las cuales fueron utilizadas desde tiempos prehispánicos por los aztecas y otras tribus de la región por sus propiedades psicotrópicas y curativas (**Figura 3**) (Hoffman, 1971).



**Figura 3.** Escultura azteca de Xochipilli, príncipe de las flores, hecha en piedra volcánica y procedente de Tlalmanalco, en el Estado de México. Se representa al Dios sentado sobre un brasero con plantas psicotrópicas como el tabaco (*Nicotiana tabacum*) y los hongos (*Psilocybe aztecorum*). Se identificaron claramente el botón (a), la flor abierta (b) y las guías del *ololiuhqui* (c), especie de la familia Convolvulaceae. Así, se piensa que la expresión facial de la deidad representada en esta escultura corresponde a un estado de éxtasis, mismo que está relacionado con el consumo de enteógenos. Fotografías reproducidas de Montúfar López 2018.



En Mesoamérica, los remedios purgantes o laxantes, conocidos por los aztecas como *cacamotoili tlanquiloni*, consisten en diversas especies de raíces tuberosas, las cuales varían en características morfológicas, hábitat y potencia de sus efectos. Actualmente, las investigaciones botánicas han identificado a estas raíces como especies pertenecientes al género *Ipomoea* y conforman el complejo de plantas medicinales conocido en la actualidad como la raíz de jalapa. Este conjunto de fármacos crudos es taxonómicamente diferente a nivel especie, pero comparten: (a) una o varias características morfológicas distintivas como la raíz engrosada y las flores en forma de embudos; (b) el nombre común de jalapas; (c) algunas características organolépticas como el sabor acre de las raíces; y (d) la aplicación terapéutica como agente purgante. Desde el punto de vista taxonómico, estas especies fueron caracterizadas como *I. purga* (la raíz de la jalapa), *I. orizabensis* (falsa jalapa o escamonea mexicana) e *I. stans* (la raíz de la tumbavaqueros), (**Figura 4**) entre otras que son menos usadas (Pereda Miranda et al., 2006).



**Figura 4.** Algunas de las especies pertenecientes al complejo medicinal comercializado como la raíz de jalapa: A) flor y hoja de *I. purga*; B) flores de *I. orizabensis*; C) tallos, hojas y raíz de *I. stans*; y D) drogacruda de la jalapa oficial (*I. purga*). Imagen tomada de: (Pereda-Miranda et al., 2006)

Este grupo de plantas medicinales llamó la atención de los colonizadores españoles, debido a que sus propiedades purgantes eran importantes en la medicina europea galénica del siglo XVI y fueron aceptadas como sustituto de la raíz de escamonea (*Convolvulus scammonia* L.), que se utilizó desde tiempos precristianos en todo el imperio romano. La “raíz de Michoacán”, *I. jalapa* (L.) Pursh, también conocida por los herbolarios europeos como ruibarbo de las Indias, fue otra especie de importancia en el uso terapéutico de las jalapas comercializadas en Europa. “La Historia medicinal de las cosas que se traen de nuestras Indias Occidentales” escrita por Nicolás Monardes, publicada entre 1564 y 1574, describe los medicamentos herbolarios americanos para explorar sus propiedades farmacológicas, aprovechando que Sevilla era el puerto de entrada al Viejo Mundo de mercancías traídas de las Antillas, que salían del puerto de la Villa Rica de Vera Cruz, en la costa del golfo de México. Por ello, Monardes cultivó en su jardín plantas americanas y describió por primera vez muchas especies como la jalapa, el maíz, el camote y el tabaco, entre otras. Su contribución fue muy relevante para facilitar la introducción de las raíces de jalapa en Europa y, de esta manera, favoreció la aprobación de los congéneres purgantes y depurativos mexicanos en las prácticas de la medicina humoral y la farmacia galénica de los imperios coloniales de España y Portugal en el siglo XVI. Un magnífico ejemplo de la propagación de estas especies mexicanas fuera de la Península Ibérica es el tratado del naturalista inglés John Gerard, "Great Herball or Generall Historie of Plantes" (titulado "Great Herball or Generall Historie of Plantes", el libro botánico más influyente en inglés en el siglo XVII y hasta principios del siglo XX, donde una ilustración de la raíz de "Michoacán", que debido a la ligereza de sus efectos se hizo popular en la medicina como sustituto del Nuevo Mundo para la drástica raíz de escamomea (Pereda-Miranda, 2021).

Hasta finales del siglo XX, la jalapa (*I. purga*) había sido una fuente de ingresos para la región del Xico, Veracruz (Linajes et al., 1994). La demanda se ha visto disminuida debido a la obtención de purgantes de diversas fuentes vegetales y comercializadas por distribuidores alemanes de plantas medicinales (por ejemplo, Müggenburg Group), entre las que destacan la jalapa brasileña (*Operculina hamiltonii* (G.Don) D.F Austin & Staples (Lira-Ricárdez et al., 2019) y la jalapa de la india (*Operculina turpethum* (L.) Silva Manso) (Ding et al., 2012). La raíz de jalapa (*I. purga*) se identificó como la droga cruda auténtica de mayor utilidad en el mundo prehispánico y que hasta la fecha se ha comercializado ampliamente. Cabe señalar

que esta planta se encuentra ilustrada en el Códice de la Cruz-Badiano que se considera como el texto más antiguo de medicina escrito en América en el siglo XVI. La jalapa era prescrita como un remedio purgante por los sanadores aztecas (Miranda & Valdés, 1964). La ilustración muestra a una hierba trepadora con una raíz tuberosa, hojas ovaladas y acorazonadas y flores rosa-purpúrea como embudos (**Figura 5**). En la actualidad, continúa el uso que se describe en el códice como una purga para el vientre (*purgatio ventris*). También, se emplea para el tratamiento de las lombrices intestinales, la meningitis, así como las manchas en la piel (Bye & Linares, 2013).



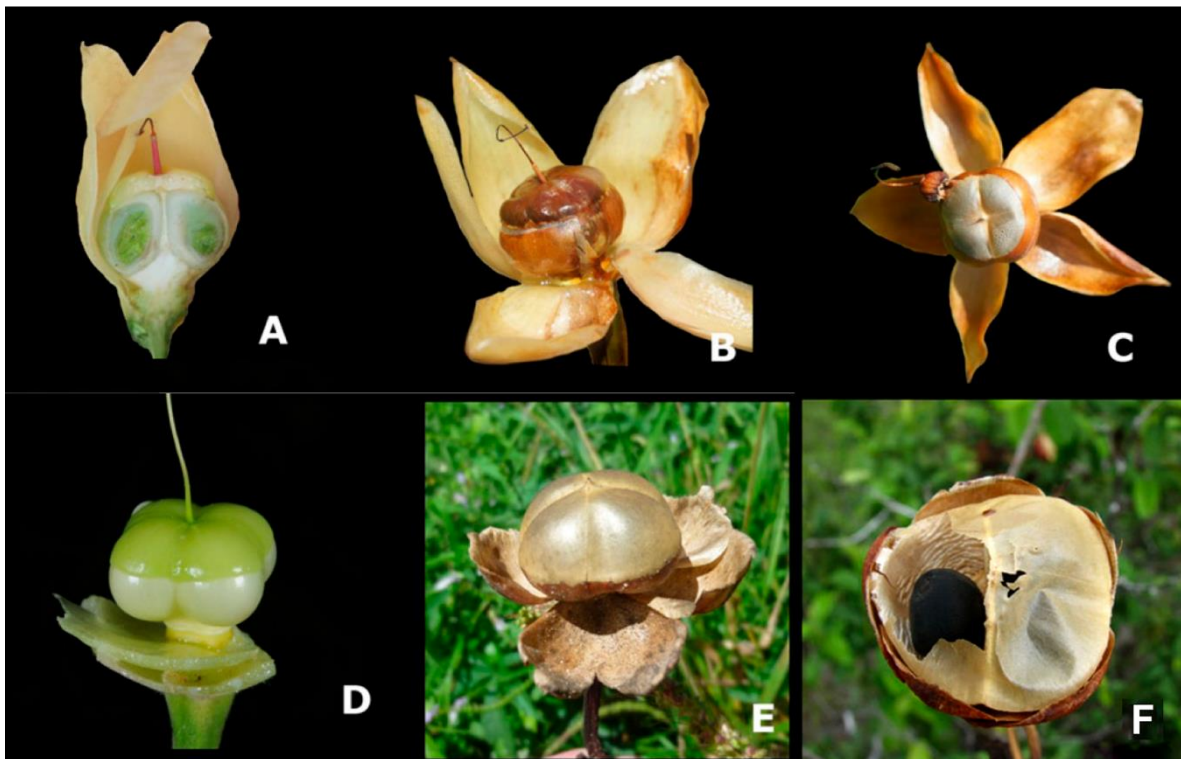
**Figura 5.** Folio 32 *rectus* del manuscrito De la Cruz-Badiano (1552 herbario Azteca). Ilustración de la raíz de jalapa (*I. purga*) ingrediente principal del remedio purgante prehispánico conocido como “cacamotli tlanoquinoli”. La descripción de la *huelicpahñtli* (medicina sabrosa) indica que se trata de un remedio herbolario con una acción purgante para el vientre (*purgatio ventris*) y que la poción se prepara en agua caliente con la raíz molida.

### 2.3 El género *Operculina* y las jalapas brasileñas

El desarrollo taxonómico de *Operculina* como un género abarcó la evolución de conceptos y prácticas morfológicas en la tarea de clasificar a la compleja y diversa familia de las Convolvulaceae; dos especies ahora pertenecientes al género *Operculina* fueron nombradas originalmente por Carlos Linneo (1753) como *Convolvulus turpethum* L. y *C. macrocarpus* L. Durante los siguientes 80 años, éstas y otras especies fueron descritas dentro de los géneros *Convolvulus* L. o *Ipomoea* L. Sin embargo, en un tratado decimonónico acerca de las plantas medicinales de Brasil, António Luiz Patricio da Silva Manso (1788-1848) propone por primera vez la creación de un nuevo género para *C. turpethum* debido a que esta especie presenta un tipo de fruto que este botánico brasileño describió (1836) como la transición entre una cápsula (un tipo de fruto seco dehiscente, es decir, que se abre al madurar para liberar las semillas) y una drupa (fruto carnoso, dehiscente, con el endocarpo leñoso, el cual encierra una sola semilla). A esta estructura característica la describió con el nombre de “opérculo” (parte superior del fruto que se desprende en un sólo bloque dejando al descubierto la sección inferior o urna que contiene las semillas), que dio origen al nombre del género *Operculina* (Staples et al., 2020).

Hasta hace poco tiempo, los taxónomos clasificaban al género *Operculina* como parte de la tribu Merremieae, sin embargo la falta de evidencias morfológicas y los descubrimientos en estudios filogenéticos moleculares recientes permitieron abandonar el rango de “Merremieae” (*incertae sedis*) como una tribú monofilética de las Convolvulaceae y en su lugar los géneros que la constituían fueron nuevamente reclasificados. De este modo, se reconoció a *Operculina* como un género monofilético describiendo como su principal característica el fruto operculado dehiscente, como bien señaló Silva Manso en el siglo XIX. Las especies constitutivas se encontraban dispersas entre los géneros *Ipomoea* y *Merremia* (Simões & Staples, 2017). El género incluye 14 especies distribuidas en los trópicos y como característica específica presenta frutos con un epicarpio circunciso (opérculo) y una dehiscencia valvular o irregular del endocarpo (**Figura 6**). La mayor diversidad de especies corresponde a los neotrópicos, concentrándose en América Central y América del Sur (Simões & Staples 2017).

**Especies incluidas:** *Operculina aequisejala* (Domin) R.W.Johnson; *O. brownii* Ooststr.; *O. codonantha* (Benth.) Hallier f.; *O. hamiltonii* (G.Don) D.F.Austin & Staples; *O. macrocarpa* (L.) Urb.; *O. petaloidea* (Choisy) Ooststr.; *O. pinnatifida* (Kunth) O'Donell; *O. polynesica* Staples; *O. pteripes* (G.Don) O'Donell; *O. riedeliana* (Oliver) Ooststr.; *O. sericantha* (Miquel) Ooststr.; *O. tansaensis* Santapau & Patel; *O. turpethum* (L.) Silva Manso; *O. ventricosa* (Bertero) Peter (Simões & Staples 2017).



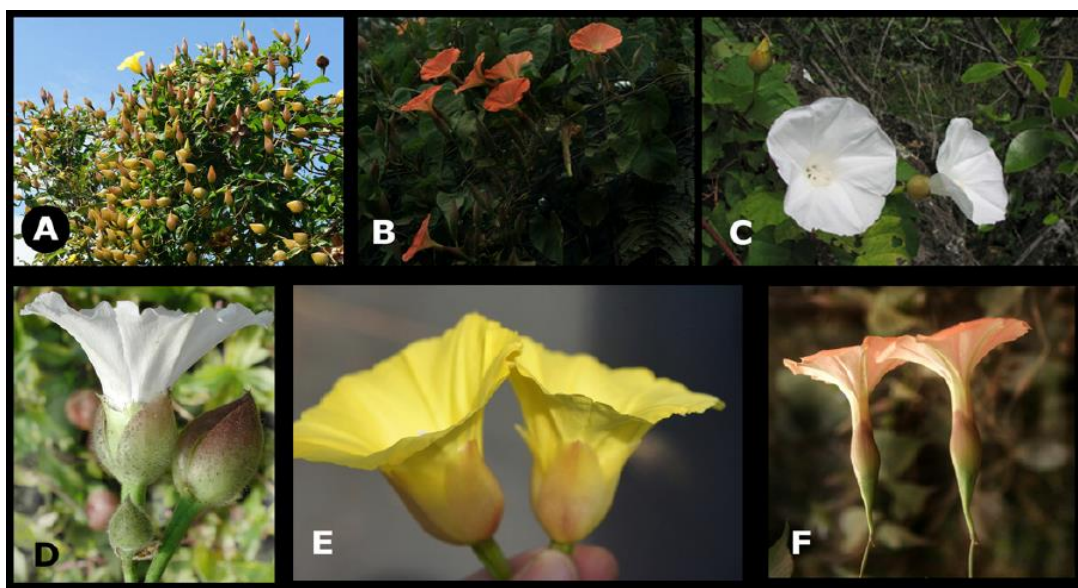
**Figura 6.** Principales características morfológicas del fruto de *Operculina*. A-C) Diferentes estadios del desarrollo del fruto de *O. hamiltonii* (raíz de jalapa brasileña). D) Fruto inmaduro con opérculo (exocarpo) intacto de *O. turpethum*. E) Fruto maduro de *O. macrocarpa* con opérculo (exocarpo) desprendido y endocarpio intacto (capa frágil e interior del pericarpio) rodeando las semillas. F) *O. brownii*, fruto maduro con endocarpio quebradizo y semillas expuestas. Imagen tomada de: (Staples et al., 2020).

**Tipo de crecimiento:** Todas las especies son herbáceas o lianas perennes con tallos volubles como un método de anclaje para su desarrollo en torno a un soporte; cuando hay una ausencia de éste, las plantas crecen como enredaderas postradas (Staples et al., 2020).

**Morfología:** Las especies de *Operculina* presentan las características ya mencionadas de muchos géneros de la familia Convolvulaceae como son los tallos, pedúnculos y pecíolos



frecuentemente alados. Hojas pecioladas, enteras o palmadas con la base cordada. Flores axilares o solitarias con corola infundibuliforme (como tubo) o acampanuladas (**Figura 7**) y anteras torcidas en espiral; fruto cápsular operculado, con la porción superior en forma de tapa carnosa con dehiscencia irregular. Semillas en número de 4 o menos, triangular o globular, glabras o pilosas. Una de las características únicas de este género es el fruto operculado. Las raíces de algunas especies se han descrito como tuberosas y de forma alargada como aquellas de la especie *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F Austin & Staples, cuyos preparados fitoterapéuticos forman parte de un complejo medicinal muy importante comercializado como un remedio purgante en ciertas regiones de Brasil (Simões & Staples 2017).

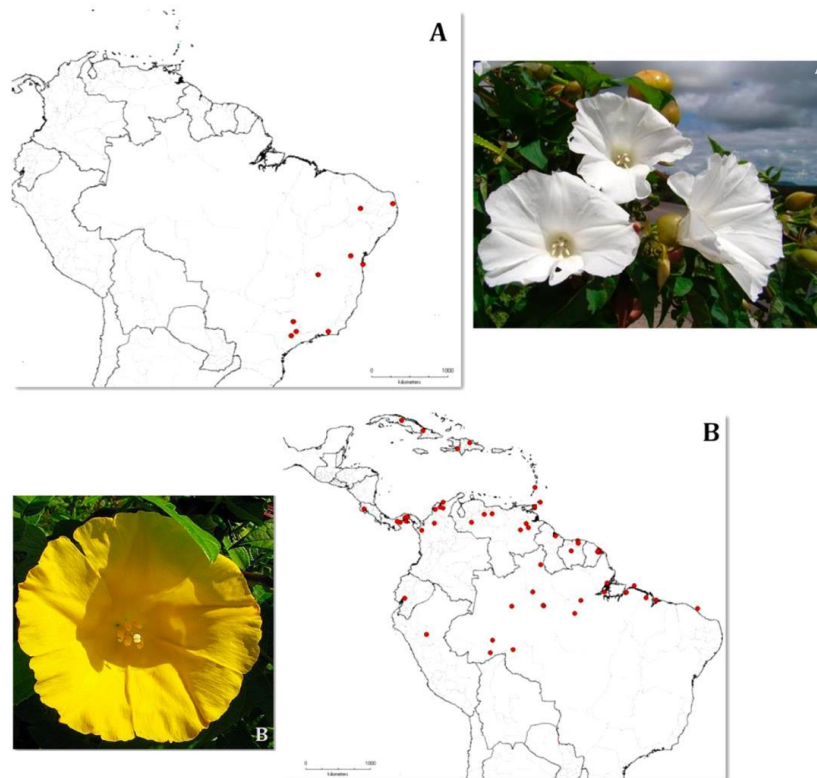


**Figura 7.** Corola infundibuliformes o acampanuladas de las flores de las especies de *Operculina*. A) *O. hamiltonii* (G. Don) D. F Austin & Staples. B) *O. pteripes* (G. Don) O'Donell. C) *O. codonantha* D) *O. turpethum* (L.) Silva Manso. E) *O. hamiltonii* con los sépalos fusionados al tubo de la corola. F) Corola en forma de embudo alargado de *O. pteripes*. Imagen tomada de: (Staples et al., 2020).

Las jalapas mexicanas (*Ipomoea purga*) y brasileñas (*Operculina macrocarpa* y *O. hamiltonii*) fueron las especies más importantes en el ámbito de los remedios purgantes originarios de América, hasta el punto de convertirse en el sucedáneo americano de la raíz de la escamonea (*Convolvulus scammonia*) pero con efectos considerados como moderados. Los colonizadores portugueses introdujeron en sus colonias en el continente americano el conocimiento de la medicina galénica imperante en la practicas médicas de la península

Ibérica en el siglo XVI. Este sistema medicinal compartía ciertos remedios como los purgantes utilizados por las tribus originarias de América, tal es el caso de los remedios provenientes de las plantas trepadoras perennes con raíces de sabor amargo de las convolvuláceas.

Este complejo de plantas medicinales, conocido como la “jalapa-de purga” en el territorio brasileño (**Figura 8**), está compuesto por especies comunes en la vegetación secundaria (Matos, 1997) y que se distribuye en las regiones tropicales comprendidas entre las Antillas y Brasil. Se han identificado principalmente dos especies con raíces tuberosas purgantes, *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (sin. *Ipomoea operculata* (Gomes) Mart) de flores blancas y otra de flores amarillas, *O. hamiltonii* (G.Don) D.F.Austin & Staples. Otra especie con propiedades laxantes es *O. turpethum* (L.) Silva Manso. Todas estas especies se emplean por sus propiedades purgantes y laxantes, también como un remedio contra las enfermedades infecciosas de la piel y en el tratamiento de la leucorrea (Gomes et al., 2009).



**Figura 8.** Distribución del complejo brasileño de plantas medicinales conocido como la raíz de jalapa. A) *Operculina macrocarpa* de flores blancas, B) *Operculina hamiltonii* de flores amarillas. Imagen tomada de: (Matos, 1997)

### 2.3.1 Jalapa de flores blancas: *Operculina macrocarpa*

*Operculina macrocarpa*, es, después de *O. turpethum*, la especie con una mayor dispersión, esto gracias a la actividad humana, la cual aparentemente está confinada para la región de Brasil en los neotrópicos de las zonas costeras con una vegetación de selva atlántica (“mata atlántica”), el bioma más amenazado de Brasil. Sin embargo, existen poblaciones establecidas en el oeste tropical de África (**Figura 8**) (Heine, 1960). Esta distribución transatlántica sugiere que *O. macrocarpa* pudo haber sido comercializada desde Brasil hasta África, tentativamente por los colonizadores portugueses u otros inmigrantes en la trata de esclavos (Heine, 1960). Los nombres comunes utilizados por la población brasileña son: batata-de-purga, jalapa, jalapina, purga-da-batata, roda-de-batata, sipipira, amerele leite, bata de purga da branca, cipó purga. En Paraguay, se conoce como bata de purga y en Ghana como abia y ebia (Staples, 2020). El **Cuadro 1** resume las diferentes sinonimias que se le han adjudicado a *O. macrocarpa*. (Simões & Staples 2017).

**Cuadro 1.** Lista de sinonimias para *O. macrocarpa* (Staples, 2020)

<i>Convolvulus frutescens</i> Mill.	<i>Piptostegia gomesii</i> Mart
<i>Convolvulus operculatus</i> Gomes	<i>Operculina convolvulus</i> Silva Manso
<i>Ipomoea operculata</i> (Gomes) Mart	<i>Meremia alata</i> Rendle

### 2.3.2 Jalapa de flores amarillas: *Operculin hamiltonii*

La jalapa de flores amarillas es una planta que florece todo el año con creces desde septiembre hasta diciembre en el norte del territorio brasileño. Sus flores amarillas son polinizadas por abejas debido a su forma peculiar. Los botánicos describen que las flores sólo se abren alrededor de las 9:30 am (Staples, 2020). Los nombres comunes en Brasil corresponden a batata-de-purga, batatão, batatão-de-mata, jalapa-amarela, jalapa-da-terra,



purga-do-cipo y batata amarela. En Panamá, se conoce como batatilla y en Trinidad y Tobago como “wild morning glory” (Staples et al., 2020).

La **Figura 9** ilustra las principales características anatómicas de *Operculina hamiltonii* D.F. Austin & Staples. Esta jalapa brasileña es una planta trepadora con flores amarillas, distribuida principalmente en los matorrales de las regiones tropicales del norte y noreste del territorio brasileño. Se trata de enredaderas leñosas perennes o lianas con raíces tuberosas. Tallos rojizos con las porciones leñosas más viejas estriadas longitudinalmente. Hojas simples de 4.5–9 × 3–7.5 cm. Flores solitarias diurnas y sin olor de 3.3–8 cm. Corola acampanulada de color amarillo brillantes 3.5–5.2 × 3.3–5.1 cm. Cáliz fructífero acrescente semileñoso de color marrón rojizo seco; sépalos 2.8–3.5 cm. Cápsula globosa deprimida con 4 lóbulos, 1.5–2 cm de diámetro, opérculo marrón rojizo, 1.2–1.4 cm de diámetro; endocarpio blanquecino, translúcido. Semillas 4 o menos de 4–8 mm, marrón opaco (Staples et al., 2020). Las raíces son ampliamente utilizadas como remedio purgante y comercializadas en diversas comunidades de la cuenca del río Amazonas, en los estados de Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí y Ceará. El **Cuadro 2** enlista las sinonimias para esta especie. (Simões & Staples 2017).

**Cuadro 2.** Lista de sinonimias de *O. hamiltonii* (Staples, 2020)

<i>Ipomoea hamiltonii</i> G. Don	<i>Ipomoea altissima</i> Mart
<i>Convolvulus alatus</i> Ham	<i>Ipomoea pterodes</i> Choisy
<i>Operculina alata</i> Urb	<i>Ipomoea ampliata</i> Choisy
<i>Ipomoea alulata</i> Miq.	<i>Operculina pterodes</i> f. <i>pubescens</i> Pilg.



**Figura 9.** Principales características morfológica de *Operculina hamiltonii* D.F. Austin & Staples. A) Raíz tuberosa y liana con hojas y frutos inmaduros y maduros. B) Flor acampanada. (C); Fruto maduro con cáliz marrón rojizo reflejado a 90° al pedicelo, opérculo dehiscente revelando endocarpo blanquecino que contiene a cuatro semillas, comenzando a desprenderse alrededor de la línea de abscisión.

### 2.3.3. Preparados fitoterapéuticos

Diversos preparados fitofarmacéuticos (**Figura 11**) se encuentran disponibles en el mercado para su comercialización (jarabes, extracto alcohólico y píldoras) o bien como drogas crudas (raíces secas cortas en rodajas o pulverizadas). Como ejemplo, tenemos a la “tintura de jalapa” Sobral que se utiliza en el noreste de Brasil como laxante y para el

tratamiento del accidente vascular encefálico (Ximenes dos Santos et al., 2012; Cunha et al., 2011). Entre las propiedades medicinales de la jalapa destacan la depurativa, diurética, energética, febrífuga, laxante y purgativa. Estos laxantes se utilizan, especialmente para la congestión intestinal (Matos, 1997; Costa, 2014).



**Figura 10.** Raíz de jalapa brasileña y productos herbolarios. La jalapa brasileña se comercializa ampliamente en las regiones del norte brasileño como droga cruda, además de numerosos productos elaborados con las raíces y el contenido de sus resinas: A) raíces; B) raíces secas cortas en rodajas; C) polvos comercializados de "batatão" y "jalapa" para la venta en un mercado local; D) jarabe de batatão (Hypólito), extracto alcohólico (Industria Farmacéutica Sobral) y píldoras (Maciel). Todos los productos fueron adquiridos en el Mercado 2000, Santarém, Pará, Brasil en septiembre de 2015. Imagen tomada de: (Pereda-Miranda, 2006)

## 2.4 Resinas glicosídicas

Los carbohidratos son biomoléculas muy abundantes en la naturaleza y son esenciales para el sustento y la sobrevivencia de las especies vivas. Además de ser una fuente potencial de energía, los carbohidratos desempeñan un papel importante en numerosos procesos fisiológicos y patogénicos en la célula, tales como el reconocimiento, la transducción de señales y la metástasis tumoral, entre otras (Mishra et al., 2021).

Las resinas glicosídicas se encuentran principalmente distribuidas en las plantas de la familia Convolvulaceae, son glicolípidos muy complejos cuya descripción es relativamente reciente (Noda et al., 1987; Pereda-Miranda et al., 1993). A la fecha, alrededor de 350 resinas glicosídicas se han descrito en la literatura fitoquímica (Fan et al., 2022; Pereda-Miranda et al., 2010) y han demostrado un amplio espectro de actividades biológicas (Rodríguez, 2018; Lira-Ricárdez & Pereda-Miranda, 2020).

### 2.4.1 Naturaleza química

Las resinas glicosídicas son metabolitos secundarios que forman parte de la descripción de azúcares acilados y que corresponden a metabolitos especializados en funciones vitales produciendo una defensa química para las plantas productoras, tales como la polinización, la defensa contra la herbivoría, la inhibición de bacterias y hongos patógenos (Leckie et al., 2016), las interacciones alelopáticas planta-planta (Lotina-Hennsen et al., 2013) y la resiliencia a mecanismos de estrés abiótico.

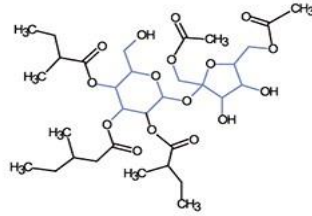
Los azúcares acilados se producen en la mayoría de las especies de la familia de las solanáceas en sus tricomas (Kruse et al., 2022), mientras que los azúcares acilados hace referencia a la clase de compuestos restringidos sólo a los miembros de la familia Solanaceae, otros glicolípidos estructural y, posiblemente, biosintéticamente análogos también se encuentran documentados en otras familias del reino vegetal, como las resinas glicosídicas de las convolvuláceas (**Figura 11**). Se presume que esta extrema diversidad estructural de los azúcares acilados y las resinas glicosídicas de las convolvuláceas ocurre debido a la promiscuidad de las aciltransferasas involucradas en su biosíntesis y a los diversos grupos acilo activados por la coenzima A (Monge et al. 2017).



**A.**



Many genera  
Solanaceae;  
Solanales

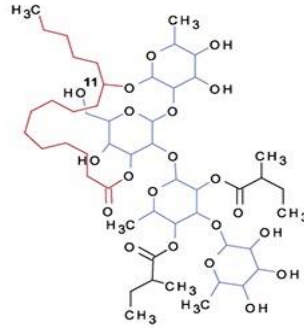


**Acilazúcares de las Solanáceas**

**B.**



Many genera  
Convolvulaceae;  
Solanales

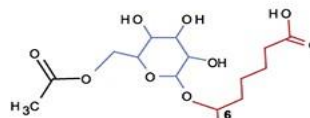


**Resinas glicosídicas**

**C.**



*Ibicella lutea*  
Martyniaceae,  
Lamiales

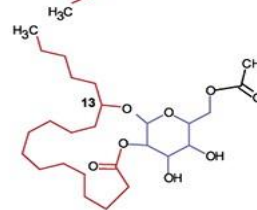


**Glicósidos de ácidos grasos**

**D.**



*Silene gallica*  
Caryophyllaceae,  
Caryophyllales

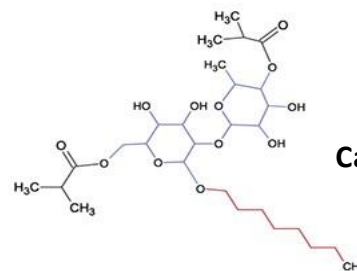


**Gallicasidos**

**E.**



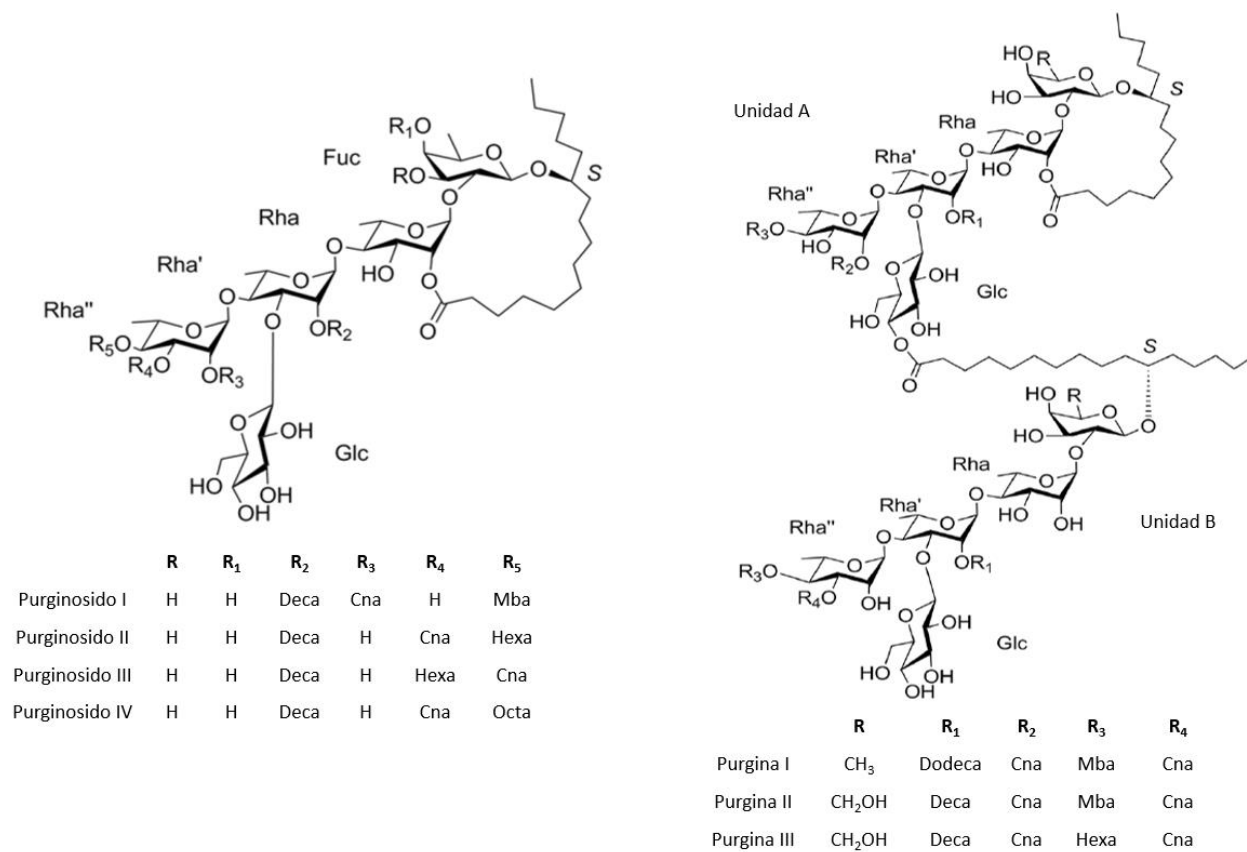
*Geranium carolinianum*  
Geraniaceae,  
Geranales



**Caroliniasidos**

**Figura 11.** Ejemplos representativos de glicolípidos de especies vegetales. Las resinas glicosídicas presentan el patrón estructural de mayor complejidad entre las diferentes clases de azúcares acilados (Kruse et al., 2022).

La **Figura 12** ilustra la diversidad estructural de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa auténtica (*Ipomoea purga*) basadas en un único núcleo pentasacárido esterificado por residuos ácidos orgánicos diversos. Este oligosárido se utilizó para la biosíntesis de estructuras diméricas (Castañeda Gómez & Pereda Miranda, 2011; Castañeda-Gómez et al., 2013).



**Figura 12.** Diversidad estructural de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga*. La estructura de los constituyentes individuales se basa en un único pentasacárido, el ácido operculínico A presente en los purginósidos I-IV. La macrolactonización sucede en la posición C-2 de la segunda unidad monosacárida y la presencia de tres unidades esterificantes del núcleo oligosárido, los ácidos *trans*-cinámico (Cna), (+)-2*S*-metilbutírico (mba), hexanoico (hexa), decanoico (n = 1) y dodecanoico (n = 3) se ubicaron en C-2 de la segunda unidad de ramnosa y en C-2 (o C-3) y C-4 en la tercera fracción ramnosa. La posición para el establecimiento del enlace éster de los dímeros para la unidad monomérica B en la unidad macrocíclica A fue en C-4 de la glucosa terminal de las purginas I-III.

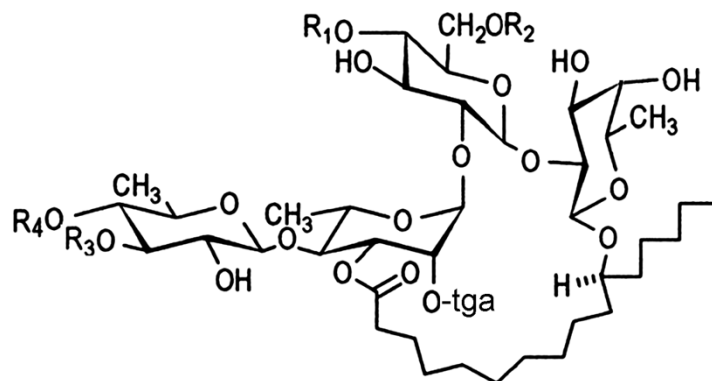
Existe una variación estructural sustancial e intrínseca entre los glicolípidos individuales de las resinas glicosídicas de las especies de convolvuláceas (Fan et al., 2022;

Pereda-Miranda et al., 2010) y que se caracteriza por la presencia de una alta diversidad de oligómeros de ácidos grasos hidroxilados (Pereda-Miranda et al., 2010). Esta diversidad química es el resultado de tres características principales: (i) un núcleo heteropolisacárido de solo unos pocos residuos de azúcar (hasta siete), que contiene aldohexosas (D-glucosa o D-galactosa) y epímeros de pentosas (L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa y D-xilosa) en sus formas de piranosa, constituidos con no más de cuatro monosacáridos diferentes; (ii) monohidroxi y dihidroxi C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> ácidos grasos como las agliconas que pueden formar una macrolactona; y (iii) esterificaciones de los núcleos de azúcar por ácidos grasos aromáticos o alifáticos que pueden ser de C<sub>2</sub>-C<sub>16</sub> carbonos de largo. Algunos oligómeros sufren condensaciones intermoleculares para formar dímeros de tipo éster de mayor peso molecular y complejidad (Castañeda-Gómez et al., 2013; Escalante-Sánchez y Pereda-Miranda, 2007).

Los patrones de acumulación de las resinas glicosídicas en hojas, semillas y raíces generalmente son consistentes dentro de una especie, pero varían entre variedades y especies filogenéticamente cercanas. En *Ipomoea*, la mayoría o todas las resinas glicosídicas se encontraron en las raíces. Esta observación sugiere que se producen en estos órganos. Sin embargo, no está claro si las resinas glicosídicas también se producen en las partes aéreas de las plantas o simplemente se transportan desde las raíces (Kruse et al., 2022).

#### 2.4.2 Métodos de purificación

De acuerdo con su naturaleza química, las resinas glicosídicas son moléculas anfipáticas, el aislamiento y la purificación de éstas no es una tarea sencilla, debido a que siempre están presentes en forma de mezclas complejas de homólogos que tienen el mismo núcleo oligosacárido, pero con mínimas diferencias ya sea en el largo de la cadena de las porciones alifáticas esterificantes o en los sitios de acilación en el núcleo oligosacárido (Pereda-Miranda et al., 2002; 2010), tal es el caso de las orizabinas I-IV (**Figura 13**). Por lo tanto, los métodos tradicionales para el aislamiento y la purificación de productos naturales, tales como el reparto líquido-líquido, la cromatografía en capa fina y cromatografía en columna abierta, usando como soporte gel de sílice, intercambio iónico y filtración en gel (Sephadex), resultan ser técnicas inapropiadas (Pereda-Miranda et al., 2010). El aislamiento y la purificación de las resinas glicosídicas se realiza empleando la técnica de HPLC.



Orizabina I  $R_1 = R_3 = H$ ;  $R_2 = nla$ ;  $R_4 = mba$

Orizabina II  $R_1 = R_3 = H$ ;  $R_2 = nla$ ;  $R_4 = iba$

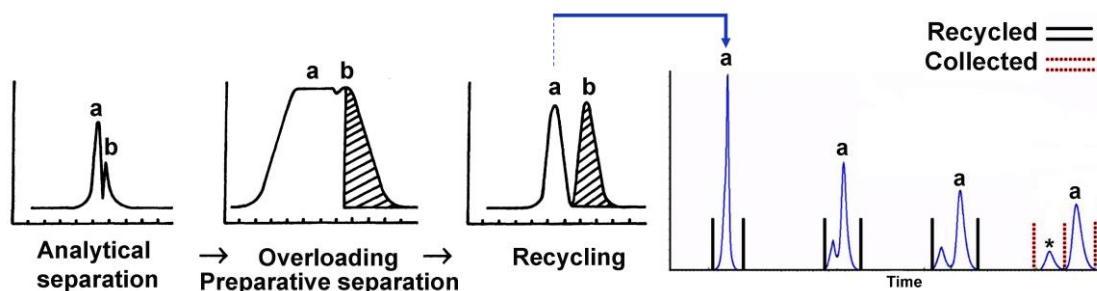
Orizabina III  $R_1 = R_3 = H$ ;  $R_2 = R_4 = nla$

Orizabina IV  $R_1 = R_4 = H$ ;  $R_2 = nla$ ;  $R_3 = iba$

**Figura 13.** Estructura química de las orizabinas I-IV, lipotetraosacáridos macrocíclicos mayoritarios de las resinas glicosídicas purificadas a partir de la raíz de la falsa jalapa, escamonea mexicana o jalapa ligera, *Ipomoea orizabensis* (G. Pelletan) Ledeb. ex Steud.



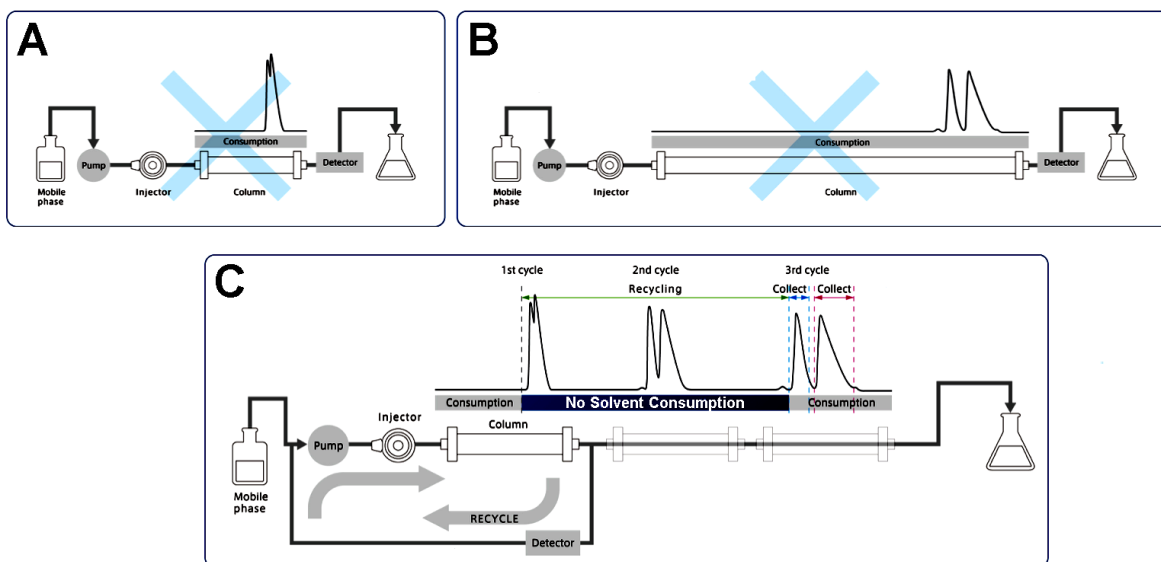
El éxito en la purificación (> 99%) de los glicolípidos constitutivos de las resinas glicosídicas, empleando HPLC, se debe primordialmente al uso de la técnica conocida como “reciclaje de pico” en conjunto del “corte de núcleo” (Pereda-Miranda & Hernández-Carlos, 2002). Esta técnica requiere del empleo de una válvula de reciclaje que permite la reintroducción en la columna cromatográfica de la muestra problema tantas veces como sea necesario y, de esta forma, se incrementa el número de platos teóricos mejorando la resolución de los picos en análisis y manteniendo al mínimo la distorsión del pico. El procedimiento finaliza cuando se observa una señal como un pico de comportamiento gaussiano, sin la presencia de picos minoritarios como indicativos de impurezas (**Figura 14**) (Pereda-Miranda & Hernández-Carlos, 2002).



**Figura 14.** Separación de dos picos con una baja resolución (**a** y **b**) en una mezcla de productos naturales estrechamente relacionados (4:1) mediante sobrecarga de columnas y reciclaje en HPLC preparativo. La sobrecarga de la columna es útil para la separación de componentes minoritarios mediante la aplicación de las metodologías de rasurado de pico y corte de núcleo. El corte de la zona de elución de la muestra enriquecida en el constituyente minoritario **b** proporciona una fracción enriquecida en el compuesto principal **a**. Después del primer reciclaje de esta fracción, la separación de los dos constituyentes es satisfactoria para recoger el pico minoritario **b**. Cuando el eluato se devuelve a la columna, el pico **a** se puede aislar en estado puro logrando su resolución después de varios ciclos de reciclaje en la columna para eliminar una impureza traza (\*).

La cromatografía en modo de reciclaje tiene las siguientes características (**Figura 15**):

- (i) reducción de los costos de la columna, ya que este proceso tiene la misma capacidad de separación que el uso de columnas más largas o múltiples; ii) reduce las cargas y los costes medioambientales, ya que el mismo disolvente de fase móvil se utiliza repetidamente durante todo el proceso de separación y, por lo tanto, reduce el consumo total de disolvente; y iii) una purificación preparativa eficaz, ya que cada componente de la mezcla se fracciona y se recoge sólo después de mejorar la separación de referencia.



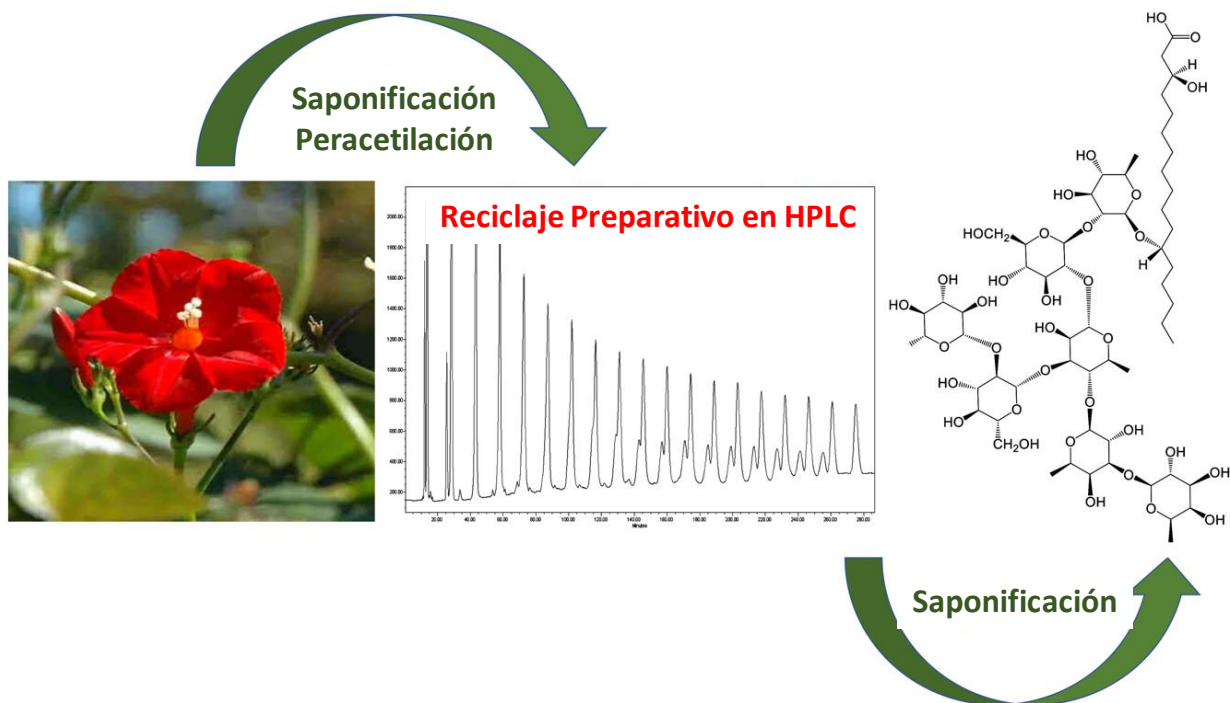
**Figura 15.** Comparación de los sistemas de HPLC preparativos equipados con una columna de fase estacionaria uniforme de tamaños de partículas pequeñas de 5 a 20  $\mu\text{m}$ . A) Cuando se utiliza una columna corta. B) Cuando se utiliza una columna larga que puede producir presiones altas en el sistema. C) Técnica de reciclaje cuando la muestra fluye a través de la misma columna repetidamente sin consumo de disolvente. El uso de una columna con una longitud de 1/3, pero en una secuencia de 3 ciclos, produce el mismo resultado que cuando se emplea con una columna con el triple de longitud y con la mitad en el consumo del disolvente.

Esta técnica se emplea para el aislamiento y la purificación de diferentes tipos de productos naturales incluyendo enantiómeros, diastereoisómeros, epímeros, isómeros posicionales y compuestos estructuralmente relacionados con tiempos de retención similares (Sidana & Joshi, 2013) y ha permitido la purificación de numerosos oligosacáridos constitutivos de las mezclas de resinas glicosídicas de las convolvuláceas. La cromatografía de fase inversa con C-18 [ $\text{C}_{18}\text{H}_{37}-(\text{CH}_3)_2-\text{OSi}-\text{OSi}(\text{OH})(\text{CH}_3)_2$ ] tiene una afinidad más fuerte por las porciones hidrofóbicas en estas resinas glicosídicas, como la aglicona (ácidos grasos mono y dihidroxilado  $\text{C}_{14}-\text{C}_{18}$ ) y los residuos esterificantes de los núcleos oligosacáridos. La aplicación de la fase reversa C-18 en el modo de reciclaje en HPLC semipreparativo para la purificación de estos glicolípidos complejos ha proporcionado muestras con una pureza del 98%, como lo demuestran los métodos analíticos de RMN y EM utilizados para la elucidación estructural de las siguientes series de resinas glicosídicas: albinósidos (Cruz-Morales et al. 2012, 2016), batatinósidos (Escalante-Sánchez et al., 2008), intrapilosinas

(Bah et al., 2007), murucoidinas (Escobedo-Martínez et al., 2010), purginósidos y las purginas (Castañeda-Gómez & Pereda-Miranda, 2011; Castañeda-Gómez et al., 2013), entre otros. También, la fase estacionaria NH<sub>2</sub> [NH<sub>2</sub>(CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>-OSi-OSi(OH)(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>], propia para el análisis de carbohidratos, se utilizó para la purificación de las sereis de homólogos de las tricolorinas (Bah & Pereda-Miranda, 1997) y las orizabinas (Hernández-Carlos et al., 1999).

Debido a la alta complejidad característica de las mezclas de resinas glicosídicas, se requiere del uso de técnicas degradativas que consisten en reacciones químicas para fragmentar, de manera paulatina, la estructura compleja del glicolípido y generar moléculas más sencillas y, de esta forma, facilitar la elucidación estructural al identificar las diferentes porciones de la molécula. Una de estas reacciones es la hidrólisis alcalina (saponificación) del extracto obtenido a partir del material vegetal, con la que se logran obtener los ácidos orgánicos que esterifican al núcleo oligosacárido y la apertura, según sea el caso, de la macrolactona. Los productos de hidrólisis solubles en la fase orgánica se someten a una reacción de derivatización para formar el éster metílico y se analizan por CG acoplada a EM (Pereda Miranda et al., 2010). El ácido glicosídico soluble en agua se recupera mediante extracción con *n*-butanol.

Recientemente, los ácidos hederifólicos A-D, heptaglicósidos y hexaglicósidos de los ácidos 3*S*,12*S*-dihidroxi- o 12*S*-hidroxiheptadecanoico de *Ipomoea hederifolia* L. (batatilla roja) se purificaron como derivados peracetilados mediante reciclaje en HPLC en fase reversa (**Figura 16**). Esta estrategia permitió la purificación de los ácidos glicosídicos extremadamente polares y que se recuperaron mediante hidrólisis básica (Castañeda-Gómez et al., 2023). Mediante la aplicación de la técnica degradativa de saponificación, se evaluaron diversas muestras comerciales de las jalapas mexicanas para la generación de perfiles cromatográficos en HPLC de sus ácidos glicosídicos que fueron purificados mediante fase reversa (columna NH<sub>2</sub> para análisis de carbohidratos; fase móvil, CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O, 3:2) en modo de reciclaje, distinguiendo cada una de los tres remedios herbararios, la jalapa verdadera (*Ipomoea purga*), la falsa jala (*I. orizabensis*) y la raíz de la tumavaqueros (*I. stans*) para su control de calidad (Pereda-Miranda et al. 2006).



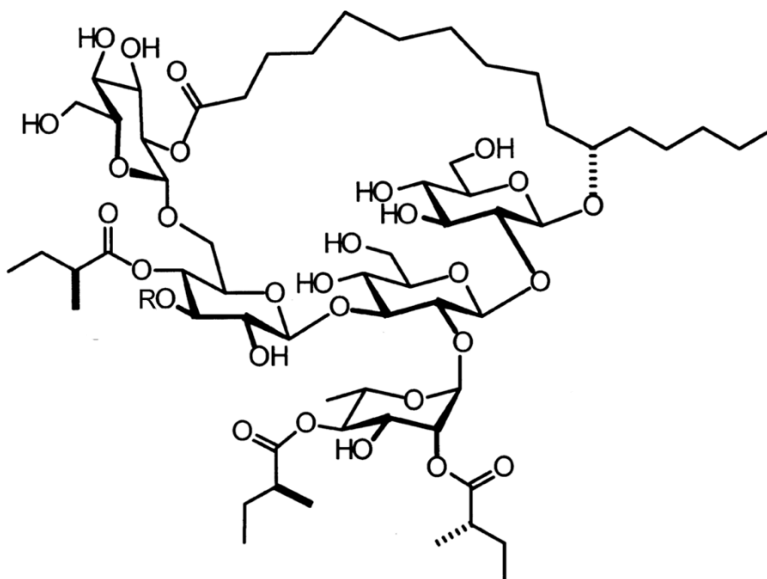
**Figura 16.** Purificación mediante HPLC en fase reversa (C-18) de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas glicosídicas de la batatilla roja. Los derivados peracetilados se convierten en los ácidos intactos mediante hidrólisis básica, logrando superar las dificultades asociadas con la purificación de ácidos glicosídicos polares intactos (Castañeda-Gomés et al., 2023).

### 2.4.3. Elucidación estructural

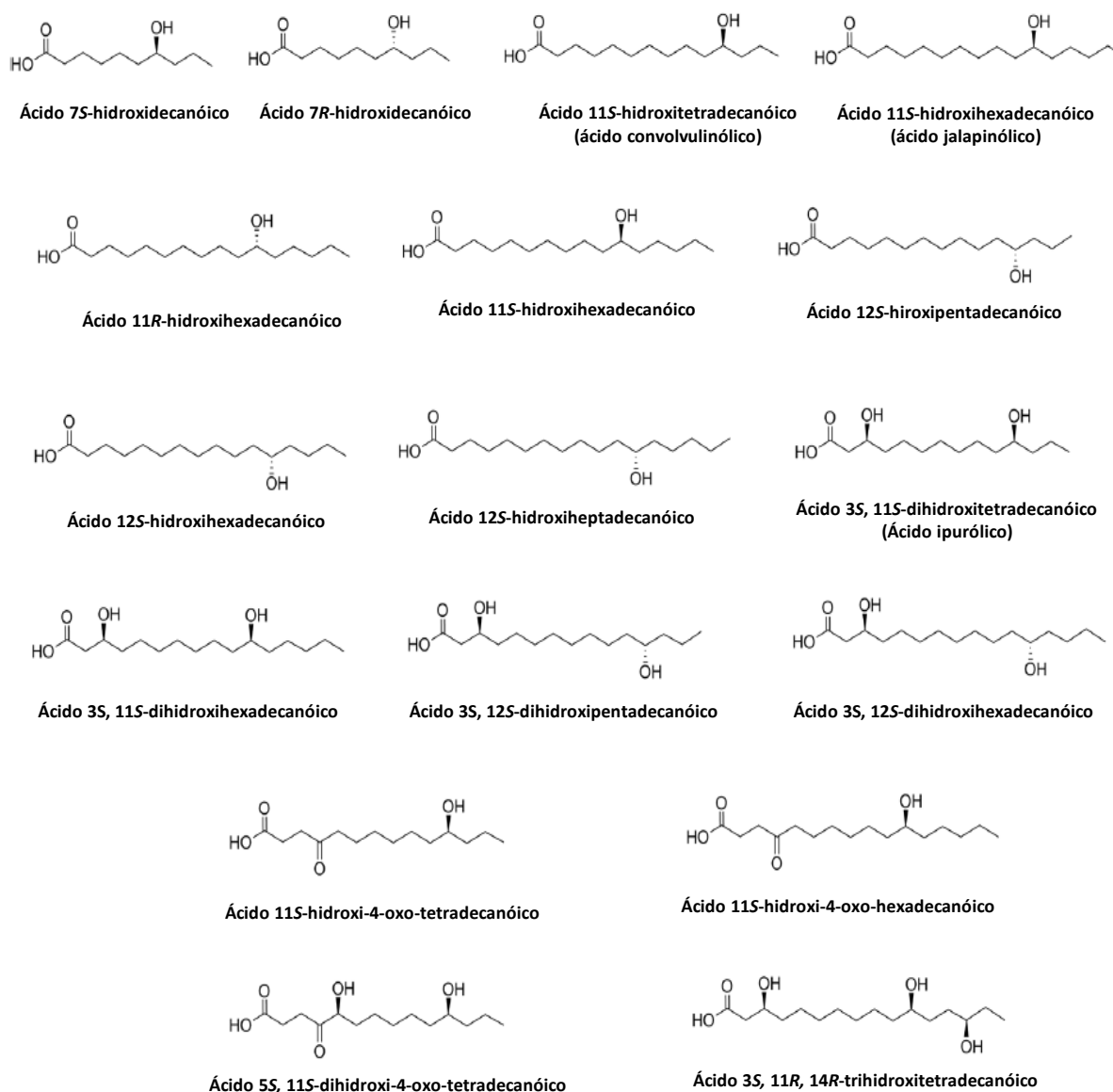
El empleo de técnicas espectroscópicas como RMN y EM-AR son herramientas muy efectivas para la elucidación estructural de los lipooligosacáridos sin la necesidad de utilizar técnicas que degraden el producto original. A partir de la generación de los perfiles de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  de los productos intactos y de sus ácidos glicosídicos, se obtiene información acerca de la estructura del núcleo oligosacárido constitutivo, como la identificación del número y tipo de unidades sacáridas. Al recurrir a las técnicas bidimensionales homonucleares (COSY, TOCSY y ROESY), y heteronucleares (HSQC y HMBC), se asigna la conectividad de cada uno de los constituyentes dentro de la molécula (Pereda-Miranda et al., 2010).

#### 2.4.4 Diversidad estructural

Históricamente, la clasificación de las resinas glicosídicas se basó en su solubilidad, la porción soluble en éter o disolventes lipofílicos como hexano o cloroformo, denominada como jalapina; y la porción insoluble o convolvulina, soluble en disolventes polares próticos como el MeOH, con el fundamento de que aquellas resinas lipofílicas solubles en éter compartían una estructura macrolactónica. Sin embargo, esta clasificación no correspondía con las propiedades anfipáticas de todas las resinas individuales, por ejemplo, las woodrosinas I y II (Ono, 1993) de *Ipomoea tuberosa* L. (*Merremia tuberosa* (L.) Rendle), siguen mostrando una insolubilidad en éter a pesar de que corresponden a macrolactonas (**Figura 17**). En realidad, la solubilidad de las resinas glicosídicas puras refleja su carácter anfipático y su disolución en disolventes orgánicos apróticos lipofílicos, como el éter o cloroformo, dependerá del tipo de cadenas esterificantes, el tamaño del oligosacárido y el grado de sustitución del núcleo oligosacárido por ácidos grasos de cadena larga. Por lo tanto, en HPLC, un tiempo de retención más largo sólo dependerá de la adsorción a través de interacciones hidrofóbicas de los analitos individuales con la fase estacionaria (C-18). Cuanto más fuerte sea la interacción por la presencia de ácidos acilantes de cadena larga, mayor será el tiempo de retención resultante.



**Figura 17.** Estructura química macrocíclica de las woodrosinas I y II de *Ipomoea tuberosa*. La estereofiricación del núcleo pentasacárido por residuos de los ácidos (+)-2*S*-metilbutírico e isobutírico en la woodrosina I (R = mba) y la woodrosina II (R = iba) no confiere una capacidad anfifílica para su disolución en éter o disolventes polares lipofílicos.

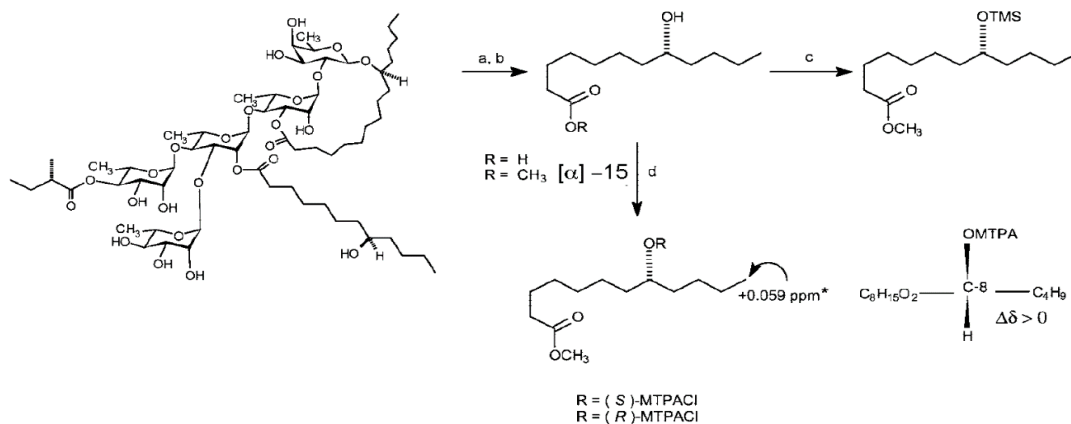


**Figura 18.** Estructuras de las agliconas descritas en las resinas glicosídicas. Imagen tomada de: (Bo-Yi, et al., 2021)

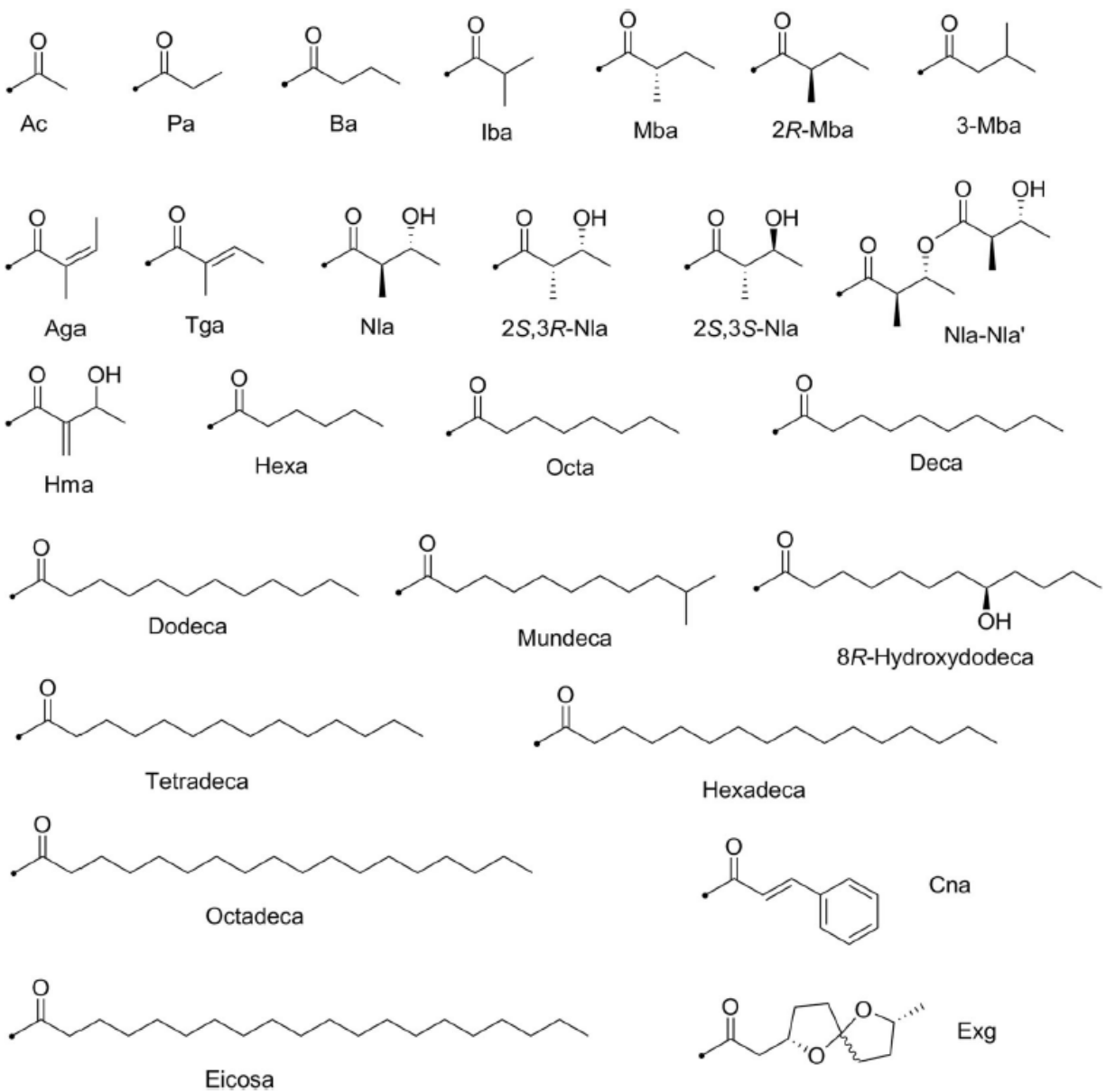
De este modo, en 2010, las resinas glicosídicas se empezaron a clasificar con base en la longitud y nombre de sus núcleos oligosacáridos macrocíclicos o acíclicos (ácidos glicosídicos) (Pereda-Miranda et al., 2010). El ácido 11S-hidroxi-hexadecanoico (ácido jalapinóico) y el ácido 11S-hidroxi-tetradecanoico (ácido convolvulinóico) son las agliconas más comunes entre las resinas glicosídicas. En años recientes, otras agliconas de ácidos grasos tales como el ácido 7R-hidroxi-decanoico y el ácido 11R-hidroxi-hexadecanoico, entre

otros, se han descrito y se resumen en la **Figura 18** Las agliconas usualmente se encuentran formando una macrolactona con el núcleo oligosacárido, sin embargo, numerosas estructuras acíclicas también han sido aisladas (Fan et. al, 2022).

Se ha descrito que los ácidos grasos 12*S*-monohidroxilados y 3*S*,12*S*-dihidroxilados muestran un valor dextrógiro para su rotación específica ( $[\alpha]_D$ ) y sus levoisómeros tienen el signo contrario para una configuración *R* (Chérigo & Pereda-Miranda, 2008; Lira-Ricárdez et al., 2019). Esta observación para la configuración absoluta también se ha confirmado mediante el análisis de RMN  $^1\text{H}$  de sus ésteres de Mosher. La **Figura 19** ilustra la secuencia de reacciones utilizadas para establecer la configuración absoluta del residuo acilante de la murocoidina X de *Ipomoea murucoides* Roem. et Schult (Chérigo & Pereda-Miranda, 2008). Los grupos esterificantes encontrados en las convolvuláceas se encuentran resumidos en la **Figura 20**, incluyendo ácidos alifáticos de cadena corta y larga, como el ácido acético y el ácido hexadecanoico, y ácidos aromáticos como el *trans*-cinámico (Fan et al., 2022).



**Figura 19.** Establecimiento de la configuración para el ácido 8*R*-hidroxidodecanoico esterificante de la murocoidina X. (a) KOH, (b) CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>, (c) TMSiCl, piridina, 70 °C, 15 min, (d) (*R*)-MTPACI o (*S*)-MTPACI, DMAP, piridina, 70 °C, 5 h. \*Δδ = δ(*S*)MTPACI – δ(*R*)MTPACI (Chérigo & Pereda-Miranda, 2008).



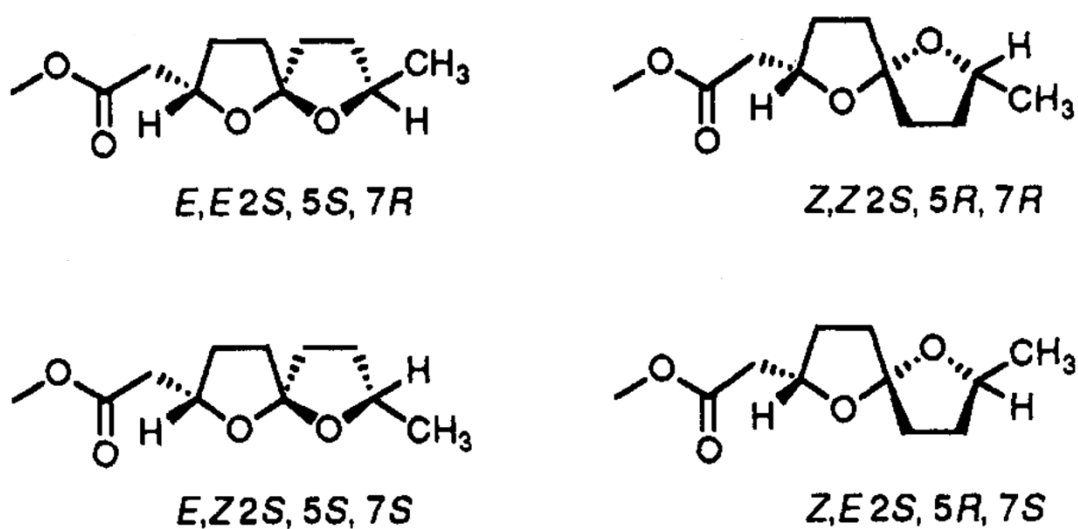
**Figura 20.** Estructuras de los grupos acilantes descritos en las resinas glicosídicas. Imagen tomada de: (Bo-Yi, et al., 2021)

El ácido exogónico (Exg, ácido 3,6-6,9-dioxidodecanoico: 2-carboximetil-7-metil-1,6-dioxaspiro-[4,4]-nonano) es un componente característico (~7%) que puede ser aislado como un ácido libre junto con pequeñas cantidades del ácido 4-oxocaprílico (4-oxo-*n*-octanoico) de la jalapa brasileña *Operculina macrocapa* y es considerado como un marcador



quimiotaxonómico para esta planta medicinal purgante. Este constituyente obtuvo su nombre trivial de la planta *Exogonium purga*, sinonimia inválida de *Ipomoea purga*, porque los autores descubridores creyeron erróneamente haberlo aislado de la jalapa mexicana (Mannich y Schumann 1938).

Graf y Dahlke (1964) asignaron su estructura como el ácido 3,6-6,9-dioxidodecanoico después de estudios degradativos y espectroscópicos. El ácido natural es ópticamente activo y se consideraba una mezcla de los cuatro posibles diastereómeros (**Figura 21**). El análisis de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  del exogonato de metilo y de la mezcla diastereomérica sintética llevó a la sugerencia de que el ácido exogónico natural consiste predominantemente de la mezcla de los diastereoisómeros *E,E* y *Z,Z* con las configuraciones  $2S,5S,7R$  y  $2S,5R,7R$ , respectivamente, que difieren en configuración sólo en el centro espiro. Sin embargo, también se pudieron detectar cantidades menores de los isómeros *E,Z* y *Z,E* ( $2R,5S,7R$  y  $2R,5R,7R$ , respectivamente) mediante un análisis en la cromatografía de gases con una fase estacionaria quiral, níquel (II) bis(3-heptafluorobutanoilo)-(1*R*)-calcanforato (Ni-R-Cam) (Lawson et al., 1992). Aparentemente, existe un equilibrio autocatalítico que facilita la epimerización de este residuo en la resina glicosídica debido a la naturaleza ácida de esta última.

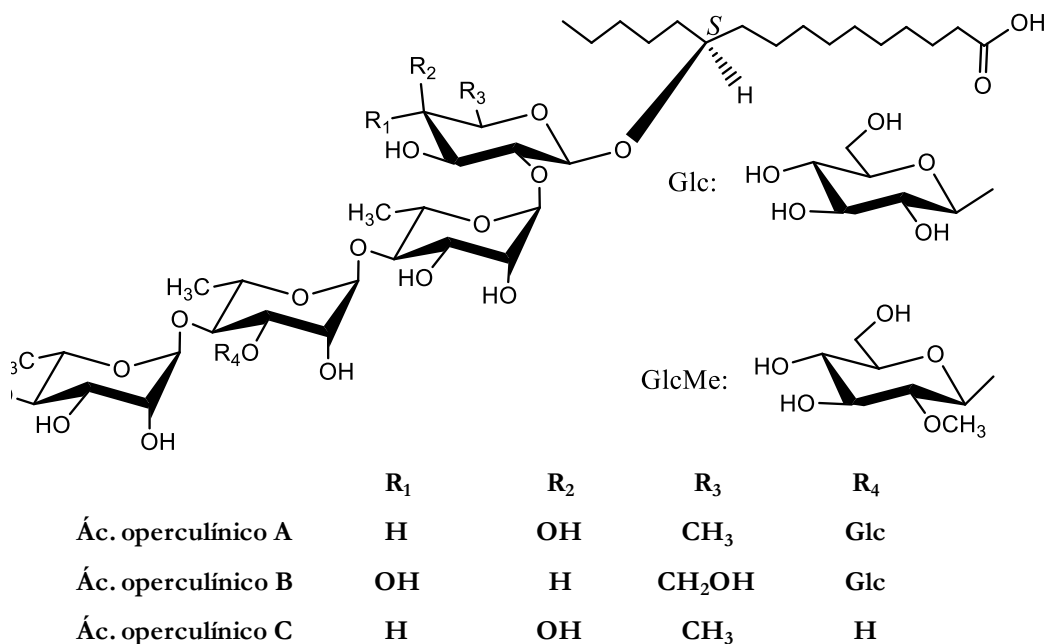


**Figura 21.** Ácido exogónico, un componente de la resina de la jalapa brasileña que también esterifica a sus oligosacáridos, existe como un equilibrio epimérico de cuatro estereoisómeros. (Lira-Ricárdez, 2021)

### 2.4.5 Resinas glicosídicas de *Operculina*

Debido a la complejidad estructural de las resinas glicosídicas y a la similitud que guardan entre ellas que dificultan su separación, la mayoría de las elucidaciones estructurales de las resinas de las especies de *Operculina* se han iniciado con la caracterización de los ácidos glicosídicos constitutivos, es decir, la molécula se somete a un proceso de saponificación con el fin de reducir la complejidad y facilitar su caracterización estructural (Pereda Miranda et al., 2010).

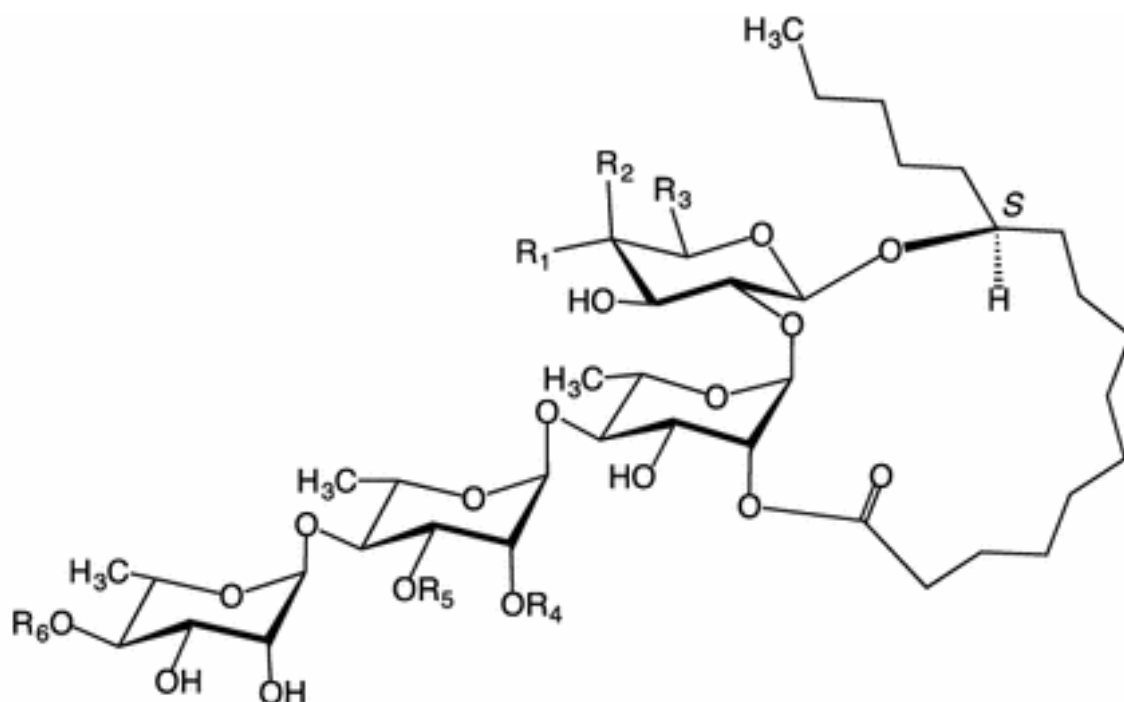
No fue sino hasta 1989 que un grupo de investigadores japoneses, liderados por Masateru Ono, caracterizaron las primeras resinas glicosídicas intactas a partir de una muestra comercial supuestamente conteniendo a la raíz pulverizada de la jalapa de flores blancas (*O. macrocarpa*), tras haber reconocido a siete ácidos operculínicos (A-G) (**Figura 22**) como los núcleos mayoritarios de las resinas glicosídicas presentes en las mezclas complejas (Ono et al., 1989).



**Figura 22.** Estructuras de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas glicosídicas de la jalapa brasileña de flores blancas (*Operculina macrocarpa*).

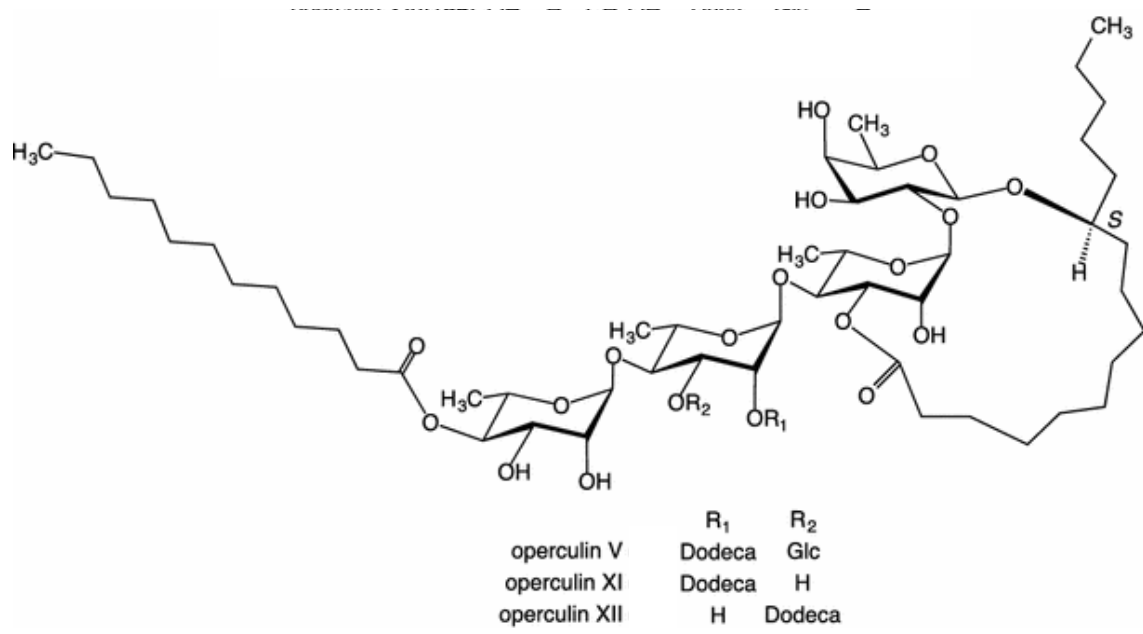
La diferencia estructural de las estructuras derivadas de los ácidos operculínicos (A-H) de las resinas glicosídicas que se han purificado de *O. macrocarpa* radica en la posición de lactonización en el núcleo oligosacárido ya que el ácido glicosídico puede esterificar intramolecularmente la posición C-2 (**Figura 23**) o C-3 (**Figura 24**) de la primera unidad de ramnosa interna. La principal característica en común de estas resinas macrocíclicas es la presencia única de grupos acilo alifáticos de cadena larga como grupos esterificantes, específicamente el ácido dodecanoico y el ácido decanoico (Ono et al., 1992). La elucidación estructural se realizó en forma progresiva, iniciando con la identificación de los núcleos saponificados, seguida de la caracterización de los derivados peracetilados y permetilados y, finalmente, se concluyó con el análisis a través de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en 1D y 2D de la estructura intacta de cada uno de los componentes individuales (Ono et al., 2017).

Otras estructuras pentasacáridas derivadas del ácido operculínico A se han aislado de otras fuentes distintas a *Operculina*, principalmente del género *Ipomoea*, como los batatinósidos XI y VI (Rosas-Ramírez, 2013; Escalante-Sánchez, 2008) de *Ipomoea batatas*, las pescapreínas (Escobedo-Martínez, 2007) de *Ipomoea pescaprae* y los purginósidos de *Ipomoea purga* (Castañeda Gómez & Pereda Miranda, 2011) (**Figura 12**).



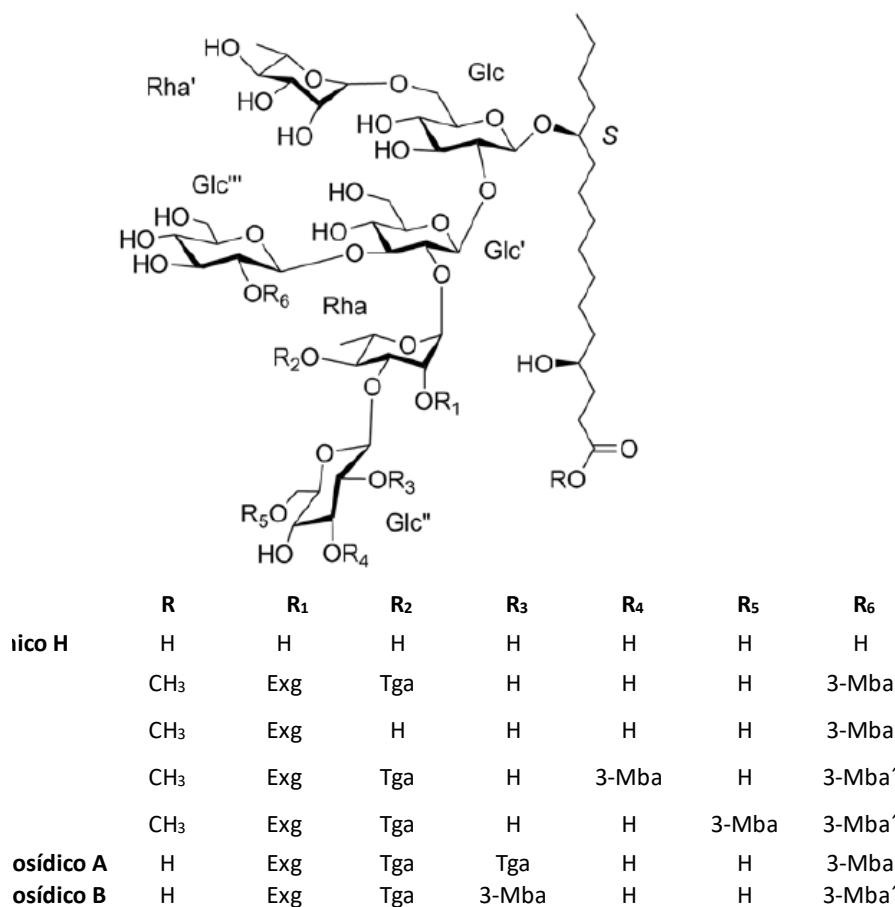
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	R <sub>6</sub>
operculin I	H	OH	CH <sub>3</sub>	Dodeca	Glc	Dodeca
operculin II	H	OH	CH <sub>3</sub>	Deca	Glc	Deca
operculin III	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	Dodeca	Glc	Dodeca
operculin IV	OH	H	CH <sub>2</sub> OH	Deca	Glc	Deca
operculin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

**Figura 23.** Resinas glicosídicas macrocíclicas purificadas a partir de *Operculina macrocarpa* con la macrolactonización en la posición C-2 de la primera ramnosa interna. (Ono, 2017)



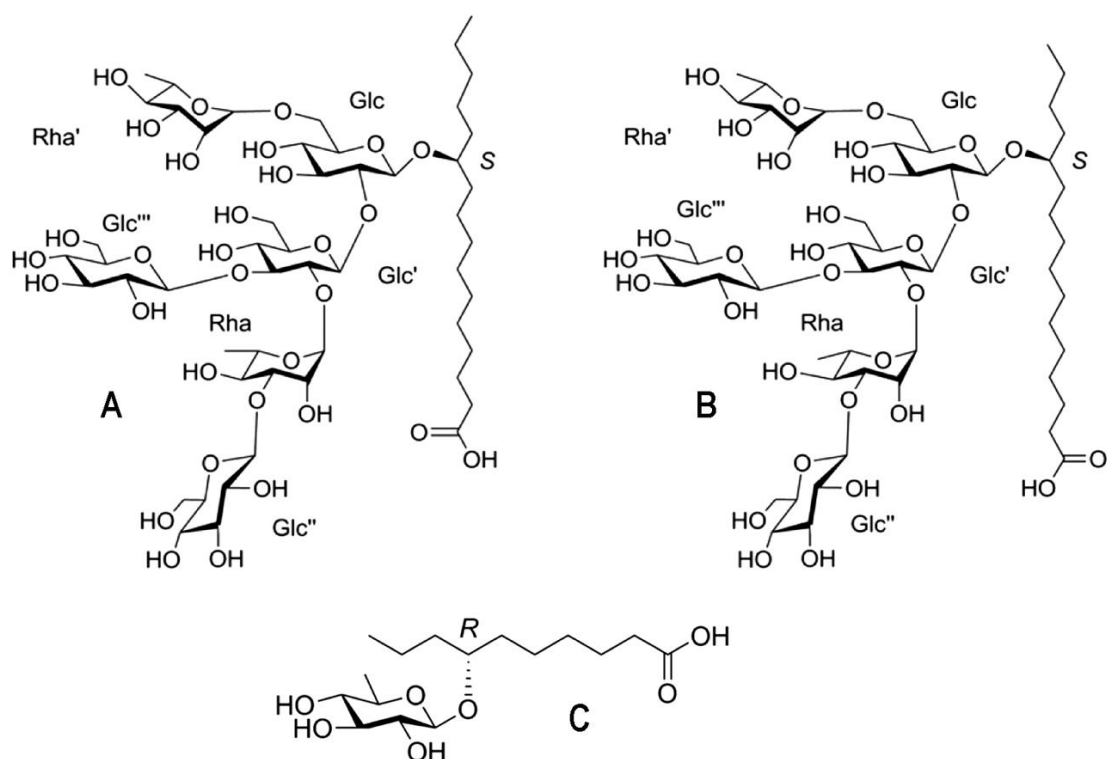
**Figura 24.** Resinas glicosídicas aisladas de *O. macrocarpa* con la macrolactonización en la posición C-3 de la primera ramnosa interna. (Ono, 2017)

En 2009, Ono y su equipo describen el aislamiento y la caracterización de un nuevo ácido operculínico derivado de la hidrólisis alcalina de la fracción insoluble en éter (convolvulina) del extracto de las raíces de *O. macrocarpa* (Ono, 2009). A diferencia de sus homólogos previamente aislados, el ácido operculínico H posee un hexasacárido con residuos acilantes de los ácidos metilbutítico, tíglico y exogónico. Por lo tanto, las resinas glicosídicas de esta planta se caracterizan por ser insoluble en éter, pero difieren de las otras resinas de las convolvuláceas purgantes por tener una solubilidad anormalmente alta en agua (Shellard, 1961). Posteriormente, la fracción correspondiente a la convolvulina del extracto de las raíces de una muestra comercial de *O. macrocarpa* fue sometido a un tratamiento con cloruro de indio (III) en metanol, de donde se obtuvieron los derivados metilados del ácido operculínico H (Ono, 2009; 2017) que se ilustran en la **Figura 25**. Los ácidos macrocarposídico C se purificaron a partir de una muestra auténtica (Lira-Ricárdez, 2019).



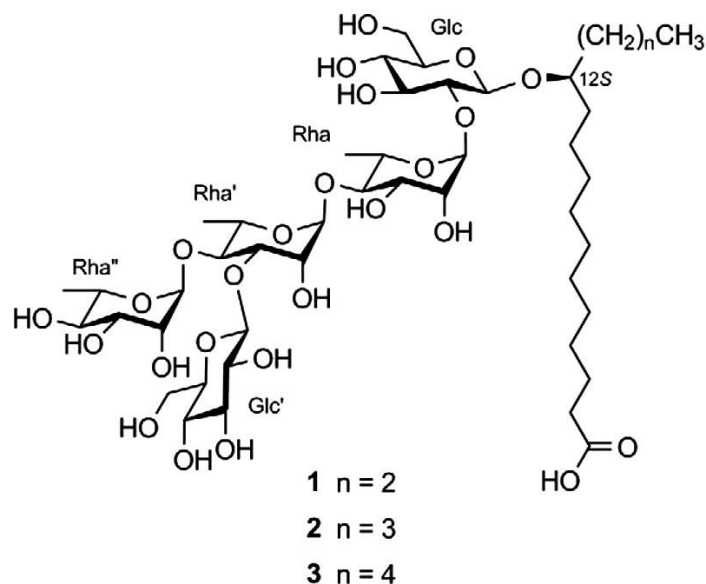
**Figura 25.** Estructura del ácido operculínico H y sus derivados esterificados. (Bo-Yi, et al., 2021)

Recientemente, el análisis de la fracción soluble en metanol del extracto de las raíces de *O. macrocarpa* se llevó a cabo generando perfiles en RMN de tres ácidos glicosídicos sin descripción previa; dos nuevos hexasacáridos, los ácidos operculínicos I y J (**Figura 19**), que resultan ser isómeros estructurales difiriendo en la posición de hidroxilación de la aglicona (Lira-Ricárdez, 2019); y un monosacárido de quinovosa del ácido 7-hidroxicanoico que fue etiquetado como el ácido operculínico K (**Figura 26**) (Lira-Ricárdez, 2019). Su hidrólisis ácida produjo una aglicona levógira ( $[\alpha]_D -3.3$ ), en concordancia con la configuración absoluta C-7(*R*) para la aglicona. Los ácidos grasos levógiros (*R*)-hidroxilados se han encontrado únicamente en dos ocasiones como agliconas o residuos acilantes en las resinas de las convolvuláceas: el ácido (-)-11*R*-hidroxihexadecanoico (ácido *ent*-jalapínico) constituyente del ácido ipomeico de *I. pes-caprae* (Sura et al., 2019) y el ácido (-)-8*R*-hidroxidodecanoico en la murucoidina X de *I. murucoides* (Chérigo & Pereda-Miranda, 2008).



**Figura 26.** Estructuras de los ácidos operculínicos I-J (A-C) de *Operculina macrocarpa* (Lira-Ricárdez, 2021)

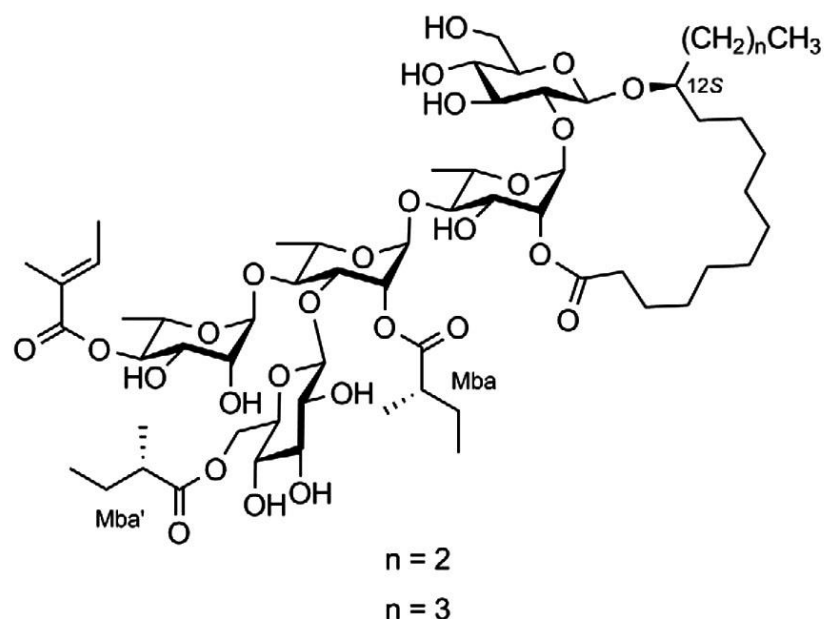
De la raíz de jalapa de la India, *Operculina turpethum* (L.) Silva Manso, también se han aislado y caracterizado resinas glicosídicas macrocíclicas intactas (Ding et al., 2012). El equipo de investigadores chinos y canadienses, encabezados por el Dr. Jian, aislaron, en primera instancia, los ácidos glicosídicos resultantes de la saponificación del extracto crudo de la jalapina. De este análisis se obtuvieron tres ácidos mayoritarios, los ácidos turpéticos A, B y C (**Figura 27**).



**Figura 27.** Estructuras de los ácidos turpéticos A-C (Ono, 2017)

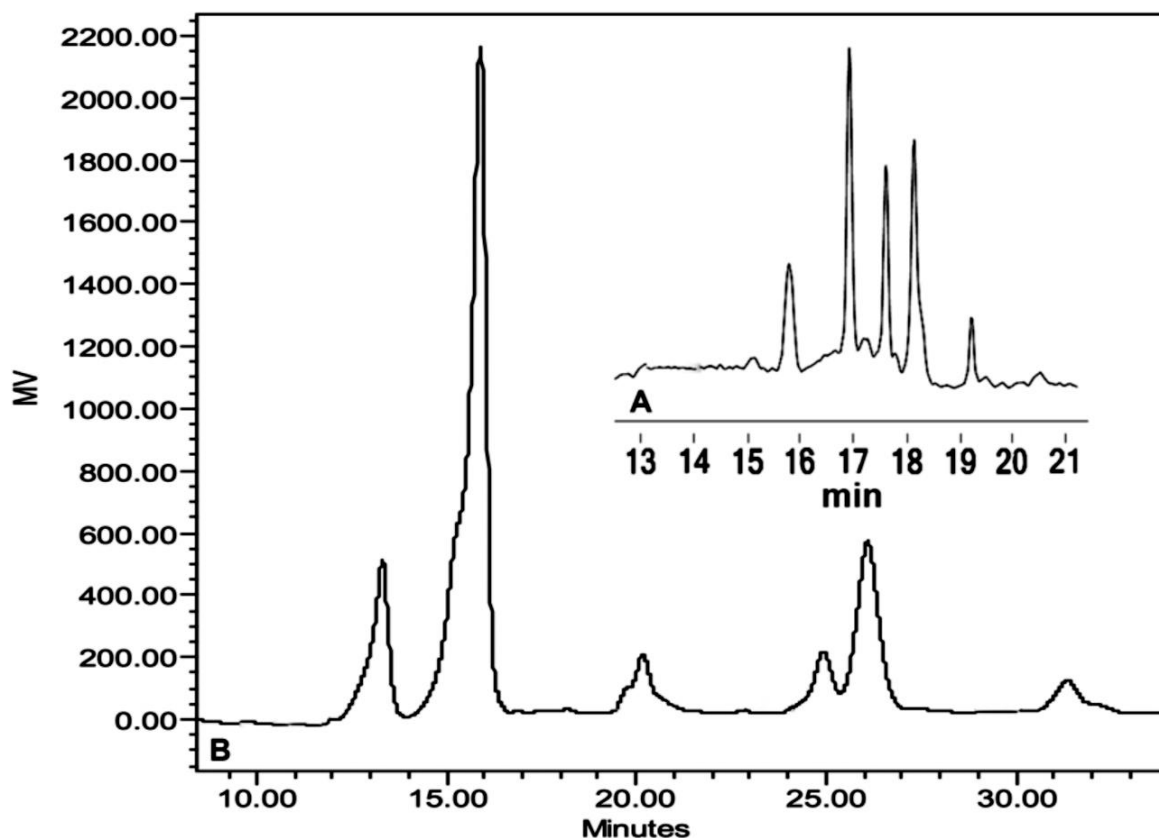
La diferencia entre estos compuestos radica en el largo de la cadena alifática de la aglicona: el ácido turpético A tiene a un ácido graso con una cadena de C<sub>15</sub>, mientras que el B una cadena de C<sub>16</sub> y el ácido C una cadena de C<sub>17</sub>. El núcleo oligosacárido común en estos ácidos glicosídicos está relacionado con los ácidos aislados por Ono en 1989; sin embargo, los ácidos turpéticos son derivados de los ácidos (12*S*)-monohidroxilados penta, hexa y heptadecanoico, mientras que los operculínicos son derivados del ácido (11*S*)-hidroxihexadecanoico. Sólo dos resinas glicosídicas intactas se aislaron y sus estructuras se caracterizaron como macrolactonas del pentasacárido acilado correspondiente al ácido operculínico B, los turpetósidos A y B (**Figura 28**). Este proceso fue posible una vez que se determinaron las estructuras de los núcleos oligosacáridos hidrolizados y mediante la comparación de las señales en sus espectros de <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C RMN por las resinas intactas.





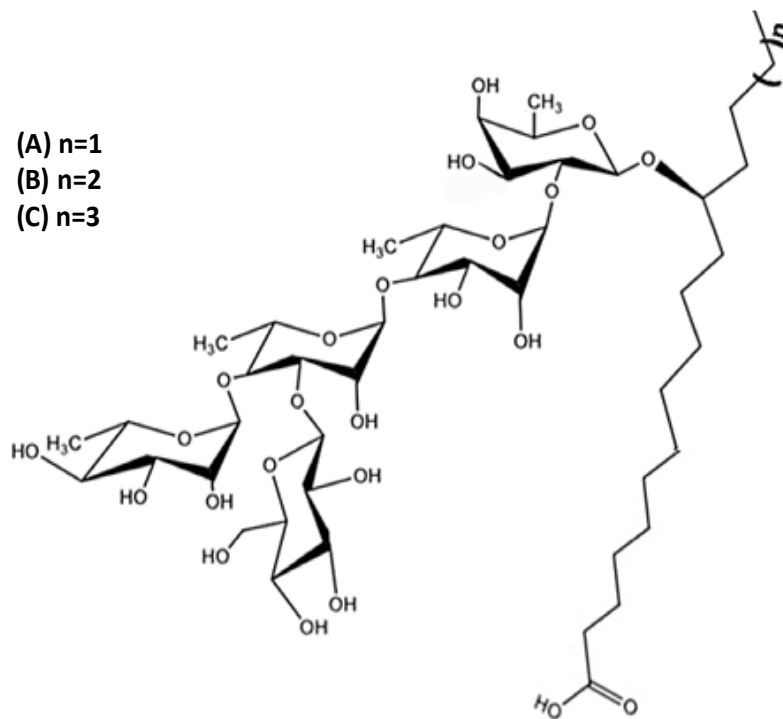
**Figura 28.** Resinas glicosídicas macrocíclicas de *Operculina turpethum* (Ono, 2017)

De la “batata de purga” de flores amarilla, *Operculina hamiltonii*, se identificaron núcleos pentasacáridos inéditos derivados de los ácidos 11S y 12S monohidroxilados. A partir del extracto saponificado y peracetilado se aislaron tres ácidos glicosídicos conocidos: los ácidos operculínicos A y B (pentasacáridos del ácido 11S-hidroxihexadecanoico) y el ácido turpético C (pentasacárido del ácido 12S-hidroxiheptadecanoico). También, se obtuvieron y caracterizaron dos ácidos glicosídicos novedosos. Se utilizó el perfil de HPLC con detección en EM-ESI para identificar las resinas conocidas y reconocer estructuras novedosas en la mezcla compleja derivatizada (**Figura 29**). La identificación de los núcleos oligosacáridos se realizó mediante la detección del ion aducto  $[M + Na]^+$  (Montiel-Ayala et al., 2021). Este análisis estructural permitió identificar el peso molecular de los derivados peracetilados para los ácidos operculínicos A ( $t_R$  15.5 min) y B ( $t_R$  13.0 min), así como para el ácido turpético C ( $t_R$  20.5 min); en dos de ellos, con el mayor tiempo de retención, la diferencia en peso con el ácido operculínico A permitió identificar a las agliconas presentes como el 12S-hidroxiheptadecanoico ( $t_R$  26.2) y el 12-hidroxiioctadecanoico ( $t_R$  31.5 min) (**Figura 30**).



$t_R$ (min)		ESIMS [M+Na] <sup>+</sup> $m/z$	Derivado peracetilado Fórmula Molecular
A	B		
15.8	13.0	1603.64565	Ácido operculínico B: C <sub>72</sub> H <sub>108</sub> O <sub>38</sub>
16.9	15.5	1545.63928	Ácido operculínico A: C <sub>70</sub> H <sub>106</sub> O <sub>36</sub> ( <b>Figura 18A</b> )
17.6	20.5	1617.65308	Ácido operculínico B + CH <sub>2</sub> : C <sub>73</sub> H <sub>110</sub> O <sub>38</sub> (ac. turpético C)
18.1	26.2	1559.65173	Ácido operculínico A + CH <sub>2</sub> : C <sub>71</sub> H <sub>108</sub> O <sub>36</sub> ( <b>Figura 18B</b> )
19.2	31.5	1573.66748	Ácido operculínico A + 2 × CH <sub>2</sub> : C <sub>72</sub> H <sub>110</sub> O <sub>36</sub> ( <b>Figura 18C</b> )

**Figura 29.** Resolución mediante HPLC de las resinas glicosídicas derivatizadas de *Operculina hamiltonii*. A: Condiciones analíticas: Columna C<sub>18</sub> (3.0 × 150 mm, 3.5 mm); fase móvil: 0.1% (v/v) HCO<sub>2</sub>H/H<sub>2</sub>O (A) y CH<sub>3</sub>CN (B); flujo: 0.25 mL/min. Gradiente: 60% B durante 30 min, 60-80% B durante 5 min, 80-100% B durante 2 min. B: Condiciones preparativas: Columna C<sub>18</sub> (19 × 300 mm, 7 μm); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (9:1), flujo: 8.0 mL/min (Montiel-Ayala et al., 2021).



**Figura 30.** Núcleos oligosacáridos minoritarios constitutivos de las resinas glicosídicas de la jalapa brasileña (*O. hamiltonii*), donde las agliconas corresponden a los ácidos grasos monohidroxiados: A) 12*S*-hidroxihexadecanoico; B) ácido 12*S*-hidroxihexadecanoico; C) ácido 12*S*-hidroxioctadecanoico. (Montiel-Ayala et al., 2021).

## 2.5 Importancia biológica

La trascendencia del uso tradicional que se le ha dado a la jalapa ha llamado la atención de la comunidad científica no sólo por conocer la composición química de la planta, sino por indagar más allá de los efectos purgantes ya conocidos de los preparados fitoterapéuticos a partir de la droga cruda de estas especies. Las resinas glicosídicas aumentan la permeabilidad de la membrana celular a cationes y aniones (Zhu et al. 2019b) para desencadenar un desequilibrio en la homeostasis celular a través de una actividad formadora de poros actuando como laxantes osmóticos al producir eliminación de agua y peristaltismo del intestino. La acción purgante también se atribuye a la activación del factor nuclear kappa  $\beta$  en el colon, que aumenta la secreción mediada por ciclooxigenasa-2 de la prostaglandina  $E_2$ , resultando en la disminución de la expresión de acuaporina-3 que inhibe el agua absorbida

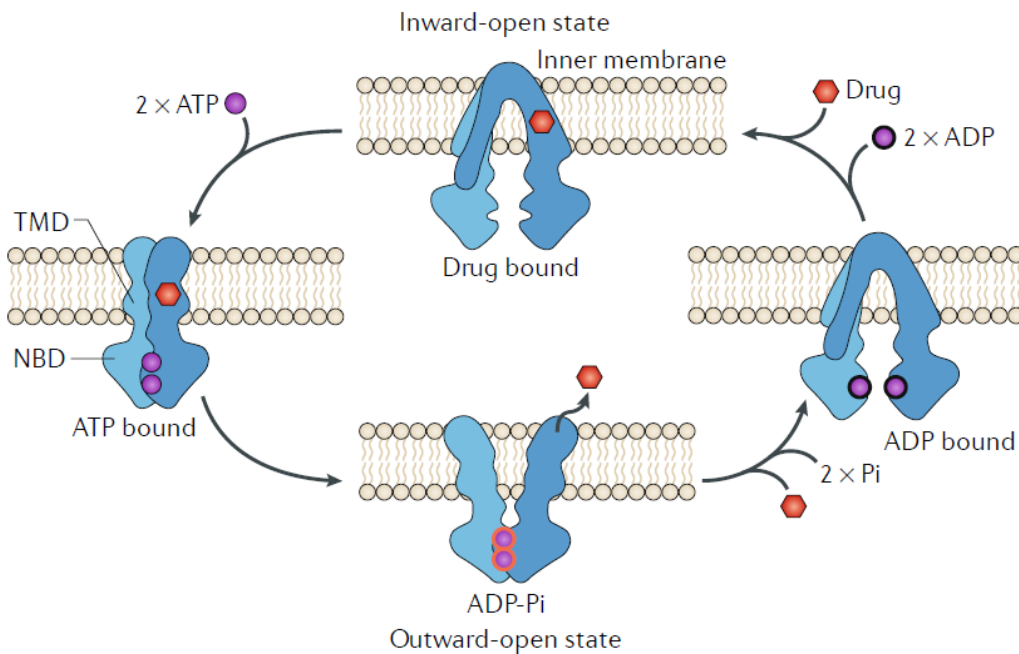
desde el intestino hasta el vaso sanguíneo (Zhu et al. 2019a). Se han estudiado diversas actividades biológicas de las resinas glicosídicas, metabolitos a los que se le atribuye gran parte de los efectos terapéuticos de las jalapas, resaltando su actividad citotóxica, antifúngica, antibacteriana, anticonvulsivo, antidepresivo, vasorrelajante y efectos de modulación sobre la resistencia cruzada a los fármacos terapéuticos de uso clínico en líneas derivadas de tumores humanos (Pereda et al., 2010).

### **2.5.1 Efecto modulador sobre la MDR**

La quimioterapia es uno de los tratamientos más efectivos contra el cáncer, sin embargo, su éxito se ha visto aminorado debido al desarrollo de la multirresistencia a los fármacos (MDR, “multiple drug resistance”) en las células tumorales. La MDR se manifiesta debido al tratamiento continuo con agentes antineoplásicos y se conocen varios mecanismos a través de los cuáles las células adquieren resistencia hacia los fármacos quimioterapéuticos: i) incremento en la extrusión de los fármacos a través de la expresión de bombas de eflujo transmembranales, tales como la Gp-P codificada por la familia de genes ABCB1; ii) decremento en el reconocimiento de los fármacos por los transportadores celulares; iii) activación de enzimas de la fase II que metabolizan rápidamente los fármacos tales como el citocromo P450 y la glutatión S-transferasa para la eliminación de los fármacos; iv) activación de sistemas de reparación de DNA y v) evasión de la apoptosis celular. Los primeros tres procesos promueven el desarrollo de la MDR previniendo la acumulación de altas concentraciones del fármaco (xenobióticos) en el medio intracelular (Cho & Kim, 2020).

La presente disertación se enfoca en el fenómeno de las bombas de eflujo, específicamente de los transportadores (ABC: ATP-binding cassette) de células humanas, las cuáles se expresan normalmente en células especializadas como las que se encuentran en el hígado; sin embargo, representan un problema cuando se expresan en las células cancerosas, ya que son proteínas integrales de muy poca especificidad lo que les facilita la eliminación de un sinnúmero de compuestos antineoplásicos de uso clínico que pueden o no estar relacionados estructural y mecánicamente en su efecto (**Figura 31**), disminuyendo así su efectividad (Cho & Kim, 2020).

La **Figura 31** ilustra el mecanismo de acción para los transportadores ABC de las células de mamíferos. Se muestra el modelo de transporte alterno con el movimiento de los protómeros en forma de pinza a través de la membrana celular, que alternan entre una conformación abierta hacia adentro y hacia afuera del citoplasma para translocar los sustratos a través de la bicapa membranal. Los dominios transmembranales (TMD) de los transportadores ABC que comprenden al sitio catalítico de unión al sustrato y al dominio de unión a nucleótidos (NBD) se unen para hidrolizar al ATP y, de esta forma, impulsar el ciclo del transporte y extrusión de los fármacos. Los cambios conformacionales están vinculados a la dimerización y disociación del NBD, que están mediados por la unión e hidrólisis del ATP (Du et al., 2018).



**Figura 31.** Esquema general de los transportadores ABC y las distintas conformaciones que ocurren durante la extrusión de fármacos fuera del citoplasma celular (Du et al., 2018).

El desarrollo de métodos bioquímicos para contrarrestar la expresión de la MDR en células cancerosas ha dado como resultado el descubrimiento de metabolitos moduladores de la actividad de los transportadores activos ABC, tal es el caso de los ensayos de modulación de las resinas glicosídicas sobre líneas resistentes de células cancerosas humanas (Figueroa-González et al., 2011; Lira-Ricárdez & Pereda-Miranda, 2020).

Estudios recientes demuestran que existe una amplia relación entre la estructura anfipática de las resinas glicosídicas y su actividad moduladora sobre los sitios catalíticos de la Gp-P y algunos transportadores ABC. Tal es el caso de la tricolorina A, un tetrasacárido macrocíclico aislado de *Ipomoea tricolor* que incrementa la susceptibilidad de las células MCF-7/Vin a la vinblastina con un factor de reversión de 270 ( $RF_{MCF-7/Vin+} = CI_{50} \text{ vinblastina} / CI_{50} \text{ vinblastina en la presencia del glicolípido de prueba}$ ); reserpina  $RF_{MCF-7/Vin+} = 19$ ) (Figuroa-González, 2012) cuando se incorporó a una concentración de 10  $\mu\text{M}$  (Lira-Ricárdez, 2019). Un estudio de acoplamiento molecular se utilizó para definir los sitios de enlace de la tricolorina A con modelos homólogos de la Gp-P humana, encontrándose una alta afinidad por el dominio 2 citosólico de enlace a los nucleótidos ( $E_f = -6.5 \text{ kcal/mol}$ ;  $K_i = 17.5 \mu\text{M}$ ) (Lira-Ricárdez, et al., 2019). Se han aislado también de *D. repens*, *M. hederacea* y de *I. muricata* un buen número de resinas glicosídicas con efecto modulador sobre la MDR, las cuáles incrementaron significativamente la citotoxicidad de la vincristina en un factor de 1.03-407.1 a una concentración de 25 $\mu\text{M}$  (Song, et al., 2015; Wang, et al., 2018, 2014). Adicionalmente, algunas estructuras no macrolactónicas, tales como la calonicina J y la merremina F, también mostraron un efecto modulador, lo cual indica que la estructura macrocíclica de las resinas glicosídicas no es esencial para el efecto modulador sobre la MDR (Yu, et al., 2011; Wang, et al., 2014).

En la Facultad de Química (UNAM), el equipo de trabajo del Dr. Pereda ha evaluado el efecto modulador de un gran número de resinas glicosídicas inéditas. Como resultado de estos estudios han surgido un gran número estructuras con importante efecto modulador de la susceptibilidad a la vinblastina de 1 a >1500 veces a las concentraciones de 1 a 25  $\mu\text{g/mL}$  (Figuroa-González, 2012). Así, la murucoidina V, la purgina II, el jalapínosido A y el albinósido III resultaron potentes agentes de reversión en ensayos *in vitro*. La disminución en la expresión de la G mediada por la murucoidina V y la purgina II se detectó por inmunofluorescencia y medida por citometría de flujo después de incubar los compuestos de prueba con un anticuerpo monoclonal anti Gp-P (Lira-Ricárdez & Pereda-Miranda, 2020). El desarrollo de las resinas glicosídicas como potentes inhibidores de la P-gp con una baja citotoxicidad, es una alternativa para superar la interferencia indeseable de esta familia de Gp-P presente en las células de mamíferos y que se expresa en las células malignas bajo exposición a las quimioterapias.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

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

### **4. HIPÓTESIS**

Los extractos preparados a partir de las muestras comerciales presentan un alto y complejo contenido de resinas glicosídicas biodinámicas cuyo aislamiento y purificación se llevará a cabo mediante técnicas analíticas avanzadas. La obtención de las moléculas puras permitirá caracterizarlas mediante su información espectroscópica (EM y RMN) y así poder relacionar su estructura molecular con sus actividades sinérgicas con agentes quimioterapéuticos de uso clínico en tratamientos antineoplásicos sobre células resistentes de cáncer humano.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Establecer un método analítico en HPLC a escala semipreparativa para la óptima resolución de los compuestos mayoritarios del extracto diclorometánico obtenido a partir de las raíces trituradas de una muestra comercial obtenida bajo el nombre “batata de purga en polvo” y en el extracto obtenido con una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1) de las raíces pulverizadas de la jalapa brasileña para la obtención de mezclas de menor complejidad que permitan la purificación y caracterización estructural de resinas glicosídicas inéditas.

### 5.2 Objetivos específicos

#### 1. Elucidación estructural:

La elucidación estructural se realizará mediante la resonancia magnética nuclear. Se realizará el análisis de las resinas glicosídicas purificadas mediante HPLC utilizando la RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en 1D y 2D para establecer la estructura molecular de cada uno de los compuestos purificados.

#### 2. Evaluación del potencial sinérgico:

Se evaluará el efecto sinérgico de los compuestos de prueba utilizando concentraciones subinhibitorias ( $\text{IC}_{50} < 10 \mu\text{g/mL}$ ) en combinación con vinblastina utilizando células MCF-7/Vin y mediante el empleo del protocolo descrito para la actividad citotóxica



## 6. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

### 6.1 Preparación del extracto orgánico

Los extractos de las muestras etiquetadas como Jalapa 2000 (muestra comercial de jalapa pulverizada, Figura 10C), quilombos y rurópolis se obtuvieron a partir de la maceración de la droga cruda usando mezclas de disolventes  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -MeOH (1:1). El extracto se sometió a un fraccionamiento primario haciendo uso de una columna de vidrio empacada con sílice 60. Este procedimiento se monitoreó con CCF obteniéndose diferentes fracciones menos complejas y ricas en resinas glicosídicas.

Las raíces de jalapa (muestra etiquetada como batata de purga) se adquirieron ya pulverizadas (Figura 26) en pequeñas bolsas de aproximadamente 200 g cada una. Se pesaron un total de 900 g, los cuáles fueron sometidos a varios procesos de maceración exhaustiva haciendo uso de los disolventes  $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ ,  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ , MeOH en un gradiente de polaridad creciente. Cada extracto se llevó a sequedad en una bomba de vacío para su posterior análisis.

### 6.2 Métodos cromatográficos

El fraccionamiento primario del extracto orgánico se realizó mediante CCA. Para ello, se empleó una columna de vidrio de 60 cm de largo por 15 cm de diámetro, empacada con gel sílice 60, de tamaño de partícula de 0.063-0.200 mm, (Merck). Como fase móvil se emplearon los disolventes:  $n\text{-C}_6\text{H}_{14}$ , diclorometano, acetona, metanol, y mezclas proporcionales entre estos de mayor polaridad. Con el fin de identificar las fracciones que contenían los compuestos de interés, éstas se analizaron a través CCF, usando cromatoplasmas metálicas recubiertas con gel sílice  $\text{F}_{254}$  (Merck) y un sistema de elución que consistió en una mezcla de acetona-metanol (9:1). Como agente cromógeno se utilizó sulfato cérico en ácido sulfúrico y se calentaron a 80 °C para el desarrollo de coloración.

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

### 6.3 Material vegetal

El **Cuadro 3** resume las muestras comerciales y las colectas en el campo que se analizaron en el presente proyecto:

**Cuadro 3.** Muestras analizadas

Muestra	Nombre de la muestra	Descripción
1	Jalapa 2000	Muestra adquirida
2	Quilombos	Muestra colectada en el campo
3	Rurópolis	Muestra colectada en el campo
4	Batata de purga en polvo ( <b>Figura 32</b> )	Muestra adquirida

El material vegetal se identificó por la Dra. Suzana Leitão (Facultad de Farmacia, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil) mediante la comparación con las características anatómicas macroscópicas para las colectas y microscópicas para los productos comercializados pulverizados descritas para esta especie (Michelin Carvalho et al., 2010).



**Figura 32.** Muestra comercial de raíces pulverizadas de la jalapa brasileña, batata de purga o jalapa en polvo. Producto adquirido vía internet en el sitio de la tienda de alimentos naturales Mercado Natural, São Paulo, SP, Brasil.

### 6.4 Fraccionamiento primario de los extractos.

Con la finalidad de aislar la mayor cantidad de resinas posible y tras haber analizado cada extracto con herramientas cromatográficas y espectrométricas, se reunieron los extractos hexánico y diclorometánico para su fraccionamiento, el cual se llevó a cabo mediante una técnica de CCA, empacándose la columna con 500 g de sílice y como fase móvil se emplearon diversas mezclas de disolventes (**Cuadro 5**).

Para dar inicio a la elución, se empleó como fase móvil hexano, obteniéndose 5 eluatos de aproximadamente 200 mL cada uno. Posteriormente, se incrementó la polaridad de la fase móvil a través de mezclas en diferentes proporciones de CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-Me<sub>2</sub>CO, Me<sub>2</sub>CO-MeOH. La técnica de CCF se empleó en este proceso con el fin de monitorear la elución de la columna para, finalmente, reunir los eluatos que presentaron una similitud cromatográfica.

**Cuadro 4.** Fases móviles usadas en los fraccionamientos primarios.

<b>Eluato</b>	<b>Disolvente</b>	<b>Proporción</b>
<b>1</b>	Hexano	100
<b>2</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Me <sub>2</sub> CO	4:1
<b>3</b>	CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> - Me <sub>2</sub> CO	1:1
<b>4</b>	Me <sub>2</sub> CO - CH <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>	4:1
<b>5</b>	Me <sub>2</sub> CO	100
<b>6</b>	Me <sub>2</sub> CO - MeOH	4:1
<b>7</b>	Me <sub>2</sub> CO - MeOH	1:1
<b>8</b>	MeOH - Me <sub>2</sub> CO	4:1
<b>9</b>	MeOH	100

## **6.5 Purificación y caracterización**

### **6.5.1 Obtención de los perfiles cromatográficos**

Con base en el análisis cualitativo de las fracciones que se obtuvieron del primer fraccionamiento, se eligieron aquellas donde, de acuerdo con su coloración al ser reveladas y su polaridad, se encontraban los compuestos de interés. Para ello se empleó la técnica HPLC en fase reversa (C-18) a escala analítica con la intención de encontrar las condiciones instrumentales que permitieran la óptima separación y purificación de las resinas. Una vez

determinadas las condiciones a escala analítica donde los compuestos se definieran mejor, éstas fueron extrapoladas a escala preparativa con la siguiente ecuación:

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

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

La técnica “corte de núcleo” se usó sobre el cromatograma obtenido con el fin de obtener mezclas de menor complejidad y, posteriormente, purificar los compuestos mayoritarios de éstas.

### 6.5.2 Determinación de constantes físicas y propiedades espectroscópicas

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

### 6.6 Evaluación biológica

**Pruebas de citotoxicidad:** Se utilizaron las líneas celulares derivadas de carcinomas humanos siguientes: colorrectal (HCT-116), cervical (Hela) y de mama (MCF-7). El estudio se realizó de acuerdo con las técnicas implementadas por el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos (Figuroa-González, 2012). Estas líneas se cultivaron en medio de suero bovino fetal a 37 °C bajo atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5% en aire y 100% de humedad relativa. Las células en fase *log* de su ciclo de crecimiento se sometieron por triplicado a diferentes concentraciones de las muestras a evaluar (0.16 a 20  $\mu\text{g/mL}$ ) y se incubaron durante 72 h en las condiciones antes mencionadas. Se usaron microplacas de 96 pozos con capacidad para 1.7 mL con 190  $\mu\text{L}$  de suspensión celular (25,000 cel/mL) y 10  $\mu\text{L}$  de la muestra disuelta en DMSO en diferentes concentraciones (0.02-2.0  $\mu\text{g/mL}$  para los compuestos puros). De la

misma manera, se preparó un control con suspensión celular. Se utilizaron como controles positivos vinblastina y colchicina. Se determinó la concentración celular mediante la cuantificación de las proteínas totales utilizando el método de tinción con la sulforodamina B a través de un lector para ELISA a 564 nm. Se calculó la  $IC_{50}$  de cada compuesto a partir de una gráfica semilogarítmica de la concentración de la muestra problema ( $\mu M$  en contra del porcentaje de inhibición del crecimiento celular. Los compuestos con una  $CI_{50} \leq 4 \mu g/mL$  se consideraron como activas

**Ensayos de modulación:** Los efectos de modulación se determinaron con el mismo método que para los ensayos de citotoxicidad. Las líneas MCF-7 sensible y MCF-7/Vin se sembraron en placas de 96 pozos y fueron tratadas con varias concentraciones de vinblastina (0.00064 – 10  $\mu g/mL$ ) en presencia o ausencia de glicolípidos aislados y descritos en este proyecto a 20 y 5  $\mu g/mL$  por 72 h. La habilidad de los glicolípidos para potenciar la citotoxicidad de la vinblastina se determinó a partir de la obtención de la  $CI_{50}$ . En estos experimentos se utilizó reserpina (5  $\mu g/mL$ ) como control positivo. El factor de reversión (FR) como un parámetro de potencia se calculó dividiendo la  $CI_{50}$  de la vinblastina entre la  $CI_{50}$  de la vinblastina en presencia del compuesto de prueba.

**Pruebas de sinergismo:** Las pruebas de sinergismo se hicieron manteniendo a las células con el mismo procedimiento descrito para citotoxicidad. El medio se cambió cada dos días añadiendo tripsina (0.25% tripsina-EDTA). Un total de 200  $\mu L$  de células HeLa (5000 c/w), células HT-29 (7500 c/w), o células MCF-7/Vin (5000 c/w) fueron depositadas en placas de 96 placas y se dejaron fijar durante la noche antes del ensayo con los compuestos. Después de 24 h, el medio de cultivo celular se reemplazó con 200  $\mu L$  del medio suplementado conteniendo al compuesto con diferentes concentraciones (30, 25, 20, 15, 10, 5 y 1  $\mu M$ ) y a la vinblastina en 0.003 y 0.0001  $\mu M$  (ambas concentraciones subinhibitorias). Para la cepa resistente MCF-7/Vin, la vinblastina se probó a 0.4  $\mu M$ . Las células se expusieron a este medio durante 48 h, monitoreadas por un ensayo de SRB. Los resultados se expresan como la concentración que inhibe el 50% del crecimiento celular después del periodo de incubación ( $CI_{50}$ ). Los valores fueron estimados a partir de un gráfico semilogarítmico de la concentración del compuesto ( $\mu M$ ) contra el porcentaje inhibición de crecimiento.

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Preparación del extracto orgánico

Jalapa (Mercado 2000): De los 868.5 g de la muestra comercial pulverizada que fueron sometidos a maceración exhaustiva, se obtuvieron 48.8 g del extracto seco. Quilombos: De 600 g de muestra, se obtuvieron 35.6 g de extracto seco. Rurópolis: De 900 g de muestra, se obtuvieron 47.9 g de extracto seco. Batata de purga (Mercadão Natural): A partir de 900 g de raíz pulverizada de jalapa, y tras haber reunido los extractos hexánico y diclorometánico, se obtuvo una muestra de 49 g.

### 7.2 Fraccionamiento primario del extracto orgánico

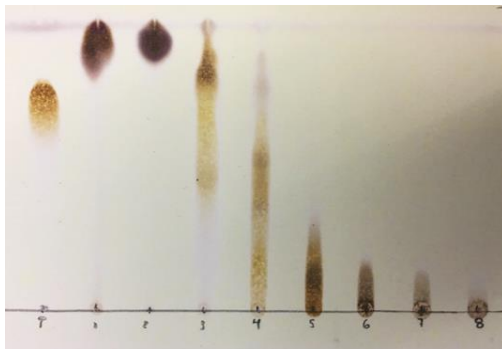
Cada uno los extractos se sometieron a un fraccionamiento en CCA. En el **Cuadro 5** se enlistan las fracciones obtenidas tras haber eluido en su totalidad la columna con las fases móviles previamente descritas en el **Cuadro 4** en la sección de metodología experimental.

**Cuadro 5.** Rendimientos del fraccionamiento primario de todas las muestras

Clave	Peso (g)			
	Mercado 2000	Quilombos	Rurópolis	Batata de purga
<b>F1</b>	1.95	1.05	0.8	0.04
<b>F2</b>	3.61	0.88	0.702	1.71
<b>F3</b>	4.13	1.87	2.2	2.18
<b>F4</b>	4.13	0.91	0.42	1.57
<b>F5</b>	5.17	1.66	2.83	0.69
<b>F6</b>	3.56	0.63	0.52	2.67
<b>F7</b>	4.76	0.1	1.61	2.93
<b>F8</b>	1.13	0.34	15.88	3.53
<b>F9</b>		5.11	6.32	7.1
<b>F10</b>		3.8	4.65	7.9
<b>F11</b>		3.62	10.7	10.7
<b>F12</b>		3.51	6.24	2.61

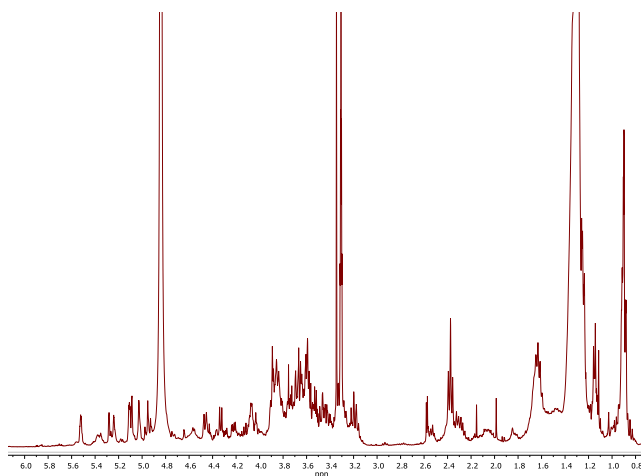
### 7.2.1 Raíz de jalapa (Mercado 2000)

El fraccionamiento primario del extracto obtenido a partir de la muestra comercial de Jalapa Mercado 2000, dio como resultado 8 fracciones de menor complejidad. El análisis llevado a cabo mediante CCF (**Figura 33**), reveló dos fracciones ricas en resinas glicosídicas (F3 y F4) de acuerdo con su coloración comparada con la muestra control de la tricolorina A (Castañeda-Gómez, 2019). Se usó como fase móvil una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2 - \text{CH}_3\text{OH}$  (1:1).



**Figura 33.** CCF del fraccionamiento primario del extracto orgánico. Carriles: T = tricolorina A, control de polaridad; 1-8 = fracciones F1-F8 generadas durante el fraccionamiento.

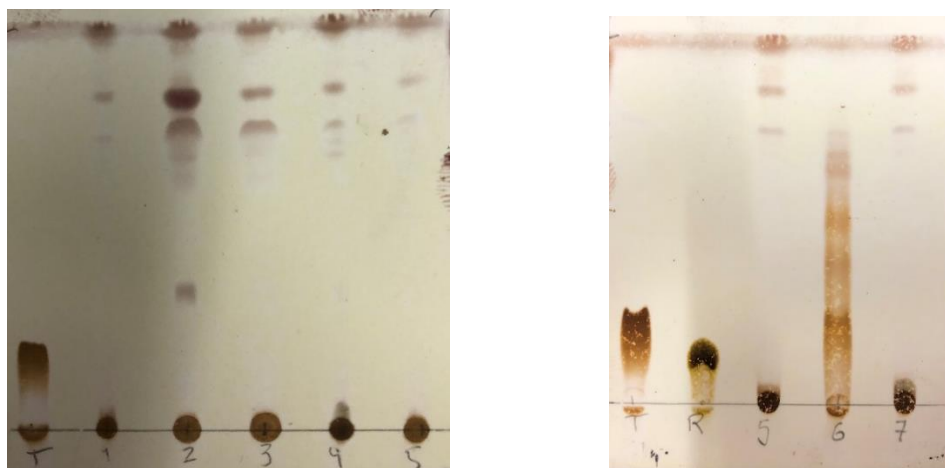
Para obtener información acerca del contenido de resinas glicosídicas presentes en las fracciones de interés, se obtuvo el espectro de RMN- $^1\text{H}$  de cada una. En la **Figura 34**, se detectaron señales tanto alifáticas para los residuos de ácidos grasos de las agliconas (0.8-2.5 ppm), así como las características para los protones oxigenados (3.2 - 4.4 ppm) y las propias de señales anoméricas (4.2 - 5.6 ppm), lo que es un buen indicio de la presencia de glicolípidos en la F4 y en la F3.



**Figura 34.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en piridina- $d_5$  de la fracción F4.

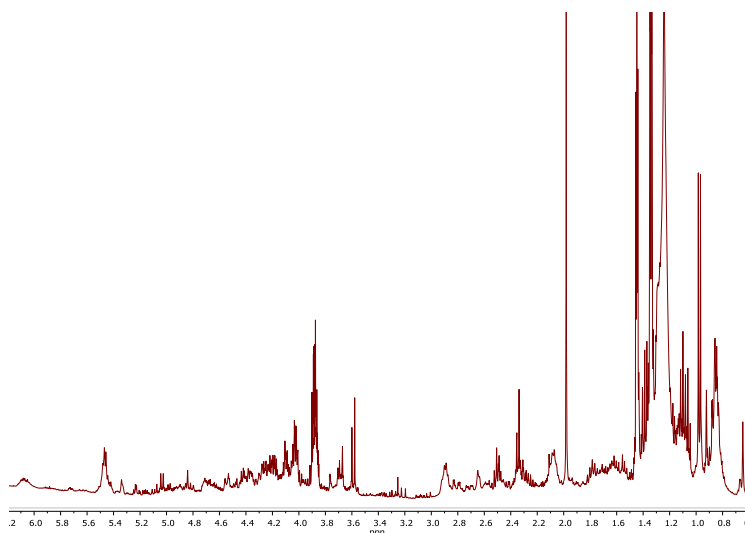
## 7.2.2 Raíz de jalapa (Quilombos)

El fraccionamiento primario del extracto obtenido a partir de la muestra colectada en los Quilombos generó 7 fracciones de menor complejidad. El análisis llevado a cabo mediante CCF (**Figura 35**) usó una fase móvil de una mezcla de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$  (4:1).



**Figura 35.** CCF del fraccionamiento primario del extracto orgánico. Carriles: T = tricolorina A, control de polaridad; 1-7 = fracciones F1-F7 generadas durante el fraccionamiento.

El análisis preliminar del espectro de RMN- $^1\text{H}$  de las subfracciones elegidas por CCF, permitió confirmar la presencia de resinas glicosídicas en la mezcla, debido a que en el espectro se apreciaron señales características para las moléculas de interés (**Figura 36**).



**Figura 36.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en piridina- $d_5$  de la fracción F6.



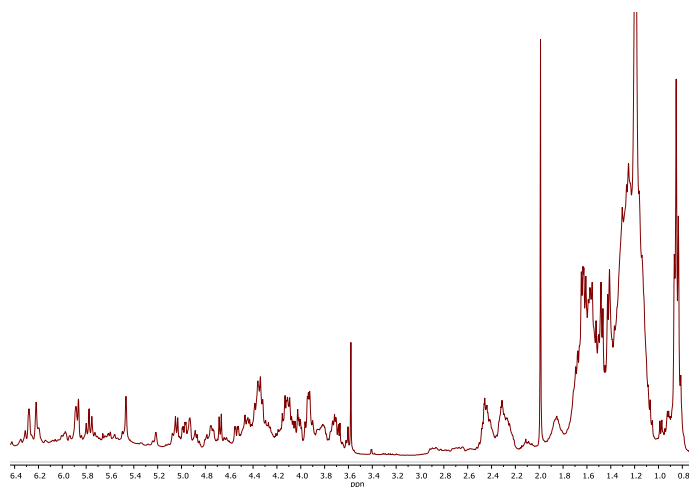
### 7.2.3 Raíz de jalapa (Rurópolis)

El fraccionamiento primario del extracto obtenido a partir de la muestra colectada en Rurópolis dio como resultado 7 fracciones de menor complejidad. El análisis llevado a cabo mediante CCF (**Figura 37**) usó una fase móvil de  $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$  (13:7) para analizar las fracciones más polares ricas en resinas glicosídicas.



**Figura 37.** CCF del fraccionamiento primario del extracto orgánico. Carriles: T = tricolorina A, control de polaridad; 1-7 = fracciones F1-F7 generadas durante el fraccionamiento.

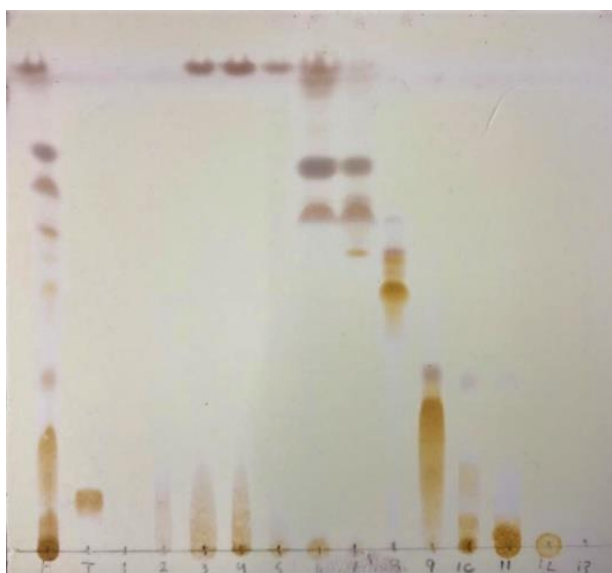
Al igual que en las muestras anteriores, el análisis del espectro de RMN- $^1\text{H}$  permitió elegir las fracciones 9-11 ricas en resinas glicosídicas con base en las señales características observadas (**Figura 38**).



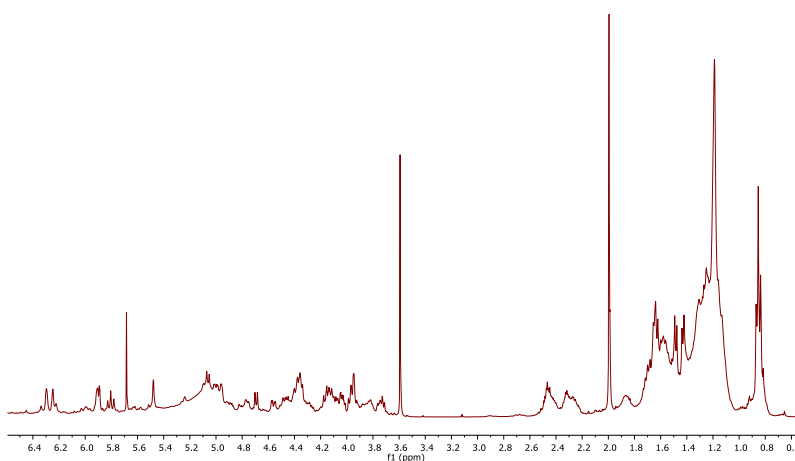
**Figura 38.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en piridina- $d_5$  de la fracción F6

#### 7.2.4 Batata de purga (Mercadão Natural)

La CCF permitió identificar las fracciones ricas en resinas de acuerdo con la coloración observada en la cromatoplaca una vez revelada, obteniéndose así los espectros de RMN  $^1\text{H}$  para el análisis de las señales inherentes a la estructura de las moléculas en estudio. Este análisis llevó a la conclusión que la fracción 9 tenía un alto contenido de resinas glicosídicas de acuerdo tanto a la CCF como a las señales identificadas en el espectro de RMN (**Figura 39**).



**Figura 39.** CCF del fraccionamiento primario del extracto orgánico. Carriles: T = tricolorina A, control de polaridad; 1-7 = fracciones F1-F7 generadas durante el fraccionamiento.



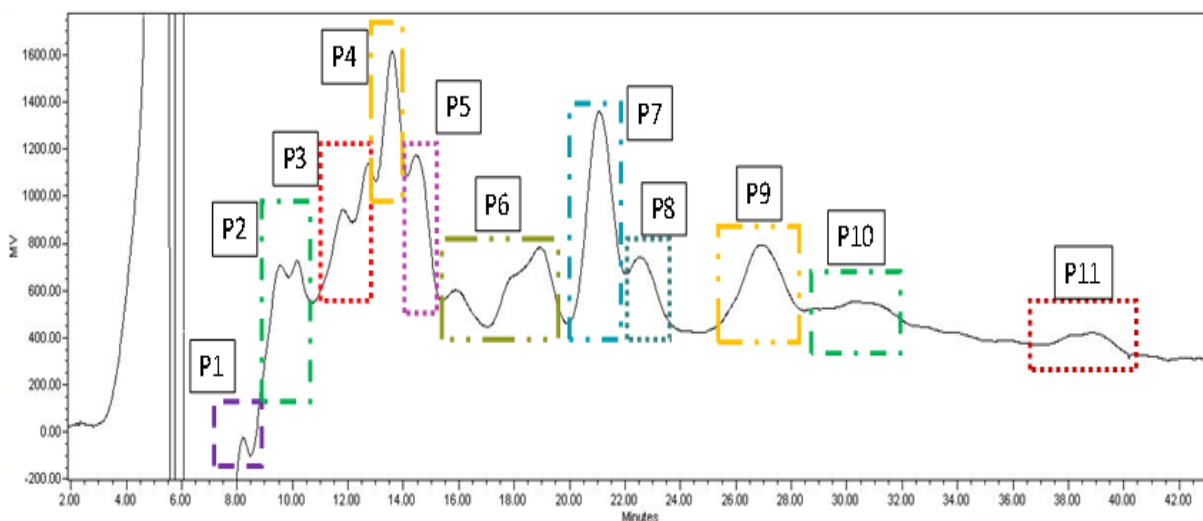
**Figura 40.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  en piridina- $d_5$  de la fracción F9.

### 7.3 Obtención de los perfiles cromatográficos a escala analítica y preparativa

A pesar de que se confirmó la presencia de resinas glicosídicas en todas las muestras de la batata de purga, es decir muestras auténticas (la raíz de jalapa colectadas en los quilombos y en Rurópolis) y las comerciales (jalapa Mercado 2000 y batata de purga Mercadão Natural), sólo se caracterizaron las resinas intactas de las muestras comerciales.

#### 7.3.1 Jalapa (Mercado 2000)

Las condiciones instrumentales analíticas que resultaron óptimas para la resolución de la fracción F4 mediante la obtención de una máxima resolución del perfil cromatográfico, se extrapolaron a nivel preparativo con el fin de aislar los componentes individuales de este producto comercial. Las condiciones finales fueron: columna Waters Symmetry C-18 ( $19 \times 300$  mm,  $7 \mu$ ); fase móvil:  $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$  (17:3); flujo: 8.00 mL/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 1024); volumen de inyección: 500  $\mu\text{L}$  (50 mg/500  $\mu\text{L}$  en metanol).



**Figura 41.** Perfil cromatográfico a escala preparativa de la fracción F4, donde se muestran los picos aislados mediante la técnica “corte de núcleo”

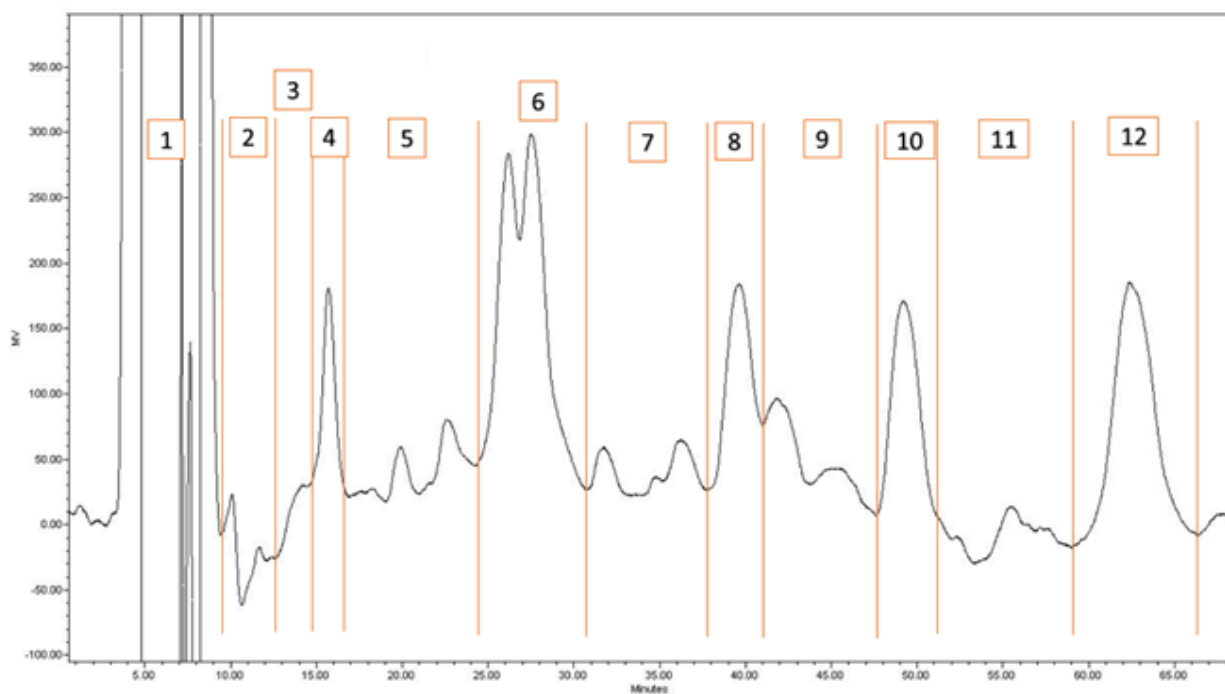
Tras haber realizado 20 inyecciones con un volumen de 500  $\mu\text{L}$  [0.1mg/ $\mu\text{L}$ ] de la muestra problema (F4) y después de haber cortado cada uno de los picos como se muestra en la **Figura 22**, se lograron obtener once fracciones de una complejidad menor. En el **Cuadro 6** se especifican las cantidades obtenidas de cada una de los eluatos colectados.

**Cuadro 6** Rendimientos del fraccionamiento de F4.

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

### 7.3.2 Batata de Purga (Mercadão Natural)

La fracción F9 se sometió a un análisis en HPLC con la intención de obtener un perfil cromatográfico (**Figura 42**) que permitiera la separación óptima de la mezcla de resinas glicosídicas. El perfil que mostró una mejor resolución de los picos se obtuvo con las siguientes condiciones: Columna C-18 Symmetry (19  $\times$  300 mm, 7  $\mu$ ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (17:3); flujo: 8.00 mL/min; detector: índice de refracción (sensibilidad 1024); volumen de inyección: 500  $\mu\text{L}$  (50 mg/500  $\mu\text{L}$  en metanol). El cuadro 6 resume los rendimientos que se obtuvieron tras agotar totalmente la fracción nueve (48 g) correspondiente al extracto diclorometánico de las raíces de jalapa.



**Figura 42** Perfil cromatográfico preparativo en fase de la fracción F9.

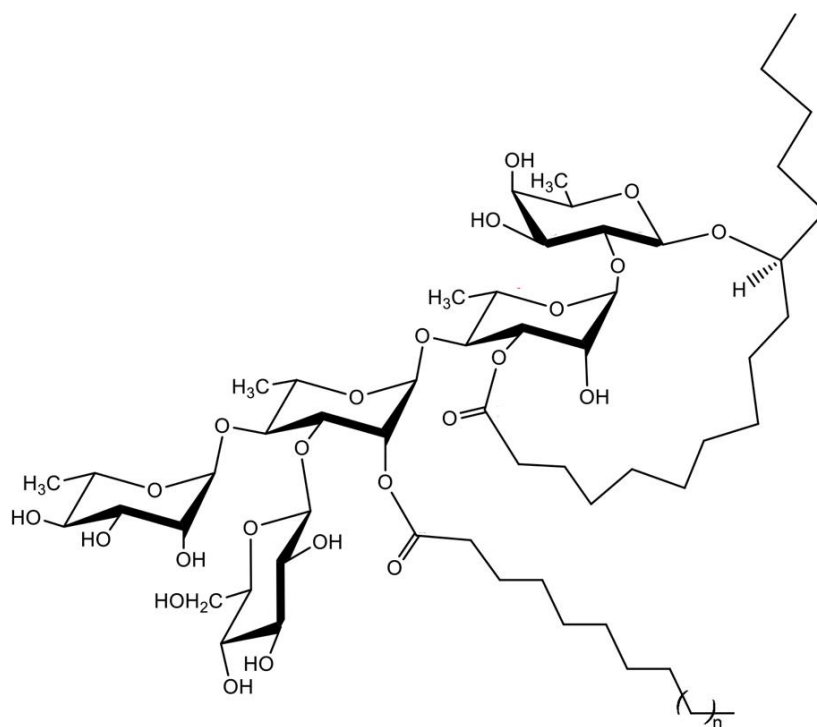
**Cuadro 7.** Rendimiento del fraccionamiento de la fracción F9

<b>Pico</b>	<b>t<sub>R</sub> (min)</b>	<b>Cantidad (mg)</b>
P1	8.4	112
P2	10.3	41.1
P3	12.5	16.1
P4	13.2	23.5
P5	14.6	47.1
P6	15.0-19.8	27.8
P7	21.2	31.6
P8	22.5	40.1
P9	26.8	35.8
P10	31.2	51.1
P11-12	37.6-40.0	74.2

## 7.4 Purificación de los constituyentes individuales

### 7.4.1 Resinas glicosídicas de la jalapa (Mercado 2000)

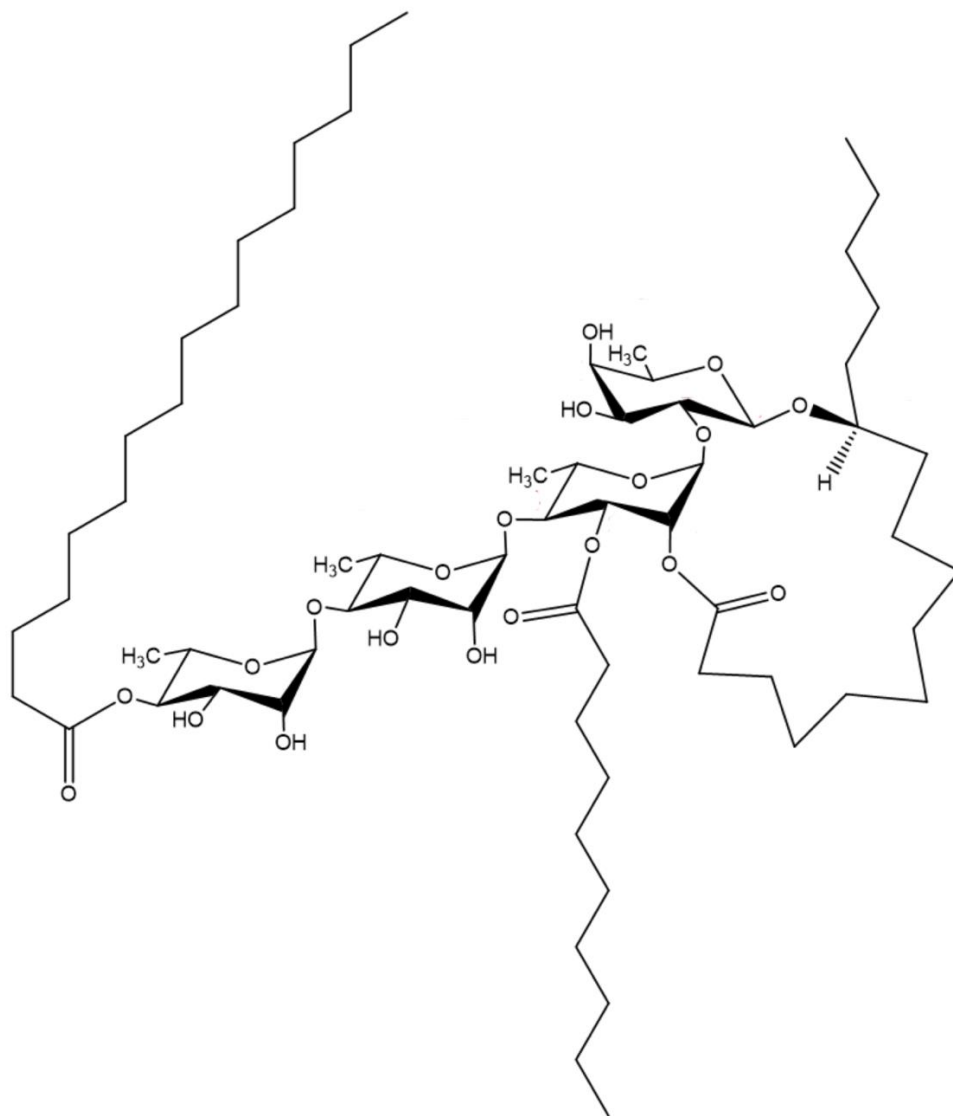
Los constituyentes individuales etiquetados como **F4P4** y **F4P7** (Moreno-Velasco, 2018) fueron purificados de la jalapa comercial (Mercado 2000) y sus estructuras caracterizadas como pentasacáridos macrocíclos del ácido operculínico A monoesterificados por los ácidos *n*-decanoico (**F4P4**) o *n*-dodecanoico (**F4P7**) (Moreno-Velasco, 2019). Estos compuestos también se purificaron originalmente de la raíz del camote, *I. batatas* (Rosas-Ramírez, 2013) y se reconocen en la literatura fitoquímica bajo los nombres triviales de los batatinósidos IV (F4P4) y IX (F4P7), su estructura se ilustra en la **Figura 43**.



**Figura 43.** Macrolactonas pentasacáridas purificadas de la raíz de jalapa. F4P4,  $n = 1$  (batatinósidos IV); F4P7,  $n = 2$  (batatinósidos IX).

El compuesto etiquetado como **F3P9** se nombró como la hamiltonina I y la descripción de su purificación y elucidación estructural se describió inicialmente por Flores-Tafoya (2020). 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 macrocíclica derivada del ácido operculínico C en la familia de las convolvuláceas con el ácido *n*-hexadecanoico como residuo acilante.



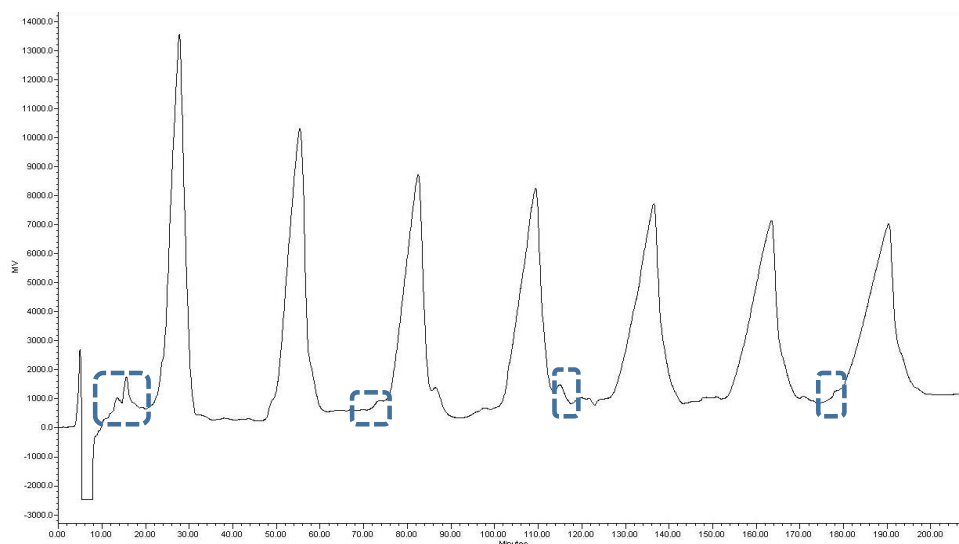
**Figura 44.** Hamiltonina I (F3P9), macrolactona tetrasacáridas purificada de la raíz de jalapa.

Dos estructuras inéditas relacionadas con los pentasacáridos macrolactónico **F4P4** ( $t_R = 13.2$  min) y **F4P7** ( $t_R = 21.2$  min) también fueron purificadas y caracterizadas. Las

fracciones etiquetadas como **F4P5** ( $t_R = 14.6$  min) y **F4P9** ( $t_R = 26.8$  min) se sometieron a un proceso de purificación que se llevó a cabo en un equipo de HPLC en modo de reciclaje a nivel semipreparativo bajo las condiciones instrumentales siguientes: columna C-18 Waters SymmetryPrep® (19 150 mm, 7  $\mu$ ); fase móvil: CH<sub>3</sub>CN:H<sub>2</sub>O (17:3); flujo 4.00 mL/min; detector: índice de refracción Waters 2440; volumen de inyección: 500  $\mu$ L (1 mg/ $\mu$ L). La técnica de rasurado de pico permitió la eliminación de homólogos minoritarios o impurezas de los picos mayoritarios (**Figuras 43 y 44**). Los rendimientos y constantes físicas registradas para los compuestos purificados se resumen en el **Cuadro 8**.

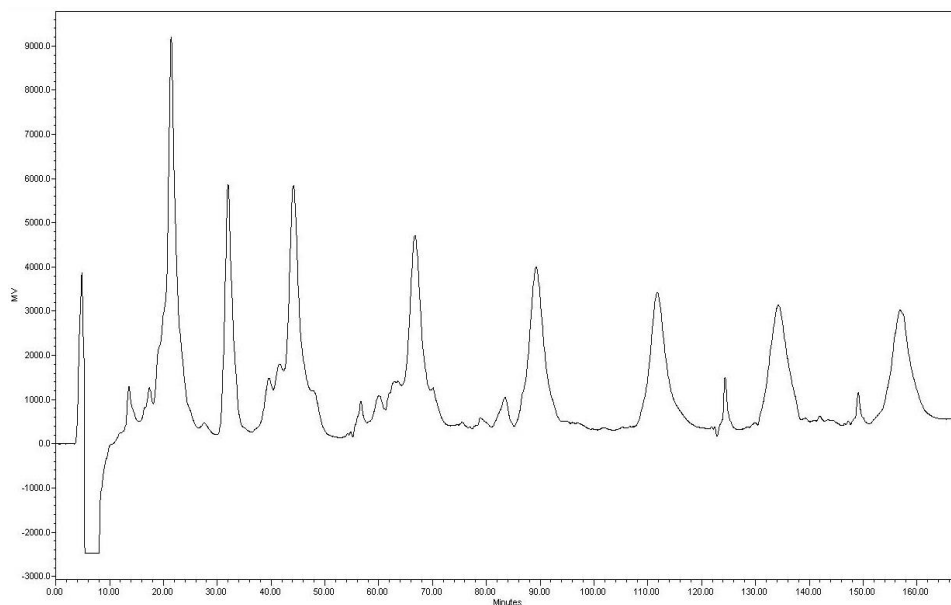
**Cuadro 8.** Rendimientos del reciclaje en HPLC y constantes físicas

	<b>JF4P4</b>	<b>JF4P5</b>	<b>JF4P7</b>	<b>JF4P9</b>
Cantidad reciclada	16.9 mg	16.2 mg	17.2 mg	18.6 mg
Número de ciclos empleados	9	7	7	8
Cantidad obtenida	8 mg	10.4 mg	16 mg	12.2 mg
Punto de fusión	95-98 °C	105-107 °C	118-120 °C	123-125 °C
$[\alpha]_D^{22}$ (c 0.01, MeOH)	-16.7	-48.0	-51.0	-43.8



**Figura 45.** Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave JF4P5, mediante las técnicas de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.





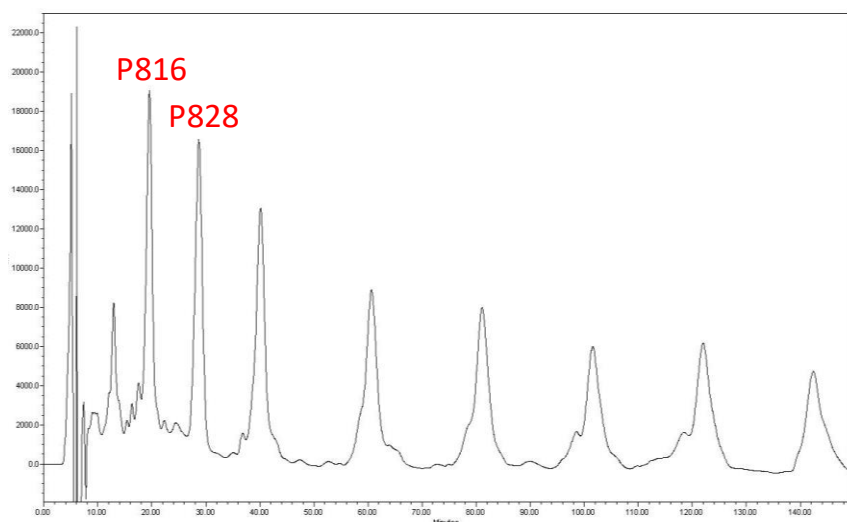
**Figura 46.** Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave JF4P9, mediante las técnicas de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.

#### 7.4.2 Resinas glicosídicas de la batata de purga (Mercadão Natural)

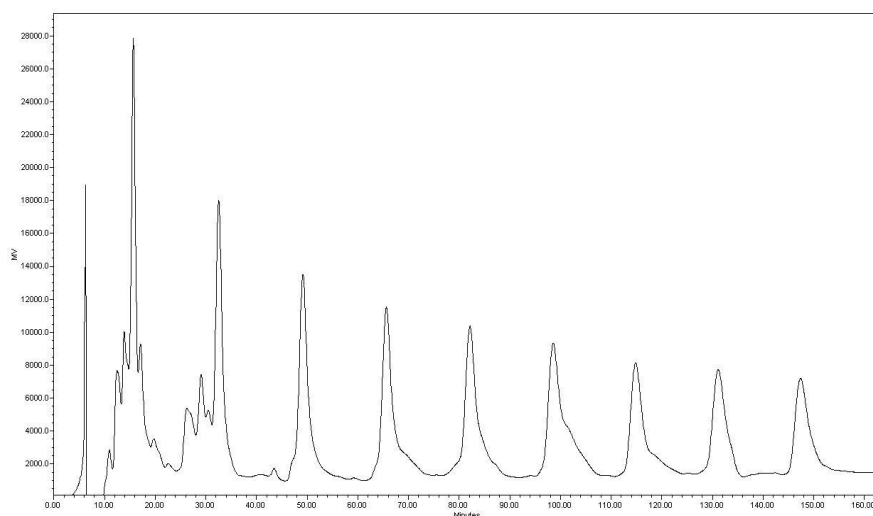
De la muestra comercial batata de purga en polvo (Mercadão Natural) se aislaron y purificaron cuatro compuestos en cantidad suficiente para registrar sus propiedades espectroscópicas. La totalidad de la subfracción etiquetada como BPF9P8 (40.1 mg) se purificó mediante reciclaje en HPLC a nivel semipreparativo, obteniéndose el cromatograma ilustrado en la **Figura 47**. En el cromatograma se aprecia la resolución de dos picos con  $t_R = 18.5$  min y  $t_R = 28.0$  min en el primer ciclo. El pico con mayor  $t_R$  se colectó y su análisis en HPLC en modo reciclaje permitió el aislamiento de un compuesto puro. El **cuadro 9** resume los rendimientos y las constantes físicas registradas para los compuestos aislados. El mismo procedimiento se realizó para purificar el pico BPF9P10 cuyo cromatograma se describe en la Figura 48.

**Cuadro 9.** Rendimientos del reciclaje en HPLC y constantes físicas

	<b>BPF9P816</b>	<b>BPF9828</b>	<b>BPF9P10</b>	<b>BFP9P11</b>
Cantidad reciclada	40.1 mg	40.1 mg	30 mg	25 mg
Número de ciclos empleados	7	1	9	2× 8
Cantidad obtenida	15.3 mg	16 mg	20 mg	12 mg
Punto de fusión	105-107 °C	105-106 °C	106-108 °C	110-112 °C
$[\alpha]_D^{22}$ (c 0.01, MeOH)	-55.0	-46.7	-50.3	-68.5

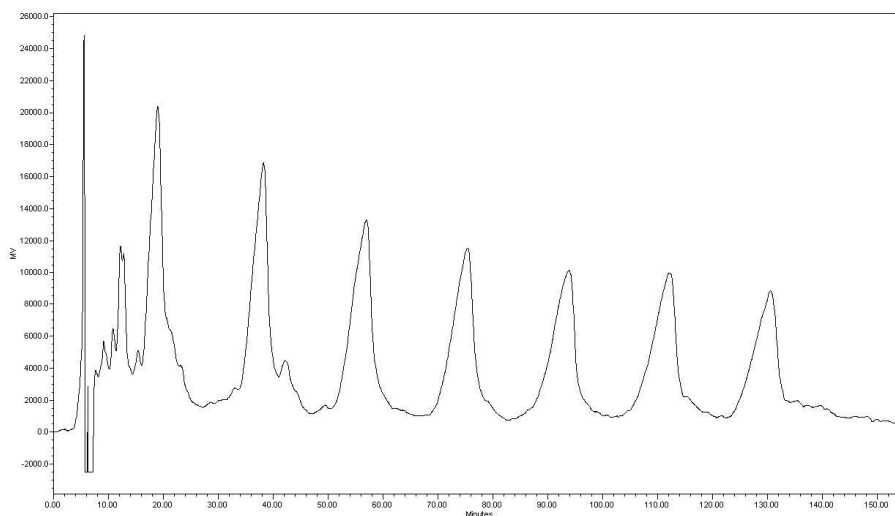


**Figura 47.** Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave BPF9P8, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.



**Figura 48.** Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave BPF9P10, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.

El pico **P9P11** se sometió a dos series de reciclajes en la columna C-18 ( $2 \times 8$  ciclos cada una) debido a que en un análisis preliminar de RMN  $H^1$  y  $C^{13}$  indicaba una duplicidad de señales y, posiblemente, correspondía a una mezcla de dos tetrasacáridos. Sin embargo, la segunda serie de reciclaje no generó un desdoblamiento de la señal indicando que se trataba de un compuesto puro. La caracterización estructural para este compuesto mediante RMN indicó una peculiaridad que se discutirá en la sección de la elucidación de las estructuras intactas.



**Figura 49.** Purificación del componente mayoritario presente en la fracción con clave F9P11, mediante la técnica de “reciclaje” y “corte y rasurado de pico”.

## 7.5 Elucidación estructural de las resinas glicosídicas

### 7.5.1 Caracterización de los núcleos oligosacáridos

La estructura de los núcleos oligosacáridos constitutivos de las resinas glicosídicas aisladas de las muestras comerciales se describió en un trabajo de investigación que consistió en optimizar las condiciones instrumentales para la determinación cualitativa mediante HPLC-ESIMS de los ácidos glicosídicos mayoritarios como los marcadores químicos para identificar el origen de la materia prima, es decir, la jalapa de purga de flores blancas (*O. macrocarpa*) o de flores amarillas (*O. hamiltonii*). Este análisis permitió la generación de información cromatográfica (tiempos de retención) y espectrométrica (valores de  $m/z$  para los cationes  $[M + Na]^+$  y sus principales iones fragmento) de muestras comerciales (polvos, tinturas y píldoras), así como las muestras incluidas en el presente proyecto preparadas a base de la raíz de jalapa (Monitel-Ayala, 2021). Una vez derivatizadas mediante saponificación y peracetilación, las muestras analizadas permitieron generar perfiles para la anotación de los ácidos glicosídicos mayoritarios los cuales correspondieron a los ácidos operculínicos A y B (Ono, 1990) y al ácido turpético C (Ding, et al., 2012). De la misma manera, se identificaron tres ácidos novedosos, los ácidos operculínicos L-N (**Figura 42**), tetrasacáridos con una

aglicona inusual de un largo de cadena de C<sub>17</sub> o C<sub>18</sub> átomos, que se encuentran hidroxiladas en la posición doce (**Figura 23 y 24**).

En todas las muestras analizadas no se encontraron los dos marcadores químicos para *O. macrocarpa* (Lira-Ricárdez et al., 2019), el ácido exogónico (**Figura 14**) y el ácido operculínico H (**Figura 18**), por lo que se concluyó que todas las muestras fitofarmacéuticas adquiridas en diferentes mercados en el norte de Brasil están manufacturadas a base de la jalapa de flores amarillas, *O. hamiltonii*. El presente trabajo aunado a las estructuras caracterizadas de extractos preparados de muestras auténticas de *O. macrocarpa* por Lira-Ricárdez (2019), confirmó que los ácidos operculínicos A-J, descritos por Ono y colaboradores (Ono, 1992) para la jalapa de flores blancas constituyen en realidad marcadores químicos y núcleos constitutivos de las resinas glicosídicas de la especie *O. hamiltonii*, la jalapa de flores amarillas.

Así, se postula que el uso tradicional de *O. macrocarpa*, como base para los preparados fitoterapéuticos, está discontinuado y que las muestras analizadas por Ono a inicios de los años noventa, adquiridas a través del distribuidor alemán de plantas medicinales “Müggenberg” (<https://www.paulmueggenburg.de>) bajo el nombre de jalapa brasileña, en realidad correspondía a una mezcla de las dos especies de la raíz de jalapa. Por lo tanto, los ácidos operculínicos A-J corresponden a los núcleos mayoritarios de las resinas glicosídicas que produce la especie de flores amarilla, ampliamente distribuida en el norte y noreste del territorio brasileño donde se comercializa en forma de fármaco cruda (raíz seca, en rodajas y pulverizada) y diversos preparados fitoterapéuticos (**Figura 10**).

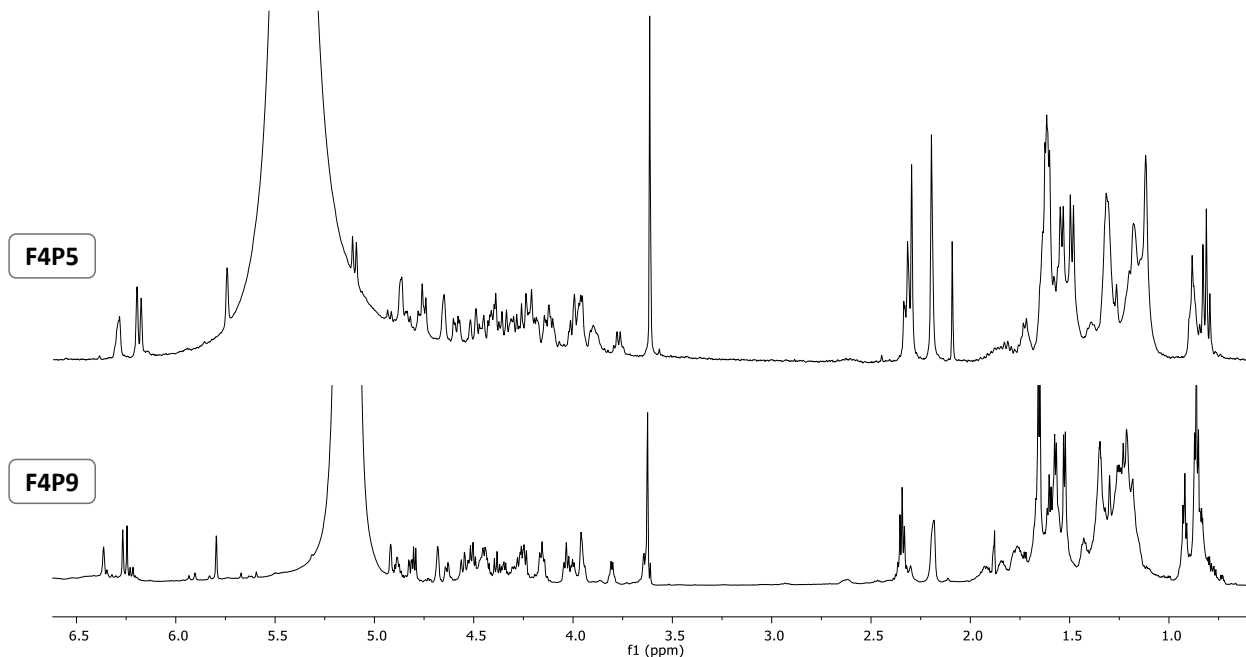
## 7.5.2 Caracterización de los compuestos individuales

### 7.5.2.1 Raíz de jalapa (Mercado 2000)

El análisis de los espectros de RMN <sup>1</sup>H de los compuestos purificados **F4P5** y **F4P9**, mediante la comparación de los desplazamientos químicos de los núcleos de hidrógeno en la región de 0-6.5 ppm de cada molécula (**Figura 50**), concluyó que el núcleo oligosacárido es idéntico en ambos compuestos debido a la sobreposición de ambos espectros (**Figura 41**), por lo que la diferencia en su tiempo de retención (**Cuadro 7**) radicaba únicamente en la longitud de la porción alifática del grupo esterificante del núcleo oligosacárido.

La obtención de los espectros de masas determinó la diferencia puntual entre las estructuras de los compuestos purificados. En el **Cuadro 11** se incluyen las especies

registradas mediante ionización con electrospray, tanto en el modo positivo como en el modo negativo (**Figuras 42 y 43**), para cada uno de los compuestos purificados y que permitió el cálculo de su fórmula molecular.



**Figura 50.** Comparación entre los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos F4P5 (trazo superior) y F4P9 (trazo inferior).

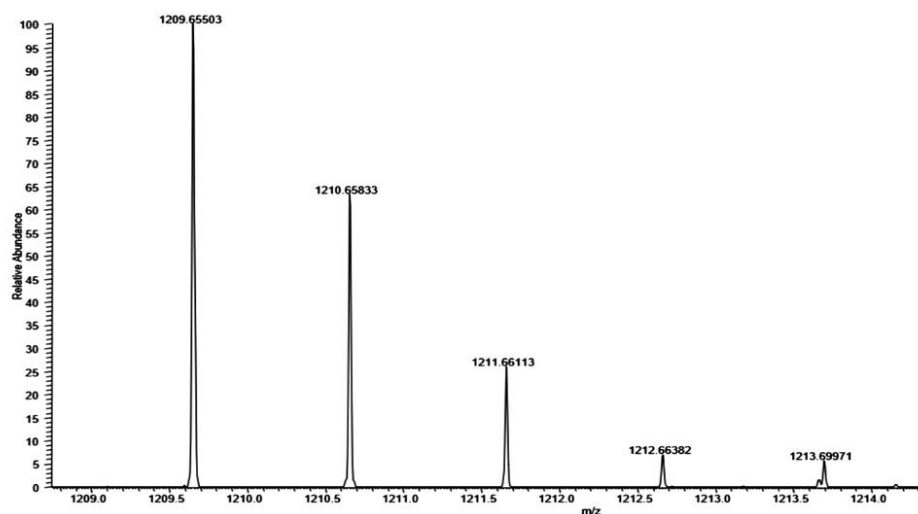
**Cuadro 10.** Especies iónicas detectadas y fórmulas moleculares calculadas para F4P5 y F4P9 mediante ESI-MS.

Especie	F4P5 ( $m/z$ )	F4P5 ( $m/z$ )	F4P7 ( $m/z$ )	F4P9 ( $m/z$ )
$[\text{M} + \text{Na}]^+$	1177.6293	1209.6550	1205.6601	1237.6909
$[\text{M} - \text{H}]^-$	1153.66	1185.71	1181.73	1213.73
<b>Fórmula calculada</b>	$\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{O}_{24}\text{Na}$	$\text{C}_{57}\text{H}_{102}\text{O}_{25}\text{Na}$	$\text{C}_{58}\text{H}_{102}\text{O}_{24}\text{Na}$	$\text{C}_{59}\text{H}_{106}\text{O}_{25}\text{Na}$
Masa teórica	1177.6340	1209.6602	1205.6653	1237.6915
Error calculado	$\delta = -3.9$ ppm	$\delta = -4.3$ ppm	$\delta = -4.3$ ppm	$\delta = -0.5$ ppm

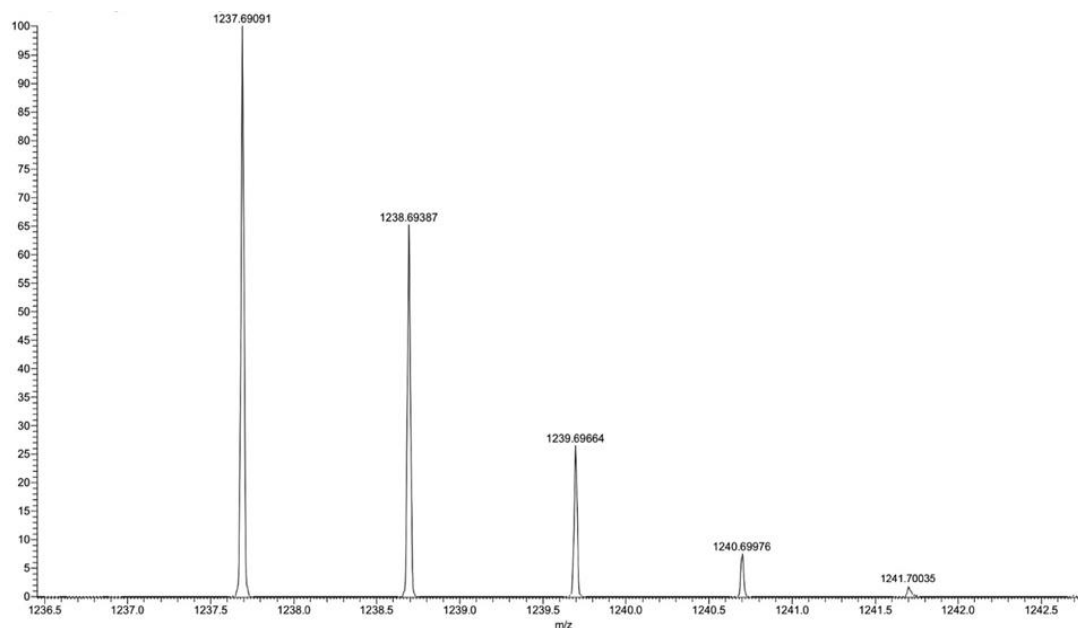
El análisis por espectrometría de masas para ambos compuestos indicó una diferencia estructural de 28 Da ( $\times 2$   $-\text{CH}_2$ ), es decir para el compuesto **F4P5** la fórmula

molecular calculada corresponde a  $C_{57}H_{102}O_{25}$  y para **F4P9** se calculó la fórmula  $C_{59}H_{106}O_{25}$ . Por lo tanto, la divergencia estructural radica en el largo de la cadena alifática esterificante. Esta misma relación se observó entre los compuestos macrocíclicos aislados de la misma fracción y descritos previamente, **F4P4** (batatinósidos IV) y **F4P7** (batatinósidos IX) (Moreno-Velasco, 2018). Por otra parte, se confirmó mediante RMN  $^{13}C$  que ambos compuestos también comparten el mismo núcleo oligosacárido constitutivo el cual corresponde al ácido operculínico A (Montiel-Ayala, 2021).

La retención de los azúcares acilados puros en un soporte de fase reversa con ligandos a base de grupos alquilo C-18 se encuentra determinada principalmente por su hidrofobicidad. La parte hidrofóbica de estos analitos (los residuos esterificantes y las agliconas) interactúa con las cadenas C-18 de la fase estacionaria, el grupo polar (los núcleos oligosacáridos) con la fase móvil. Las resinas glicosídicas esterificadas con un área hidrofóbica mayor interaccionan de mayor manera en la capa del ligando de la fase estacionaria que aquellos analitos con un área menor. En consecuencia, cuanto más largos sean los grupos esterificantes, es decir, *n*-dodecanoico vs *n*-decanoico, se observó un mayor tiempo de retención, por ejemplo, **F4P5** ( $t_R = 14.6$  min) y **F4P9** ( $t_R = 26.8$  min).



**Figura 51.** Espectro de alta resolución en modo positivo generado mediante ESI por el hamiltoniósido I (F4P5) mostrando la distribución isotópica y las abundancias relativas para el conjunto isotópico del ión aducto con sodio  $[C_{57}H_{102}O_{25}Na]^+$ .

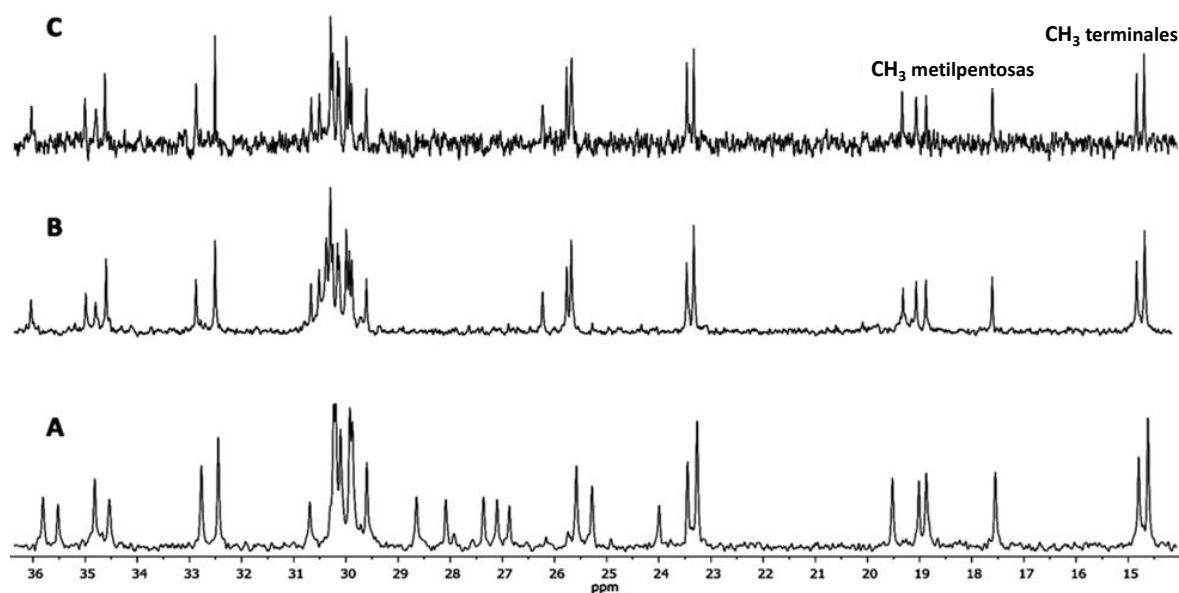


**Figura 52.** Espectro de alta resolución en modo positivo generado mediante ESI por el hamiltoniosido II (F4P9) mostrando la distribución isotópica y las abundancias relativas para el conjunto isotópico del ión aducto con sodio  $[C_{59}H_{106}O_{25}Na]^+$ .

Otro dato crucial acerca de la naturaleza estructural de estos nuevos compuestos se determinó tras descubrir la diferencia de 32 Da (MeOH) que existe con sus compuestos análogos **F4P4** ( $m/z$  117.6293  $[M + Na]^+$   $C_{56}H_{98}O_{24}Na$ ) y **F4P7** ( $m/z$  1205.6601  $[M + Na]^+$   $C_{58}H_{102}O_{24}Na$ ). Por ejemplo, el ión  $[M + Na]^+$  detectado en modo positivo tras la volatilización de la muestra **JF4P5** ( $t_R=14.6$  min) registró un valor de  $m/z$  igual a 1209.6550, mientras que su análogo, el compuesto **JF4P4** ( $t_R=13.2$  min), registró un valor de  $m/z$  con una diferencia de 32 Da ( $m/z$  117.6293  $[M + Na]^+$ ) indicando la funcionalización adicional por un grupo metoxilo (-OCH<sub>3</sub>). Por lo tanto, se concluyó que la diferencia en el tiempo de retención en HPLC se debe a que los compuestos **JF4P5** y **JF4P9** son los análogos acíclicos de **JF4P4** y **JF4P7**, respectivamente. Así, el tiempo de retención de las resinas glicosídicas en fase reversa con las condiciones instrumentales en HPLC descritas anteriormente se determina por: i) la longitud y la cantidad de residuos esterificantes del núcleo oligosacárido y ii) la restricción estructural de la aglicona (si se encuentra o no formando una macrolactona). Por lo tanto, la resina glicosídica con el éster de mayor longitud (C<sub>12</sub>) y de estructura acíclica correspondió a la molécula con mayor tiempo de retención. El orden de

elución fue el siguiente **F4P4** ( $t_R = 13.2$  min) < **F4P5** ( $t_R = 14.6$  min) < **F4P7** ( $t_R = 21.2$  min) < y **F4P9** ( $t_R = 26.8$  min); por lo tanto, las macrolactonas (**F4P4** y **F4P7**) presentan un área hidrofóbica menor que las estructuras acíclicas (**F4P5** y **F4P9**) por lo que su interacción con la fase estacionaria de fase reversa C-18 es menor, tal como lo demuestran sus tiempos de retención. La diferencia entre el orden de elución para las estructuras homólogas de estas dos series se estableció, prioritariamente, por su diferencia en la lipofilidad en función de la longitud del residuo esterificante.

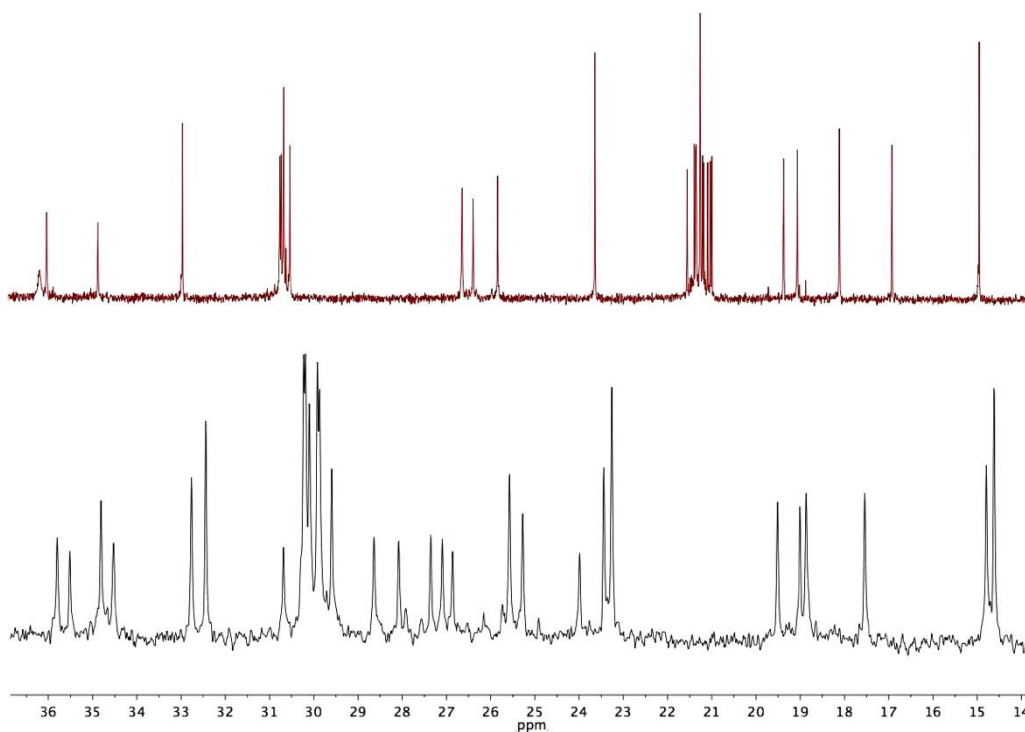
El análisis comparativo de los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  entre los análogos cíclicos y acíclicos permitió observar que los desplazamientos químicos para las señales de los metilenos centradas en  $\delta_C$  23-36 ppm en el compuesto macrocíclo presentan claramente una mayor dispersión debido a la restricción impuesta por la falta de flexibilidad de los enlaces  $-\text{OCO}-\text{CH}_2-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}_2-$  de la aglicona como consecuencia de la macrolactonización intramolecular (**Figura 44A**). En contraste, las señales de los metilenos de la aglicona de los compuestos acíclicos que, al presentar una mayor libertad conformacional, colapsaron con desplazamientos químicos similares haciendo imposible su asignación (**Figura 44B y C**).



**Figura 53.** Comparación de los espectros de RMN- $\text{C}^{13}$  en piridina- $d_5$  en la región correspondiente a los desplazamientos químicos para la aglicona ( $\delta$  15-36) de JF4P7 (batatinósido IX; A), JF4P9 (hamiltoniósido I; B) y de JF4P5 (hamiltoniósido II, C).



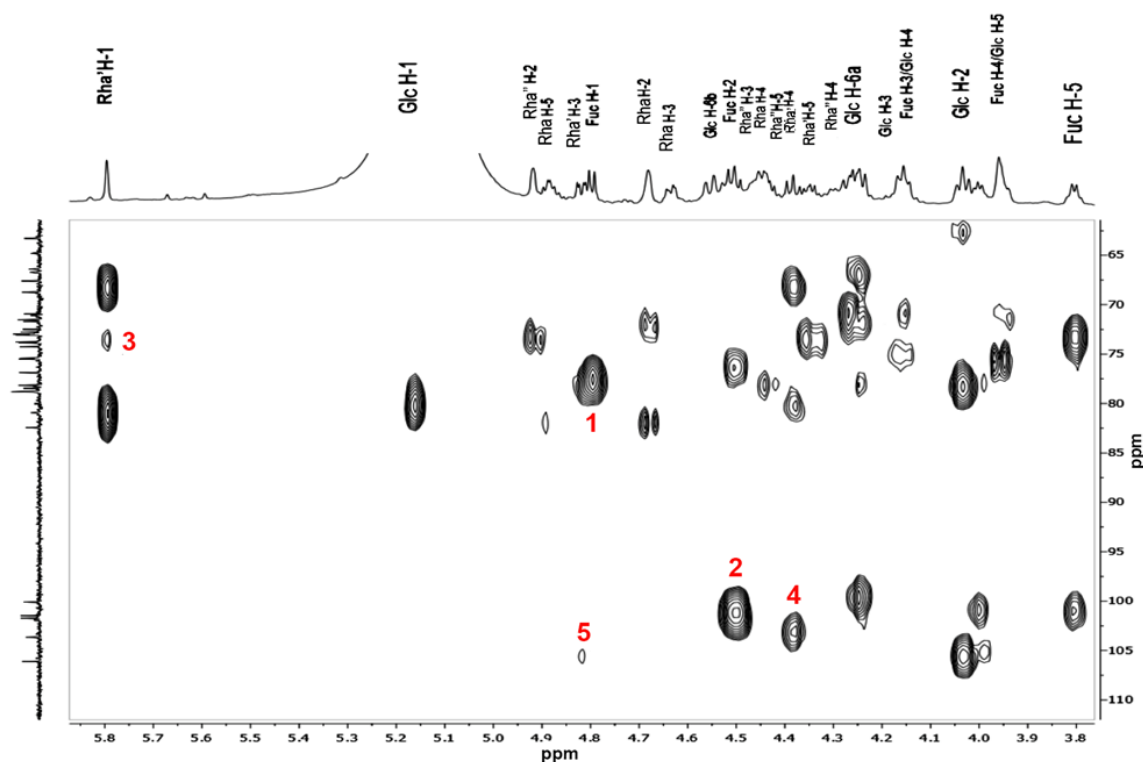
De esta forma, las estructuras de los compuestos **JF4P5** y **JF4P9** se establecieron como pentasacáridos esterificados con los ácidos *n*-decanoico y *n*-dodecanoico, respectivamente. Por ejemplo, en el espectro de RMN <sup>13</sup>C del compuesto **JF4P7**, se identificaron 23 señales CH<sub>2</sub> en la región centrada en  $\delta$  23-36, de las cuales 13 correspondían a la aglicona del núcleo de oligosacárido (el ácido operculínico) y las diez señales restantes se asignaron a las señales CH<sub>2</sub> del ácido orgánico acilante. La longitud de la cadena esterificante se determinó restando sus señales correspondientes al comparar los espectros de RMN <sup>13</sup>C entre el ácido operculínico peracetilado A y el compuesto **JF4P7**, ya que todos los compuestos aislados de la fracción JF4 presentan la misma aglicona, el ácido 11*S*-hidroxihexadecanoico (**Figura 45**). Los compuestos **F4P5** y **F4P9** demostraron ser pentasacáridos acíclicos individuales ya que se observó la señal en forma de triplete para los protones del metileno magnéticamente equivalentes en C-2 ( $\delta$  2.3) de la aglicona (**Figura 41**). Además, el grupo éster metílico ( $\delta$  3.6) para la fracción carboxílico terminal (-CO<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>) de la aglicona confirmó su estructura acíclica (Escobedo-Martínez & Pereda-Miranda, 2007). De esta manera, se estableció que la porción esterificante corresponde a un *n*-decanoilo, en congruencia con los resultados del análisis GC-MS del residuo soluble en la fase orgánica (*t*<sub>R</sub> 7.4 min; EIMS: *m/z* [M]<sup>+</sup> 172, C<sub>10</sub>H<sub>20</sub>O<sub>2</sub>) producido por saponificación de los compuestos aislados intactos **F4P4** y **F4P7**. La saponificación de los compuestos **F4P5** y **F4P9** proporcionó el ácido *n*-dodecanoico (*t*<sub>R</sub> 9.1 min; EIMS: *m/z* [M]<sup>+</sup> 200, C<sub>12</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 54.** Comparativo entre espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  del ácido operculínico A (trazo superior en rojo) y del compuesto F4P7 intacto (trazo inferior en negro).

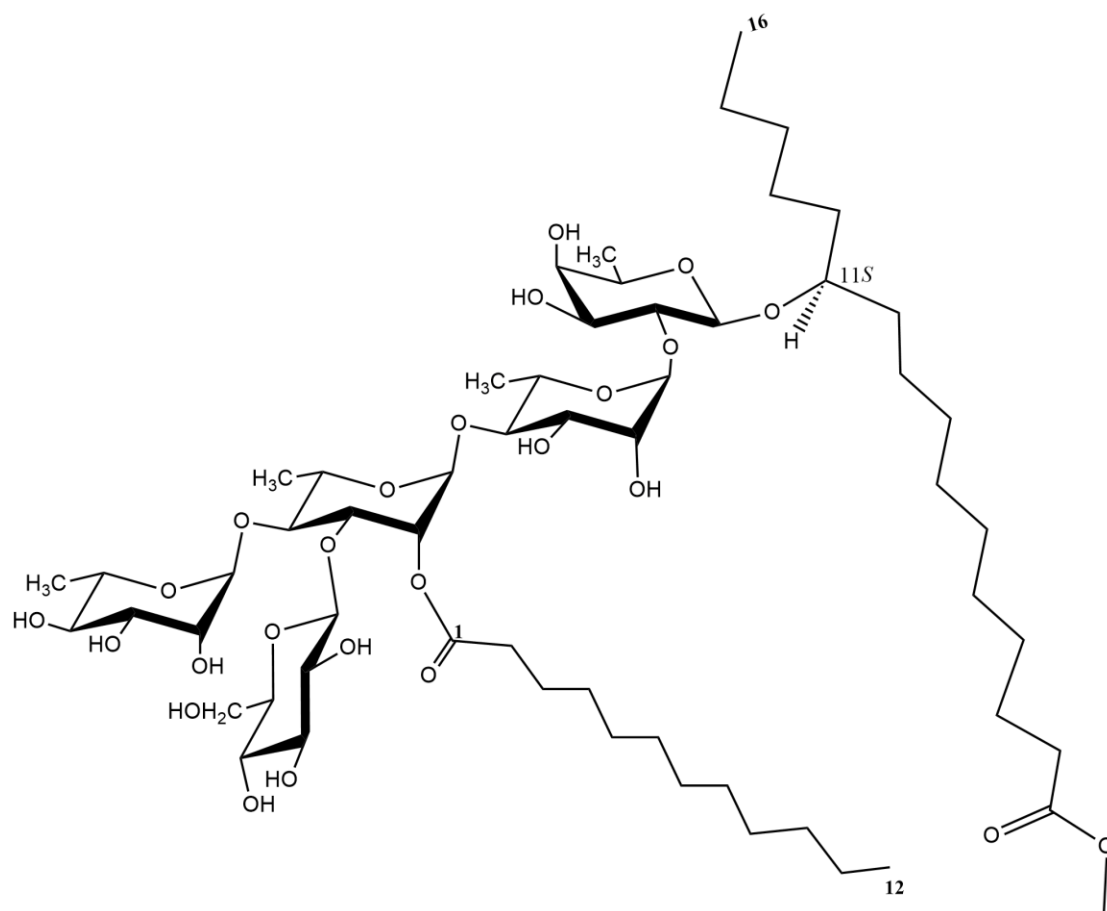
Así, estos compuestos correspondían a derivados acíclicos de las macrolactonas batatinósidos IX (**JF4P4**) y VI (**JF4P7**) aislados originalmente del camote (*I. batatas*) (Rosas-Ramírez, et al., 2017). La conectividad entre la aglicona (Agl) y la cadena de azúcar, así como la secuencia de glicosilación entre los monosacáridos de ambos pentasacáridos y la posición de esterificación en la posición C-2 de la tercera unidad monosacárida (Rha') para cada residuo se fundamentó mediante experimentos HMBC ( $^{2,3}J_{\text{CH}}$ ). Las conectividades detectadas en este espectro heteronuclear para ambos compuestos inéditos son similares (**Figura 46**). Por ejemplo para **JF4P9**, se observaron los siguientes cuadros de conectividad: (1) entre Agl C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  79.9)/Fuc H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  4.83); (2) Rha C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  100.5)/Fuc H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.53); (3) Rha' C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  99.6) y Rha H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4.68); (4) Rha'' C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  103.8) y Rha' H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4.37); (5) Glc H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.11) y Rha' C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  80.7). De esta manera se caracterizó al compuesto **JF4P9** como el 11*S*-hidroxihexadecanoato de metilo del 11-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*-[ $\alpha$ -L-

ramnopiranosil-(1→4)-*O*-(2-*O*-*n*-dodecanoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→2)- $\beta$ -D-fucopiranosido (**Figura 56**).

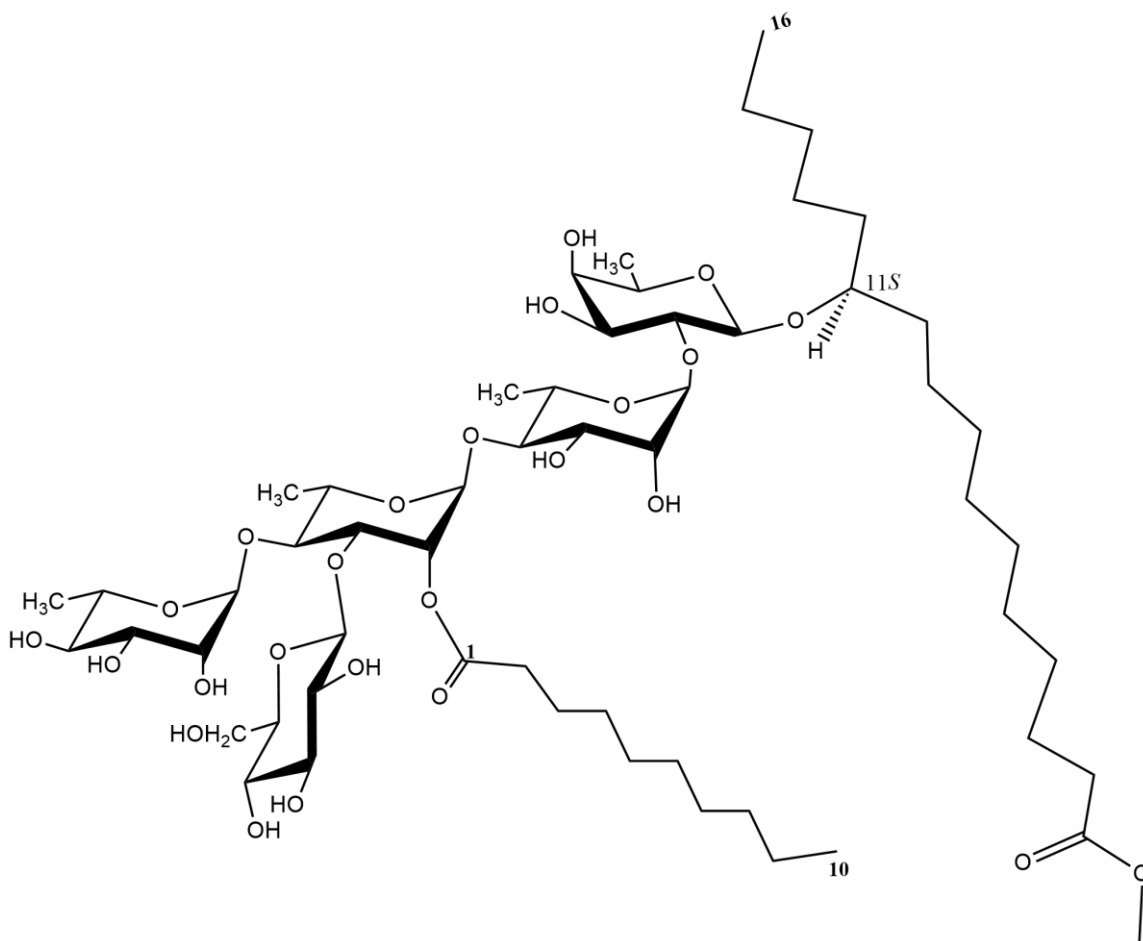


**Figura 55.** Espectro heteronuclear  $^1\text{H}$  ( $^{2,3}J_{\text{CH}}$ ) (HMBC) del hamiltoniosido I (F4P9) con alta resolución 1D  $^1\text{H}$  (700 MHz) y  $^{13}\text{C}$  (175 MHz) proyecciones en piridina- $d_5$ .

En tanto que el compuesto mayoritario aislado de la fracción etiquetada como **JF4P5**, se identificó como el 11(*S*)-hidroxihexadecanoato de metilo del 11-*O*- $\beta$ -D-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[ $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→4)-*O*-(2-*O*-*n*-decanoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1→2)- $\beta$ -D-fucopiranosido (**Figura 57**). En el **Cuadro 11** se enlistan los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento correspondientes a los protones y los carbonos de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida y las señales características para la aglicona de las resinas glicosídicas aisladas de Jalapa 2000.



**Figura 56.** Estructura química del compuesto JF4P9 (hamiltoniósido I).



**Figura 57.** Estructura química del compuesto F4P5 (hamiltoniosido II).

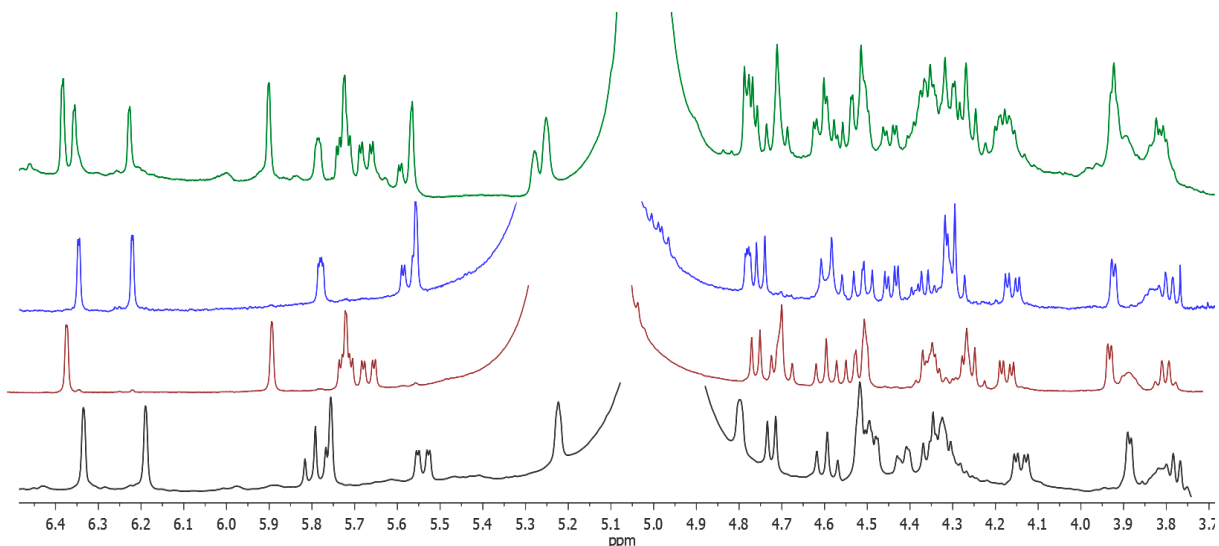
**Cuadro 11.** Constantes espectroscópicas (RMN <sup>1</sup>H y <sup>13</sup>C) de los compuestos F4P5y F4P9.

Posición	F4P9 (Hamiltoniósido I)		F4P5 (Hamiltoniósido II)	
	RMN <sup>1</sup> H $\delta_H$ ppm, multiplicidad, <i>J</i> (Hz)	RMN <sup>13</sup> C $\delta_C$ ppm	RMN <sup>1</sup> H $\delta_H$ ppm, multiplicidad, <i>J</i> (Hz)	RMN <sup>13</sup> C $\delta_C$ ppm
Fuc-1	4.78 d (7.2)	101.5	4.75 d (7.1)	101.3
2	4.48 dd (9.1, 7.7)	75.5	4.45 dd (8.4, 7.1)	75.3
3	4.14 dd (9.1, 3.4)	76.9	4.15 m*	76.7
4	3.96 d (3.4)	73.8	3.95 d (3.7)	73.6
5	3.79 q (6.3)	71.7	3.78 q (6.4)	71.5
6	1.51 d (6.3)	17.5	1.49 d (6.4)	17.4
Rha-1	6.21 d (0.8)	101.7	6.18 d (1.3)	101.6
2	4.68 dd (3.3, 0.8)	73.1	4.66 (3.2, 1.3)	72.8
3	4.61 dd (9.2, 3.3)	72.8	4.59 dd (9.2, 3.2)	72.2
4	4.23 dd (9.4, 9.2)	74.3	4.24 (9.2, 9.2)	74.1
5	4.87 dq (9.4, 6.2)	67.6	4.85 dq (9.2, 6.1)	67.5
6	1.56 d (6.2)	19.1	1.54 d (6.1)	18.5
Rha'-1	5.77 d (1.4)	100.1	5.75 d (0.9)	100
2	6.33 dd (3.1, 1.4)	73.8	6.29 (3.1, 0.9)	73.8
3	4.80 dd (9.2, 3.1)	81	4.77 dd (9.0, 3.1)	80.8
4	4.35 dd (9.2, 9.2)	78.5	4.34 dd (9.0, 9.0)	78.4
5	4.33 dq (9.2, 6.1)	74.2	4.31 m*	68.8
6	1.64 d (5.5)	19.2	1.61 d (5.6)	18.7
Rha''-1	6.24 d (0.8)	103.6	6.20 d (1.2)	103.1
2	4.90 dd (3.3, 0.8)	72.7	4.87 dd (3.1, 1.2)	72.6
3	4.42 m*	73.2	4.41 m*	72.9
4	4.26 dd (9.4, 9.4)	70.9	4.26 dd (9.2, 9.2)	70.8
5	4.42 m*	68.7	4.37 m*	68.6
6	1.63 d (6.1)	19.2	1.63 d (6.1)	19.1
Glc-1	5.14 d (7.7)	106.1	5.11 d (7.7)	105.6
2	4.02 dd (9.0, 7.7)	75.5	4.02 m*	78.1
3	4.17-4.12 m*	76.9	4.16-4.10 m*	72.4
4	4.17-4.12 m*	75.5	4.16-4.10 m*	76.8*
5	3.95 m*	80.9	3.90 m	78.7*
6a	4.23 m*		4.21 dd (11.4, 3.6)	
6b	4.53 dd (12.0, 1.7)	63.3	4.51 dd (11.4, 1.1)	63
Agl-1	-	173.9	-	174.2
2	2.33 t (7.5)	34.5	2.32 t (7.5)	34.6
11	3.92 m	78.2	3.96 m*	77.9
16	0.85 t (6.8)	14.6	0.82 t (7.0)	14.6
Dodeca - 1'	-	174.4	-	-
2	2.34	34.9	-	-
12	0.91 t (6.8)	14.7	-	-
Deca - 1	-	-	-	174.2
2	-	-	2.32 m (7.5)	34.8
10	-	-	0.89 t (6.8)	14.8a

\*Señales intercambiables

### 7.5.2.2 Batata de purga (Mercadão Natural)

Una vez que se registraron las constantes físicas de las resinas glicosídicas purificadas, tanto de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  en 1D y 2D (hetero y homonucleares) como de los espectros de ESI-MS, se realizó un primer análisis que consistió en una comparación de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los cuatro compuestos aislados (**Figura 58**).



**Figura 58.** Comparación entre los espectros de RMN  $^1\text{H}$  de los compuestos BPF9P10 (negro), BPF9P828 (rojo), BPF9P816 (azul) y BPF9P11 (verde)

La región comprendida en el rango  $\delta_{\text{H}}$  5.0-6.5 ppm, es decir, las señales más desplazadas a campos bajos corresponden tanto a los hidrógenos anoméricos como a las posiciones de acilación y lactonización del núcleo oligosacárido cuya multiplicidad y constantes de acoplamiento se compararon con las anteriormente descritas para los cinco compuestos mayoritarios aislados de la muestra comercial jalapa 2000. Se observan tres hidrógenos anoméricos correspondientes a ramnosa ( $J = 0.8\text{-}1.2$  Hz) y un hidrógeno para fucosa ( $J = 7.0\text{-}7.4$  Hz) en los espectros correspondientes a las muestras **BPF9P10**, **BPF9P828** y **BPF9P816** (**Figura 58**). Esta información, aunada al análisis realizado al espectro en 2D heteronuclear (HSQC), permitió deducir que se trata de resinas glicosídicas constituidas por el mismo núcleo tetrasacárido, el ácido operculínico C, identificado en la hamiltonina I (**F3P9**) purificada de la muestra comercial de la raíz de jalapa Mercado 2000.

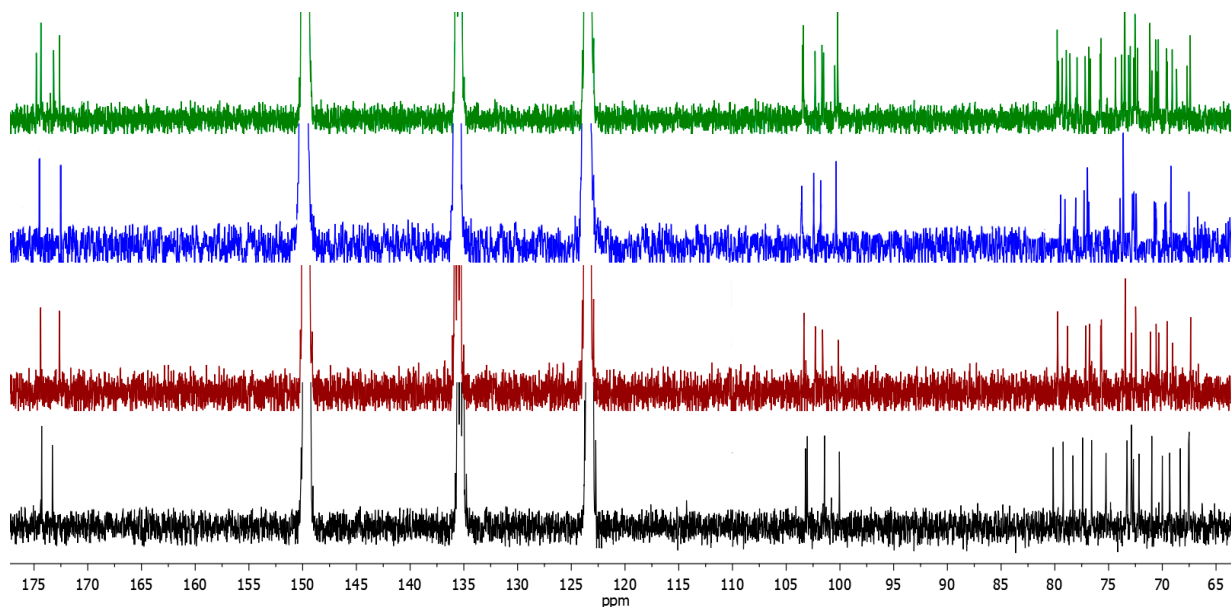
En esta misma región, dichos espectros tienen en común una señal con una multiplicidad que corresponde a un doblete de dobletes ( $J = 9.0, 3.0$  Hz) centrado entre  $\delta_H$  5.5-5.7, que corresponde a la señal del hidrógeno a la posición C-3 de la segunda unidad monosacárida, la primera ramnosa interna (Rha), siendo esta la posición de lactonización para los tres núcleos oligosacáridos inéditos correspondientes a las muestras descritas **BPF9P10**, **BPF9P828** y **BPF9P816**. Esta posición también se observó en los pentasacáridos macrolacíclicos **JF4P4** (batatinósidos IV) y **JF4P7** (batatinósidos IX). Sin embargo, difirió en la posición de lactonización observada en la hamiltonina I (**JF3P9**) que correspondió a la posición C-2 de la Rha'.

La señal restante en esta zona de campo bajo, por lo tanto, se asignó a la posición de acilación sobre el núcleo oligosacárido. Como se observa en el comparativo de la **Figura 58**, las señales que se encuentran centradas entre  $\delta_H$  5.70-5.85 ppm, exceptuando a las señales descritas para los anoméricos, sus desplazamientos químicos difieren en cada una de las muestras de la siguiente forma: para el compuesto **BPF9P10** se observó un doblete de dobletes (dd) en forma de un triplete debido a dos acoplamientos *trans*-diaxiales ( $J = 9.9, 9.8$  Hz) que corresponde a la posición C-4 de la ramnosa terminal (Rha''); en la muestra **BPF9P816** se observó un dd ( $J = 3.3, 0.8$  Hz) que corresponde a la posición C-2 de la segunda ramnosa interna (Rha') mediante una interacción axial-ecuatorial con el protón vecinal H-3 y una ecuatorial-ecuatorial con el protón anomérico; y, por último, en el analito **BPF9P828** se identificó una señal dd ( $J = 9.0, 3.0$  Hz) que corresponde a la posición C-3 de la segunda ramnosa interna (Rha) que mostró una interacción vecinales *trans*-diaxial y axial-ecuatorial. Así, se dedujo que estos tres compuestos son isómeros estructurales y que la diferencia radicaba en la posición del ácido graso que esterifica al núcleo tetrasacárido compuesto de una fucosa y tres ramosas.

El análisis de los espectros de RMN generados por la muestra **BPF9P11**, después de haberse asegurado su pureza mediante dos procedimientos de reciclaje de 8 ciclos cada uno en HPLC (**Cuadro 10**), permitió establecer que se trataba de una estructura dimérica ya que la complejidad mostrada en los espectros correspondía con la sumatoria de las señales colapsadas de los espectros de RMN  $^1H$  y  $^{13}C$  individuales para las muestras **BPF9P828** y **BPF9P816** (**Figuras 49** y **50**), por lo que se decidió caracterizar en primera instancia dichas



muestras y usar las asignaciones como herramienta para llegar a la estructura final de la estructura dimérica.



**Figura 59.** Comparación entre los espectros de RMN <sup>13</sup>C de los compuestos **BPF9P10** (negro), **BPF9P828** (rojo), **BPF9P816** (azul) y **BPF9P11** (verde)

El análisis comparativo de los espectros de RMN <sup>13</sup>C, generados por las muestras aisladas de la muestra comercial batata de purga (Mercadão Natural), terminó por confirmar las características estructurales que se dedujeron a partir del análisis de la comparación de espectros de RMN <sup>1</sup>H. Para las muestras **BPF9P10**, **BPF9P828** y **BPF9P816**, se observaron dos señales en cada espectro en la región centrada entre  $\delta_C$  170 y 175 ppm las cuales se asignaron mediante sus correlaciones espectrométricas, para los carbonilos de la aglicona y al carbonilo del residuo acilante. En la región centrada entre  $\delta_C$  98 y 105 ppm se identificaron cuatro señales que corresponden a los carbonos anoméricos confirmando así su estructura tetrasacárida (**Figura 50**).

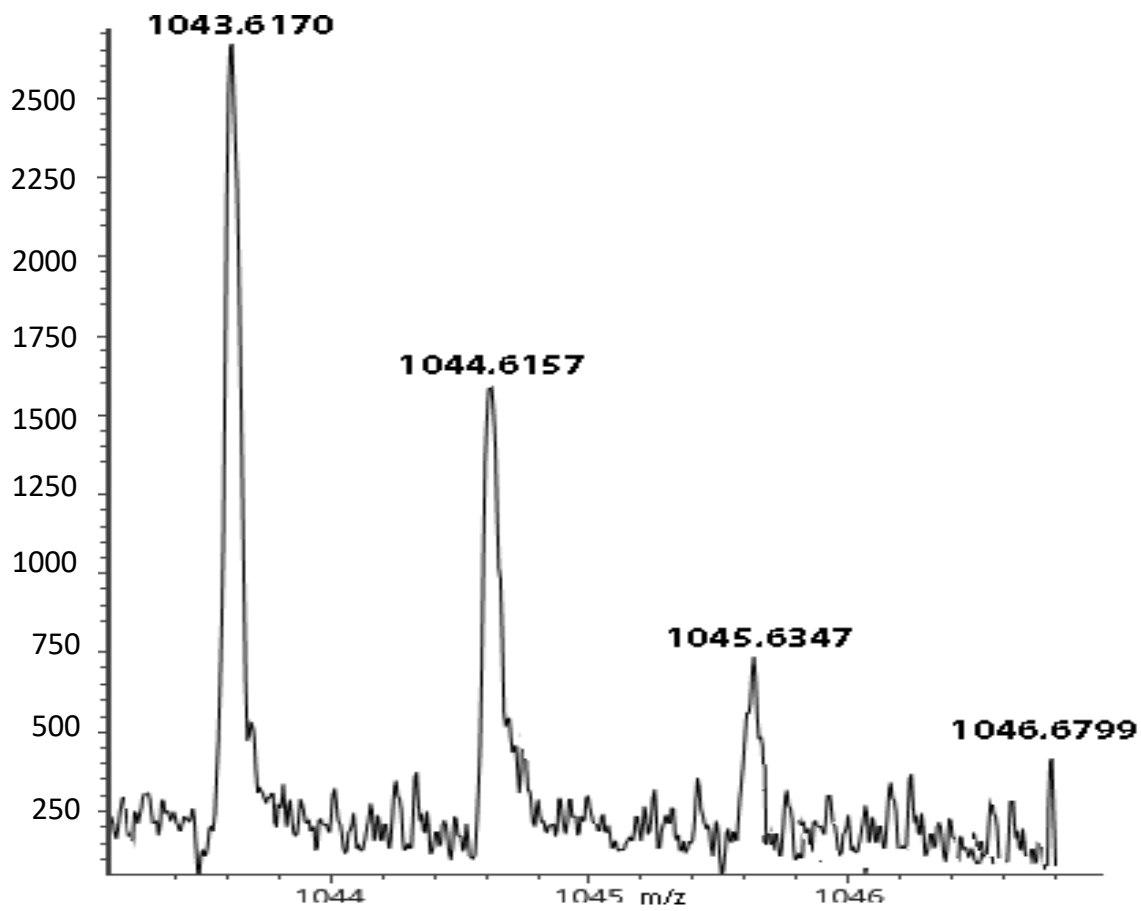
En las tres muestras se detectó en espectrometría de masas, en modo positivo mediante ESI, un pico que corresponde al aducto  $[M + Na]^+$  con un valor de  $m/z$  1043 Da para una fórmula molecular de  $C_{52}H_{92}O_{19}Na$  (**Cuadro 12, Figuras 50-52**), lo que confirma la isomería entre estos tres compuestos y cuya diferencia estructural radica en la posición donde el residuo acilante funcionaliza al núcleo oligosacárido, como se discutió en el análisis comparativo de los espectros de RMN <sup>1</sup>H, el cual se identificó como el ácido *n*-dodecanoico

al considerar la diferencia en peso con el ácido operculínico C lactonizado<sub>7</sub> [856 (C<sub>40</sub>H<sub>72</sub>O<sub>19</sub>) – H<sub>2</sub>O + Na]<sup>+</sup>). Al tener el mismo residuo acilante, se dedujo que la variación entre el tiempo de retención entre estos isómeros se relaciona con su isomería estructural, dado que, mientras más externa respecto al núcleo oligosacárido se encuentre la cadena alifática, las interacciones del compuesto con la columna de decaoctilsilano tenderán a ser mayores, debido a que existe un menor impedimento estérico por parte de la macrolactona. Así, aquella resina glicosídica con la posición acilada más alejada al punto de macrolactonización, tendrá mayor tiempo de retención, en este caso el compuesto **BPF9P10**, con la posición C-4 de la ramnosa terminal acilada. Así, la secuencia de elución en función del tiempo de elución fue **BPF9P816** ( $t_R = 18.5$  min) < **BPF9P828** ( $t_R = 28.0$  min) < **BPF9P10** ( $t_R = 32.1$  min).

**Cuadro 12.** Especies iónicas detectadas y fórmulas moleculares calculadas para los compuestos aislados de batata de purga mediante ESI

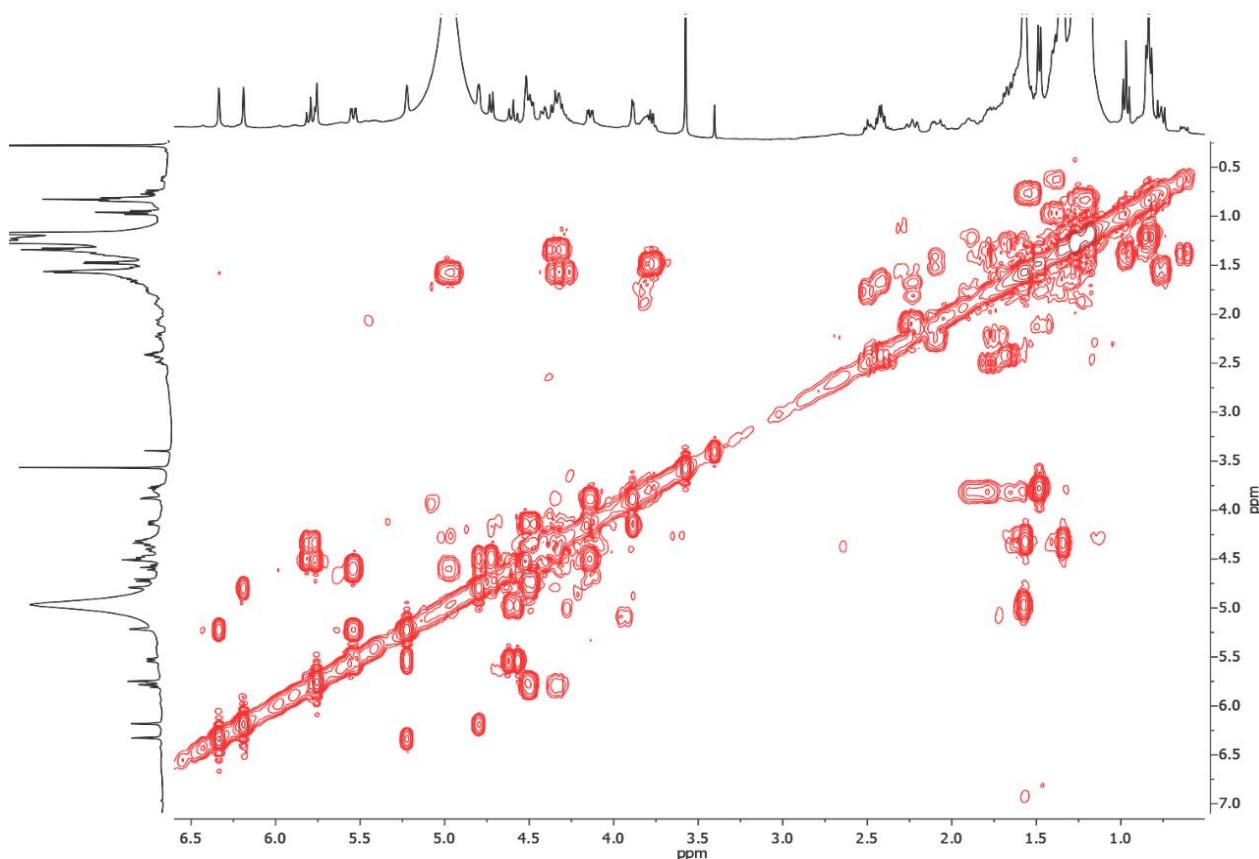
Especie	<b>BPF9P816</b> ( <i>m/z</i> )	<b>BPF9P828</b> ( <i>m/z</i> )	<b>BPF9P10</b> ( <i>m/z</i> )	<b>BPF9P11</b> ( <i>m/z</i> )
[M + Na] <sup>+</sup>	1043.6161	1043.6236	1043.6128	2(1043.6170)
[M – H] <sup>-</sup>	1019.59	1019.6140	1019.62	2(1019.5461)
<b>Fórmula calculada</b>	C <sub>52</sub> H <sub>92</sub> O <sub>19</sub> Na	C <sub>52</sub> H <sub>92</sub> O <sub>19</sub> Na	C <sub>52</sub> H <sub>92</sub> O <sub>19</sub> Na	C <sub>104</sub> H <sub>184</sub> O <sub>38</sub>
Masa teórica	1043.6125	1043.6125	1043.6125	2042.55
Error calculado	$\delta = -3.45$ ppm	$\delta = -5.6$ ppm	$\delta = -0.2$ ppm	$\delta = -4.3$ ppm

Para la muestra **BPF9P811** se detectó en modo positivo mediante ESI, un pico con un valor *m/z* igual a 1043.617 Da (**Figura 60**), el cual coincide con el valor detectado para lo aductos de sodio del ión molecular de los compuestos anteriormente discutidos. Sin embargo, tomando en cuenta el tiempo de retención y las correlaciones observadas en los experimentos en 1D y 2D de RMN <sup>1</sup>H y RMN <sup>13</sup>C, se dedujo que el pico se trataba de la especie [M/2 + Na]<sup>+</sup>, especie que es común detectar cuando se analizan este tipo de dímeros producto de las condensaciones intermoleculares entre dos resinas individuales (Escalante-Sánchez & Pereda-Miranda, 2007; Castañeda-Gómez et al., 2013).



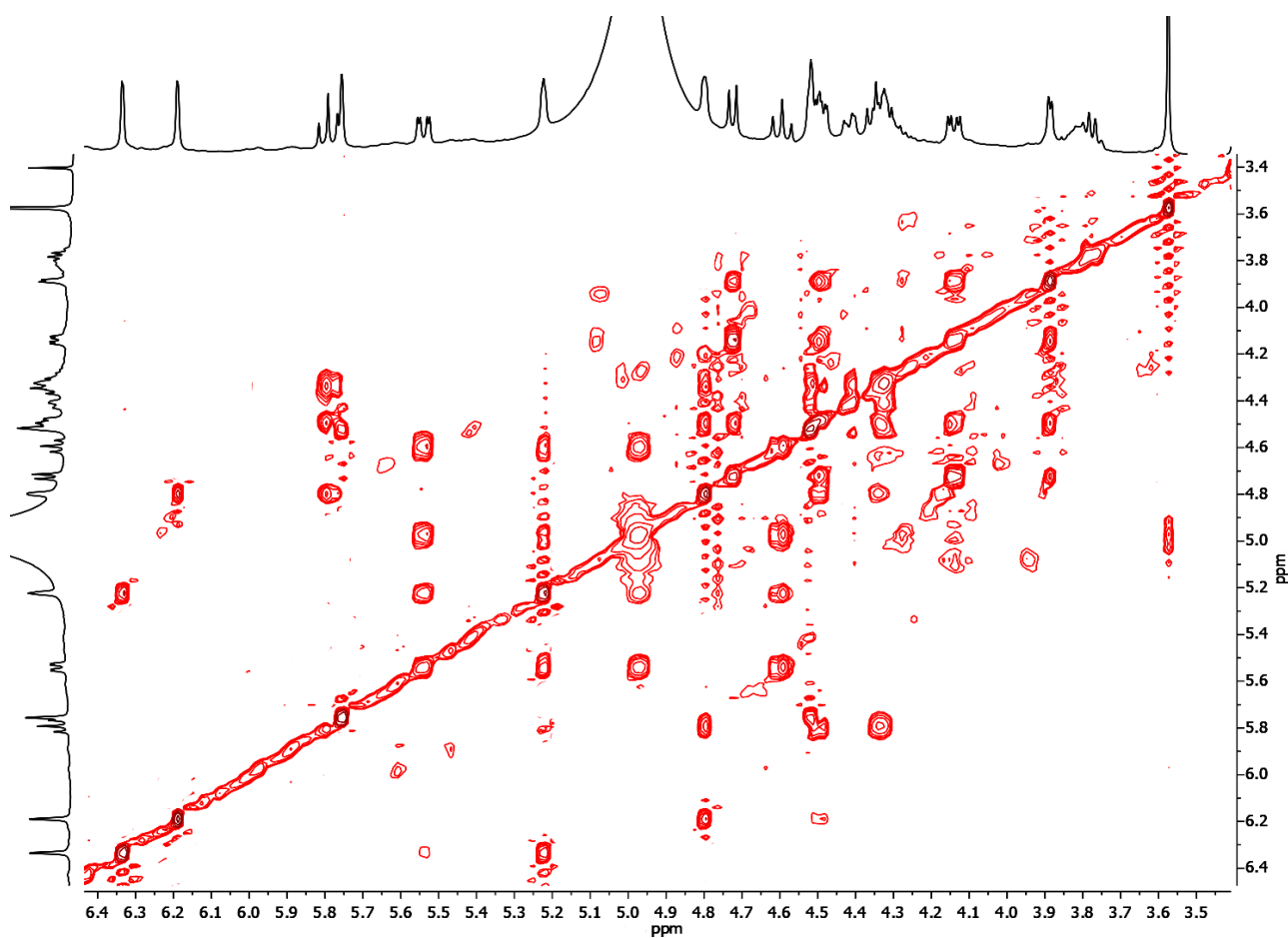
**Figura 60.** Espectro de EM-ESI en modo positivo de BPF9P811.

La estrategia de análisis empleada para la asignación de las señales en los espectros generados por los compuestos puros y llegar a la estructura final de cada uno de los cuatro compuestos aislados consistió, principalmente, en el análisis de los espectros en 1D de RMN  $^1\text{H}$  y RMN  $^{13}\text{C}$  para determinar las características precisas y anteriormente discutidas acerca de la naturaleza estructural de las resinas glicosídicas. En primer lugar, este análisis permitió la asignación de cada unidad monosacárida a través de los cuadros de conectividad generados por el espectro 2D COSY (**Figura 61**). Conociendo la naturaleza de las señales anoméricas y con ayuda del espectro de HMBC, se asignaron para el compuesto **BPF9P10** cuatro señales anoméricas Fuc-1 ( $\delta_{\text{H}}$  4.72,  $\delta_{\text{C}}$  101.4), Rha-1 ( $\delta_{\text{H}}$  6.34,  $\delta_{\text{C}}$  100.), Ram'-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.76,  $\delta_{\text{C}}$  103.2) y Ram''-1 ( $\delta_{\text{H}}$  6.19,  $\delta_{\text{C}}$  103), las cuales representan el punto de partida para el establecimiento de los cuadros de conectividad y determinar cada uno de los azúcares del núcleo oligosacárido, el ácido operculínico C.

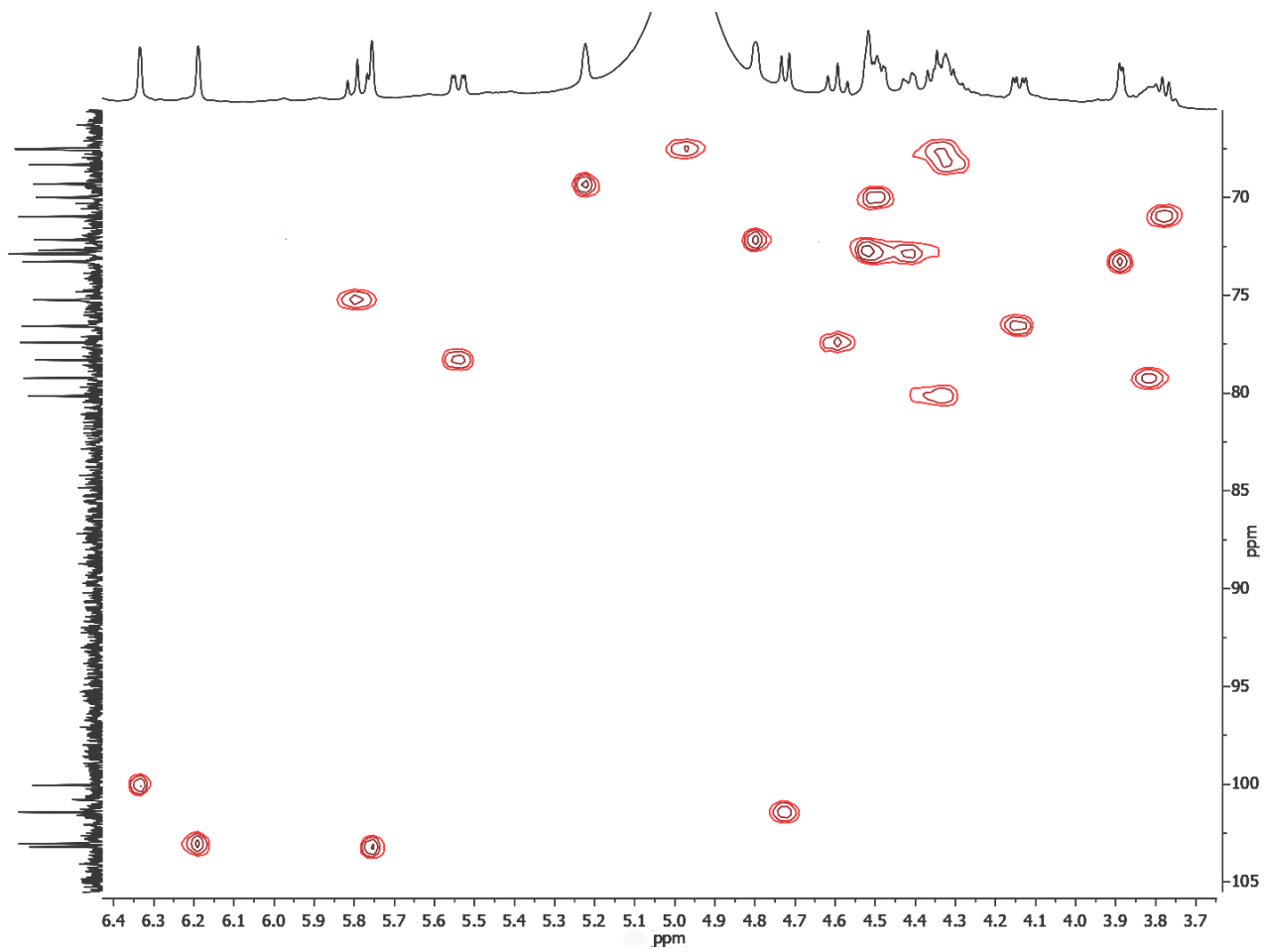


**Figura 61** Espectro COSY del compuesto BPF9P10.

Una vez asignada cada una de las señales de las unidades monosacáridas, éstas fueron confirmadas a través del análisis del espectro en 2D TOCSY ( $^1J_{HH}$ ) (**Figura 62**). La correspondencia de cada señal en el espectro de RMN  $^1H$  con su respectivo átomo de carbono se llevó a cabo mediante el análisis del espectro de dos dimensiones ( $^1J_{CH}$ ) HSQC (**Figura 63**). De esta manera, se identificaron 17 señales dentro de la zona del espectro de  $^{13}C$  comprendida entre  $\delta_C$  60-85 para los metinos que conforman cada una de las unidades monosacáridas.

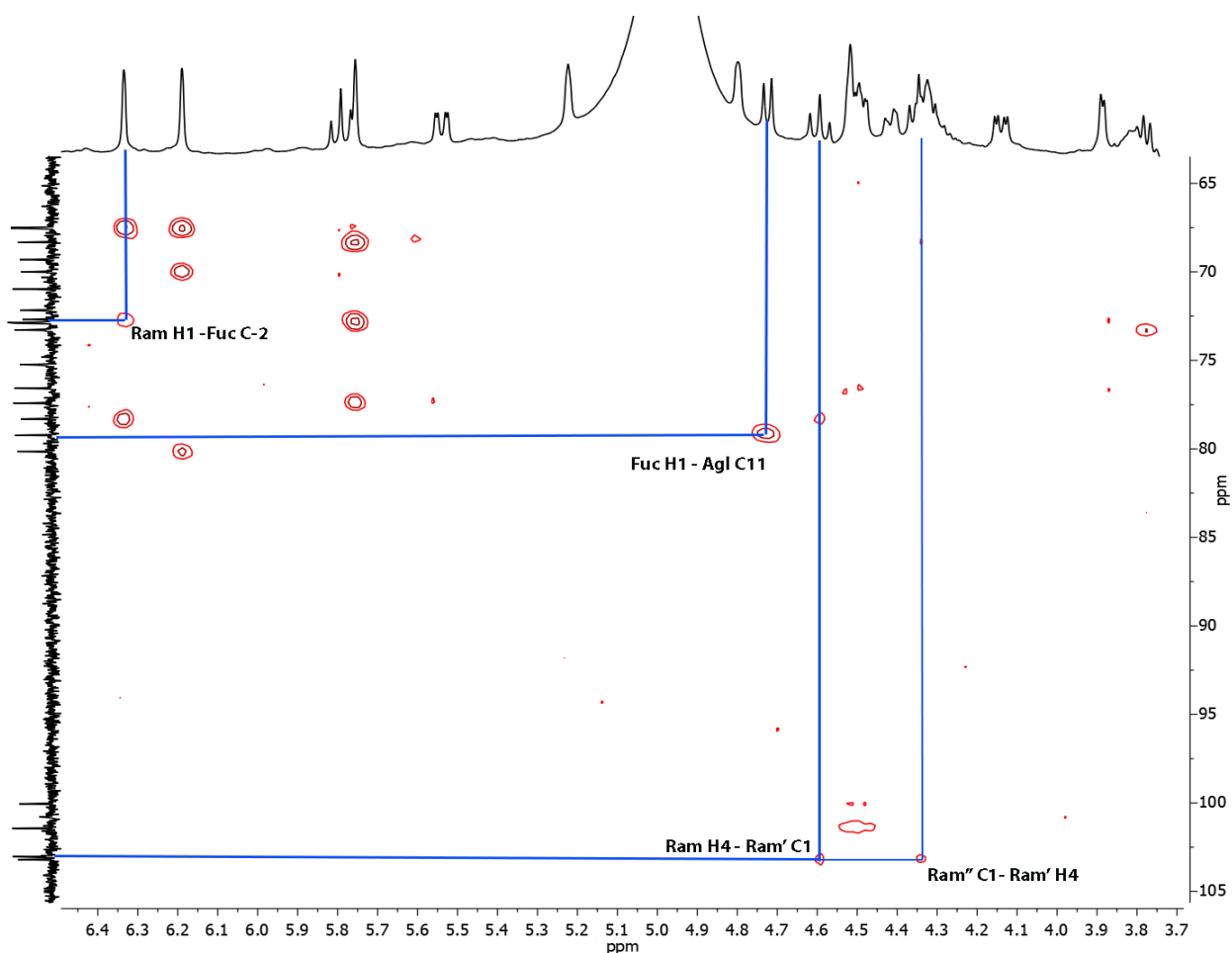


**Figura 62.** Espectro TOCSY de la región oligosacárida del compuesto BPF9P10



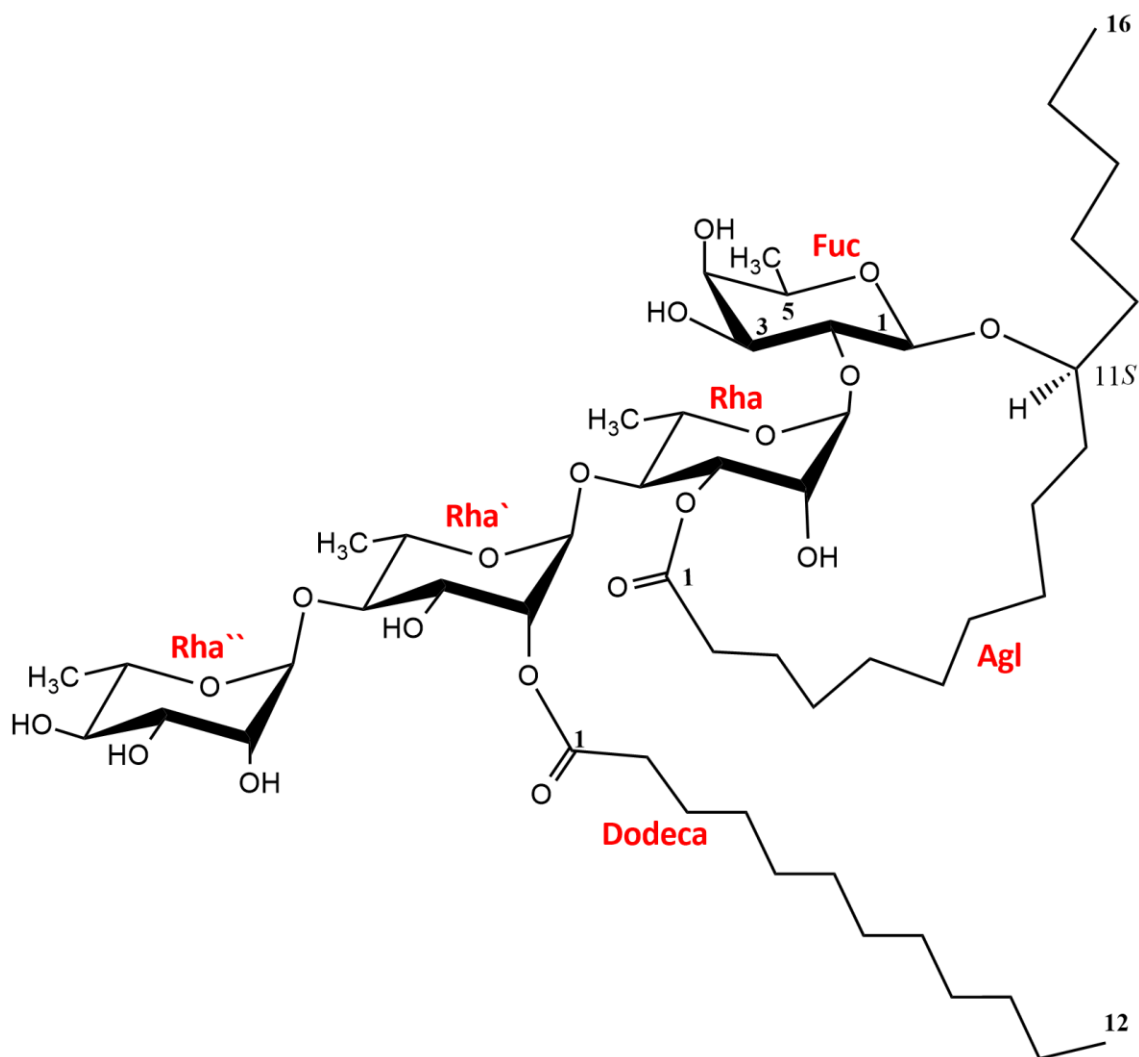
**Figura 63.** Espectro HSQC de la región oligosacárida del compuesto BPF9P10.

La secuencia de glicosilación se estableció mediante el análisis de las interacciones  $^3J_{CH}$  registradas en el experimento de dos dimensiones HMBC (**Figura 64**). Posteriormente, se observaron las siguientes conectividades  $^{2,3}J_{CH}$  claves en el experimento HMBC. Se observaron los siguientes cuadros de conectividad para BPF9P10: (a) entre Agl C-11 ( $\delta_C$  80)/Fuc H-1 ( $\delta_H$  4.77); (b) Rha C-1 ( $\delta_C$  100.5)/Fuc H-2 ( $\delta_H$  4.53); (c) Ram' C-1 ( $\delta_C$  102.7)/Rha H-4 ( $\delta_H$  4.71); (d) Rha'' C-1 ( $\delta_C$  103.7)/Rha' H-4 ( $\delta_H$  4.60), mismas que se reproducen en los espectros de los otros dos isómeros purificados, **BPF9P816** y **BPF9P828**. De esta forma y, exceptuando las señales más desplazadas en el espectro de RMN  $^1H$  que corresponden a hidrógenos anoméricos, se establecieron las posiciones de lactonización y esterificación.



**Figura 64.** Espectro HMBC de la porción oligosacárida del compuesto BPF9P10 donde se indica la secuencia de glicosilación.

En el **Cuadro 13** se enlistan los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento correspondientes a los protones y los carbonos de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida de la resina glicosídica purificada de la fracción **BF9P816**, el cual se identificó como el éster intramolecular: 11(*S*)-hidroxihexadecanoico 11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2-*O*-*n*-dodecanoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- *O*- $\beta$ -D-fucopiranosido, 1,3''-éster y se nombró como la hamiltonina II (**Figura 65**).



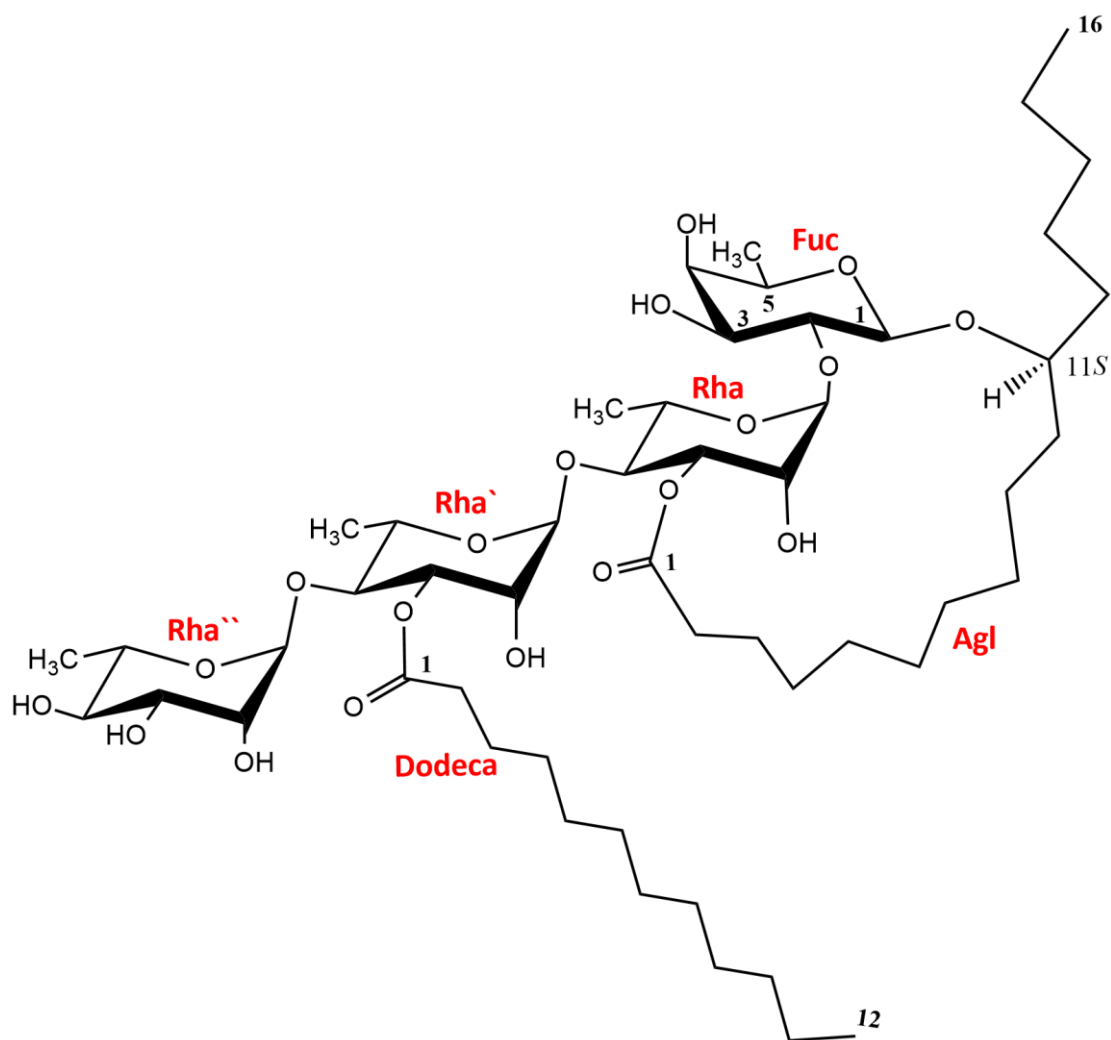
**Figura 65.** Estructura del compuesto BPF9P816 (hamiltonina II)



**Cuadro 13.** Constantes espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) de la hamiltonina II (BPF9P816) ( $\delta_{\text{H}}$  en ppm, multiplicidades,  $J$  en Hz).

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
Fuc- 1	4.76 d (7.8)	101.4
2	4.52 dd (9.5, 7.8)	72.9
3	4.16 dd (9.5, 3.5)	76.4
4	3.93 dd (3.5)	73.4
5	3.80 dq (3.5, 6.45)	71.0
6	1.51 d (6.4)	17.0
Ram-1	6.35 d (1.1)	100.1
2	5.27 dd (1.1, 2.8)	69.5
3	5.58 dd (2.8, 9.8)	77.7
4	4.59 dd (9.8, 9.8)	78.5
5	4.99 dq (9.8, 6.2)	67.7
6	1.57 d (6.2)	18.7
Ram'-1	5.56 d (1.7)	103.2
2	5.79 dd (3.3, 1.7)	74.1
3	4.60 m	70.8
4	4.34 dd (9.1, 9.1) *	80.2
5	4.32 m*	67.6
6	1.64 (5.4)	18.5
Ram''-1	6.23 d (1.6)	103.3
2	4.79 dd (1.6, 3.3)	72.1
3	4.45 dd (9.1, 3.3)	72.4
4	4.30 dd (9.1, 9.1)	79.5
5	4.37 dq (9.1, 6.4)	70.4
6	1.68 d (6.0)	18.2
Agl-1	-	175.7
2a	2.71 ddd (13.5, 10.3, 2.7)	34.2
2b	2.26 ddd (13.5, 7.1, 3.1)	79.2
11	3.82	79.2
16	0.97 t (7.0)	14.3
Dodeca-1	-	173.0
2a	2.31 m	34.3
2b	2.34 m	79.2
12	0.86 t (6.8)	14.0

En el **Cuadro 14** se enlistan los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento correspondientes a los protones y los carbonos de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida de la resina glicosídica purificada de la fracción **BPF9P828**, el cual se identificó como el éster intermolecular 11(*S*)-hidroxihexadecanoico 11-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(3-*O*-*n*-dodecanoil)- $\alpha$ -L-ramnpiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- *O*- $\beta$ -D-fucopiranosido, 1,3''-éster y denominado como la hamiltonina II (**Figura 66**).



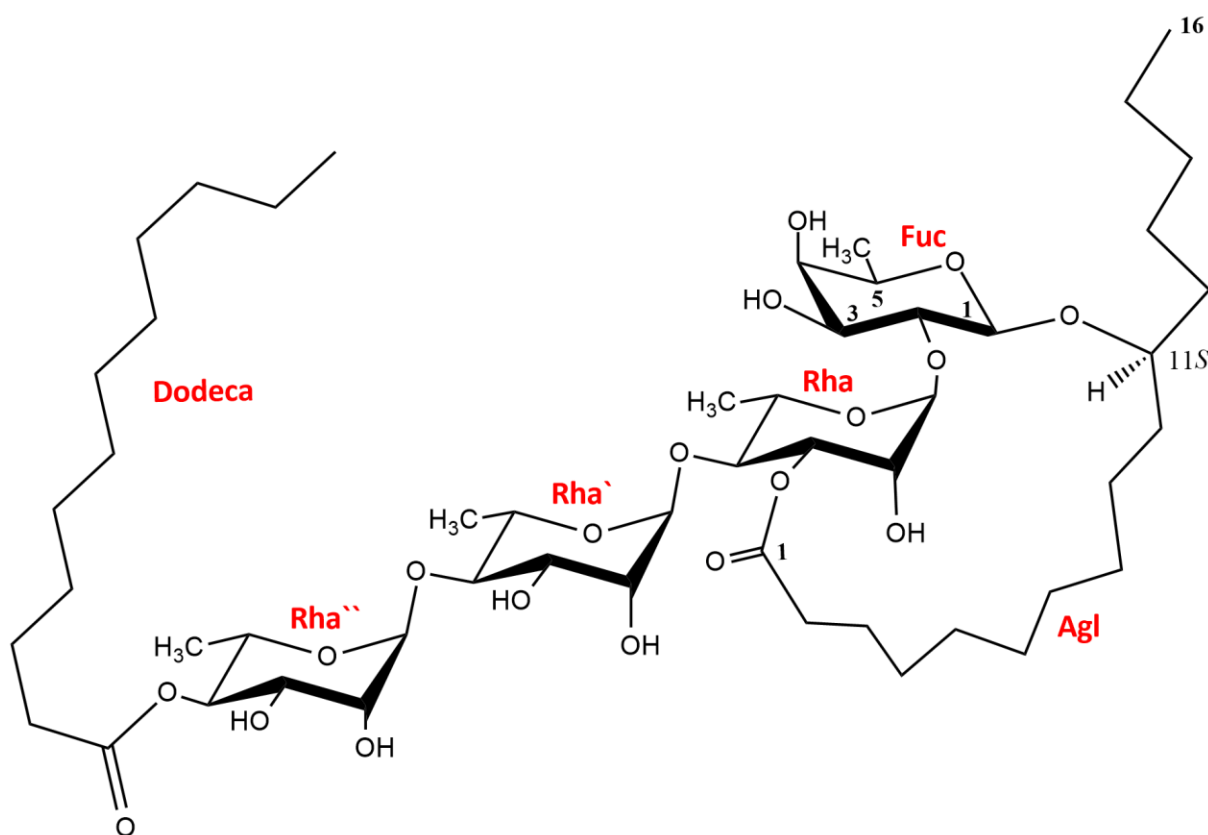
**Figura 66.** Estructura del compuesto BPF9P828 (hamiltonina III).

**Cuadro 14.** Constantes espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) de la Hamiltonina III (BPF9P828) ( $\delta_{\text{H}}$  en ppm, multiplicidades,  $J$  en Hz).

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
Fuc-1	4.77 d (7.8)	102
2	4.53 dd (10.6, 7.8)	73.3
3	4.18 dd (10.6, 3.8)	77.2
4	3.94 d (3.8)	73.9 *
5	3.81 dq (6.3)	71.5
6	1.51 d (6.3)	17.5
Ram-1	6.38 d (1.3)	100.5
2	5.22 dd (1.3, 2.8)	70
3	5.67 dd (2.8, 10.0)	79.2
4	4.71 dd (10.0, 10.0) *	76.1
5	5.05 dq (10.0, 6.2)	67.8
6	1.56 d (6.2) *	19.6
Ram ' -1	5.90 d (1.1)	102.7
2	4.71 dd (m) *	70.7
3	5.73 dd (3.0, 10.0) *	76.1
4	4.60 dd (10.0, 10.0)	77.5
5	4.37 dq (10.0, 6.2) *	69.4
6	1.55 d (6.1)	18.8
Ram'' -1	5.73 d (1.1) *	103.7
2	4.51 dd (1.1, 4.4)	72.9 *
3	4.36 dd (4.4, 4.4) *	72.8
4	4.25 dd (4.4, 7.4)	73.9 *
5	4.27 dq (7.4, 5.7)	71.0 *
6	1.59 d (5.7)	18.6
Agl - 1	-	174.2
2a	2.17 m	34.9
2b	2.29 m	
11	3.90 m	80
16	0.97 t (7.1)	14.9
Dodeca-1	-	172.4
2a	2.33 m	34.7
2b	2.48 m	
12	0.87 t (7.0)	14.6

\*Señales intercambiables

En el **Cuadro 15** se enlistan los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento correspondientes a los protones y los carbonos de cada una de las unidades monosacáridas que constituyen la porción oligosacárida de la resina glicosídica purificada de la fracción BF9P10, el cual fue identificado como el éster intramolecular del 11(*S*)-hidroxihexadecanoico 11-*O*-(4-*O*-*n*-dodecanoil)- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 2)- *O*- $\beta$ -D-fucopiranosido, 1,3''-éster y que corresponde a la hamiltonina IV en la serie de regioisómeros (**Figura 67**).



**Figura 67.** Estructura del compuesto BPF9P10 (hamiltonina IV)

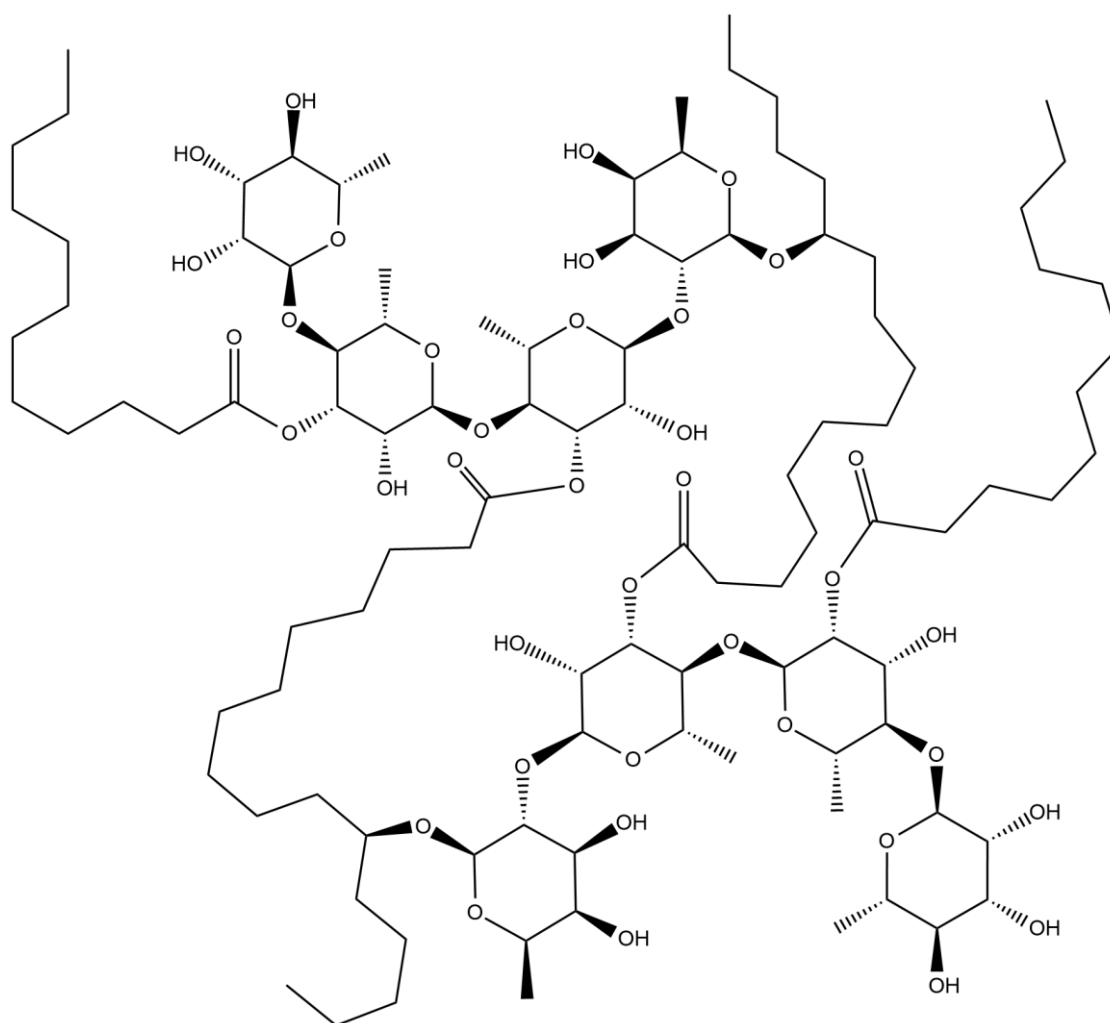
**Cuadro 15.** Constantes espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) de la Hamiltonina IV (BPF9P10) ( $\delta_{\text{H}}$  en ppm, multiplicidades,  $J$  en Hz).

Posición	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
Fuc- 1	4.72 d (7.8)	101.4
2	4.50 dd (9.5, 7.8) *	72.7
3	4.13 dd (9.5, 3.6)	76.6
4	3.88 d (3.6)	73.3
5	3.78 q (6.5)	70.9
6	1.48 d (6.3)	17
Ram-1	6.34 d (0.8)	100
2	5.22 dd (0.8, 2.8)	69.3
3	5.54 dd (9.9, 2.8)	72.7
4	4.59 dd (9.9, 9.9)	77.4
5	4.98 m*	67.5
6	1.58 d (6.2)	18.5
Ram'-1	5.76 d (0.8)	103.2
2	4.52 (3.3, 0.8)	72.7
3	4.42 dd (9.1, 3.3) *	72.9
4	4.34 dd (9.1, 9.1) *	80.2
5	4.35 m*	67.6
6	1.56 (6.4)	17.7
Ram''-1	6.19 d (0.8)	103
2	4.80 dd (0.8, 3.2)	72.1
3	4.49 dd (9.8, 3.2) *	70
4	5.79 dd (9.9, 9.8)	75.3
5	4.33 m*	68.3
6	1.34 d (6.4)	18.6
Agl-1	-	174.3
2a	2.23 ddd (13.5, 10.3, 2.7)	34.4
2b	2.10 ddd (13.5, 7.1, 3.1)	
11	3.82	79.2
16	0.97 t (7.06)	14.3
Dodeca-1	-	173.3
2a	2.46 m	34.6
2b	2.37 m	
12	0.83 t (6.66)	14.1

\*Señales intercambiables

Al igual que en el análisis de RMN  $^1\text{H}$ , el espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  generado por la muestra **BPF9P11**, revela la complejidad estructural resultante de una condensación intramolecular entre los compuestos **BPF9P816** y **BPF9P828**, sin embargo, a diferencia de los espectros de RMN  $^1\text{H}$ , los espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  no convergen en el mismo desplazamiento químico.

Haciendo uso de los datos recopilados a través de los experimentos de RMN y EM, se llegó a la estructura descrita en la **Figura 68**. En el **Cuadro 16** se enlistan los desplazamientos químicos así como las constantes de acoplamiento registradas para cada uno de las señales de la estructura dimérica.



**Figura 68.** Estructura del compuesto BPF9P11 (hamiltonina V).

**Cuadro 16.** Constantes espectroscópicas (RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) de la Hamiltonina V (BPF9P11). ( $\delta_{\text{H}}$  en ppm, multiplicidades,  $J$  en Hz).

Posición	Unidad A		Unidad B	
	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$	$\delta$ $^1\text{H}$	$\delta$ $^{13}\text{C}$
Fuc- 1	4.78 d (7.8)	101.2	4.77 d (4.78)	101.1
2	4.54 m	72.7	4.52 m	72.5
3	4.18 m	76.4	4.18 m	76.3
4	3.94 m	73.1	3.94 m	73.1
5	3.81 m	70.7*	3.80 m	70.7
6	1.52 d (6.3)	16.7	1.51 d (6.3)	16.7
Ram-1	6.39 d (1.7)	99.7	6.36 d (1.7)	99.7*
2	5.25 brs	69.2	5.28 brs	69.1
3	5.68 dd (2.8, 10.0)	78.5	5.58 dd (2.8, 9.8)	77.5
4	4.71 dd (10.0, 10.0)	75.3	4.59 dd (9.8, 9.8)	78.2
5	5.07 m *	66.9	5.00 dq *	67.2
6	1.56 d *	18.4	1.56 d *	18.8
Ram'-1	5.90 d (1.6)	101.9	5.57 d (1.7)	100.0
2	4.71 m	69.2	5.79 dd (3.3, 1.7)	73.9
3	5.73 dd (3.0, 10.0)	72.1	4.60 m	70.5
4	4.60 dd (10.0, 10.0)	76.7	4.32 dd (10.0, 10.0)	73.3
5	4.36 m	68.6	4.30 m	68.2
6	1.56 d *	18.5	1.65 d (5.4)	18.2
Ram''-1	5.73 d (1.1)	102.9	6.23 d (1.6)	103.0
2	4.52 dd (1.1, 4.4)	72.1	4.78 m	71.9
3	4.37 m	70.0	4.45 dd (9.2, 3.3)	72.2
4	4.27 dd (4.4, 7.4)	73.3	4.30 m	70.1
5	4.35 m	69.9	4.38 m	72.1*
6	1.60 d (5.7)	17.8	1.69 d (6.2)	18.0
Agl-1	-	173.9	-	174.4
2a	2.71 ddd (13.5, 10.3, 2.7)	33.9	2.71 ddd (13.5, 10.3, 2.7)	34.1
2b	2.26 ddd (13.5, 7.1, 3.1)		2.26 ddd (13.5, 7.1, 3.1)	
11	3.82	79.2	3.90 m	80
16	0.97 t (7.1) *	14.1	0.97 t (7.1) *	13.9
Dodeca-1	-	172.2	-	172.7
2a	2.33 m	34.1	2.23 m	34.2
2b	2.48 m		2.10 m	
12	0.87 t (7.0)	13.9	0.87 t (7.0)	13.9

\*Señales intercambiales

brs = broad signal

## 7.6 Pruebas biológicas de las resinas glicosídicas

En este proyecto se describen los ensayos biológicos realizados sobre los compuestos aislados de las muestras comerciales de la jalapa 2000 y la batata de purga (Mercadão Natural), incluidos aquellos previamente aislados, i.e., el compuesto **JF3P9** (Flores-Tafoya, 2019) y los compuestos **JF4P4** y **JF4P7**. La citotoxicidad de todas las resinas purificadas se evaluó inicialmente en un panel de líneas celulares derivadas de tumores humanos, a saber, líneas celulares colorrectales (HCT-116), carcinoma cervical (HeLa) y cáncer de mama (MCF-7 y MCF-7/Vin resistente a múltiples fármacos) utilizando el ensayo de la sulforodamina B (SRB) (Vichai et al., 2006).

### 7.6.1 Pruebas de citotoxicidad

En el **cuadro 17** se resumen los datos de citotoxicidad de los compuestos aislados. Ninguna de las resinas glicosídicas mostró actividad citotóxica intrínseca en ninguna de las líneas celulares ( $CI_{50} > 25 \mu M$ ). Este criterio se tomó en cuenta para los ensayos posteriores de sinergismo con la vinblastina.

**Cuadro 17.** Citotoxicidad de las resinas glicosídicas.

Compuesto	$CI_{50}$ ( $\mu M/mL$ )			
	<b>MCF-7</b>	<b>HeLa</b>	<b>HCT116</b>	<b>HCT15</b>
<b>JF4P4</b>	>25	>25	>25	>25
<b>JF4P5</b>	>25	>25	>25	>25
<b>JF4P7</b>	>25	>25	>25	>25
<b>JF4P9</b>	>25	>25	>25	>25
<b>JF3P9</b>	$22 \pm 2.5$	$21.6 \pm 1.8$	>25	$18.89 \pm 2.9$
<b>BPF9P816</b>	>25	>25	>25	>25
<b>BPF9P828</b>	>25	>25	>25	>25
<b>BPF9P10</b>	>25	>25	>25	>25
Colchicina	$0.005 \pm 0.002$	$0.006 \pm 2e-4$	$0.08 \pm 0.02$	$0.006 \pm 0.003$
Vinblastina	$0.004 \pm 1e-3$	$0.004 \pm 2e-4$	$0.3 \pm 0.02$	$0.004 \pm 1e-3$
Podofilotoxina	$0.024 \pm 7e-4$	$0.11 \pm 7e-3$	$0.062 \pm 0.01$	$0.04 \pm 3e-3$

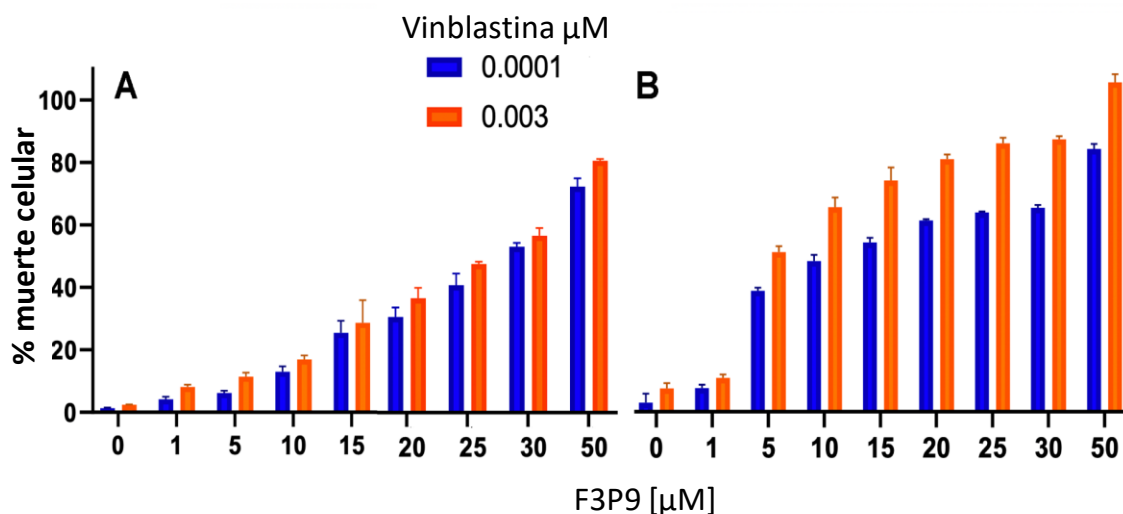
Cada valor se representa como el promedio  $\pm$  DE de tres diferentes experimentos individuales.

### 7.6.2 Pruebas de sinergismo

Se evaluó el efecto sinérgico de cada uno de los compuestos aislados a las concentraciones 50, 30 25, 20, 15, 10, 5 y  $1 \mu M$  con la vinblastina para aumentar el potencial citotóxico de ésta a concentraciones subletales ( $0.0001$  ó  $0.003 \mu M$ ).



El número de células sobrevivientes se determinó y comparó contra un blanco después de una incubación de 48 h. Por ejemplo, mientras que la vinblastina a 0.003  $\mu\text{M}$  apenas inducía el 1.5% de muerte celular (**Figura 69**), cuando el cultivo se suplementó con 5  $\mu\text{M}$  del compuesto **JF3P9**, este valor incrementó a un 47% en la línea de cáncer MCF-7 ( $\text{CI}_{50}$  5.0  $\mu\text{M}$ ). Asimismo, la vinblastina (0.003  $\mu\text{M}$ ) combinada con diversas concentraciones de esta resina glicosídica también resultó en la inducción de porcentajes considerables de muerte celular en la línea resistente MCF-7/Vin (**Figura 69 A**), incluso a concentraciones bajas ( $\text{CI}_{50}$  10.9  $\mu\text{M}$ ). La diferencia en la concentración inhibitoria media entre ambas cepas de la línea MCF-7 es congruente con la resistencia cruzada expresada por la línea MCF-7/Vin (**Cuadro 18; Figura 69B**).



**Figura 69.** Gráfico de la inhibición del crecimiento de la línea celular multirresistente MCF-7/Vin (**A**) y de la línea sensible MCF-7 (**B**) después de 48 h en una terapia combinatoria de la resina glicosídica JF3P9 con vinblastina, seguida por el ensayo de SRB.

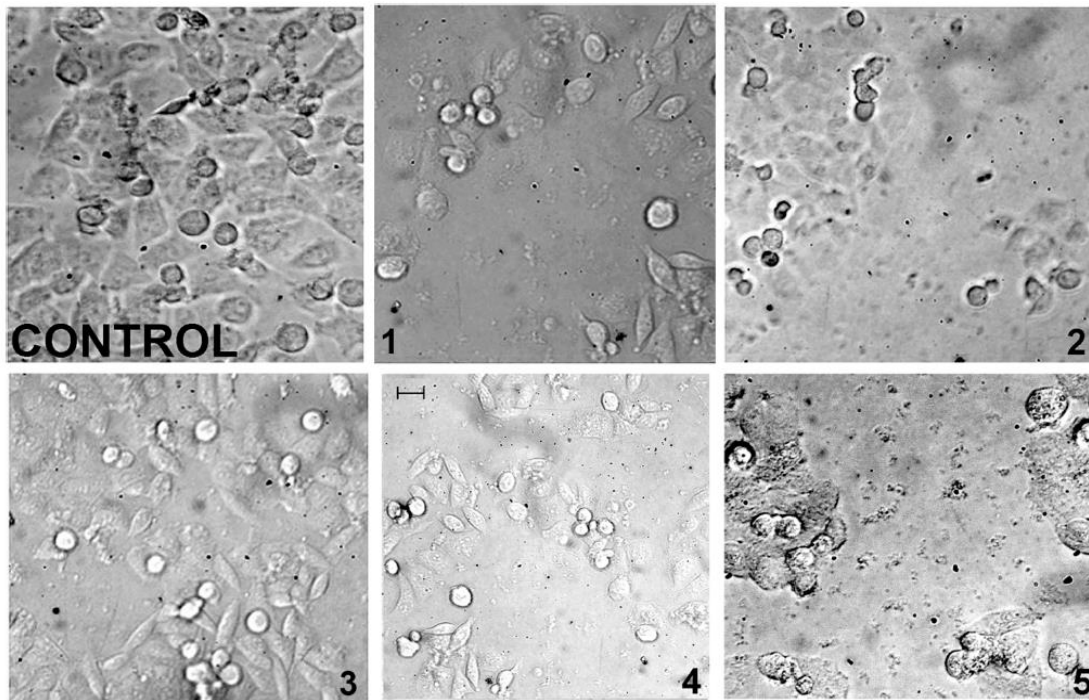
En el **cuadro 18** se resumen los valores de concentraciones medias inhibitorias ( $\text{CI}_{50}$ ) que representan la potenciación sinérgica de las resinas glicosídicas a diferentes concentraciones (1-50  $\mu\text{M}$ ) con la vinblastina a una concentración subinhibitoria (0.003  $\mu\text{M}$ ). La **Figura 70** ilustra la inhibición del crecimiento de las células resistentes MCF-7/Vin después de una terapia combinatoria con cada una de las resinas glicosídicas purificadas a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  con una dosis subletal de vinblastina (0.4  $\mu\text{M}$ ).

**Cuadro 18.** Ensayo de sinergismo de la vinblastina con las resinas glicosídicas sin actividad citotóxica intrínseca.

Compuesto <sup>a</sup>	CI <sub>50</sub> (μM)			
	MCF-7	MCF-7/Vin <sup>b</sup>	HeLa	HCT-116
<b>JF3P9</b>	5.0 ± 0.4	10.9 ± 0.6	5.2 ± 0.8	10.7 ± 1.1
<b>JF4P9</b>	4.4 ± 0.8	3.1 ± 0.9	14.6 ± 2.9	6.8 ± 1.5
<b>JF4P5</b>	4.7 ± 0.7	10.0 ± 0.8	26.1 ± 0.7	8.6 ± 1.2
<b>JF4P7</b>	15.2 ± 1.4	18.4 ± 1.6	26.6 ± 1.4	17.7 ± 0.7
<b>JF4P4</b>	12.3 ± 1.6	19.4 ± 1.8	23.8 ± 0.5	12.8 ± 2.6
<b>BPF9P816</b>	18.2 ± 1.4	29.5 ± 1.5	24.5 ± 1.4	25.9 ± 1.7
<b>BPF9P828</b>	14.7 ± 1.1	33.9 ± 2.7	29.8 ± 1.1	28.1 ± 0.6
<b>BPF9P10</b>	19.4 ± 2.8	26.1 ± 0.5	28.8 ± 1.1	26.1 ± 2.1
<b>BPF9P11</b>	4.2 ± 0.7	5.0 ± 0.9	16.1 ± 0.7	7.6 ± 1.2
<sup>c</sup> Colchicina	0.05 ± 0.002	1.57 ± 0.26	0.006 ± 2e-4	0.08 ± 0.02
<sup>c</sup> Vinblastina	0.035 ± 0.01	1.63 ± 0.25	0.004 ± 2e-4	0.3 ± 0.02
<sup>c</sup> Podofilotoxina	0.024 ± 7e-4	0.11 ± 7e-3	0.062 ± 0.01	0.04 ± 3e-3

<sup>a</sup>Los compuestos fueron evaluados a las concentraciones de 50, 30, 25, 15, 10, 5 y 1 μM combinados con la vinblastina a una concentración de 0.003 μM. <sup>b</sup>Vinblastina para la línea MCF-7/Vin se ensayó a una concentración de 0.4 μM. <sup>c</sup>CI<sub>50</sub> usada como control en los ensayos de citotoxicidad con SRB.

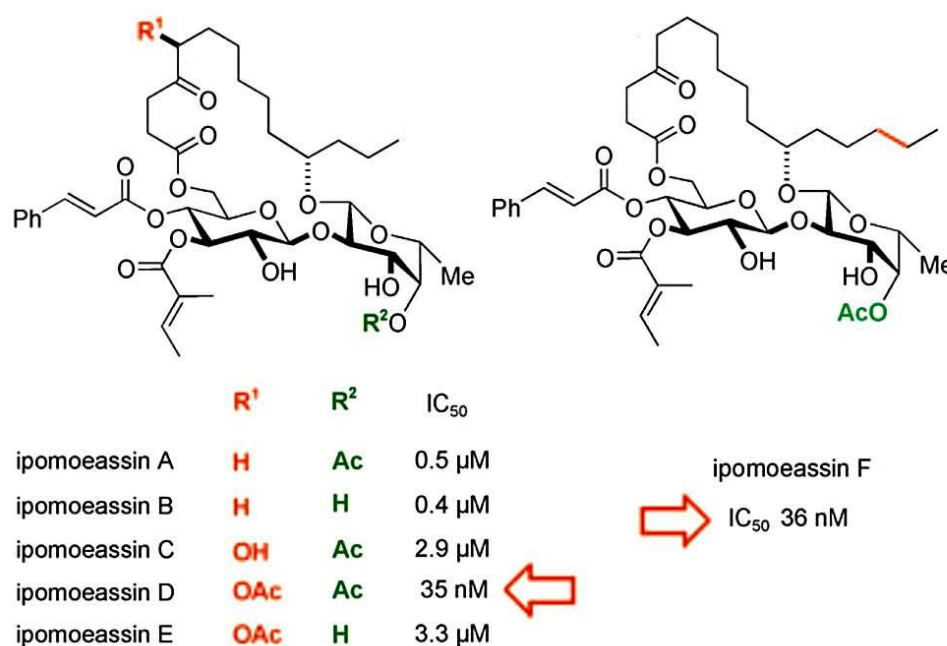
Todos estos compuestos aún a concentraciones bajas de 5 μM siguieron demostrando una potenciación significativa de la citotoxicidad de la vinblastina ensayada a dosis subinhibitorias. Estos resultados demostraron que dosis subletales de vinblastina en combinación con las resinas glicosídicas inducen un efecto sinérgico citotóxico de mayor potencia, mientras que el tratamiento con cada una de las resinas puras, de manera individual, no favorece la muerte celular. Por lo tanto, este efecto sinérgico ilustra la interacción de dos productos naturales, un agente quimioterapéutico y un segundo inactivo como agente citotóxico, cuando el efecto combinado es mayor que el efecto observado cuando se administra el agente activo por separado (Pushpakom et al., 2019). Este tipo de observación se demostró previamente para la ipomeólida A, un pentasacárido cíclico del ácido (11*R*)-hidroxihexadecanoico, el cual potenció la citotoxicidad (50%) a una concentración de 4 μM, en combinación con doxorubicina (1 μM) en células K-532 incrementando las respuestas apoptóticas (Sura et al., 2019). Este tipo de estrategia resulta de utilidad para el reposicionamiento de fármacos en la quimioterapia de las neoplasias malignas refractarias.



**Figura 70.** Visualización microscópica de la línea celular resistente MCF-7/Vin después de 48 h de incubación con una dosis subinhibitoria de vinblastina  $0.4 \mu\text{M}$  (control) en combinación con las resinas glicosídicas aisladas 1:JF3P9, 2:JF4P9, 3:JF4P5, 4:JF4P7, 5:JF4P4.

Las resinas glicosídicas, en combinación con la vinblastina, fueron capaces de restaurar la susceptibilidad quimioterapéutica en células MCF7-/Vin, como previamente se había reportado para la muruocoidina V y la purgina II (Figuroa-González, 2012). Estos compuestos anfipáticos aparentemente interactúan con las bombas de eflujo expresadas en células multirresistentes (MCF7-Vin) como se demostró con ensayos de eflujo de rodamina 123 y citometría de flujo después de incubar las células con el anticuerpo monoclonal de ratón (UIC2 anti-MDR1) específico para la Gp-P (Lira-Ricárdez, 2020). De acuerdo con estudios previos, la combinación de glicoconjugados con agentes quimioterapéuticos, como la vinblastina, también puede interferir en importantes vías oncogénicas que conducen a la formación de especies reactivas de oxígeno, lo que sensibiliza las células cancerosas y mejora la actividad de los medicamentos antineoplásicos (Duarte et al., 2021). Las propiedades anfifílicas de las resinas, similares a los surfactantes, también se han asociado con frecuencia con la citotoxicidad de los glicolípidos (Govindarajan 2028).

Los efectos sinérgicos observados en la presente investigación también pueden ser el resultado del impacto sobre la autofagia, un proceso celular catabólico ejercido en respuesta al estrés oxidativo (Anand & Bharadvaja, 2022; Devi et al., 2021). La terapia combinatoria también puede prevenir la propagación de células cancerosas al inhibir la proliferación celular, el daño a las proteínas/ADN (alquilación de ADN), las vías de señalización del cáncer y la metástasis, que eventualmente pueden producir la muerte celular. Sin embargo, se recomiendan estudios para una evaluación adicional de los mecanismos sinérgicos citotóxicos subyacentes a estas combinaciones con las resinas glicosídicas. Finalmente, el equilibrio lipofilicidad/hidrofilicidad ha demostrado ser una consideración crítica para la citotoxicidad de las resinas glicosídicas (Lira-Ricárdez & Pereda-Miranda, 2020) como lo demuestran ipomoeasinas naturales y algunos de sus derivados con actividad inhibidora del crecimiento celular a una dosis nanomolar (IC = 4.2–36 nM). La ipomoeasina F se une al complejo enzimático Sec61 e induce citotoxicidad al interrumpir múltiples aspectos de la biogénesis de proteínas en el retículo endoplásmico, principalmente la translocación de proteínas (Zong et al., 2019).



**Figura 71.** Estructuras de las ipomoeasinas A-F y datos de citotoxicidad (CI<sub>50</sub>) contra la línea celular de cáncer de ovario humano (A2780). El equilibrio lipofilicidad/hidrofilicidad es un parámetro crítico para la citotoxicidad como se desprende de los valores de CI<sub>50</sub> descritos para las ipomoeasinas. Reproducido de Nagano et al, 2009

## 8. CONCLUSIONES

1.- Los métodos de aislamiento y caracterización descritos en la presente disertación para los hamiltoniósidos I y II, y las hamiltoninas II-IV de *Operculina hamiltonii* demuestran que las resinas glicosídicas, al estar presentes en mezclas compuestas de compuestos homólogos, son de difícil aislamiento y purificación. La técnica de HPLC acoplada a la detección con índice de refracción a nivel semipreparativo en modo de reciclaje resultó una buena herramienta para la separación y la purificación de estos compuestos.

2.- Haciendo uso de las técnicas de RMN y EM, se elucidó la estructura molecular de seis compuestos novedosos provenientes de preparados fitoterapéuticos manufacturados a base de la raíz de Jalapa de flores amarillas, *O. hamiltonii*. Este análisis permitió identificar dos resinas glicosídicas novedosas acíclicas de la muestra comercial Jalapa 2000 (hamiltoniósidos I y II), las cuales tienen como núcleo constitutivo pentasacárido al ácido operculínico A y se aislaron como ésteres metílicos, a diferencia de sus homólogos macrolactónicos previamente caracterizados (los batatinósidos IV (F4P4) y IX (F4P7) y también purificados de esta fuente vegetal. La única diferencia estructural entre las estructuras pentasacáridas de los hamiltoniósidos I y II radica en el largo de la cadena alifática del ácido orgánico esterificante, es decir, el ácido *n*-dodecanóico para el hamiltoniósido I y el ácido *n*-decanóico para el hamiltoniósido II.

3.- Por otra parte, cuatro resinas glicosídicas fueron aisladas de la muestra comercial etiquetada como “batata de purga (Mercadão Natural)”; tres de las cuales corresponden a regioisómeros estructurales de posición en la macrolactonización del núcleo tetrasacárido caracterizado como el ácido operculínico C y la cuarta se describió como un dímero tipo éster de dos de los tetrasacáridos individuales. Las hamiltoninas II-IV, se identificaron como derivados del ácido operculínico C. La relación estructural de isomería entre estos compuestos resultó una consecuencia de la posición de esterificación por el ácido *n*-dodecanóico del núcleo oligosacárido. Esta diastereoisomería afectó la lipofilicidad de cada uno de los compuestos y sus tiempos de retención en HPLC en fase reversa C-18 y reflejan la disponibilidad de interacciones entre la cadena alquílica del ácido esterificante y la matriz del soporte de la fase estacionaria.

4.- La caracterización estructural de estas resinas glicosídicas novedosas permitió incrementar la información relacionada con la diversidad del acervo estructural de estos glicolípidos biodinámicos y su relación entre la estructura molecular y su potencial farmacológico. Ninguna de las resinas glicosídicas purificadas demostró tener potencial citotóxico cuando éstas fueron sometidas a un ensayo de SRB con diferentes líneas celulares de cáncer humano, sin embargo, la actividad sinérgica de las resinas glicosídicas en conjunto con vinblastina en concentraciones subletales se demostró.

5.- La hamiltonina I potenció significativamente la actividad citotóxica de la vinblastina a concentraciones subinhibitorias (0.4  $\mu\text{M}$ ) sobre líneas celulares resistentes (MCF-7/Vin). Este efecto demostró que cuando las resinas glicosídicas se evalúan individualmente no inducen la muerte celular, a diferencia de cuando las células se someten a terapias combinatorias con vinblastina en concentraciones subinhibitorias.

6.- Las actividades biológicas demostradas para las resinas glicosídicas, aunadas a la reciente popularización de los fármacos basados en carbohidratos, hace de los glicolípidos de las convolvuláceas una excelente fuente de estructuras biodinámicas que actúen en conjunto con las terapias antineoplásicas y así contrarrestar los efectos secundarios producto de la resistencia múltiple cruzada que ocurren en la mayoría de las neoplasias malignas bajo quimioterapia.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Anand, S.; Bharadvaja, N. (2022). *Revista Brasileira Farmacognosia*, 32, 211–220.
- Austin, D. F. (1973). The American Erycibeae (Convolvulaceae): Maripa, Dicrasontyles, and Lysiostyles. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 306-412.
- Austin, D. F., Staples, G. W. (1983). Additions and changes in the neotropical Convolvulaceae-notes on *Merremia*, *Operculina*, and *Turbina*. *Journal of the Arnold Arboretum*, 64, 483-489.
- Bah, M., Pereda Miranda, R. (1997). Isolation and structural characterization of new glycolipid ester type. *Tetrahedron*,, 9007-9022.
- Bah, M., Pereda-Miranda, R. (1996). Detailed FAB-mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individuals oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*, 52: 13063.
- Bah, M., Chérigo, L., Cardoso , A., Fragoso-Serrano, M., Hammond, B., Pereda-Miranda, R. (2007). Intrapilosins I-VII, pentasaccharides from the seed of *Ipomoea intrapilosa*. *J. Nat. Prod.*, 70, 1153.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2015). Jalapinoside, a aacrocylic bisdesmoside from the resin glycosides of *Ipomea purga*, as a modulator of multidrug resistance in human cancer cells. *Journal of Natural Products*, 168-172.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2015). Jalapinoside, a macrocylic bisdesmoside from the resin glycosides of *Ipomoea purga*, as a modulator of multidrug resistance in human cancer cells. *Journal of Natural Products*, 168-172.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2016). Jalapinoside II, a bisdesmoside resin glycoside, and related glycosidic acids from the officinal jalap root (*Ipomoea purga*). *Phytochemistry Letters*, 85-93.
- Bye, R., Linares, E. (2013) Códice de la Cruz-Badiano. Medicina prehispánica. Arqueología Mexicana, Editorial Raíces, Cd. México, Edición especial: 50, Primera parte, p. 91.
- Castañeda Gómez, J., Pereda Miranda, R. (2011). Resin glycosides from the herbal drug jalap (*Ipomoea purga*). *Journal of Natural Products*, 1148-1153.
- Castañeda-Gómez, J., Figueroa-González, G., Jacobo, N., Pereda-Miranda, R. (2013). Purgin II, a resin glycoside ester-type dimer and inhibitor of multidrug efflux pumps from *Ipomoea purga*. *Journal of Natural Products*, 64-71.

- Castañeda-Gómez, J., Lavias-Hernández, P., Fragoso-Serrano, M., Lorena, A., Pereda-Miranda, R. (2019). Acylsugar diversity in the resin glycosides from *Ipomoea tricolor* seeds as chemosensitizers in bres cancer cells. *Phytochemistry*, 32:77-82.
- Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Cruz-Morales, C., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2017). HPLC-MS profiling of the multidrug-resistance modifying resin glycoside content of *Ipomoea alba* seeds. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27(4):434-439.
- Castañeda-Gómez, J.F., Leitao, S.G., Pereda-Miranda, R. (2023) Hederifolic acids A-D, hepta and hexasaccharides from the resin glycosides of *Ipomoea hederifolia*. *Phytochemistry* en prensa.
- Cho, Y., Kim, Y. K. (2020). Cancer Stem Cells as a Potential Target of Overcome Multidrug Resistance. *Frontiers in Oncology*, 10: 764.
- Corona-Castañeda, B., Rosas-Ramírez, D., Castañeda-Gómez, J., Aparicio-Cuevas, M. A., Fragoso-Serrano, M., Figueroa-González, G., Pereda-Miranda, R. (2016). Resin glycosides from *Ipomoea wolcottiana* as modulators of the multidrug resistance phenotype in vitro. *Phytochemistry*, 123:48-57.
- Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Figueroa-González, G., Mendoza-García, A. D., Lorence, A., Pereda-Miranda, R. (2012). Mammalian multidrug resistance lipopenthasaccharide inhibitors from *Ipomoea alba* seeds. *Journal of Natural Products*, 75:1603-1611.
- Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Fragoso-Serrano, M., Figueroa-González, G., Lorence, A., Pereda-Miranda, R. (2016). Resin glycosides from *Ipomoea alba* seeds as potential chemosensitizers in breast carcinoma cells. *Journal of Natural Products*,:3093-3104.
- Cunha, G. H., Santos, L. K., Fechine, F. V., Pontes, A. V., Oliveira, J. C., Moraes, M. O., Moraes, M. E. (2011). Efficacy of the tincture of jalapa in the treatment of functional constipation: A double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Contemporary Clinical Trials*, 153-159.
- Daló, N., Moussatché, H. (1978). Acción tóxica de las plantas del género *Ipomoea*. *Rev Universidad Centro Occidental*, 25-39.
- Devi, A.; Dwibedi, V.; Khan, Z. A. (2021). *Revista Brasileira Farmacognosia.*, 31, 387-407.
- Ding, W., Jiang, Z.-H., Wu, P., Xu, L., Wei, X. (2012). Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry*, 165-174.



- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J., Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 523-539.
- Du, D., Wang-Kan, X., Neuberger, A., van Veen, H. W., Pos, K. M., Piddock, L. J., Luisi, B. F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews Microbiology*, 523-539.
- Duarte, D.; Cardoso, A.; Vale, N. (2021). *International Journal of Molecular Sciences.*, 22, 7408.
- Emran TB, Shahriar A, Mahmud AR, Rahman T, Abir MH, Faijanur-Rob-Siddiquee M, Ahmed H, Rahman N, Nainu F, Wahyudin E, Mitra S. (2020) Multidrug resistance in cancer: understanding molecular mechanisms, immunoprevention, and therapeutic approaches. *Frontiers in Oncology*, 2581. doi: 10.3389/fonc.2022.891652
- Escalante-Sánchez, E., Rosas-Ramírez, D., Linares, E., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (2008). Batatinosides II-VI, acylated lipooligosaccharides from the resin glycosides of sweet potato. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9423-9428.
- Escobedo-Martínez, C., Pereda-Miranda, R. (2007). Resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *Journal of Natural Products*, 974-928.
- Evans, W. C. (2010). *Trease and Evans Pharmacognosy*. London: Saunders.
- Fang, X.-T. L., Wei-Shuo. (2006). *Medicinal chemistry of bioactive natural products*. Beijing: Wiley Interscience.
- Figuroa-González, G., Nadia, J.-H., Zentella-Dehesa, A., Pereda-Miranda, R. (2011). Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Natural Products*, 93-97.
- Gomes, A., da Silva, P., Soares, S., da Silva, C. E., Gallão, M. I., Germani, R., & Ricardo, N. (2009). Isolation and physico-chemical and rheological characterisation of the Brazilian jalap starch (*Operculina tuberosa* Meisn.). *Carbohydrate Polymers*, 885-890.
- González Pozos, L. (2018). *Purificación mediante HPLC y elucidación estructural de un pentasacárido del ácido 12-hidroxiocetadecanoico de la jalapa brasileña (Ipomoea hamiltonii)*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química, UNAM, México.
- Govindarajan, M. (2018) Amphiphilic glycoconjugates as potential anti-cancer chemotherapeutics. *European Journal of Medicinal Chemistry.*, 143, 1208–1253.

- Graf E, Dahlke E (1964) Über die Exogonsäure. *Planta Medical* 12:293–295.
- Heine, H. (1960). *Operculina macrocarpa* (L.) Urb (Convolvulaceae) in West Tropical Africa. *Kew Bull*, 14: 397-399.
- Hoffman, A. (1971). Teonanácatl and Ololiuqui, two ancient magic drugs of Mexico. *B. Narcotics*, 3-14.
- Johnsun, R. W. (1980). A new combination in *Operculina* (Convolvulaceae). *Journal Adelaide Botanical Garden*, 2: 355.
- Kruse, L. H., Bennett, A. A., Mahood, E. H., Lazarus, E., Park, S. J., Schroeder, F., Moghe, G. D. (2022). Illuminating the lineage-specific diversification of resine glycoside acylsugars in the mornign glory (Convolvulaceae) family using computational metabolomics. *Horticulture Research*, 9: 1-10.
- Lawson EN, Jamie JF, Kitching W (1992) Absolute stereochemistry of exogonic acid. *Journal of Organic Chemistry* 57:353–358.
- Linajes, A., Rico Gray, V., Carrión, G. (1994). Traditional Productios System of the Root of Jalapa, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, Mexico. *Economic Botany*, 84-89.
- Lira-Ricárdez, J., Pereda-Miranda, R. P., Castañeda-Gómez, J., Fragoso-Serrano, M., Simas, R. C., Leitao, S. G. (2019). Resin Glycosides from the roots of *Operculina macrocarpa* (Brazilian Jalap) with purgative activity. *Journal of Natural Products*, 1664-1667.
- Lund, M., Petersen, T., Dalhoff, K. (2017). Clinical Implications of P-Glycoprotein Modulation in Drug–Drug Interactions. *Drugs*, 859-883.
- Mabberley, D. J. (2008). *The plant book*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mannich C, Schumann P (1938) Über Jalapenharz und dessen Hauptbestandteil, das Convolvulin. *Archiv de Pharmazie* 276:211–226.
- Matos, F. (1997). *O formulário fitoterápico do Prof. Dias da Rocha*. Fortaleza: UFC Edições.
- Michelin, D., Gandolfo Finati, S. C., Silva Sacramento, L. V., Vilegas, W., Nunes Salgado, H. (2010). Controle de qualidade de raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18-22.

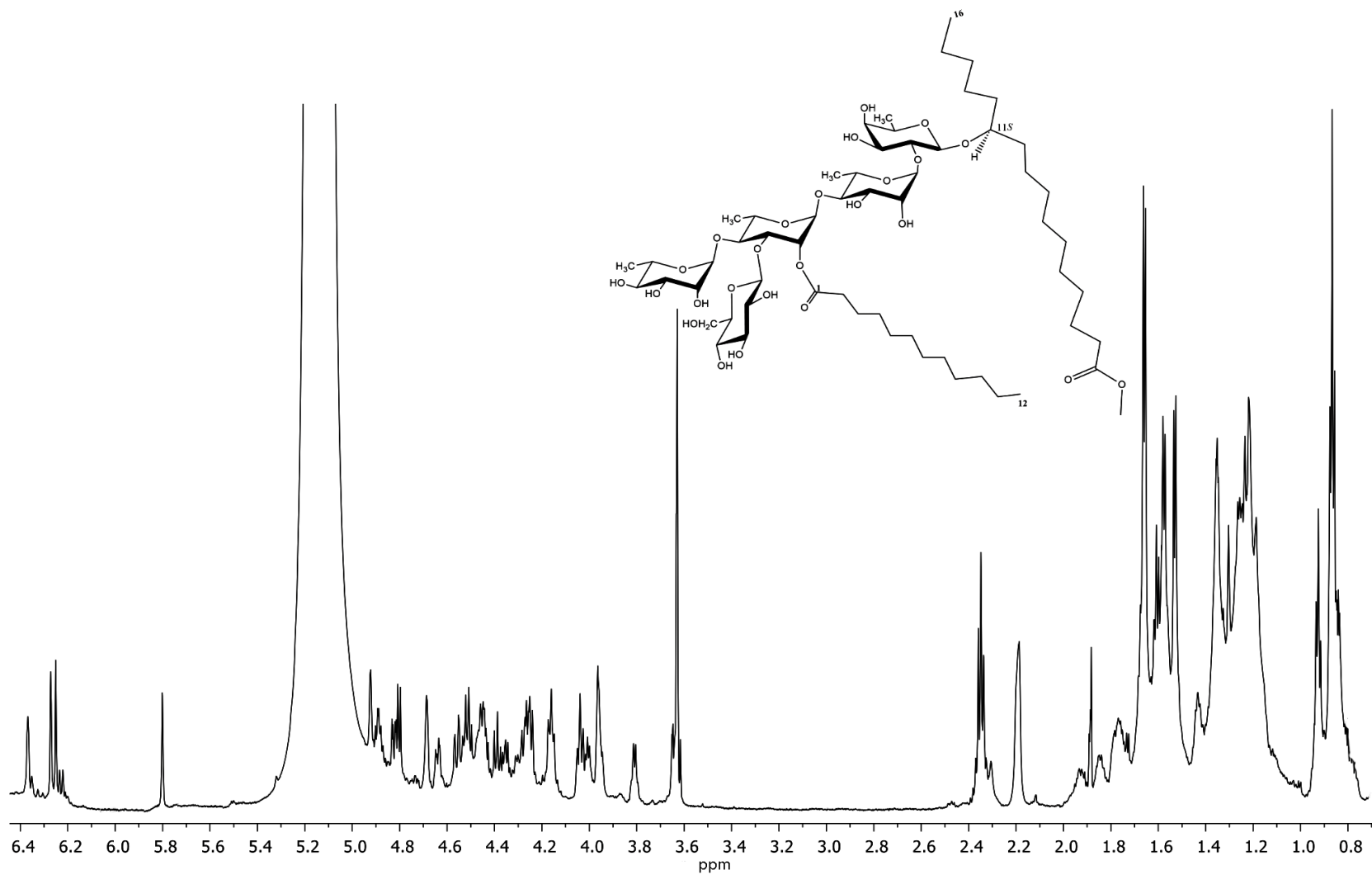
- Miranda, F.; Valdés, J. Comentarios botánicos. En: *Libellus de Medicinalibus Indorum Herbis*; Instituto Mexicano del Seguro Social: Mexico City, 1964; Capítulo III; pp 243-282.
- Monardes, N. (1990). *Herbolaria de las Indias. Historia Natural del Nuevo Mundo*. México: Instituto Mexicano del Seguro Social.
- Montiel-Ayala, M. E., Jiménez-Bárceñas, N. R., Castañeda-Gómez, J., Moreno-Velasco, A., Lira-Ricárdez, J., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2021). Glycosidic Acid Content from the Roots of *Operculina hamiltonii* (Brazilian Jalap) and Some of Their Phytopharmaceuticals with Purgative Activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 31: 698 - 708.
- Montúfar López, A. (2018) Las flores de Xochipilli, un acercamiento taxonómico. En: *La Flor en la Cultura Mexica*. Museo Nacional de Antropología, Instituto Nacional de Antropología e Historia, Cd. de México, pp. 45-50
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T. (1987). Resin Glycosides I. Isolation and Structure Elucidation of Orizabin I, II, III and IV, genuine Resin Glycosides from the root of *Ipomoea Orizabensis*. *Tetrahedron*, 3889 - 3902.
- Noda, N., Yoda, S., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992). Resin Glycosides. XV. Simonins I-V, Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the Root of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chem. Pharm. Bull.*, 3163 - 3168.
- Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1989). Resin Glycosides. V. Identification and Characterization of the Component Organic and Glycosidic Acids of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides ("Jalapin") from Rhizoma Jalapae Braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Phar. Bull.*, 3209-3213.
- Ono, M. (2017). Resin glycosides from Convolvulaceae plants. *J. Nat. Med.*, 591-604.
- Ono, M., Fujimoto, K., Kawata, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1992). Resin Glycosides. XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from Rhizoma Jalapae Braziliensis (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, 1400-1403.
- Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1991). Resin Glycosides. XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII, New Ether-Soluble Resins Glycosides of Rhizoma Jalapae Braziliensis (Root of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, 2534-2539.
- Ono, M., Nishi, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. (1990). Resin Glycosides. IX. Operculins I, II, V and VIII, New Ether-Soluble Resin Glycosides of Rhizoma Jalapae Braziliensis (the Roots of *Ipomoea operculata*). *Chem. Pharm. Bull.*, 2986-2991.

- Ono, M., Nishioka, H., Fukushima, T., Kunitatsu, H., Mine, A., Kubo, H., Miyahara, K. (2009). Components of Ether-Insoluble Resin Glycoside (Rhamnoconvolvulin) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis*. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 262-268.
- Ono, M., Oda, S., Yasuda, S., Mineno, T., Okawa, M., Kinjo, J., Miyahara, K. (2017). Acylated Glycosidic Acid Methyl Esters Generated from the Convolvulin Fraction of *Rhizoma Jalapae Braziliensis* by Treatment with Indium(III) Chloride in Methanol. *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 107-11.
- Pagadala, N. S., Khajamohiddin, S., Tuszynski, J. (2017). Software from molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 91-102.
- Pereda Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron*, 3145-3154.
- Pereda Miranda, R., Castañeda Gómez, J., Rosas Ramírez, D. (2010). *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products* (Vol. 2). (A. D. Kinghorn, O. H. Columbus, & J. Kobayashi, Eds.) New York: Springer-Verlag.
- Pereda Miranda, R., Fragoso Serrano, M., Escalante Sánchez, E., Hernández Carlos, B. (2006). Profiling of the Resin Glycoside Content of Mexican Jalap Roots with Purgative Activity. *Journal of Natural Products*, 1460-1466.
- Pereda-Miranda R (2021) A viagem da jalapa desde a Vera Cruz mexicana até o Jalapão brasileiro. *Revista A Flora*, Número 3: 4-7.
- Pereda, R. M., Bah, M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 111-131.
- Pereda-Miranda, R., Kaatz, G., Gibbons, S. (2006). Polyacylated Oligosaccharides from Medicinal Mexican Morning Glory Species as Antibacterials and Inhibitors of Multidrug Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products*, 406-409.
- Planchon, L., Bretin, P. (1937). *Précis de matière médicale*. Paris: Librairie Maloine.
- Rodriguez, J., O'Neil, S., Walczak, M. A. (2018). Constrained saccharides: a review of structure, biology, and synthesis. *Natural Product Reports*, 220-229.
- Rosas-Ramírez, D., Pereda-Miranda, R. (2013). Resin Glycosides from the Yellow-Skinned Variety of Sweet Potato (*Ipomoea batatas*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 9488-9494.

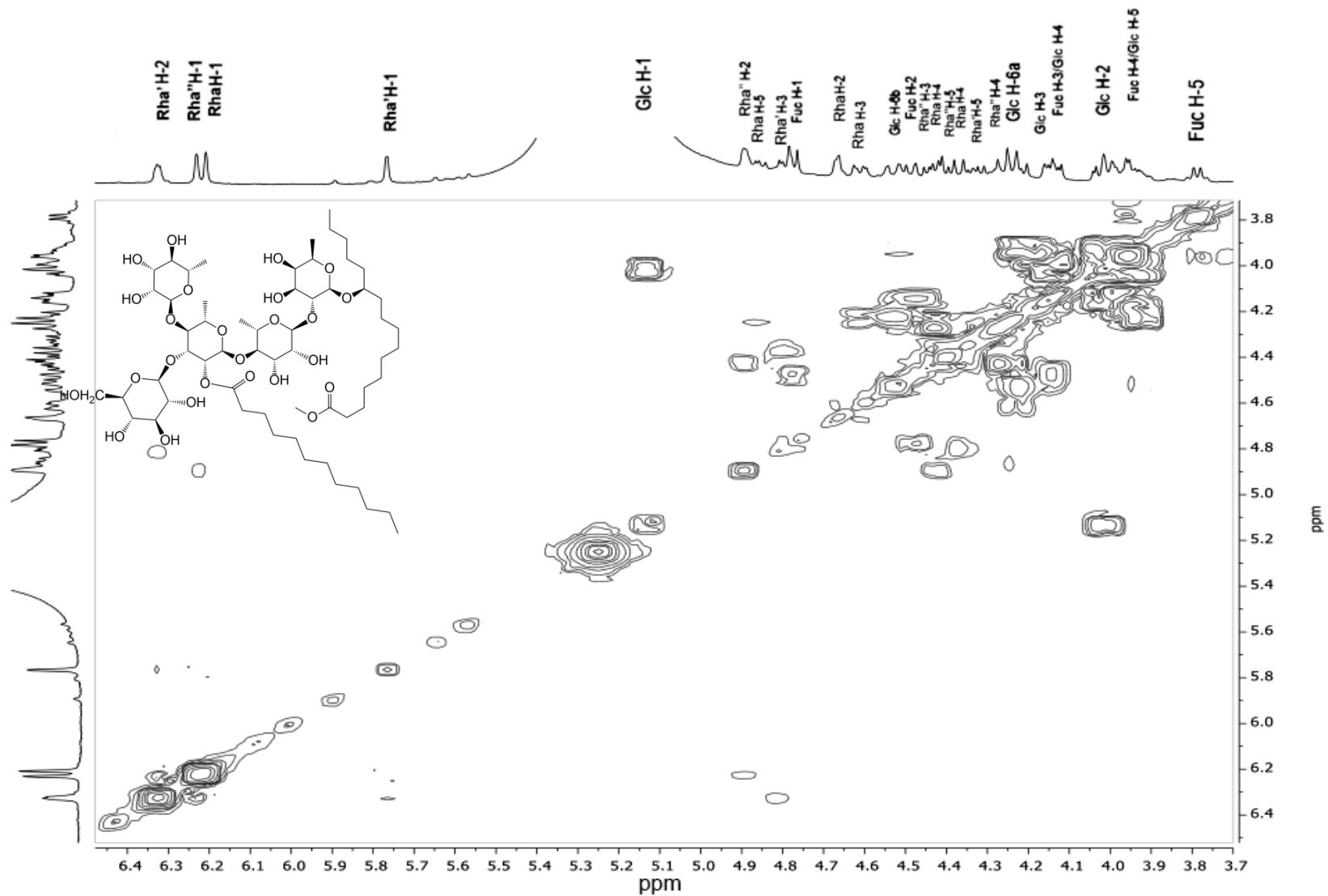
- Rosas-Ramírez, D., Escalante-Sánchez, E., Pereda-Miranda, R. (2011). Batatins III-VI, glycolipid ester-type dimers from *Ipomoea batatas*. *Phytochemistry*, 773-780.
- Sidana, J., Joshi, L. K. (2013). Recycle HPLC: a powerful tool for the purification of natural products. *Chromatogra. Res. Int.*
- Simoës, A. R., Staples, G. (2017). Dissolution of Convolvulaceae tribe Merremiae and a new classification of the constituent genera. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 561-586.
- Song, W. B., Wang, W. Q., Zhang, S. W., Xuan, L. J. (2015). Multidrug resistance-reversal effects of resin glycosides from *Dichondra repens*. *Bioorganic Medical Chemistry Letters*, 25(4):795-798.
- Staples, G. W., Simoës, A. R., Austin, D. (2020). A monograph of Operculina (Convolvulaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 105: 64-138.
- Staples, G., Brummitt, R. K. (2007). Convolvulaceae. In V. H. Heywood, R. K. Brummitt, A. Culham, O. Seber (eds.), *Flowering plant families of the world* (pp. 108-110). Royal Botanic Gardens.
- Staples, G., Er, E. (2011, Septiembre 30). *Convolvulaceae Unlimited*. Retrieved from <http://convolvulaceae.myspecies.info/node/9>
- Stefanovic, S., Krueger, L., Olmstead, R. G. (2002). Monophyly of the Convolvulaceae and circumscription of their major lineages based on DNA sequences of multiple chloroplast loc. *American Journal of Botany*, 1510-1522.
- Sura, M. B., Ponnappalli, M. G., Annam, S. C. V. A. R., Bobbili, V. V. P. (2019) Resin glycosides from Convolvulaceae family: an update. *Journal of Natural Products*, 82, 1292.
- Taber, W., Vinig, L., Heacock, R. (1963). Clavine and lysergic acid alkaloids in varieties of morning glory. *Phytochemistry*, 65-70.
- V.K, T., Mishra, R. C., Sarma, A., Tripathi, R. P. (2021). Carbohydrate based potential chemotherapeutic agents: recent developments and their scope in future drug discovery. *Mini-Rev Medicinal Chemistry*, 1497-1519.
- Wang, W. Q., Liu, S. S., Song, W. B., Li, J., Xuan, L. J. (2018). Resin glycoside from the seeds of *Ipomoea muricata* and their multidrug resistance reversal activities. *Phytochemistry*, 149:24-30.

- Wang, W. Q., Song, W. B., Lan, X. J., Huang, M., Xuan, L. J. (2014). Merremins A-G. Resin glycosides from *Merremia hederacea* with multidrug resistance reversal activity. *Journal of Natural Products*, 77(10):2234-2240.
- Wilkin, P. (1999). A Morphological Cladistic Analysis of the Ipomoceae (Convolvulaceae). *Springer*, 853-876.
- Ximenes dos Santos, L. K., da Cunha, G. H., Vagnaldo Fechine, F., Vieira Pontes, A., Costa de Oliveira, J., Frota Bezerra, F. A., Amaral de Moraes, M. E. (2012). Toxicology and safety of the tincture of *Operculina alata* in patients with functional constipation. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 469-476.
- Yu, B. W., Luo, J. G., Wang, J. S., Zhang, D. M., Yu, S. S., Kong, L. Y. (2011). Penthasaccharide resin glycosides from *Ipomoea pes-caprae*. *Journal of Natural Products*, 74(4):620-628.
- Zong, G.; Hu, Z.; O'keefe, S.; Tranter, D.; Iannotti, M. J.; Baron, L.; Hall, B.; Corfield, K.; Paatero, A. O.; Henderson, M. J.; Roboti, P.; et al. (2019) Ipomoeassin F Binds Sec61 $\alpha$  to Inhibit Protein Translocation. *Journal of the American Chemical Society*, 141, 8450–8461.

## 10. ANEXOS

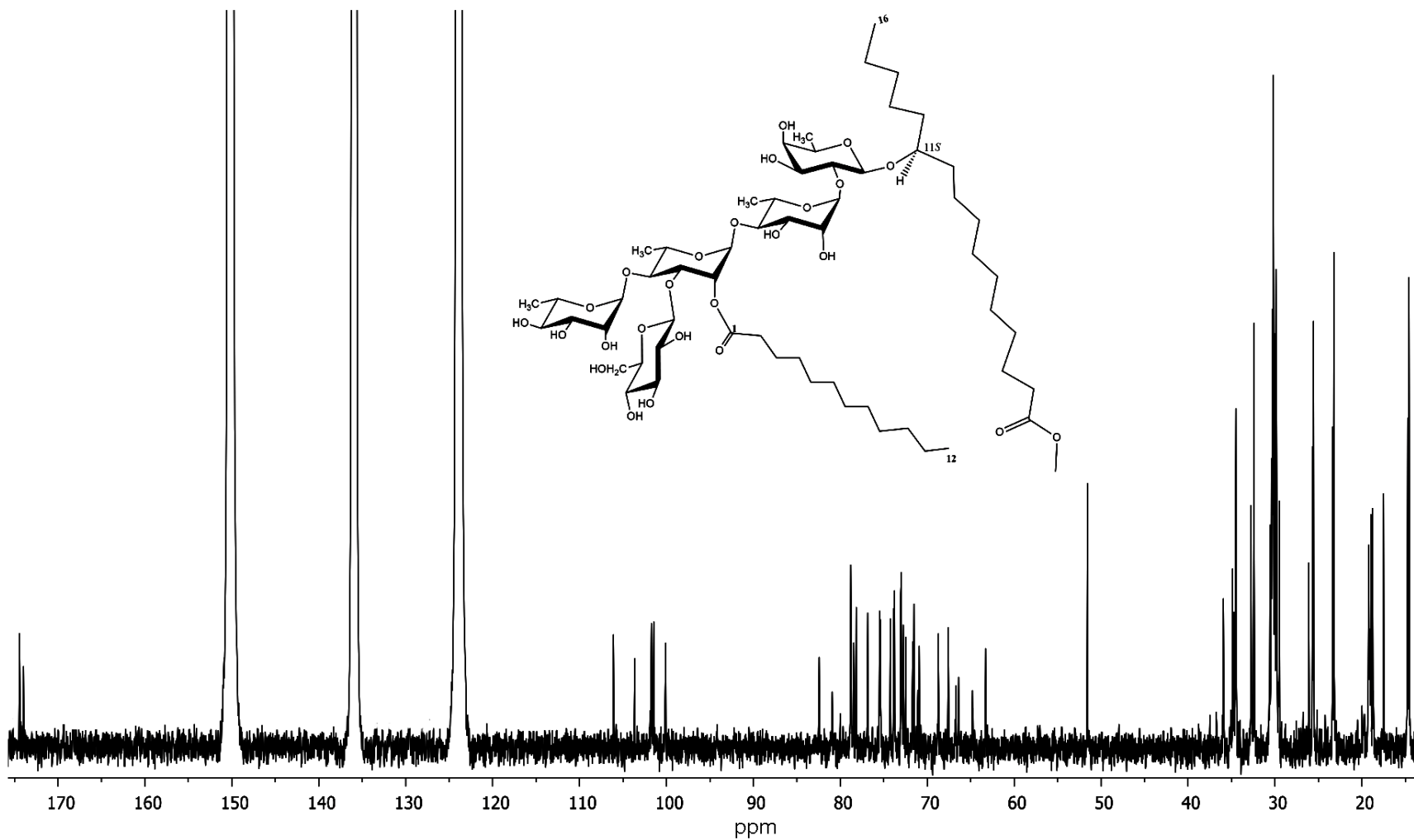


Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (700 MHz) del hamiltoniosido I en piridina- $d_5$

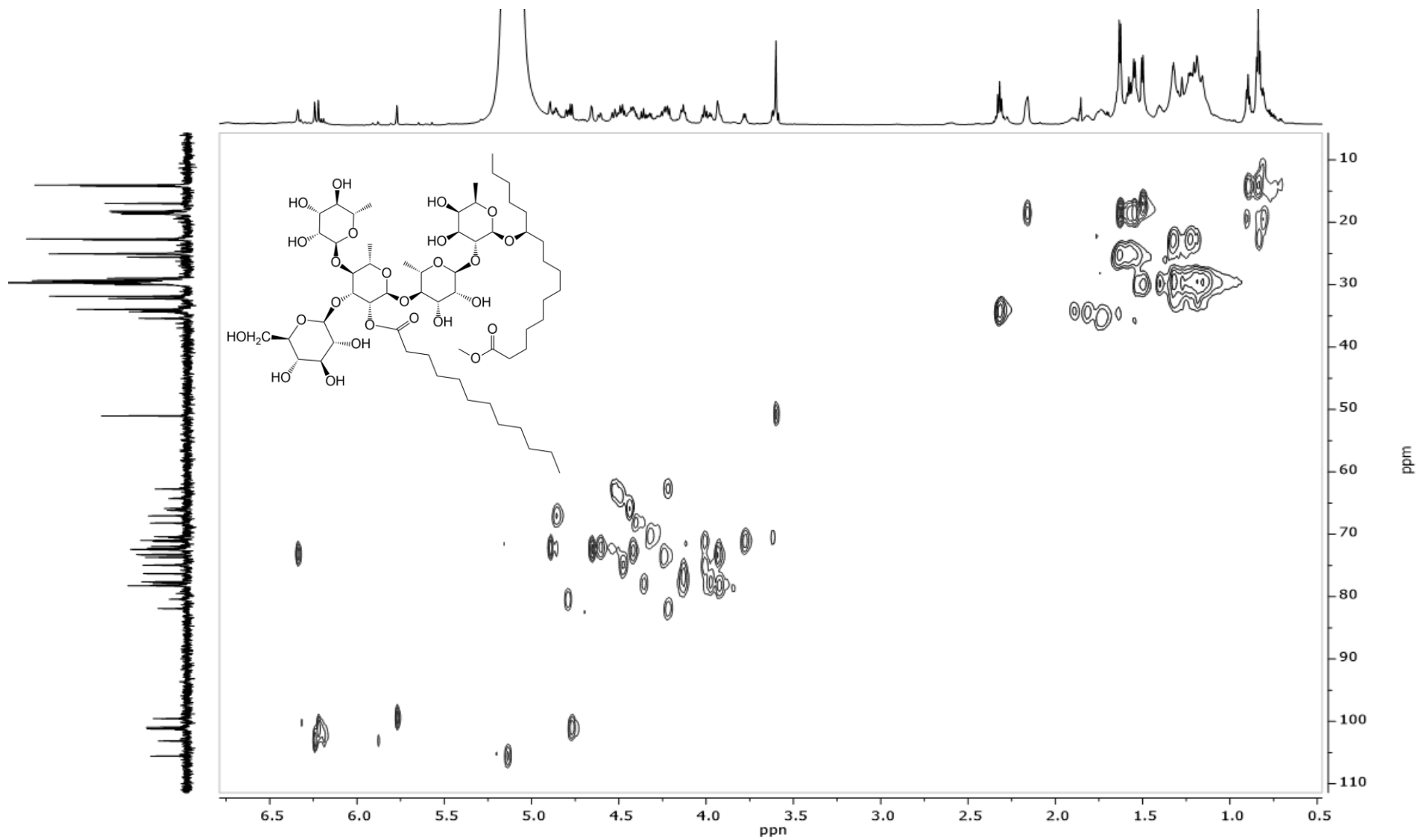


Espectro de correlación homonuclear ( $^3J_{HH}$ ) (COSY) del hamiltoniósido I en piridina- $d_5$

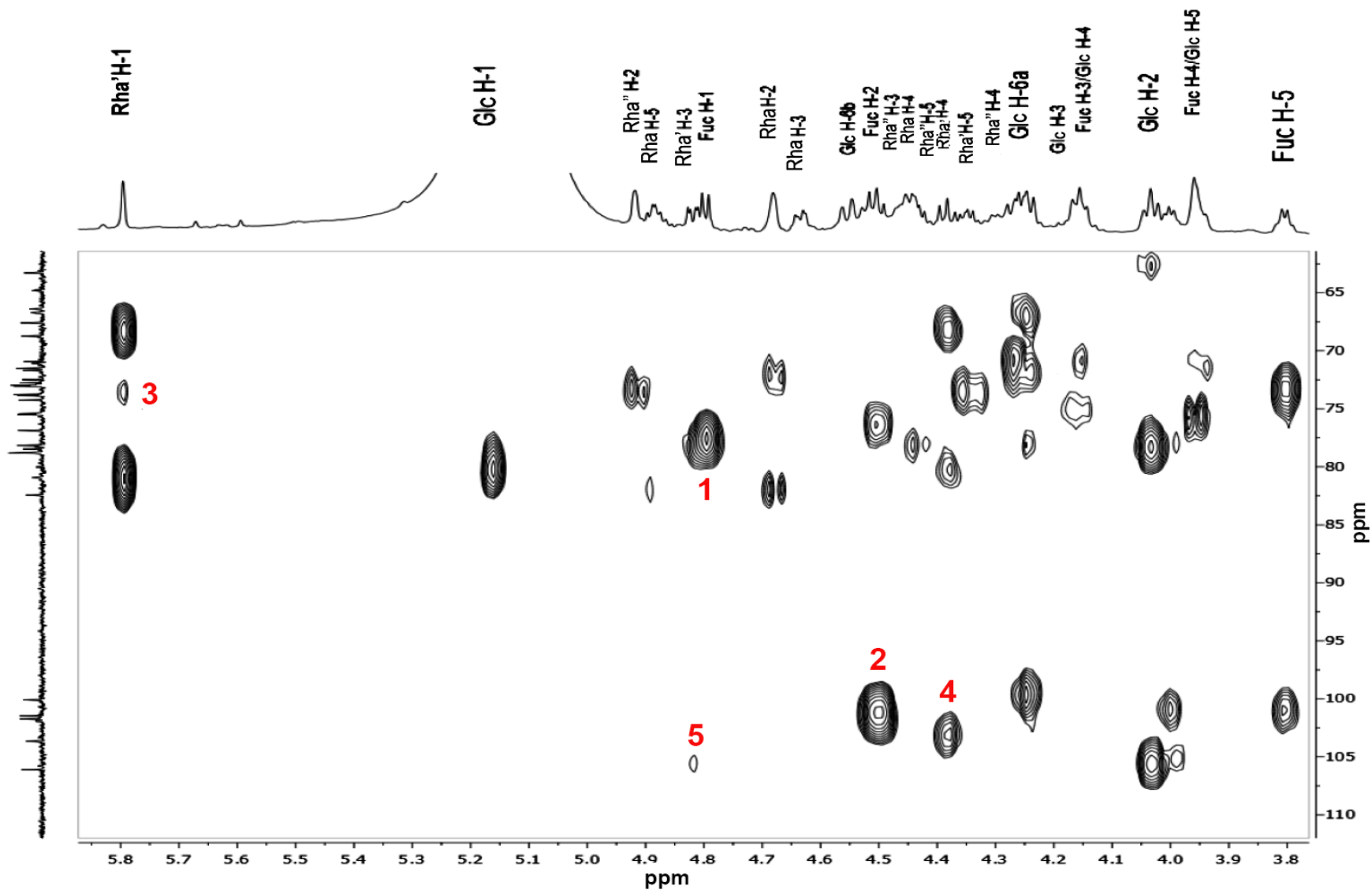




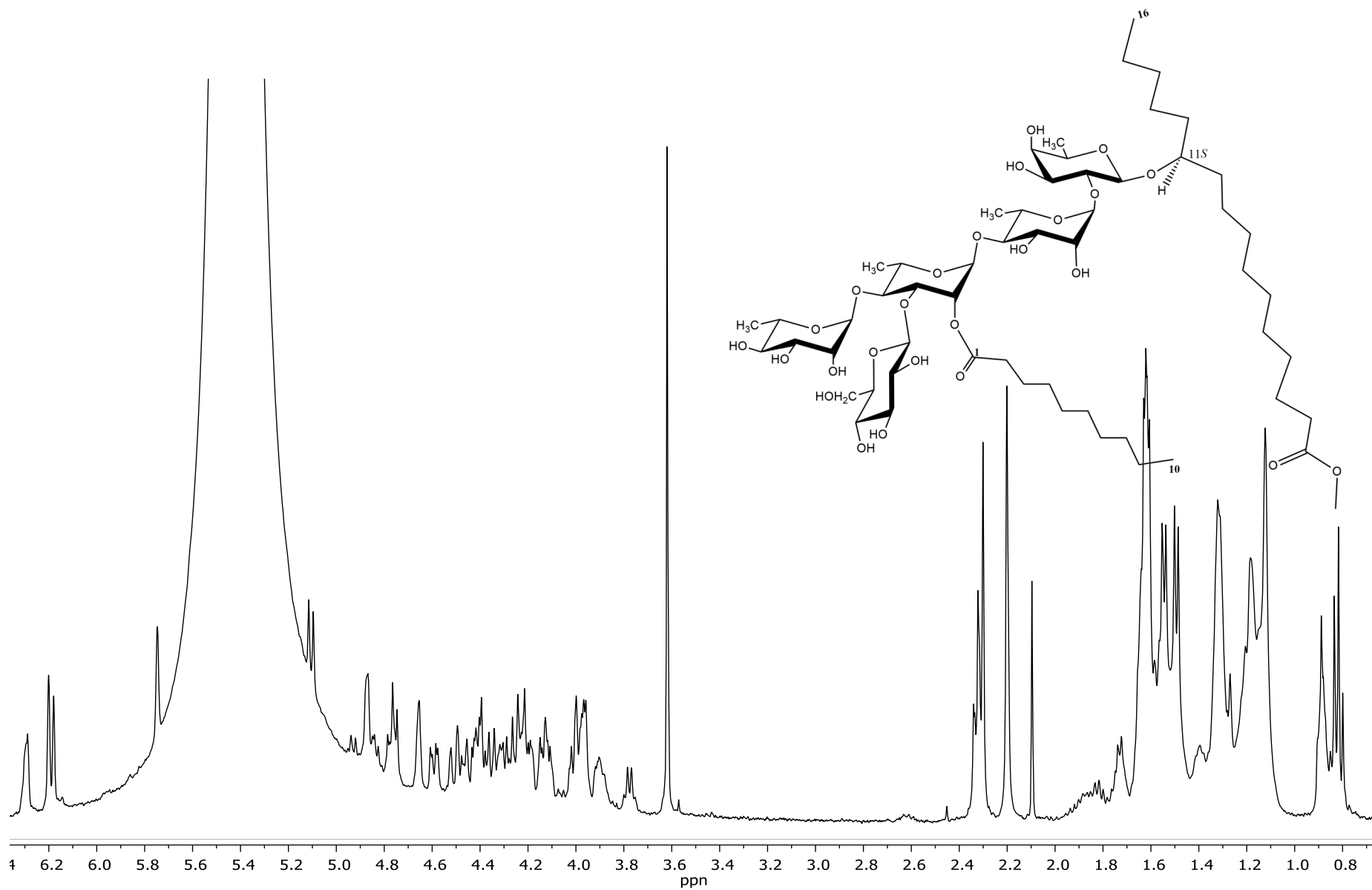
Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz) del hamiltoniosido I en piridina- $d_5$



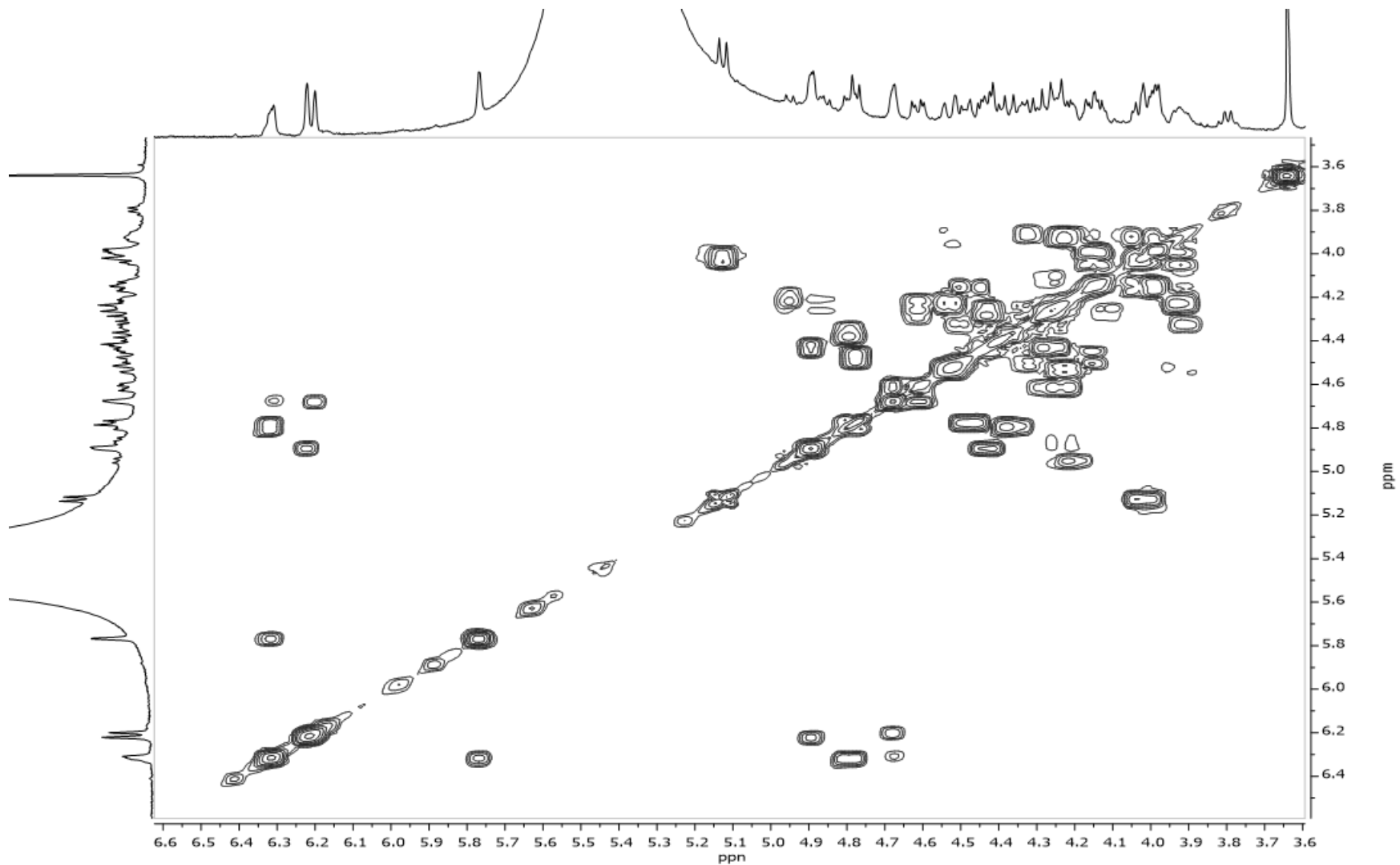
Espectro de correlación heteronuclear ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (HSQC) del hamiltoniosido I en piridina- $d_5$



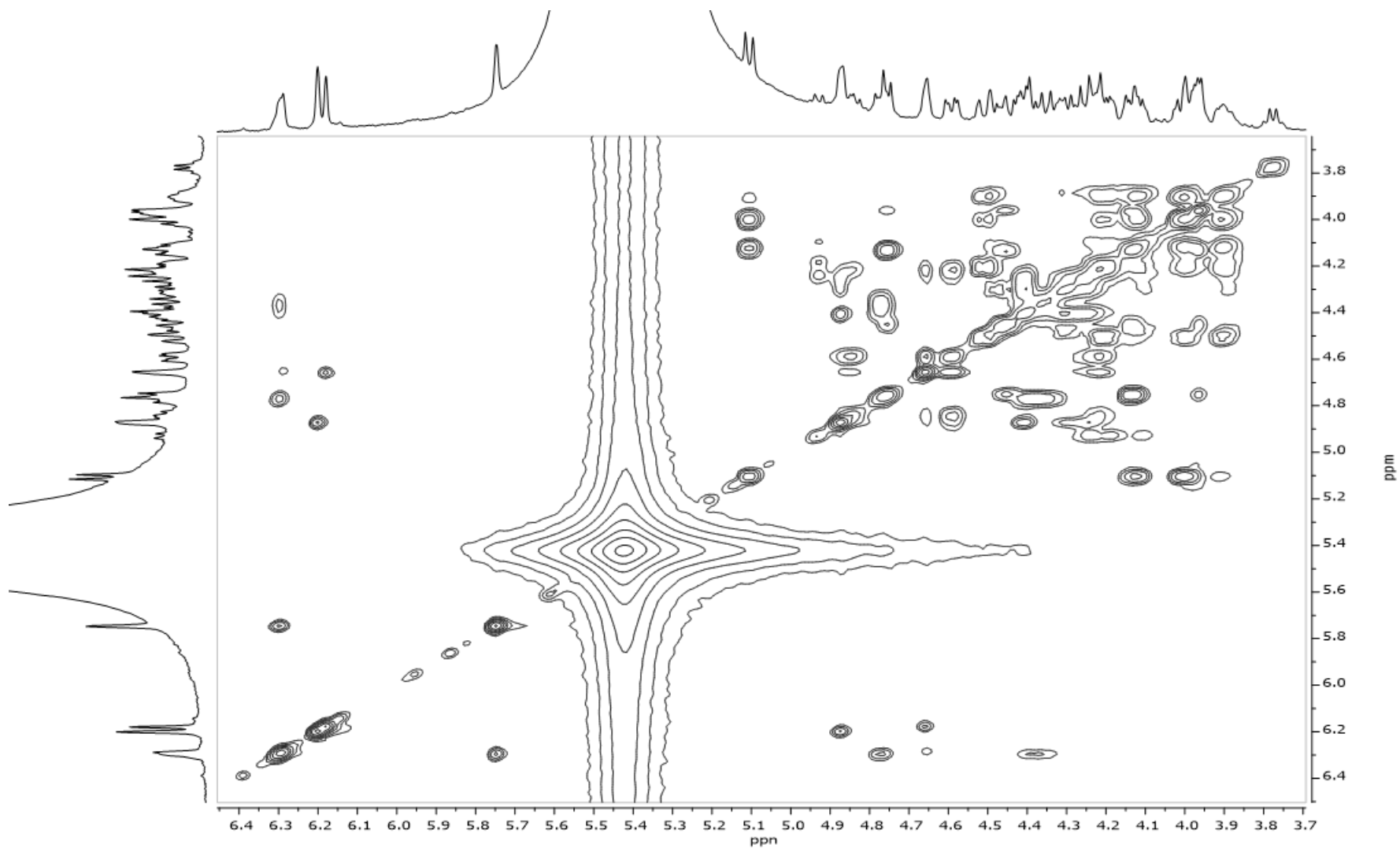
Espectro de correlación heteronuclear ( $^{2,3}J_{CH}$ ) (HMBC) del hamiltoniosido I en piridina- $d_5$ . Asignaciones de conectividad para la secuencia de glicosilación: **1**, Agl C-11/Fuc H-1; **2**, Rha C-1/Fuc H-2; **3**, Rha' H-1/Rha C-4; **4**, Rha'' C-1/Rha' H-4; **5**, Glc C-1/Rha' H-3



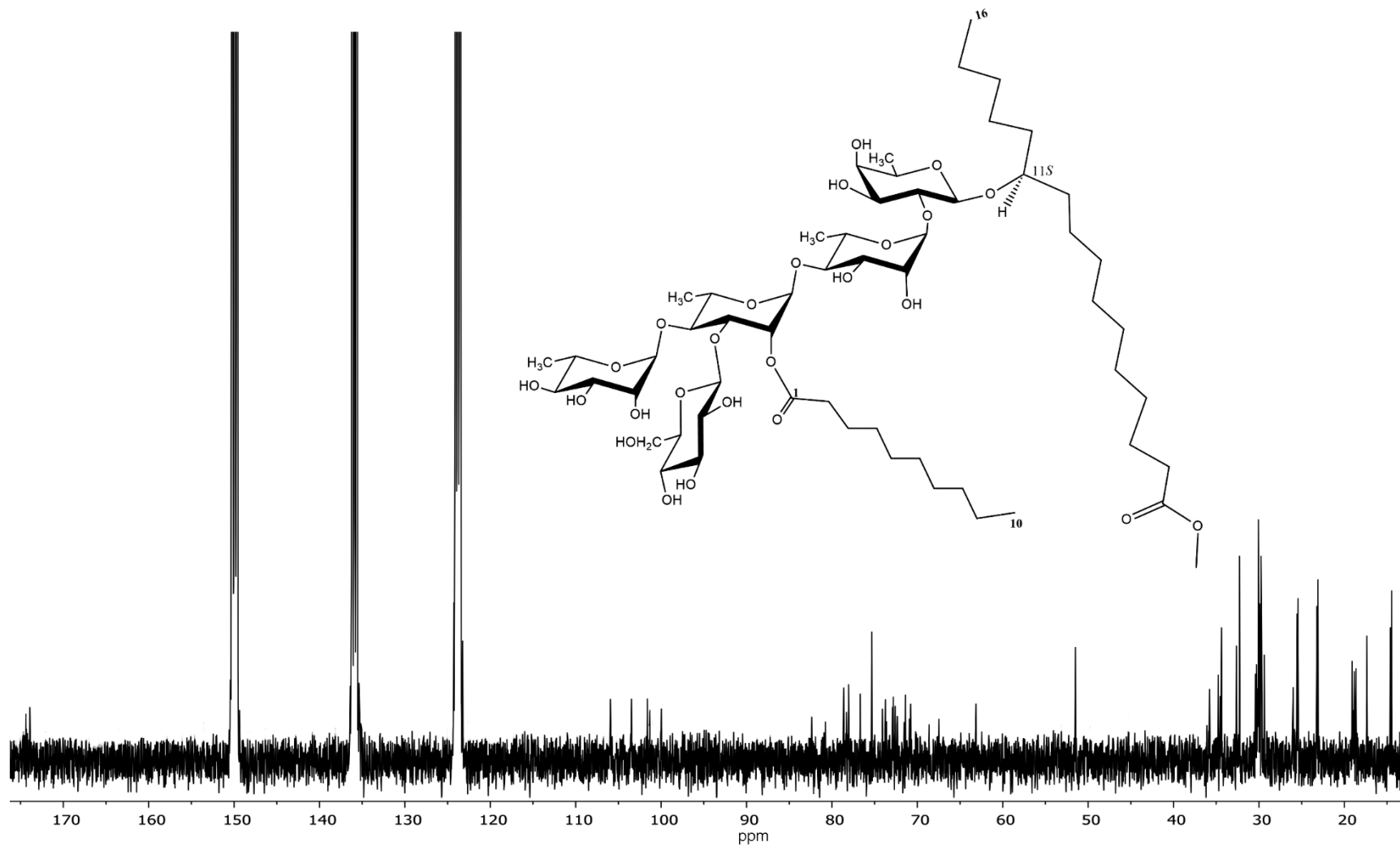
Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz) del hamiltoniosido II en piridina- $d_5$



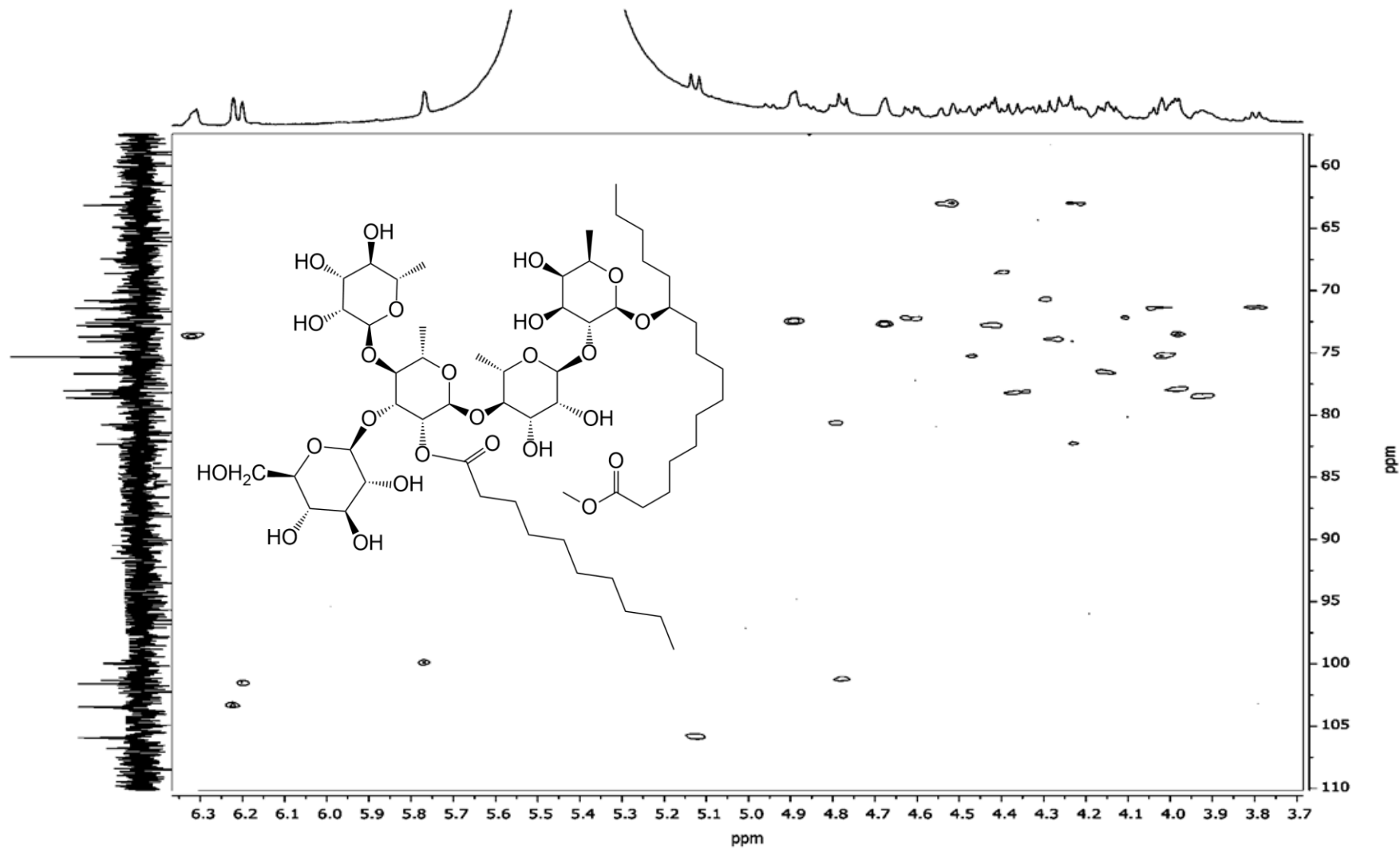
Espectro de correlación homonuclear ( $^3J_{HH}$ ) (COSY) del hamiltoniósido II en piridina- $d_5$



Espectro de correlación  $^1\text{H}$  homonuclear (TOCSY) del hamiltoniósido II en piridina-*d*<sub>5</sub>

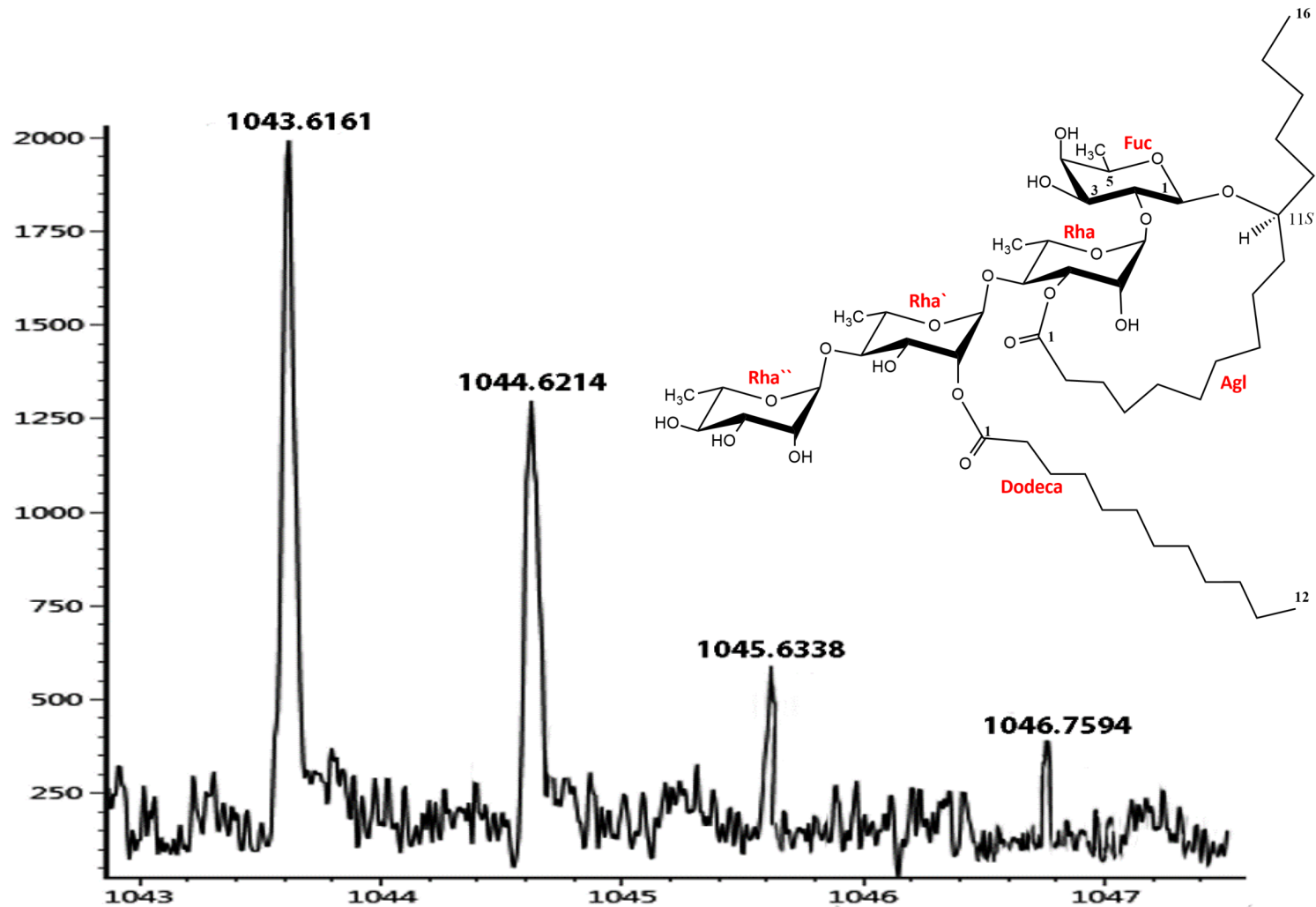


Espectro de RMN-<sup>13</sup>C (175 Mhz) del hamiltoniósido II en piridina-*d*<sub>5</sub>

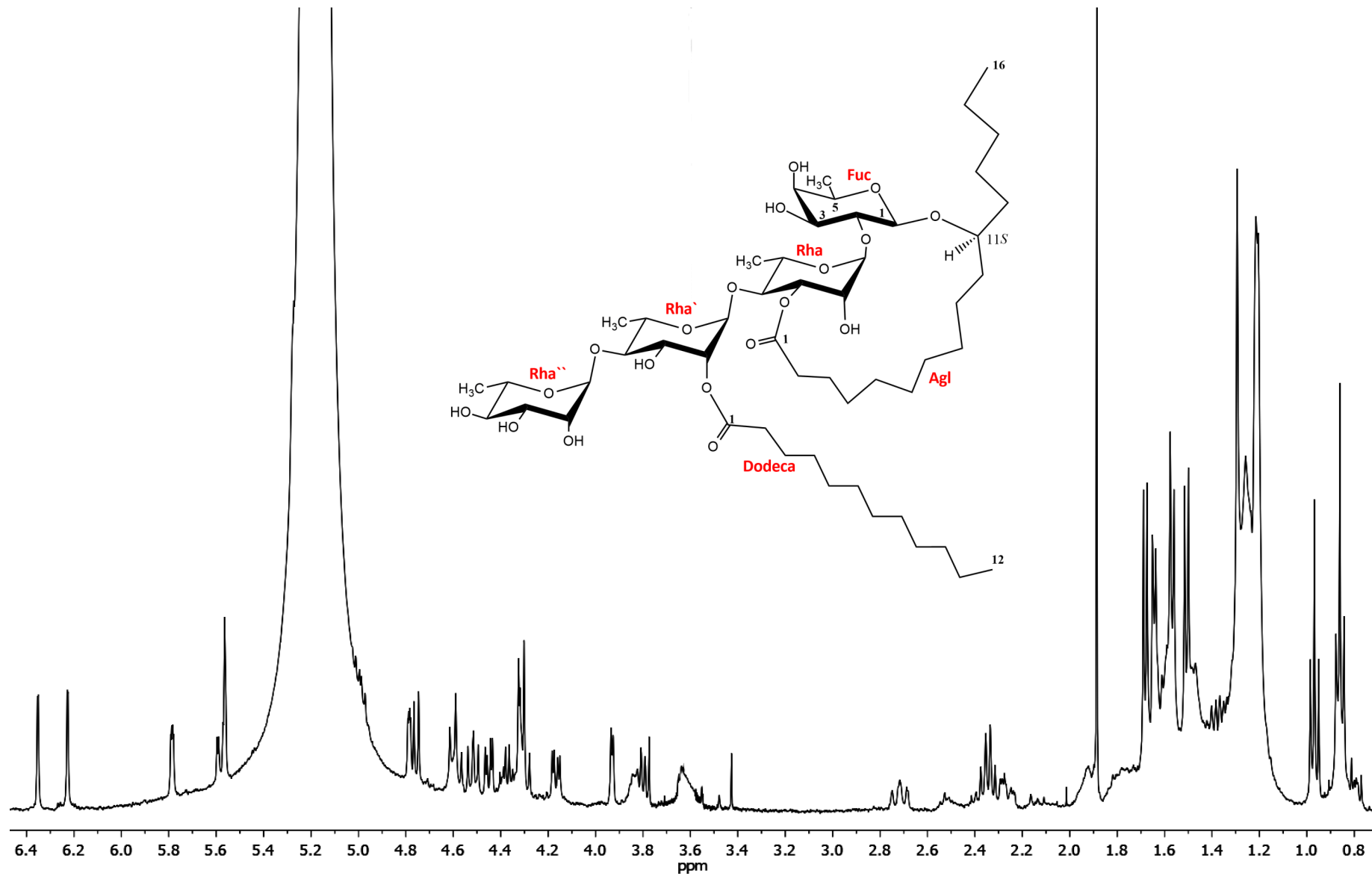


Espectro de correlación heteronuclear ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (HSQC) de la hamiltoniosido I en piridina-*d*<sub>5</sub>

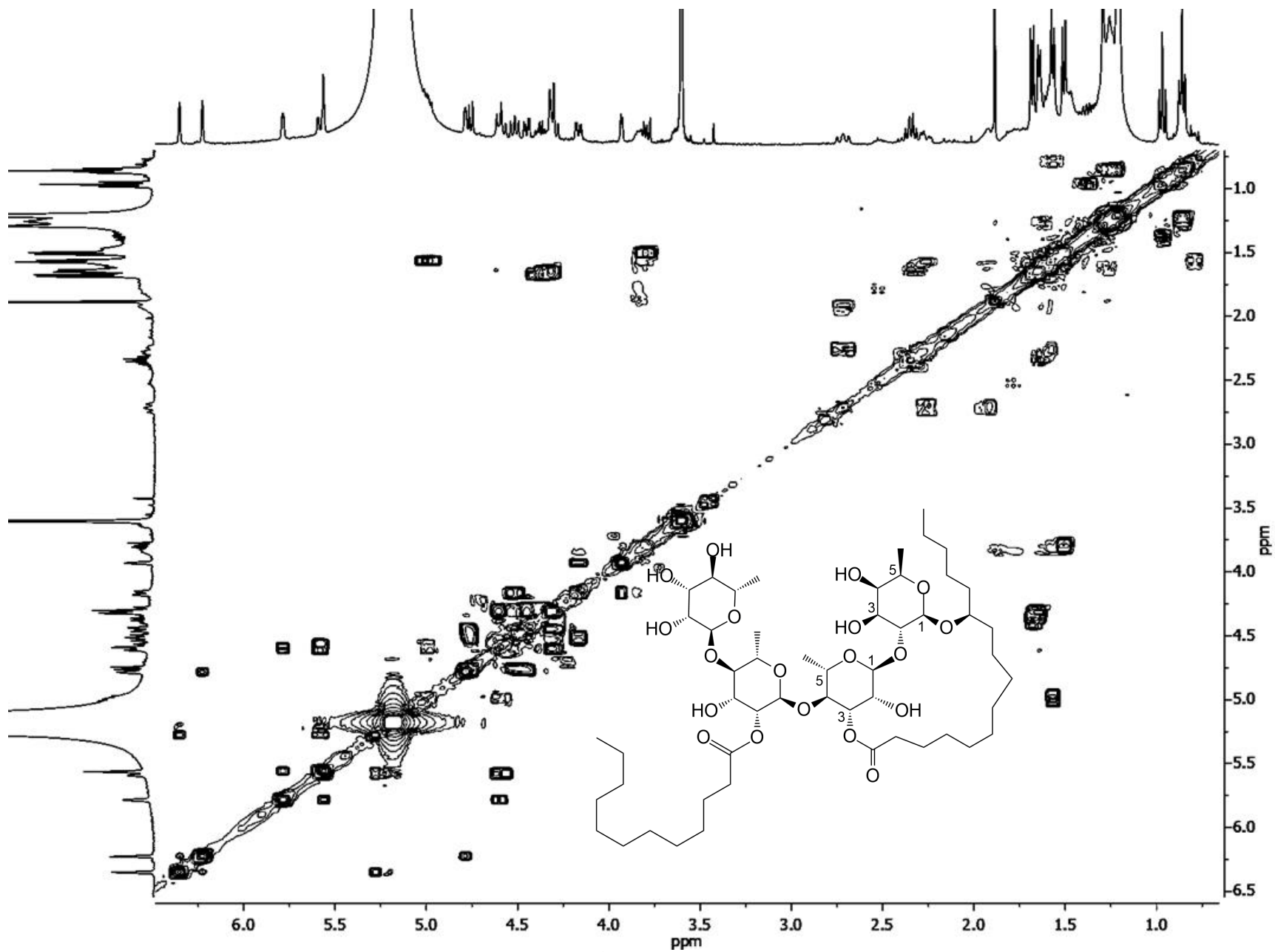




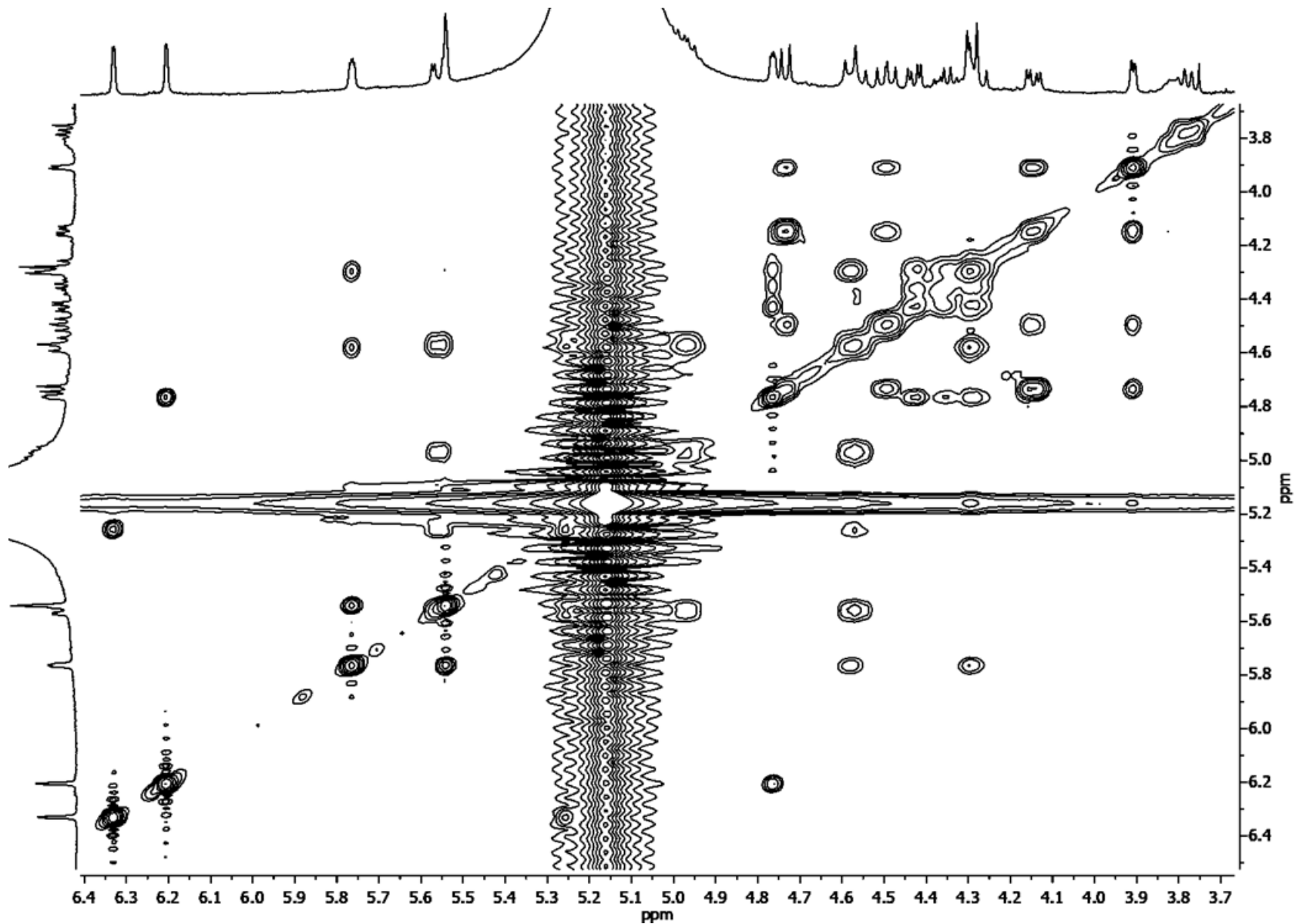
Espectro en modo positivo generado mediante ESI por la hamiltonina II (**BPF9P816**) mostrando la distribución isotópica y las abundancias relativas para el conjunto isotópico del ión aducto con sodio  $[C_{52}H_{92}O_{19}Na]^+$ .



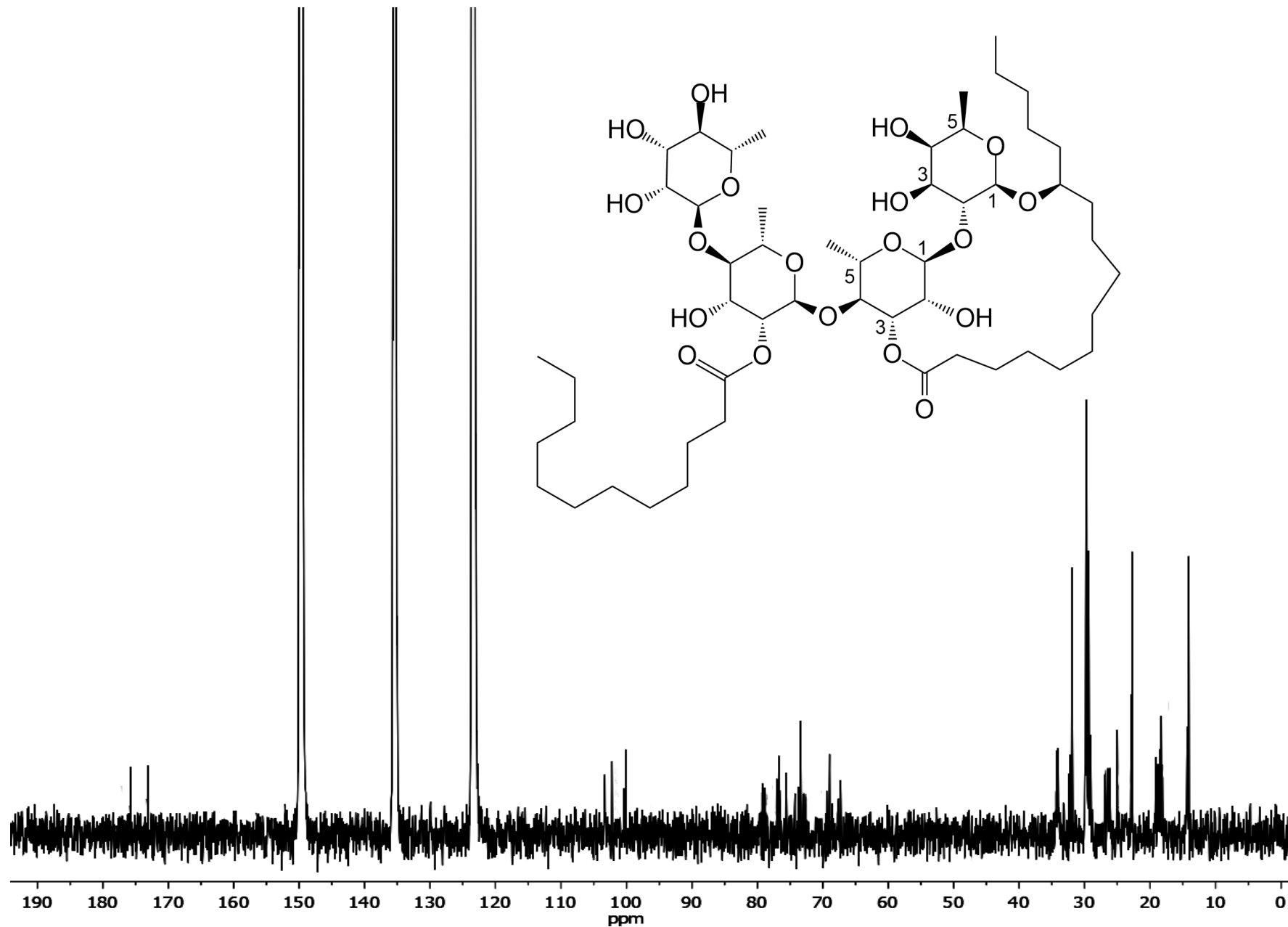
Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz) de la hamiltonina II en piridina- $d_5$



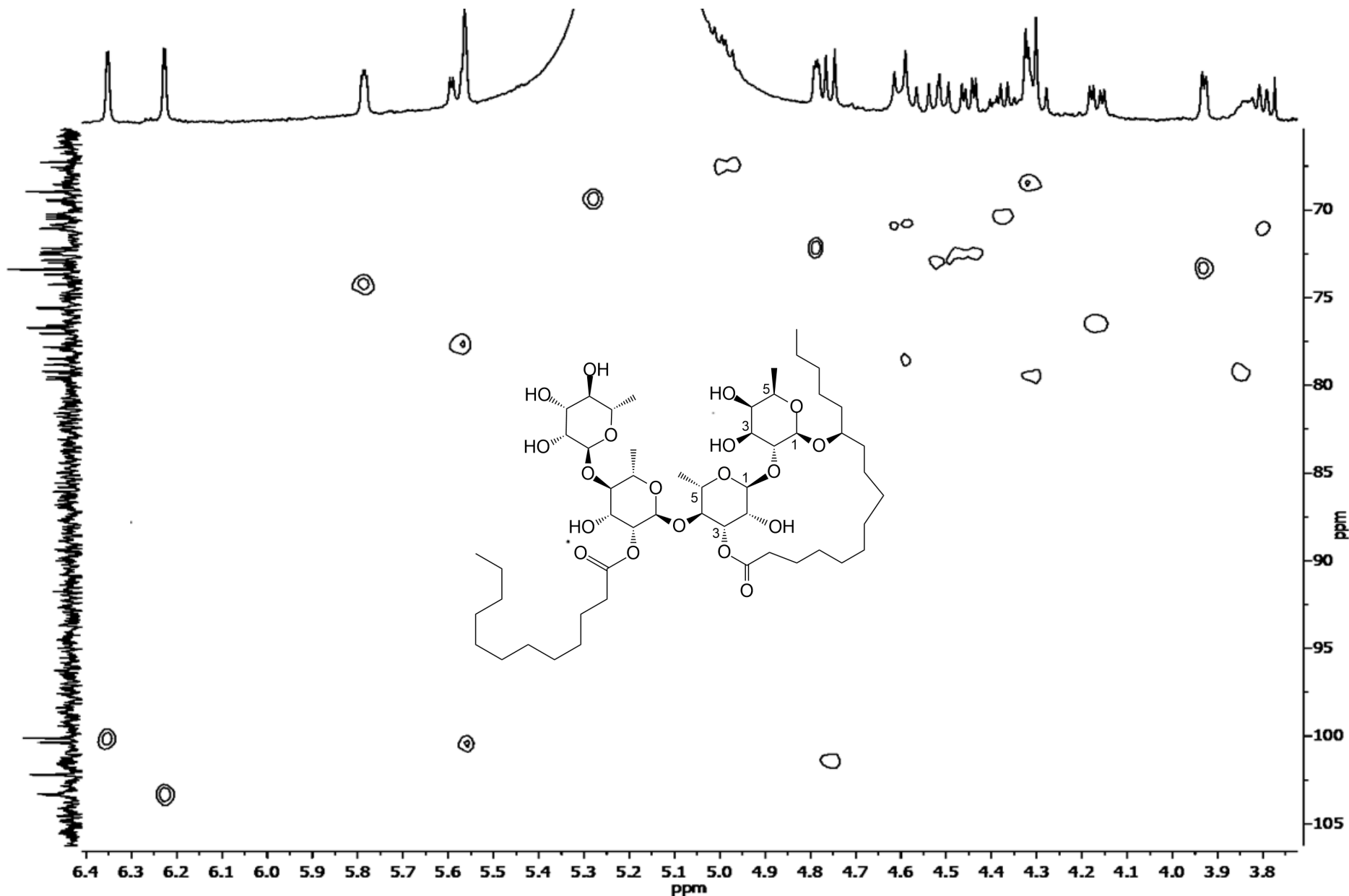
Espectro de correlación homonuclear ( $^3J_{HH}$ ) (COSY) de la hamiltonina II en piridina-*d*<sub>5</sub>



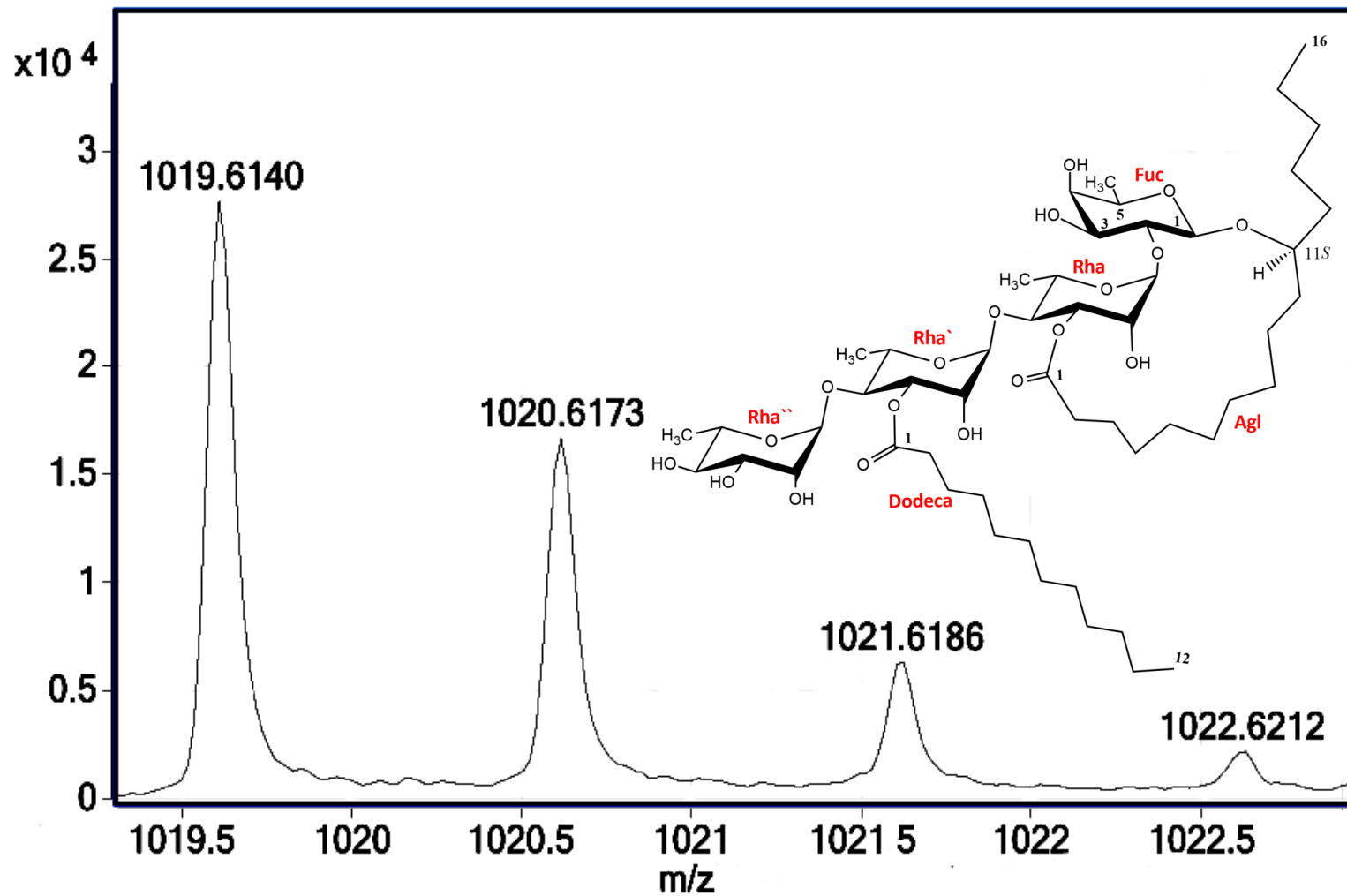
Espectro de correlación  $^1\text{H}$  homonuclear (TOCSY) de la hamiltonina II en piridina- $d_5$



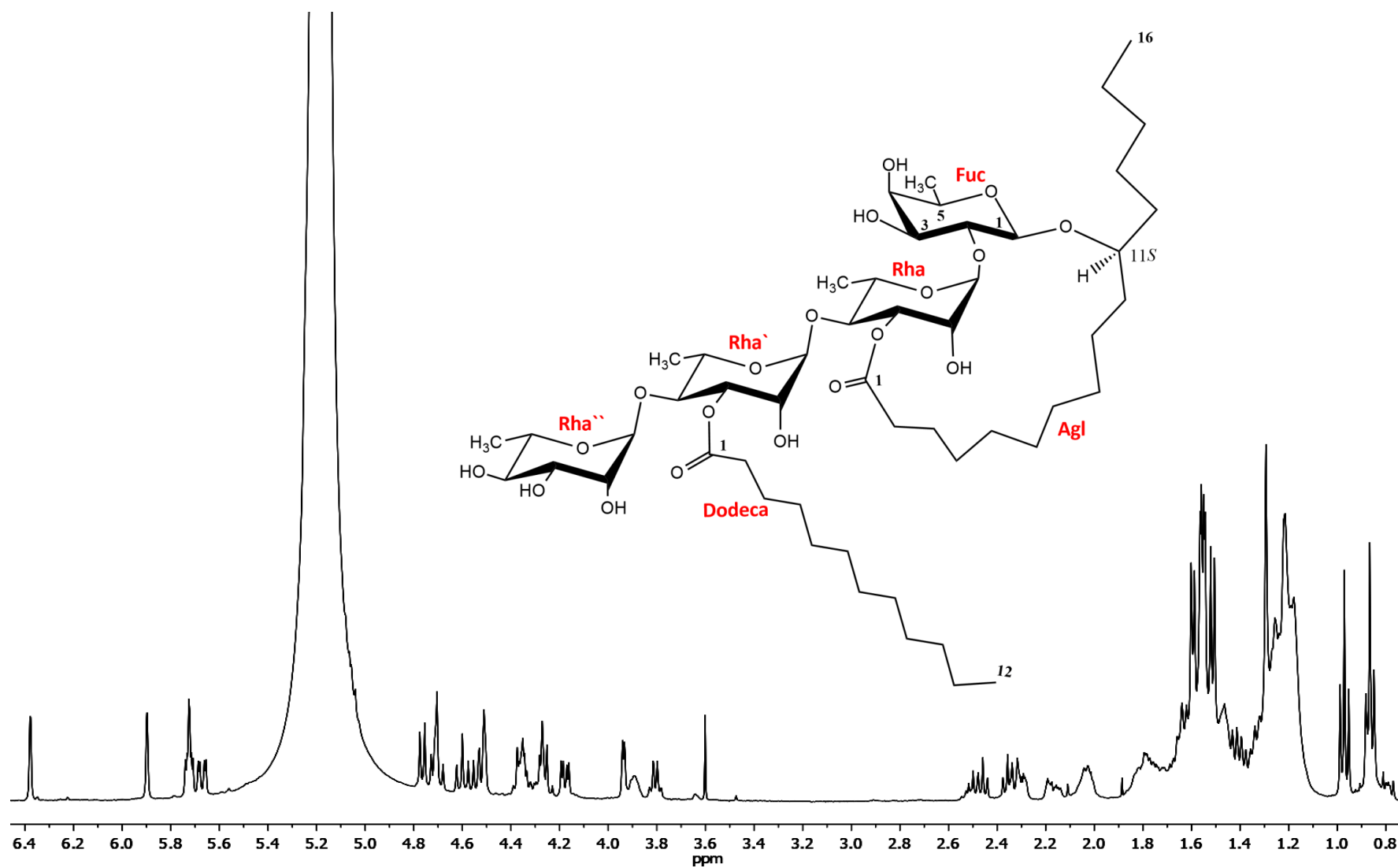
Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz) de la hamiltonina II en piridina- $d_5$



Espectro en de correlación heteronuclear ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (HSQC) de la hamiltonina II en piridina- $d_5$

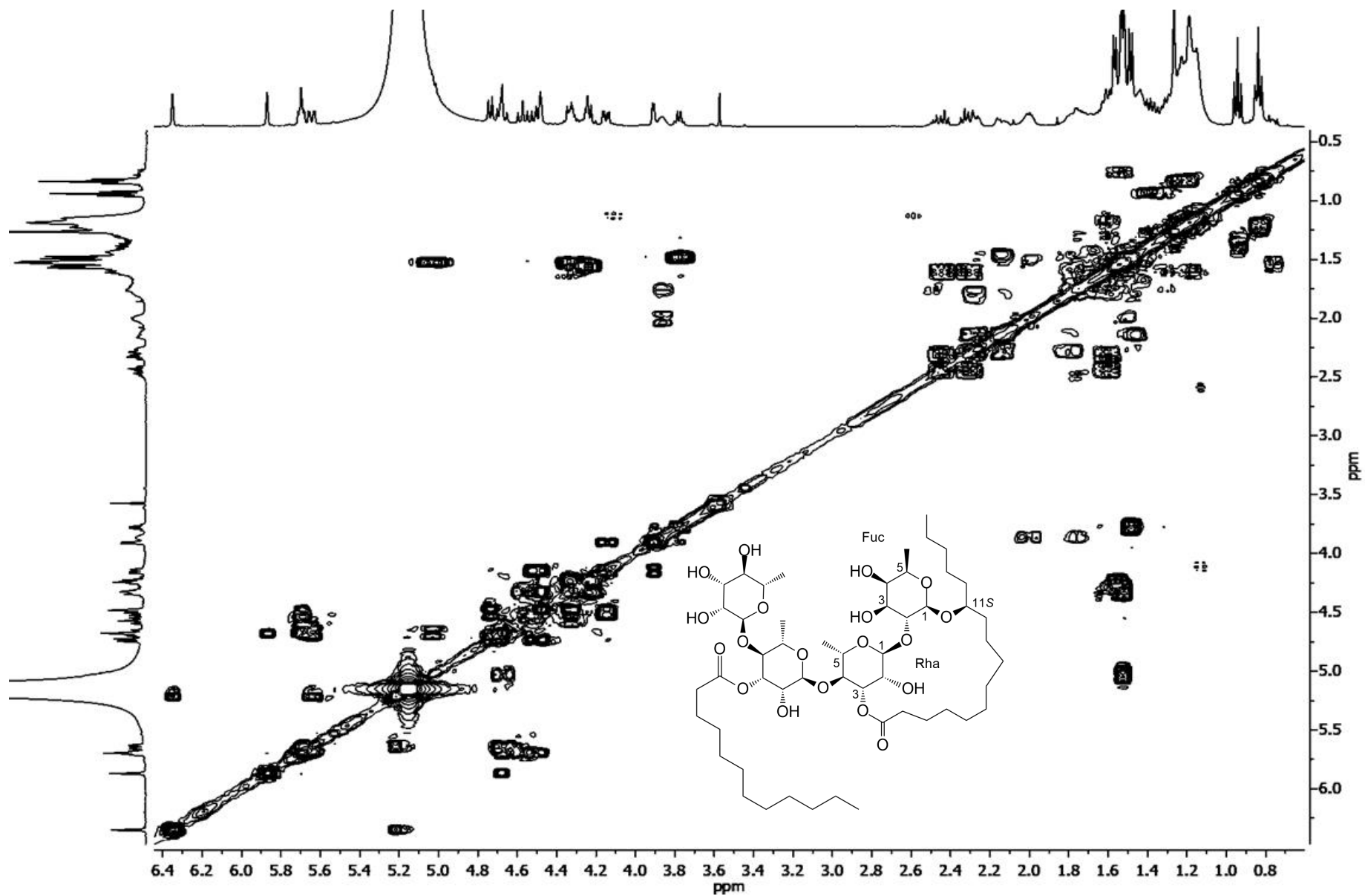


Espectro en modo negativo generado mediante ESI por el hamiltonina III (BPF9P828) mostrando la distribución isotópica y las abundancias relativas para el conjunto isotópico del ión [C<sub>52</sub>H<sub>91</sub>O<sub>19</sub>]<sup>-</sup>.

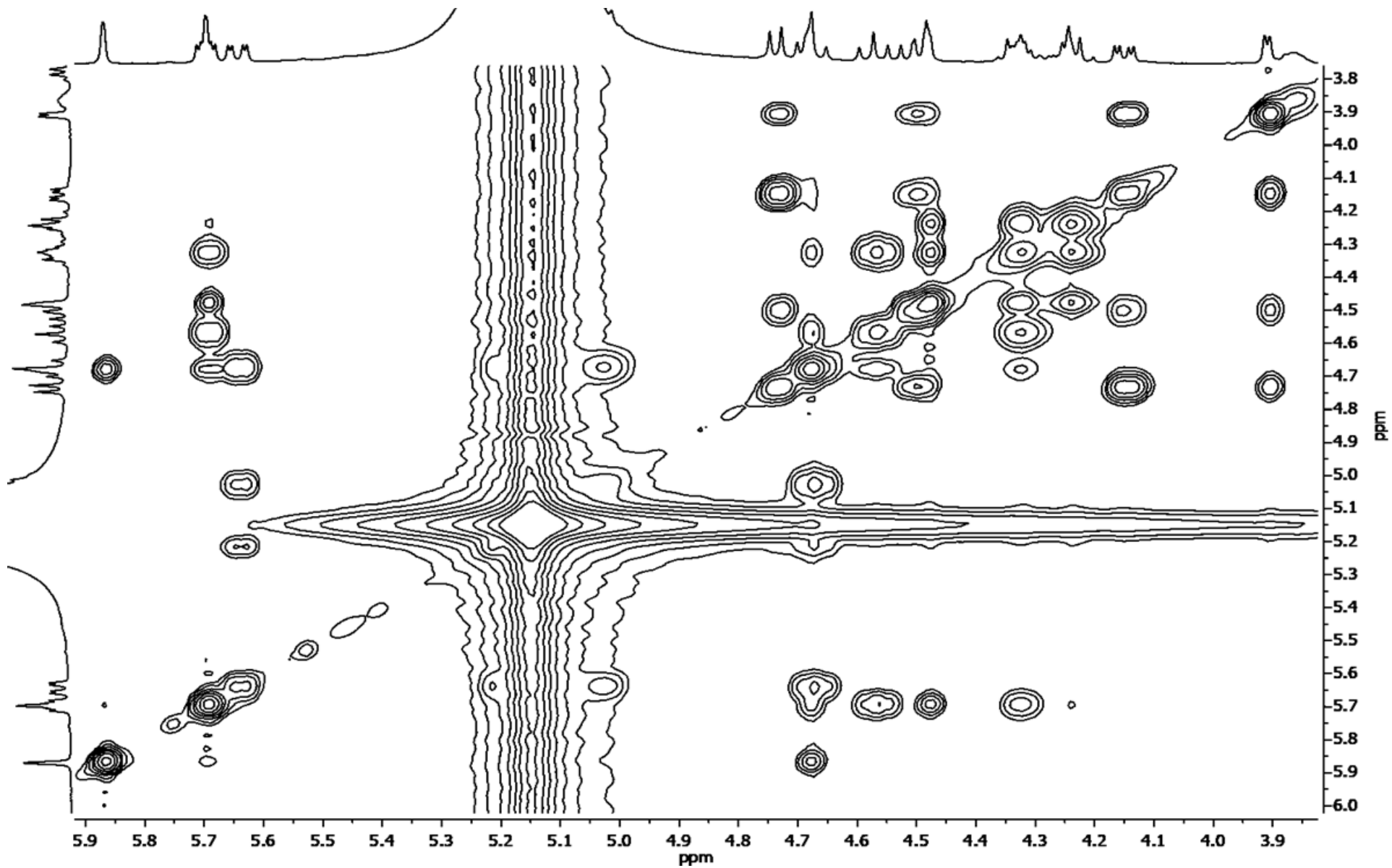


Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz) de la hamiltonina III en piridina- $d_5$

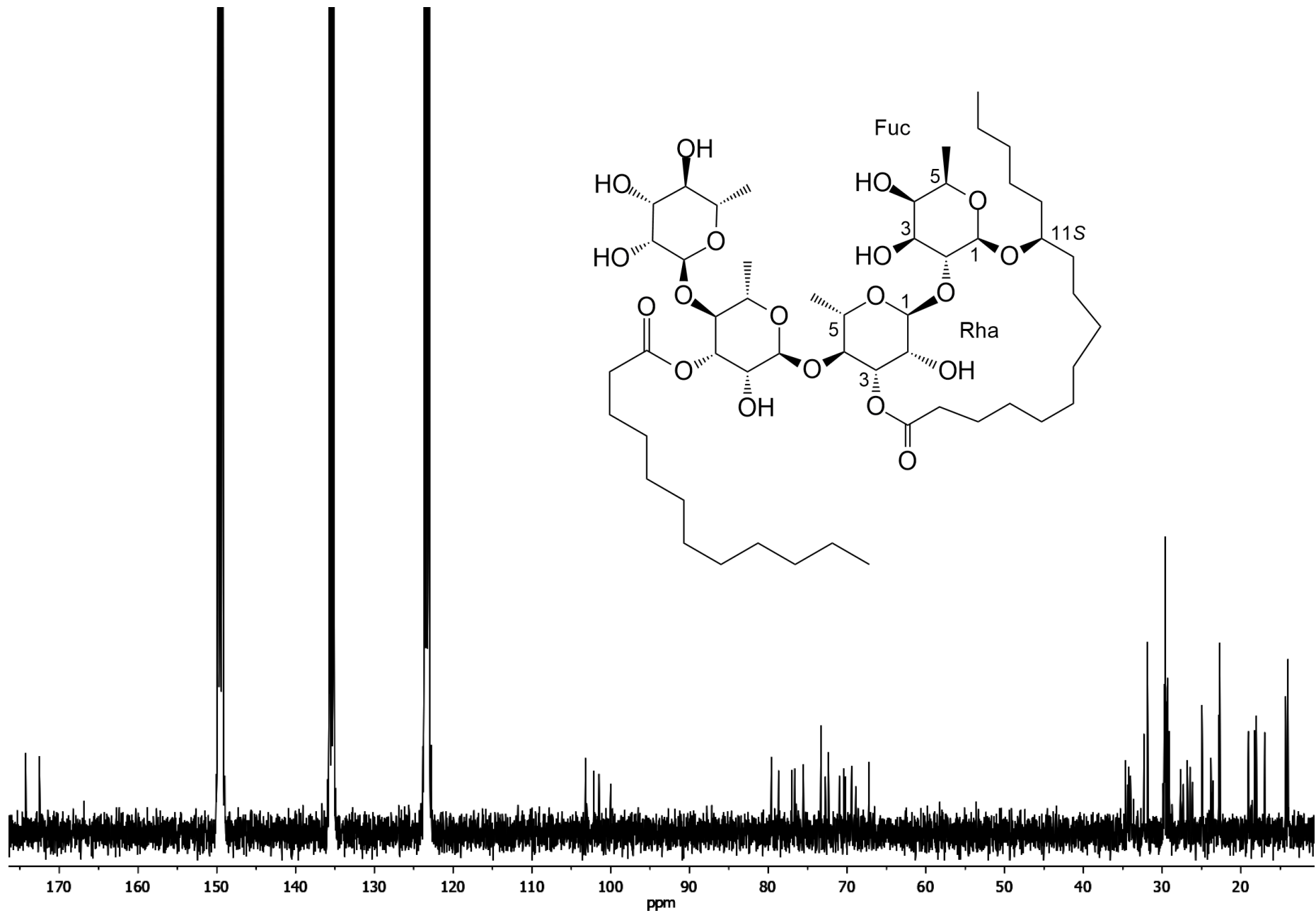




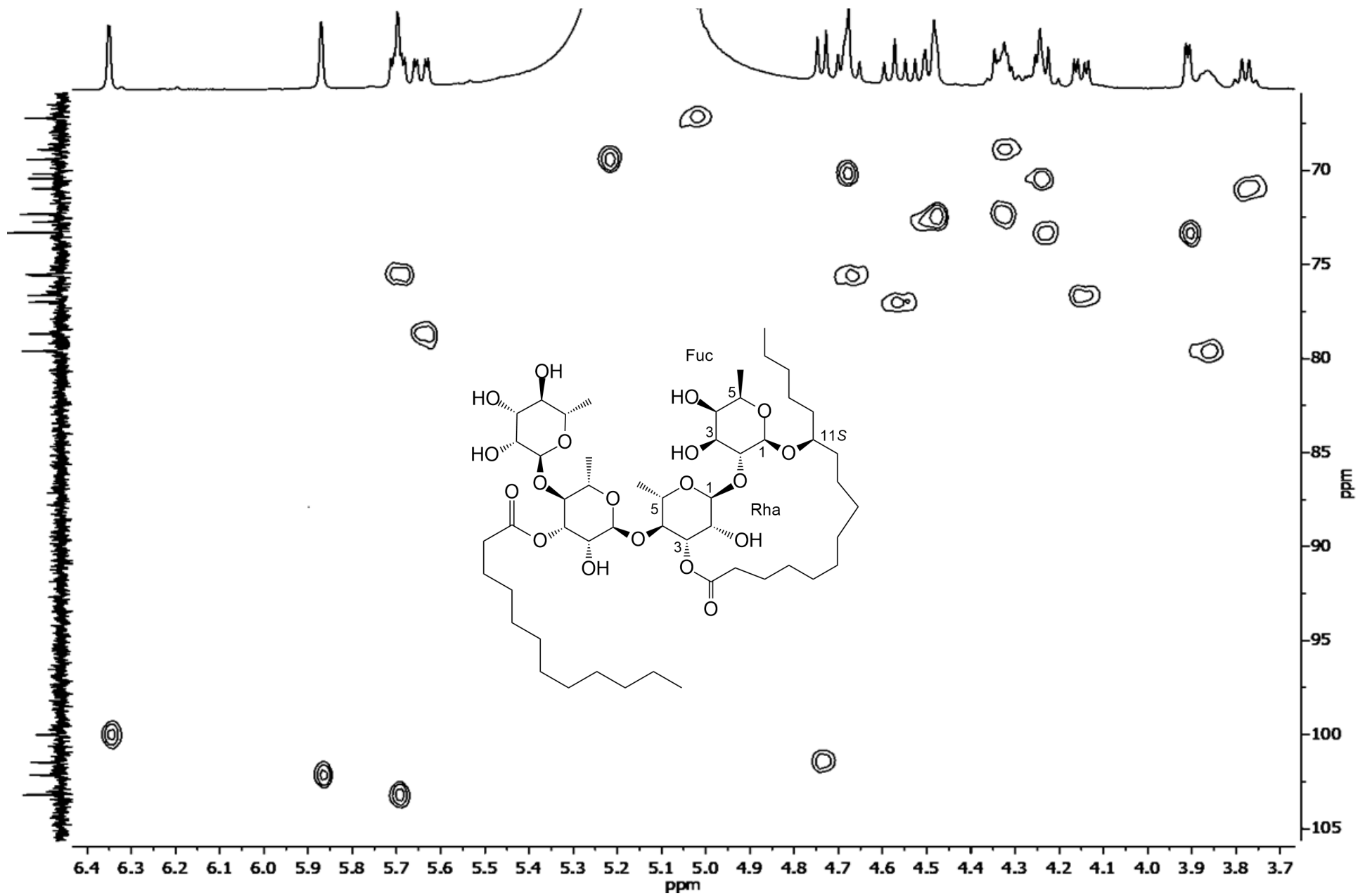
Espectro de correlación homonuclear ( $^3J_{\text{HH}}$ ) (COSY) de la hamiltonina III en piridina-*d*<sub>5</sub>



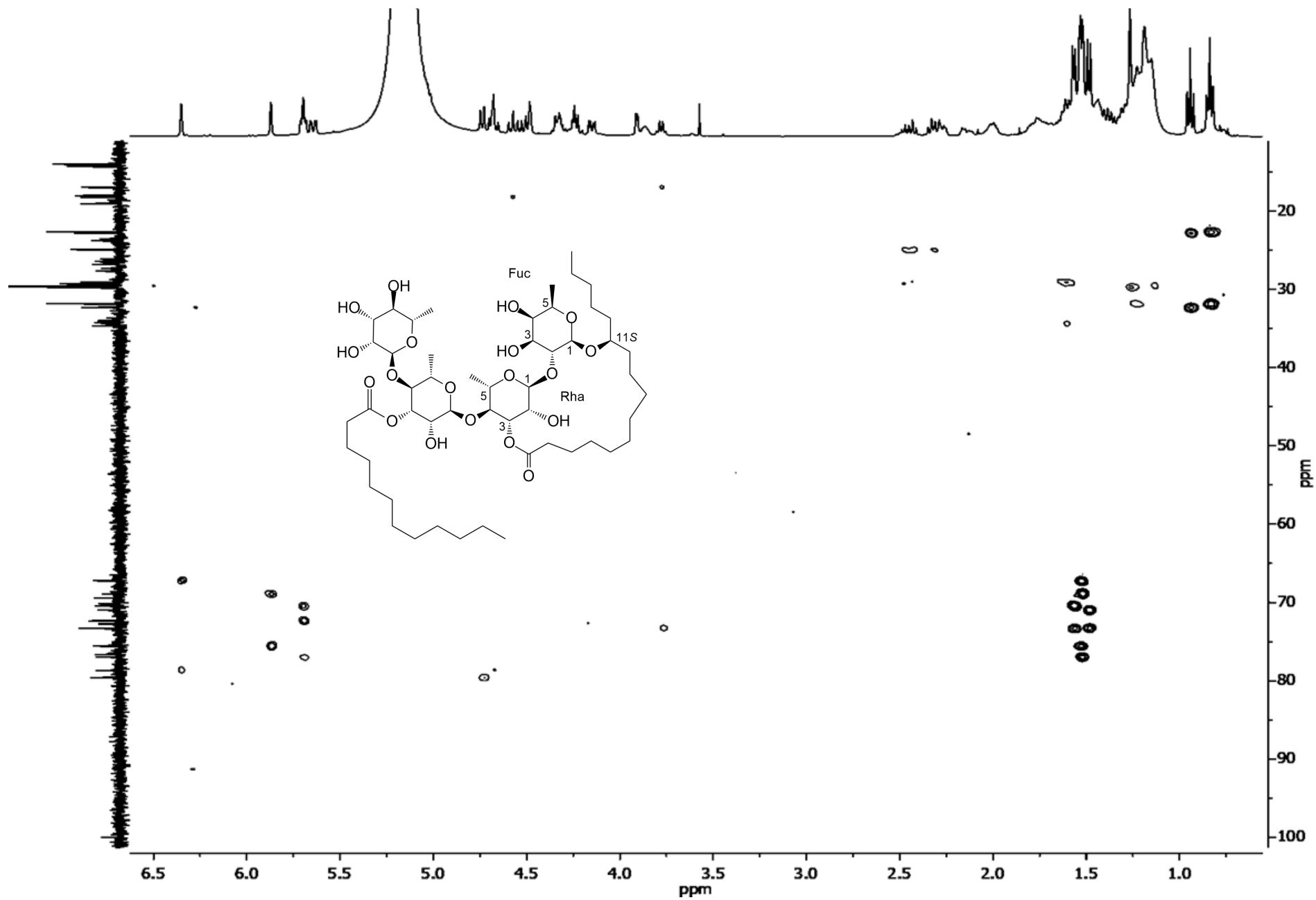
Espectro de correlación  $^1\text{H}$  homonuclear (TOCSY) de la hamiltonina III en piridina- $d_5$



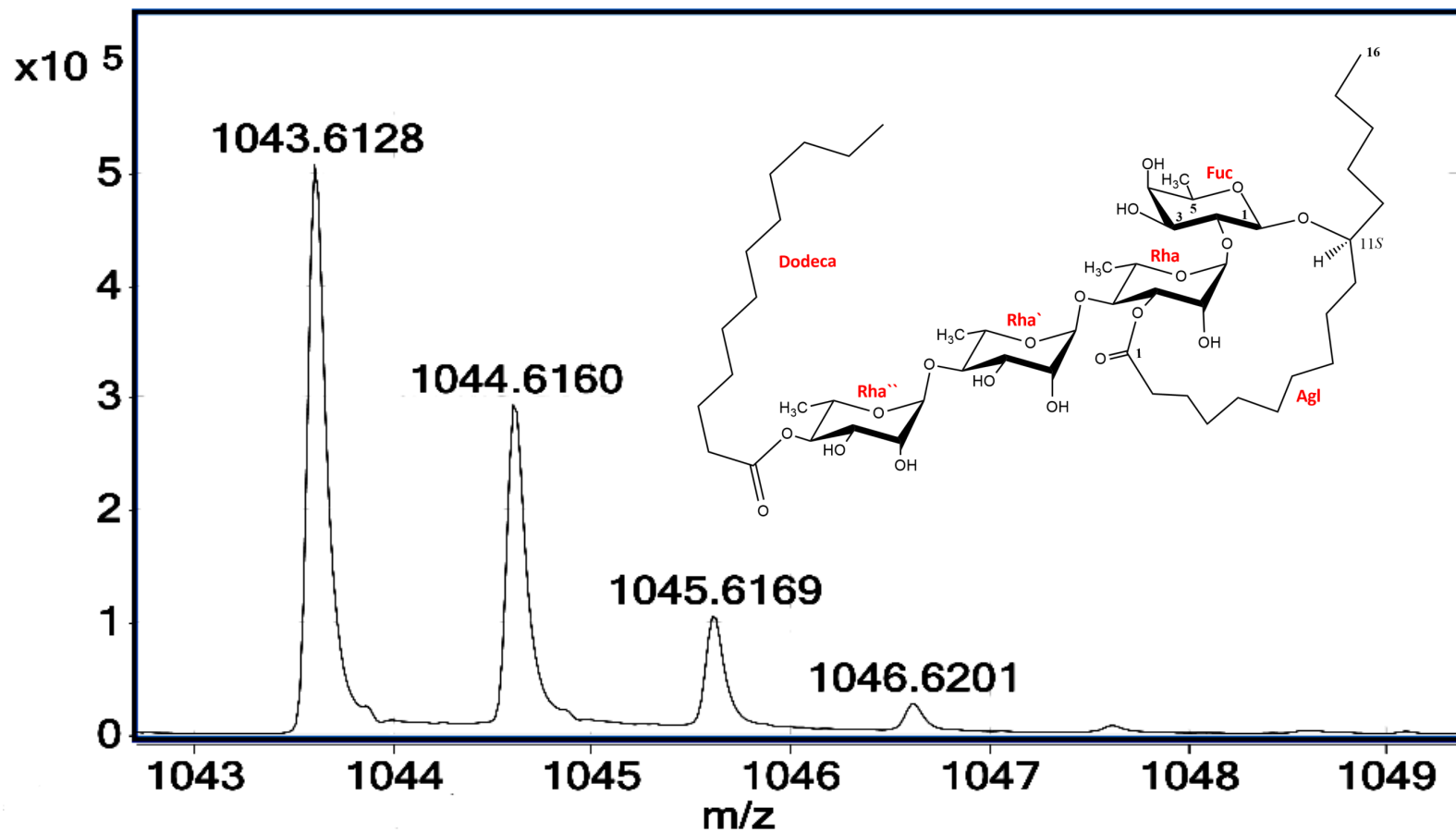
Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz) de la hamiltonina III en piridina- $d_5$



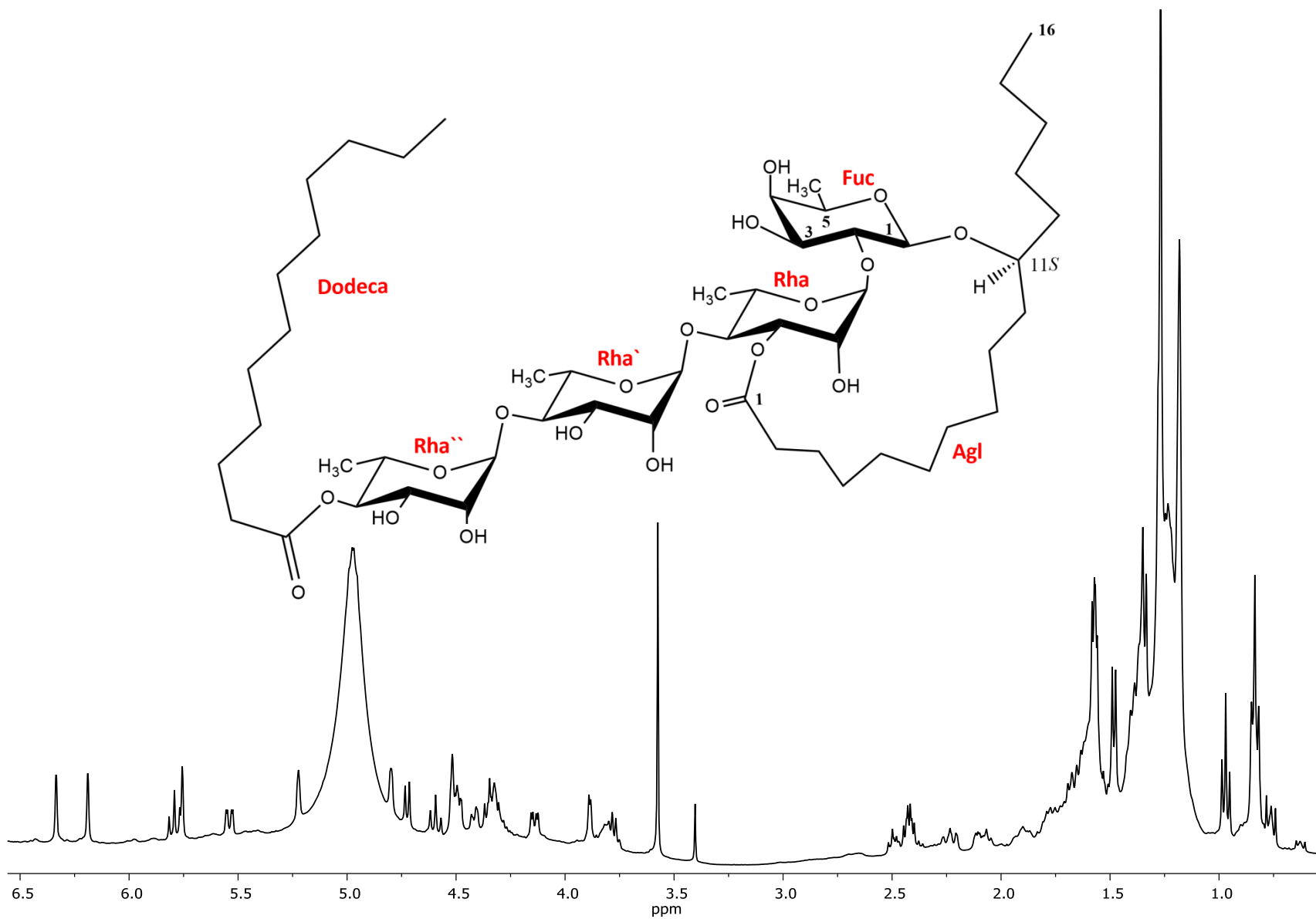
Espectro de correlación heteronuclear ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (HSQC) de la hamiltonina III en piridina- $d_5$



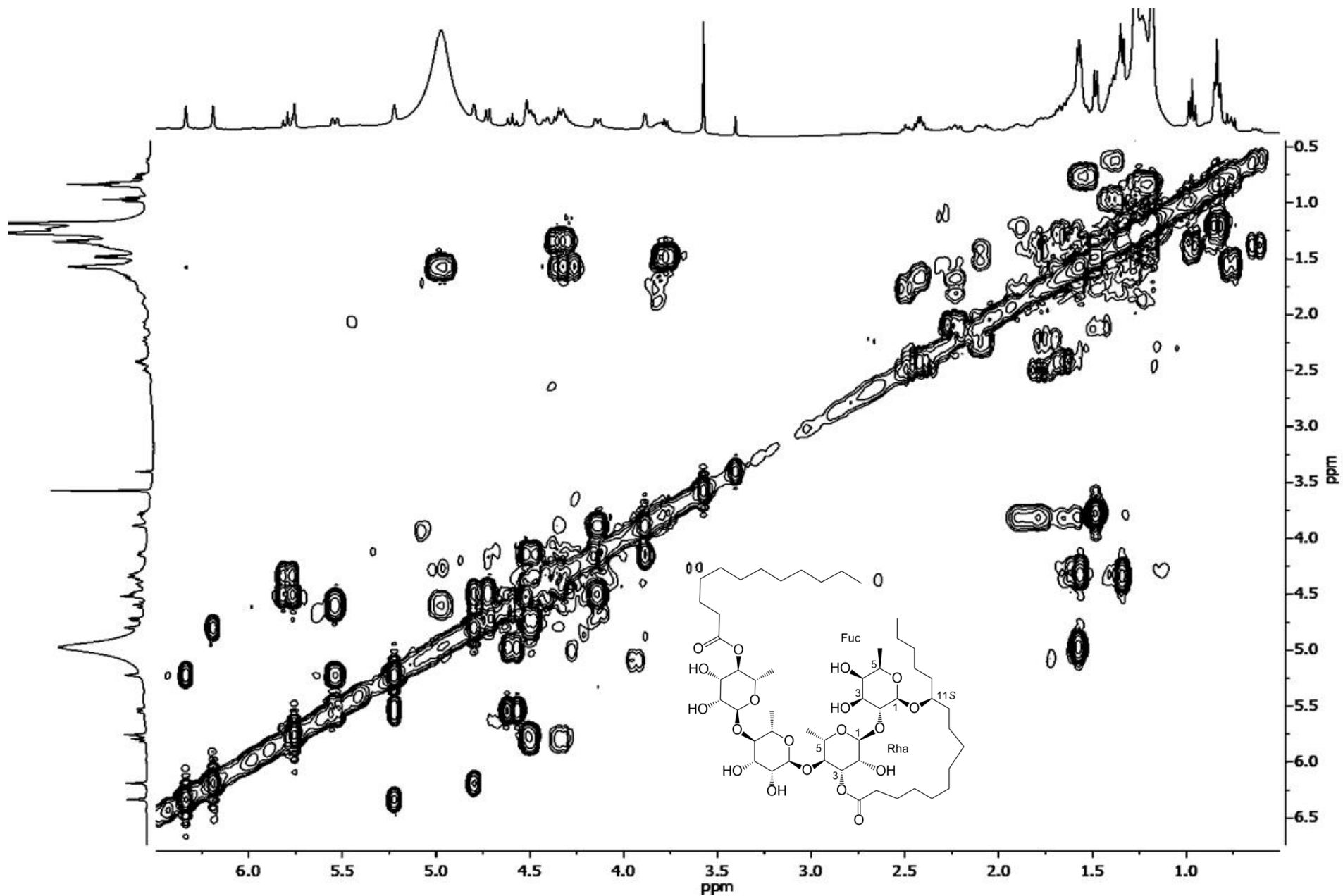
Espectro de correlación heteronuclear ( $^{2,3}J_{\text{CH}}$ ) (HMBC) de la hamiltonina III en piridina-*d*<sub>5</sub>.



Espectro en modo positivo generado mediante ESI por el hamiltonina III (BPF9P10) mostrando la distribución isotópica y las abundancias relativas para el conjunto isotópico del ión  $[C_{52}H_{92}O_{19}Na]^+$ .

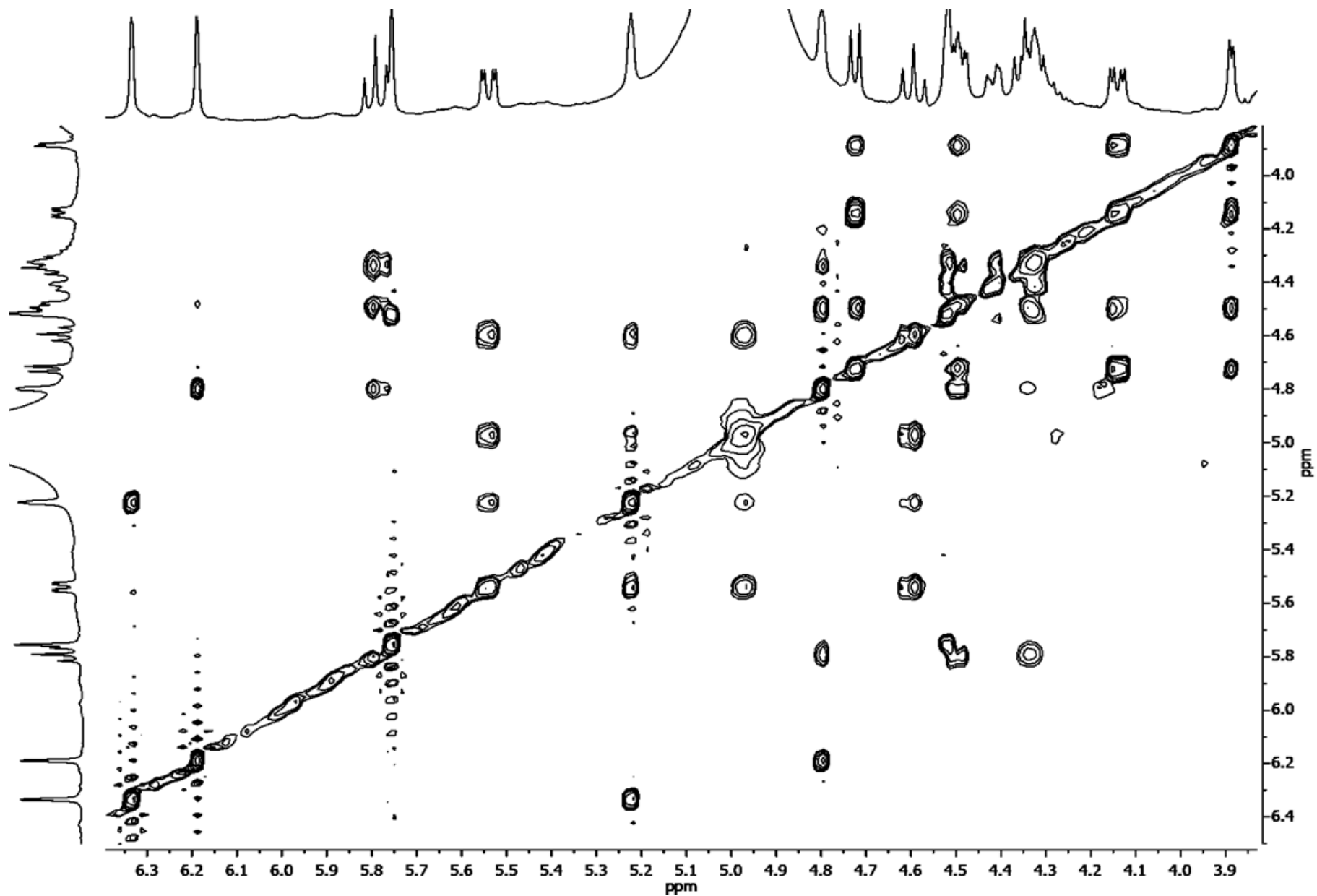


Espectro de RMN-<sup>1</sup>H (400 MHz) de la hamiltonina IV en piridina-*d*<sub>5</sub>

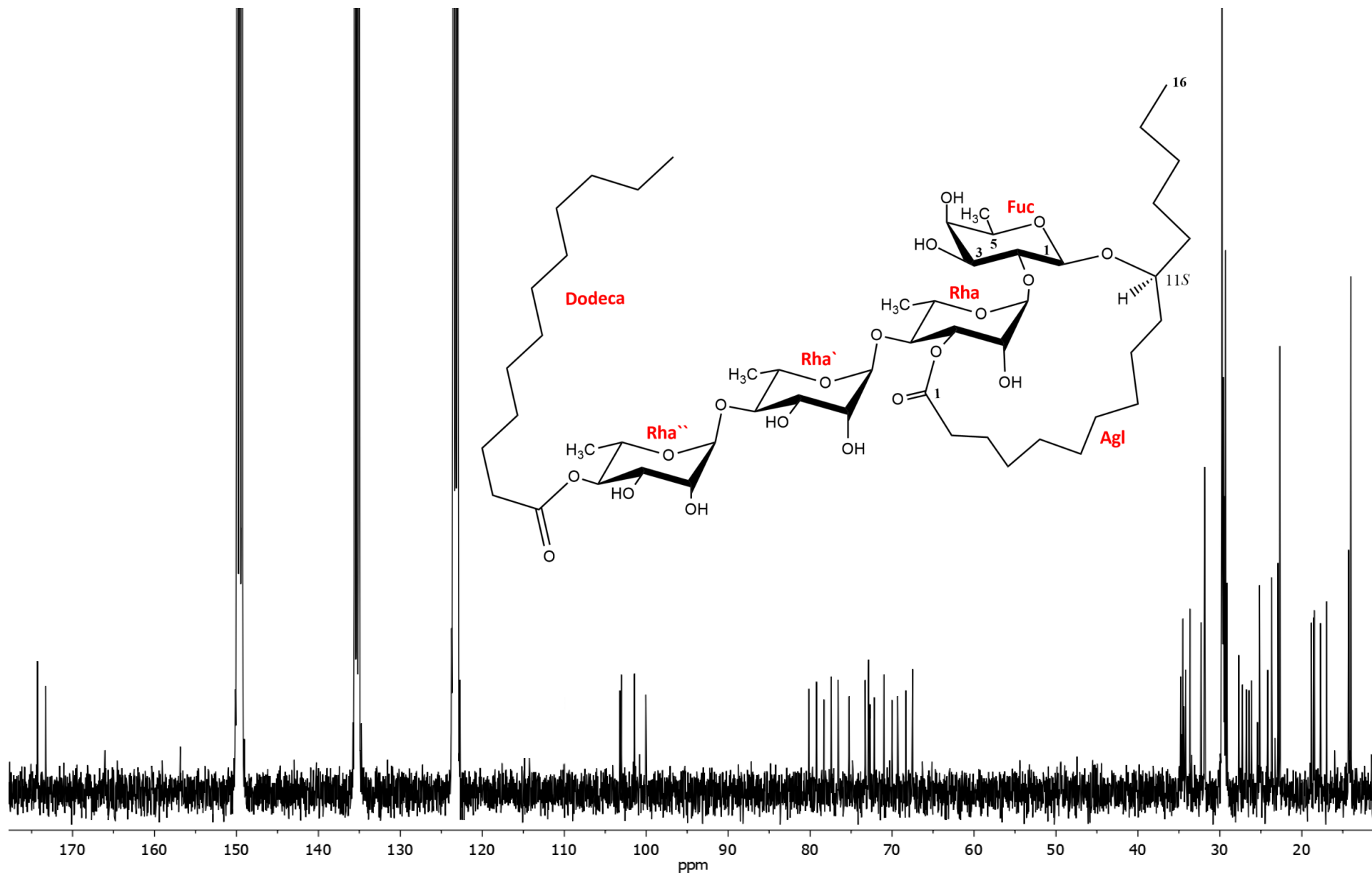


Espectro de correlación homonuclear ( $^3J_{\text{HH}}$ ) (COSY) de la hamiltonina IV en piridina- $d_5$

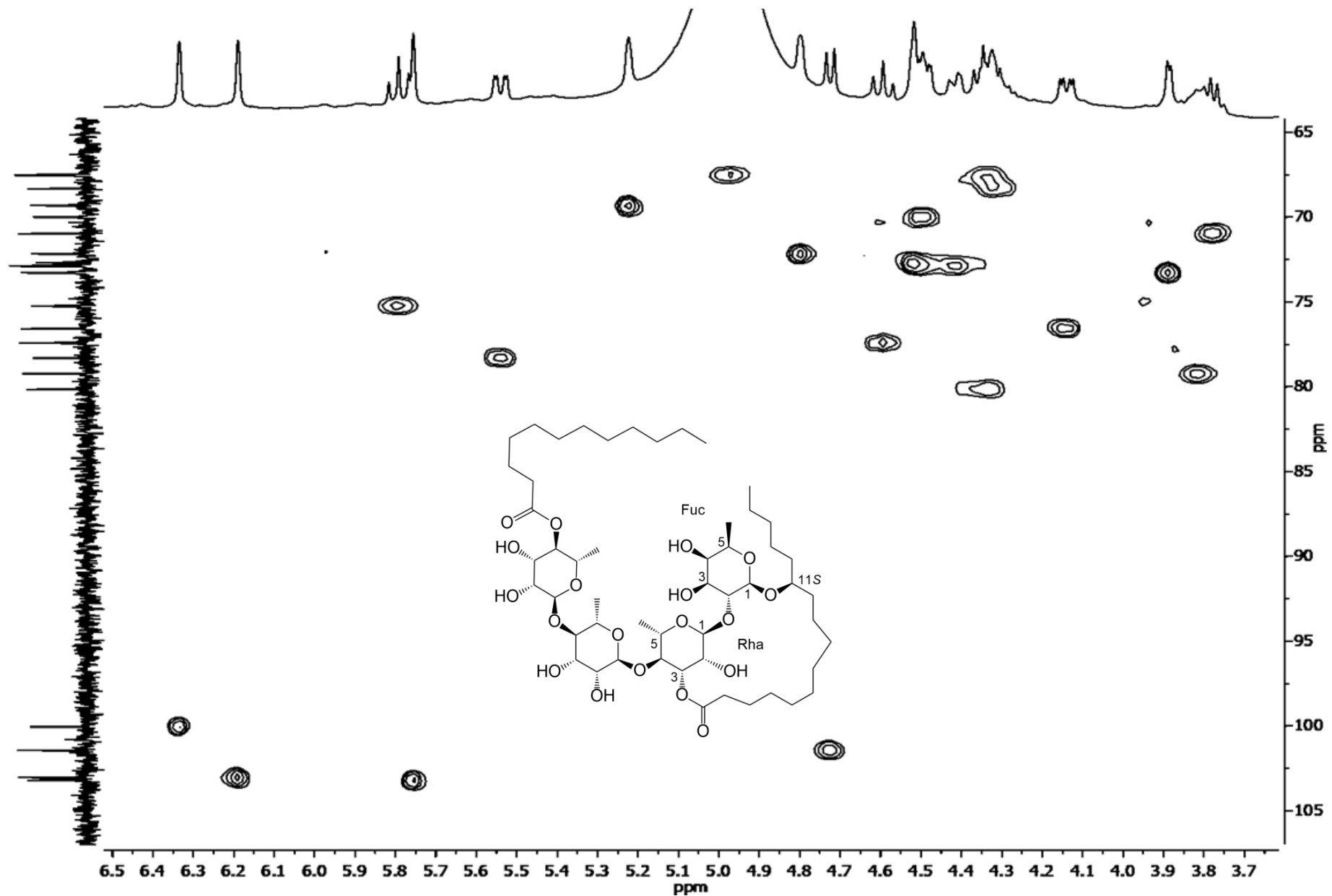




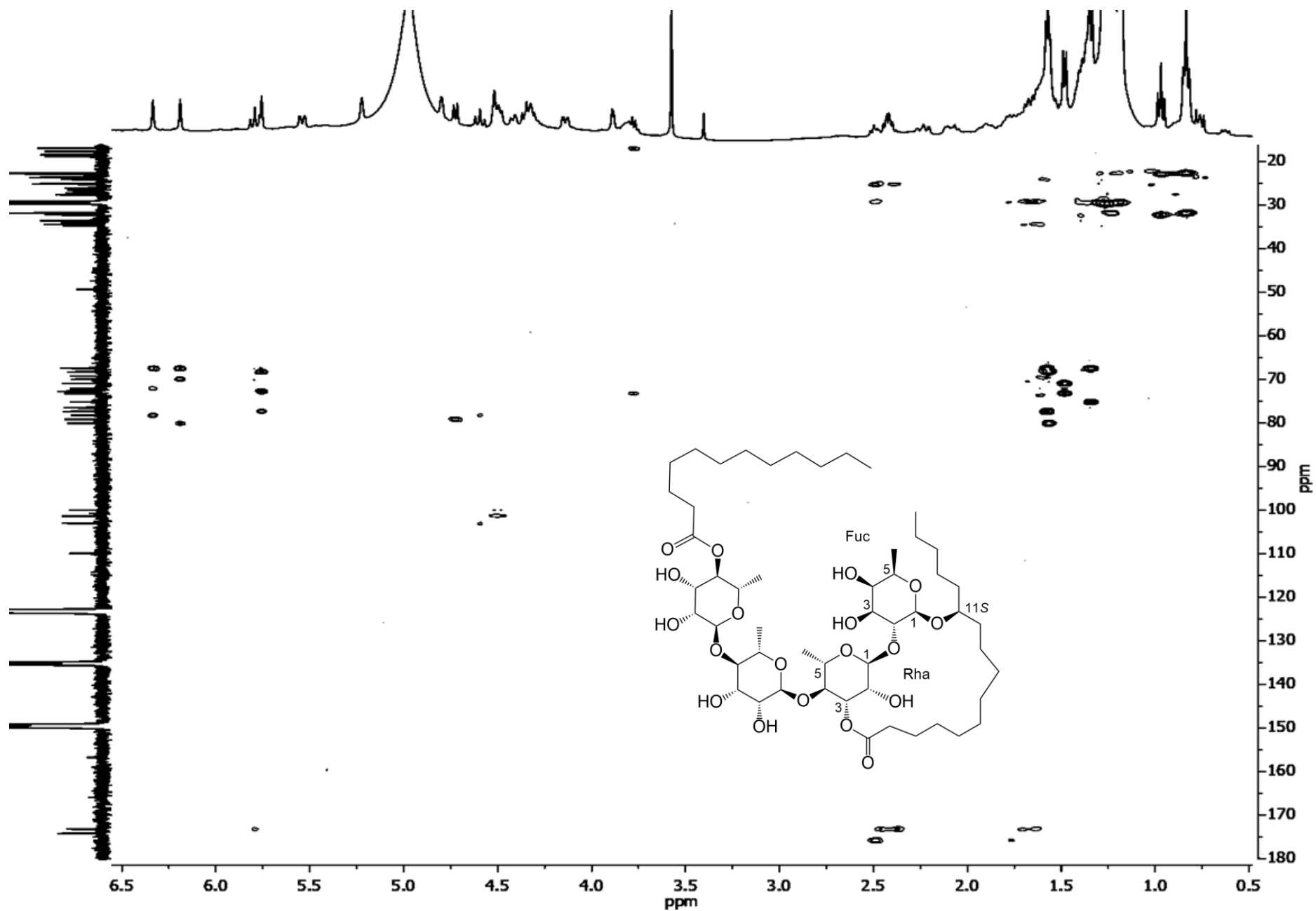
Espectro de correlación  $^1\text{H}$  homonuclear (TOCSY) de la hamiltonina IV en piridina- $d_5$



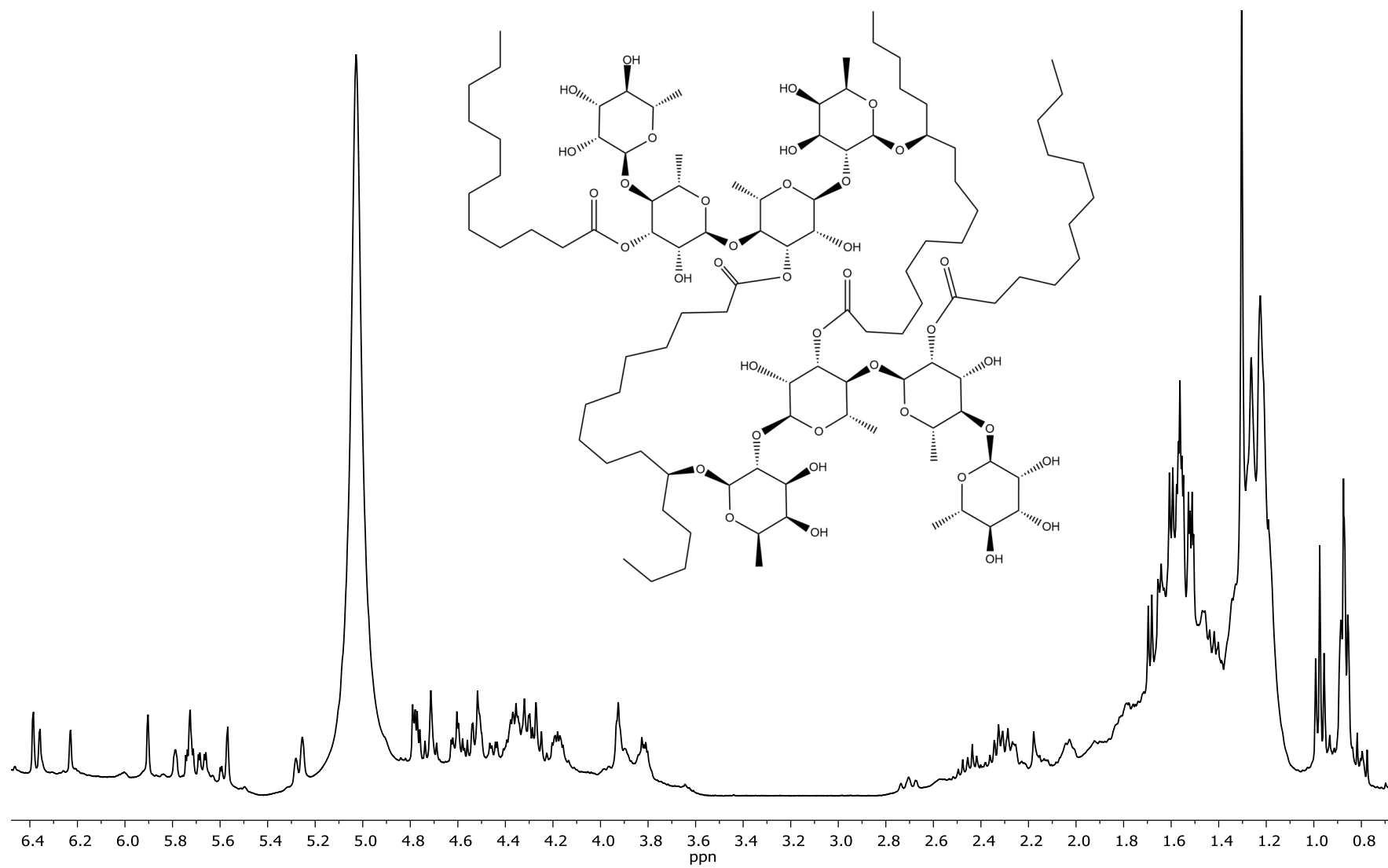
Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz) de la hamiltonina IV en piridina- $d_5$



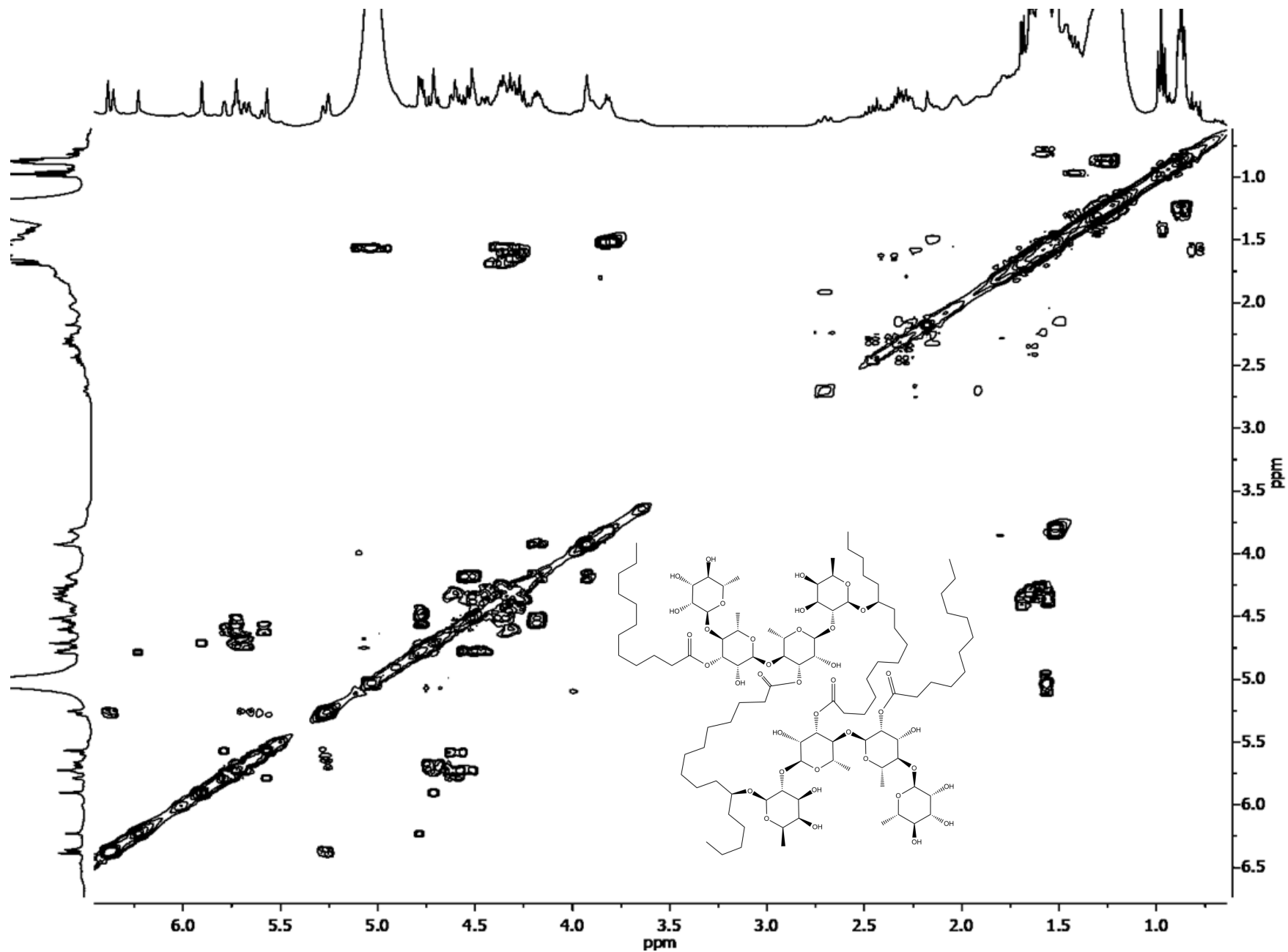
Espectro de correlación heteronuclear ( $^1J_{\text{CH}}$ ) (HSQC) de la hamiltonina IV en piridina- $d_5$



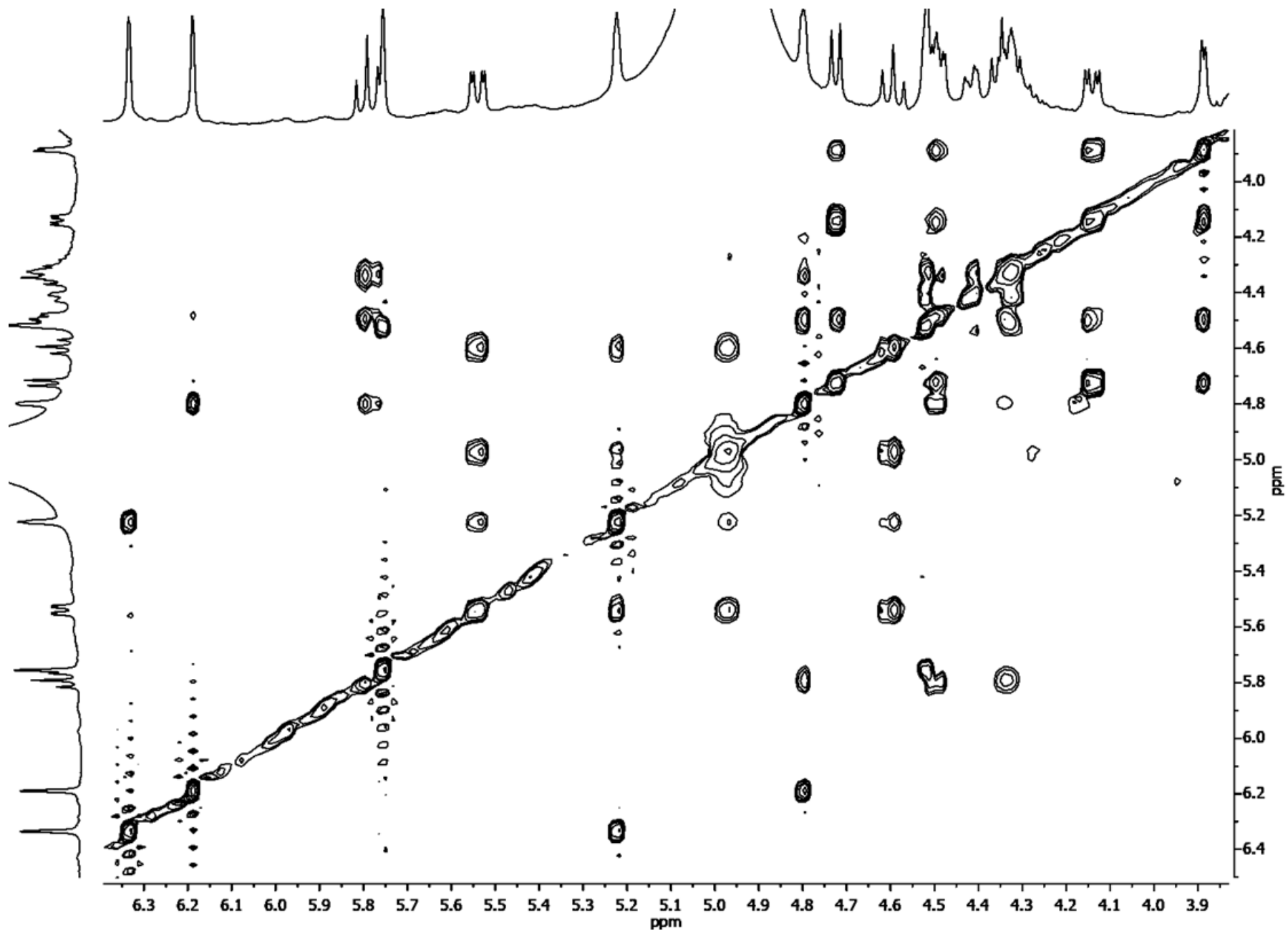
Espectro de correlación heteronuclear ( $^{2,3}J_{\text{CH}}$ ) (HMBC) de la hamiltonina IV en piridina- $d_5$ .



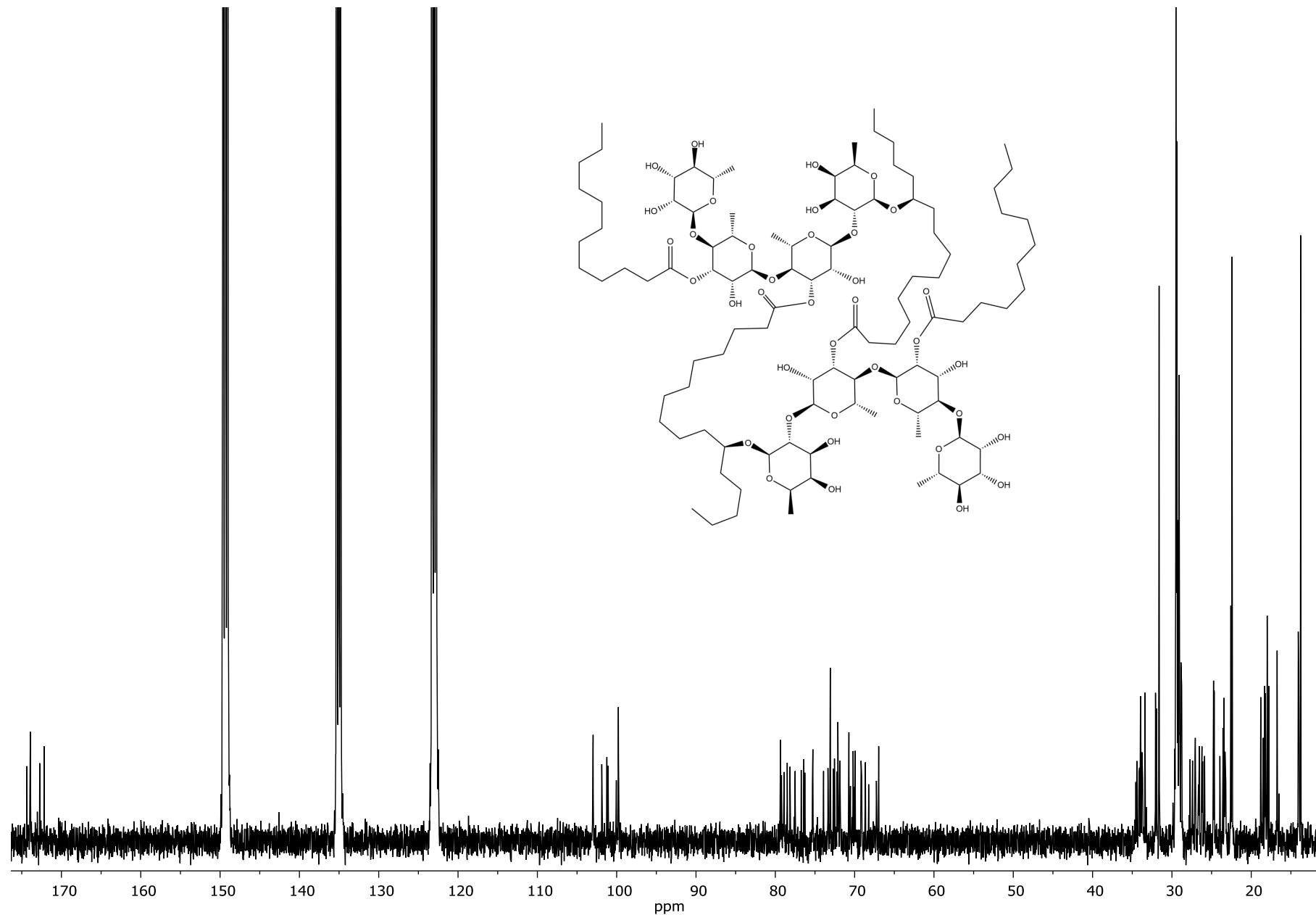
Espectro de RMN- $^1\text{H}$  (400 MHz) de la hamiltonina V en piridina- $d_5$



Espectro de correlación homonuclear ( $^3J_{\text{HH}}$ ) (COSY) de la hamiltonina V en piridina-*d*<sub>5</sub>

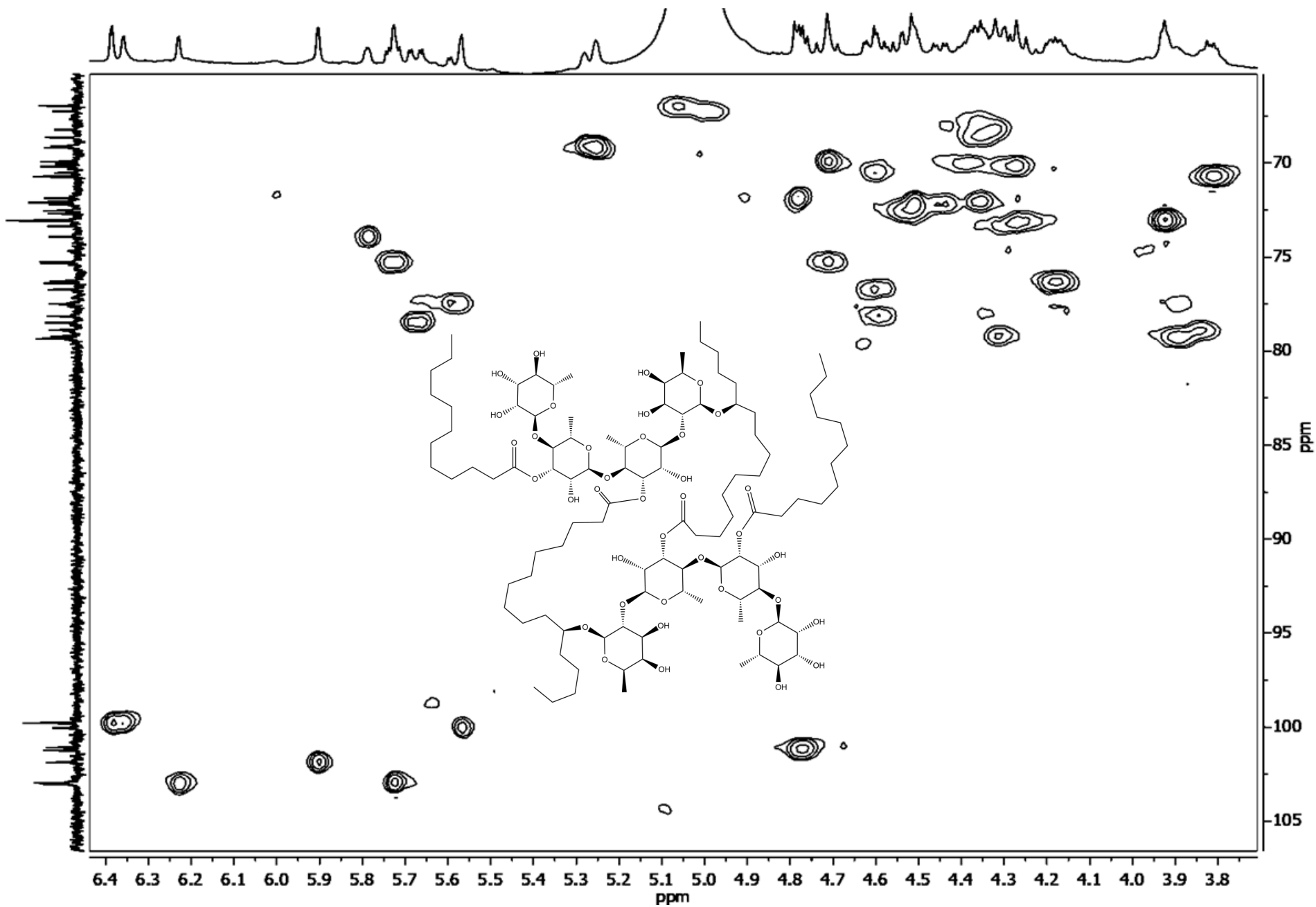


Espectro de correlación  $^1\text{H}$  homonuclear (TOCSY) de la hamiltonina V en piridina- $d_5$

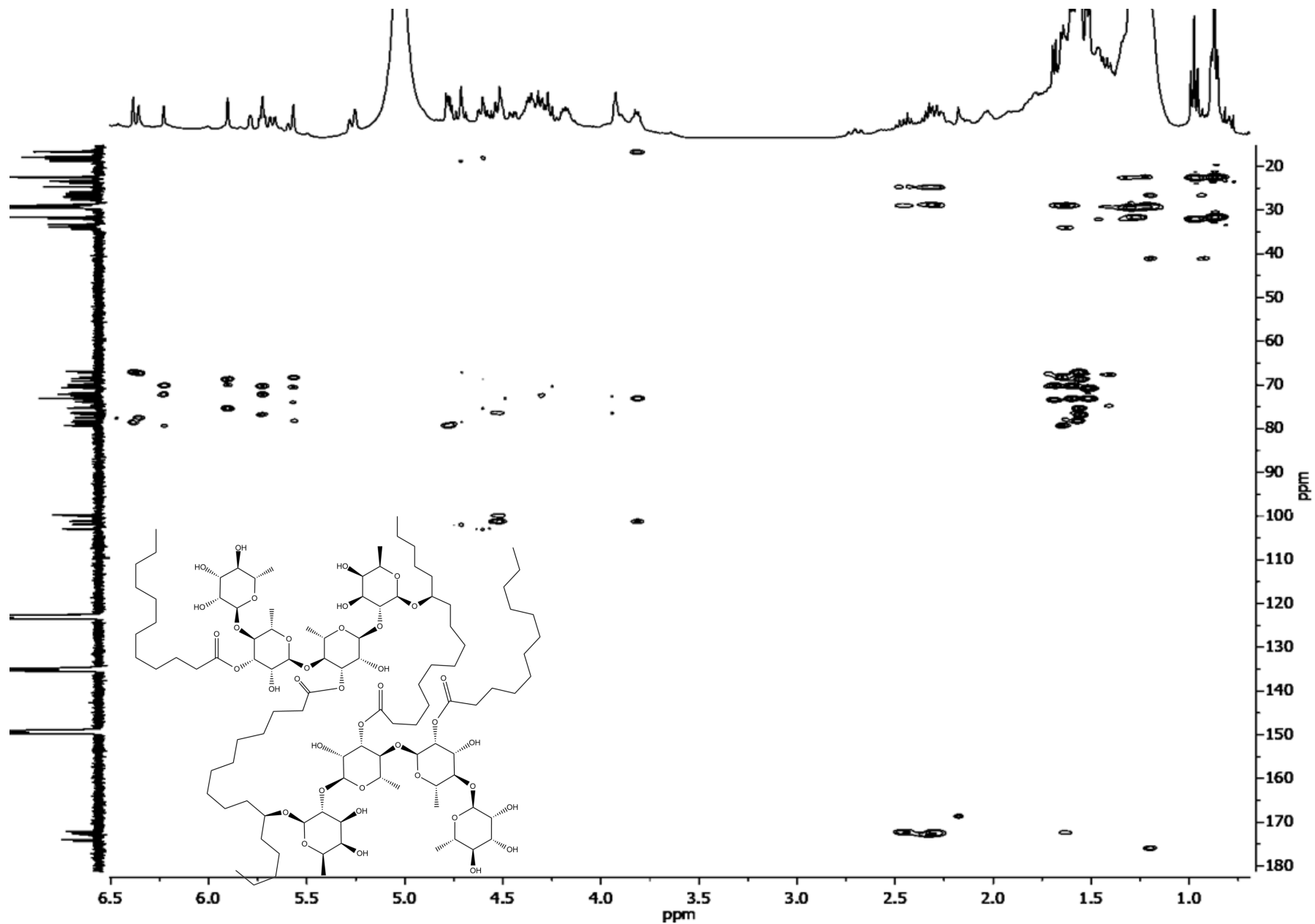


Espectro de RMN- $^{13}\text{C}$  (175 MHz) de la hamiltonina V en piridina- $d_5$





Espectro de correlación heteronuclear ( $^1J_{CH}$ ) (HSQC) de la hamiltonina V en piridina- $d_5$



Espectro de correlación heteronuclear ( $^{2,3}J_{\text{CH}}$ ) (HMBC) de la hamiltonina V en piridina- $d_5$ .

# 11. ARTÍCULO PUBLICADO

## Resin Glycosides from *Operculina hamiltonii* and Their Synergism with Vinblastine in Cancer Cells

Armando Moreno-Velasco, Pedro de Jesús Flores-Tafoya, Mabel Fragoso-Serrano, Suzana Guimarães Leitão, and Rogelio Pereda-Miranda\*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.2c00594>



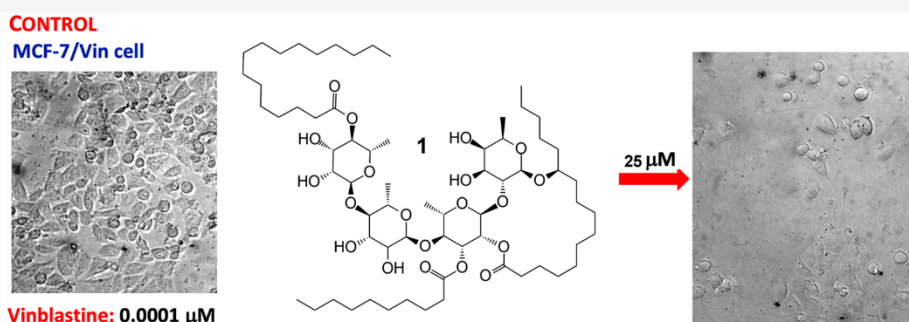
Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information



**ABSTRACT:** *Operculina hamiltonii* is a vine native to the north and northeast region of Brazil, where its roots are traded as a depurative and laxative remedy with the name of Brazilian jalap in traditional medicine. Procedures for the isolation, purification by recycling HPLC, and structure elucidation of three undescribed resin glycosides are presented herein. Hamiltonin I (**1**) represents a macrocyclic structure of a tetrasaccharide of (11S)-hydroxyhexadecanoic acid. Additionally, two acyclic pentasaccharides, named hamiltoniosides I (**2**) and II (**3**), were also isolated, which are related structurally to the known compounds **4** and **5**, macrocyclic lactone-type batatinosides. The tetrasaccharide core of **1** was diacylated by *n*-decanoic acid and the unusual *n*-hexadecanoic acid moiety, while the pentasaccharides **2**–**5** were esterified by one unit of *n*-decanoic or *n*-dodecanoic acid. All the isolated compounds were found to be inactive as cytotoxic agents. However, when they were evaluated (1–25 μM) in combination with a sublethal concentration of the anticancer agent vinblastine (0.003 μM), a significant enhancement of the resultant cytotoxicity was produced, especially for multidrug-resistant breast carcinoma epithelial cells. Such combined synergistic potency may be beneficial for chemotherapy, making resin glycosides potential candidates for drug repurposing of conventional chemotherapeutic drugs to reduce their side effects.

*Operculina* is a member of the morning glory family (Convolvulaceae) and distributed globally throughout the tropics.<sup>1</sup> The Brazilian *O. hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples and *O. macrocarpa* (L.) Urban<sup>2</sup> and Indian jalaps, *O. turpethum* (L.) S. Manso,<sup>3</sup> are the most important species due to their use in traditional medicine as well as for their introduction to the world market of purgative roots as substitutes for the Mexican jalap root, *Ipomoea purga* (Wender) Hayne.<sup>4</sup> Currently, there is a wide variety of commercial therapeutic products that contain the Brazilian jalap in their formulations, which corresponds to the vine with yellow flowers (*O. hamiltonii*) and is distributed widely in the north and northeast of Brazil (Figure S1, Supporting Information). Recently, HPLC-ESIMS fingerprinting of crude drugs and commercial phytopharmaceuticals based on jalap root demonstrated the absence of the chemical marker for *O. macrocarpa*, operculinic acid H, in all analyzed samples. Thus, the use of the Brazilian jalap with white flowers (*O.*

*macrocarpa*) has been discontinued.<sup>5</sup> The therapeutic applications of the Brazilian jalap roots and their phytopharmaceutical products are as a soft purgative, expectorant, brain tonic, and laxative and have also been indicated for the treatment of arthritis, ascites, gout, hemiplegia, and facial palsy. They are specially used as purgative agents in cases of intestinal worms.<sup>5</sup>

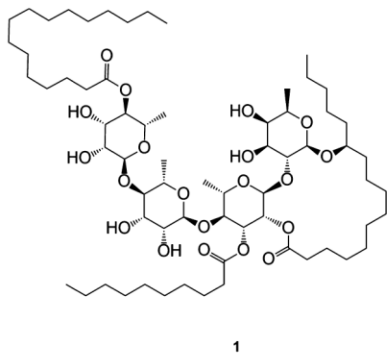
Acylsugars or resin glycosides are complex oligosaccharides (with up to seven monosaccharide units) of fatty acids as macrolactone derivatives for the vast majority of examples.<sup>6</sup>

Received: June 28, 2022

They are esterified by short-chain aliphatic acids and/or long-chain fatty acids, which results in a high diversity of glycolipids built on distinct sugar cores.<sup>2,7</sup> These unique secondary metabolites are confined to the Convolvulaceae, and they seem to play important roles in the natural pest resistance to microorganisms<sup>8</sup> and insects,<sup>9</sup> as well as in plant–plant interactions.<sup>10</sup> This structural hyperdiversity could be the result of the activity of promiscuous enzymes during the biosynthetic pathways of these bioactive secondary metabolites.<sup>11</sup>

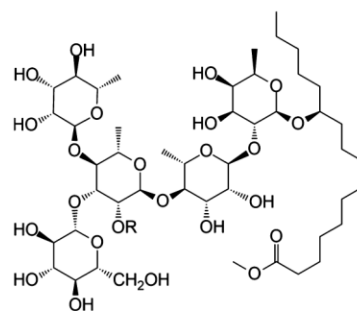
Resin glycosides have been found to be modulators of efflux pumps responsible for the MDR phenotype in prokaryotic<sup>12</sup> and eukaryotic cells,<sup>13</sup> but most of them are mild or noncytotoxic compounds.<sup>13c</sup> In vitro screening methods have demonstrated the therapeutic potential of resin glycosides as coadjuvants to avoid drug resistance and restore the clinical utility of chemotherapy in drug repurposing of conventional drugs for treating infections and cancer.<sup>14</sup>

Previously, three undescribed glycosidic acids, operculinic acids L–N, having tetrasaccharide and pentasaccharide moieties with unusual 12-hydroxy fatty acid aglycones of different chain lengths (C<sub>17</sub> and C<sub>18</sub>), in addition to the known operculinic acids A–C, were obtained by saponification of the isolated resin glycosides from commercial powdered roots of the Brazilian jalap.<sup>5</sup> In the present study, the structure elucidation of three undescribed resin glycosides (1–3) is presented. Two known macrocyclic lactone-type oligosaccharides (4 and 5) from the batatinoside series were also isolated. Their purification by recycling preparative HPLC–refractive index is described. Likewise, the cytotoxicity enhancements of sublethal concentrations of vinblastine (Vin) in combination with all isolated resin glycosides to HCT-116 (colon carcinoma), HeLa (cervix carcinoma), MCF-7 (breast carcinoma), and MCF-7/Vin (multidrug-resistant breast carcinoma) cells were examined.

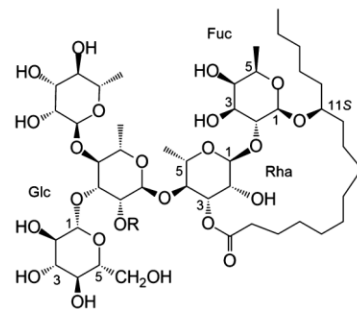


## RESULTS AND DISCUSSION

**Isolation and Structure Elucidation.** The crude-soluble CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–EtOH extract, rich in resin glycosides from the powdered Brazilian jalap root, initially was subjected to fractionation on Si gel column chromatography (CC) with mixtures of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> and Me<sub>2</sub>CO as elution solvents to afford eight combined fractions (Figure S1, Supporting Information). F3 and F4 concentrated the major resin glycoside mixtures and were analyzed further by analytical reversed-phase HPLC with refractive index detection (RI) coupled off-line to electrospray mass spectrometry, to identify novel acyl sugars (Table S1, Supporting Information) by recording mass values for ions [M



2 R = n-C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>O  
3 R = n-C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O



4 R = n-C<sub>12</sub>H<sub>23</sub>O  
5 R = n-C<sub>10</sub>H<sub>19</sub>O

+ Na]<sup>+</sup> and [M – H]<sup>–</sup>, as previously described to resolve the complex resin glycosides mixtures that are usually isolated from morning glory species.<sup>7,15</sup> Five major peaks were identified from the two selected resin glycoside fractions, which were then purified by peak-shaving and heart-cutting techniques in recycling preparative HPLC–RI (Figure S2, Supporting Information). Each peak collected was recycled to achieve homogeneity to the point of separation of the overlapped component.<sup>16</sup> These procedures provided single chemical entities suitable for structure elucidation, which were initially analyzed by ESIMS in the positive- and negative-ion modes (Table S1, Supporting Information) and independently evaluated for enhancement of vinblastine cytotoxicity.

Recycling procedures of the main peaks from fraction F3 afforded compound 1 (t<sub>R</sub> = 20.9 min), while fraction F4 furnished compounds 2 (t<sub>R</sub> = 26.8 min), 3 (t<sub>R</sub> = 14.6 min), 4 (t<sub>R</sub> = 21.2 min), and 5 (t<sub>R</sub> = 13.2 min). Saponification of all isolated pure compounds yielded their constitutive glycosidic acids. From compounds 2 and 3, a pentasaccharide of jalapinoic acid was identified as operculinic acid A (6), which was also obtained from the saponification of 4 and 5. However, saponification of compound 1 yielded a tetrasaccharide of the same aglycone, operculinic acid C (7). Both oligosaccharides represent major glycosidic acids previously identified from *O. macrocarpa* (syn. *I. operculata*) and *Ipomoea batatas*.<sup>17</sup> Acid hydrolysis of 6 provided three monosaccharides, identified by GC–MS analysis of the tetramethylsilane (TMS) derivatives, as L-rhamnose, D-fucose, and D-glucose, while 7 yielded L-rhamnose and D-fucose.<sup>5</sup> The same major fatty acid was isolated as the aglycone from both glycosidic acids, which was methylated (CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub>) and identified by NMR and MS as (11S)-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester ([α]<sub>D</sub><sup>20</sup> +7.0).<sup>5</sup> In addition, derivatization as the trimethylsilyl ethers allowed the corroboration of the position of

Table 1. <sup>1</sup>H NMR Spectroscopic Data of Compounds 1–3 in C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N (δ in ppm, and J in Hz)

position	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>
Fuc-1	4.74 d (7.8)	4.78 d (7.7)	4.75 d (7.1)
2	4.51 dd (9.4, 7.8)	4.48 dd (9.1, 7.7)	4.45 dd (8.4, 7.1)
3	4.15 dd (9.4, 3.4)	4.14 dd (9.1, 3.4)	4.15 m*
4	3.90 d (3.4)	3.96 d (3.4)	3.95 d (3.7)
5	3.79 dq (6.4)	3.79 q (6.3)	3.78 q (6.4)
6	1.50 d (6.4)	1.51 d (6.3)	1.49 d (6.4)
Rha-1	6.35 d (1.5)	6.21 d (0.8)	6.18 d (1.3)
2	5.24 dd (2.9, 1.5)	4.68 dd (3.3, 0.8)	4.66 (3.2, 1.3)
3	5.55 dd (9.8, 2.9)	4.61 dd (9.2, 3.3)	4.59 dd (9.2, 3.2)
4	4.61 dd (9.8, 9.8)	4.23 dd (9.4, 9.2)	4.24 (9.2, 9.2)
5	4.96 dq (9.8, 6.0)	4.87 dq (9.4, 6.2)	4.85 dq (9.2, 6.1)
6	1.59 d (6.0)	1.56 d (6.2)	1.54 d (6.1)
Rha'-1	5.77 d (1.4)	5.77 d (1.4)	5.75 d (0.9)
2	4.53 dd (2.7, 1.4)	6.33 dd (3.1, 1.4)	6.29 (3.1, 0.9)
3	4.43 dd (9.0, 2.7)	4.80 dd (9.2, 3.1)	4.77 dd (9.0, 3.1)
4	4.35 dd (9.0, 9.0)	4.35 dd (9.2, 9.2)	4.34 dd (9.0, 9.0)
5	4.32 dq (9.0, 5.8)	4.33 dq (9.2, 6.1)	4.31 m*
6	1.56 d (5.8)	1.64 d (5.5)	1.61 d (5.6)
Rha''-1	6.20 d (1.2)	6.24 d (0.8)	6.20 d (1.2)
2	4.81 dd (2.6, 1.2)	4.90 dd (3.3, 0.8)	4.87 dd (3.1, 1.2)
3	4.50 dd (9.6, 9.6)	4.42 m*	4.41 m*
4	5.81 dd (9.6, 9.6)	4.26 dd (9.4, 9.4)	4.26 dd (9.2, 9.2)
5	4.35 dq (9.6, 6.3)	4.42 m*	4.37 m*
6	1.36 d (6.3)	1.63 d (6.1)	1.63 d (6.1)
Glc-1		5.14 d (7.7)	5.11 d (7.7)
2		4.02 dd (9.0, 7.7)	4.02 m*
3		4.17–4.12 m*	4.16–4.10 m*
4		4.17–4.12 m*	4.16–4.10 m*
5		3.95 m*	3.90 m
6a		4.23 m*	4.21 (11.4, 3.6)
6b		4.53 dd (12.0, 1.7)	4.51 (11.4, 1.1)
Ag-1			
2a	2.26 ddd (14.0, 7.7, 3.0)	2.33 t (7.5)	2.32 t (7.5)
2b	2.34 ddd (14.0, 8.6, 2.3)		
11	3.82 m	3.92 m	3.96 m*
16	0.85 t (7.3)	0.85 t (6.8)	0.82 t (7.0)
Dodeca-1			
2		2.34	
12		0.91 t (6.8)	
Deca-1			
2	2.40 m		2.32 m (7.5)
10	1.01 t (7.3)		0.89 t (6.8)
Hexadeca-1			
2	2.50 m		
16	0.85 t (7.3)		

<sup>a</sup>900 MHz. <sup>b</sup>700 MHz. <sup>c</sup>400 MHz.

hydroxylation at C-11, since α-cleavage on either side of the trimethylsilyloxy group gave diagnostic ions at *m/z* 287 ([C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>3</sub>TMS]<sup>+</sup>) and 173 ([C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>OTMS]<sup>+</sup>) (Figure S3, Supporting Information). The optical activity for this hydroxylated fatty acid was previously determined to be the dextrorotatory 11-(*S*)-hydroxylated epimer,<sup>5</sup> as demonstrated by the application of Mosher esters to various monohydroxylated fatty acids.<sup>18,19</sup>

The mass spectrometric study of compound 1 (*t<sub>R</sub>* = 20.9 min) from fraction F3 by ESI in the positive-ion mode did not

allow the detection of a protonated molecule [M + H]<sup>+</sup>, and instead the adduct [M + MeOH + H]<sup>+</sup> that was generated with the solvent used in the analysis for the production of the ion stream was observed (Figure S4, Supporting Information). This type of adduct is characteristic of molecules with a high polarity such as the oligosaccharide under study.<sup>21</sup> For instance, the positive-ion ESI spectrum of peracetylated operculinic acid A (8) registered the cation *m/z* 1581.6658 [M + Na + 2H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (Figure S43, Supporting Information). The [M + MeOH + H]<sup>+</sup> adduct for 1 recorded a value of *m/z*



1263.8515 (calcd  $C_{67}H_{123}O_{21}$  requires 1263.8551;  $\delta = -2.8$  ppm), which allowed the calculation of the formula  $C_{66}H_{118}O_{20}$  for the natural product (Table S1, Supporting Information). Alkaline hydrolysis of intact compound **1** fragmented the macrocyclic lactone and liberated the acylating fatty acids of the oligosaccharide core, which were identified by GC-MS analysis as *n*-dodecanoic acid and *n*-hexadecanoic acid.

For the glycosidic core, its HSQC spectrum ( $^1J_{CH}$ ) showed four anomeric signals for Fuc-1 ( $\delta_H$  4.75,  $\delta_C$  101.4), Rha-1 ( $\delta_H$  6.29,  $\delta_C$  101.4), Rha'-1 ( $\delta_H$  6.21,  $\delta_C$  101.3), and Rha''-1 ( $\delta_H$  6.23,  $\delta_C$  103.8). In turn, the signals attributable to the oxygenated carbons of each sugar centered between 60 and 80 ppm were also assigned (Table 2). Analysis of the HMBC

**Table 2.**  $^{13}C$  NMR Spectroscopic Data of Compounds **1–3** in  $C_5D_5N$  ( $\delta$  in ppm)

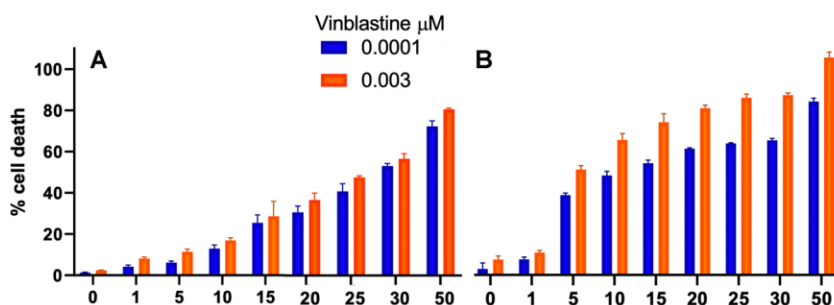
position	1 <sup>a</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>c</sup>
Fuc-1	101.4	101.5	101.3
2	72.8	75.5	75.3
3	76.5	76.9	76.7
4	73.2	73.8	73.6
5	71	71.7	71.5
6	17	17.5	17.4
Rha-1	100.0	101.7	101.6
2	69.2	73.1	72.8
3	78.4	72.8	72.2
4	77.5	74.3	74.1
5	67.6	67.6	67.5
6	18.4	19.1	18.5
Rha'-1	103.2	100.1	100
2	72.7	73.8	73.8
3	72.7	80.9	80.8
4	80.2	78.5	78.4
5	68.4	74.2	73.8
6	18.6	19.2	18.7
Rha''-1	103.1	103.6	103.1
2	72.3	72.7	72.6
3	70.2	73.2	72.9
4	75.2	70.9	70.8
5	67.6	68.7	68.6
6	17.7	19.2	19.1
Glc-1		106.1	105.6
2		75.5	78.1
3		76.8	76.7
4		78.7*	78.6*
5		78.7*	78.6*
6		63.3	63
Ag-1	173.3	173.9	174.2
2	34.4	34.5	34.6
11	79.4	78.2	77.9
16	14.1	14.6	14.6
Dodeca-1		174.4	
2		34.9	
12		14.7	
Deca-1	173.9		174.6
2	34.5		34.9
10	14.3		14.7
Hexadeca-1	174.0		
2	24.9		
16	14.1		

<sup>a</sup>225 MHz. <sup>b</sup>175 MHz. <sup>c</sup>100 MHz.

spectrum (Figure S42, Supporting Information) revealed the following connectivities that confirmed the glycosylation sequence: Fuc H-1 ( $\delta_H$  4.75)/Agl C-11 ( $\delta_C$  78.1), Fuc H-2 ( $\delta_H$  4.49)/Rha C-1 ( $\delta_C$  101.4), Rha H-4 ( $\delta_H$  4.27)/Rha' C-1 ( $\delta_C$  101.3), and Rha' H-4 ( $\delta_H$  4.42)/Rha'' C-1 ( $\delta_C$  103.8). The physical constants and spectroscopic properties for the saponified derivative corresponded to those described for operculinic acid **7**.<sup>17</sup> Comparison of the glycosylation sequence for the natural product **1** and its glycosidic acid derivative by means of the HMBC spectrum permitted the assignments of the following connectivities (Figure S9, Supporting Information): Fuc H-1 ( $\delta_H$  4.76)/Agl C-11 (79.4), Fuc H-2 ( $\delta_H$  4.54)/Rha C-1 ( $\delta_C$  100.0), Rha H-4 ( $\delta_H$  4.63)/Rha' C-1 ( $\delta_C$  103.1), Rha' H-4 ( $\delta_H$  4.38)/Rha'' C-1 ( $\delta_C$  103.2), and Fuc C-1 ( $\delta_C$  101.4)/Agl H-11 ( $\delta_H$  3.82).

The relationship for the esterification position in Rha'' H-4 ( $\delta_H$  5.83) with *n*-hexadecanoic acid ( $\delta_{C-1}$  174.6) was also found by HMBC experiments through the observed  $^2,3J_{CH}$  coupling<sup>4b,7</sup> (Figure S9, Supporting Information). However, this residue was differentiated from the decanoyl substituents by means of the small downfield shift ( $\Delta\delta + 0.2$  ppm  $\times 3$  CH<sub>2</sub> = ca. + 0.6 ppm) induced by the (CH<sub>2</sub>)<sub>3</sub>-increment in the length of the aliphatic chain,<sup>22</sup> as previously demonstrated for the batatin series from *I. batatas*.<sup>23</sup> The correlations between the remaining carbonyls for the *n*-decanoic acid at Rha C-3 ( $\delta_H$  5.55 and  $\delta_C$  78.4) and that for aglycone lactone, which should be located at Rha C-2 ( $\delta_H$  5.24 and  $\delta_C$  69.2), were registered at  $\delta_C$  173.9 and 173.3, respectively (Figure S9, Supporting Information). The position for the lactonization was demonstrated by the chemical shifts for the diastereotopic CH<sub>2</sub> protons at  $\delta_H$  2.23 and 2.39, as previously reported for the operculins with the lactonization at C-2 Rha,<sup>24</sup> in contrast with the signals for the CH<sub>2</sub> protons of the aglycone esterifying the position C-3 of the inner Rha in compounds **4** and **5**, as a pair of signals centered at ca.  $\delta_H$  2.29 and 2.69. These  $\alpha$ -CH<sub>2</sub> diastereotopic protons to the lactone group (aglycone C-1) displayed distinctive chemical shifts as two doublets of doublets (ddd) signals due to the strain imposed by the cyclic structure. Therefore, for all macrocyclic resin glycosides, the carbonyl resonance for the lactone that is always centered at ca. 172–174 ppm is easily identified through the correlations ( $^2J_{CH}$ ) with these nonmagnetically equivalent diastereotopic C-2 methylene protons.<sup>4b,7</sup>

For hamiltonin **1** (**1**), the position of lactonization and esterification of the sugar moiety was established as follows (Figure S9, Supporting Information): (1) the carbonyl signal centered at  $\delta$  173.3 was assigned to the lactone group because of its observed  $^2J_{CH}$  coupling with the C-2 diastereotopic methylene protons of the aglycone unit ( $\delta_H$  2.26 and 2.34), and the lactonization was corroborated at position C-2 of the second monosaccharide unit (Rha) by the observed  $^3J_{CH}$  coupling between this carbonyl group and the corresponding proton ( $\delta_H$  5.25) on the saccharide core; (2) for the carbonyl signal at  $\delta_C$  173.9, its  $^2J_{CH}$  coupling with the multiplet at 2.40 allowed the assignment for the decanoyl group esterifying position C-3 of the second monosaccharide unit (Rha) by the observed  $^3J_{CH}$  coupling with  $\delta_H$  5.55; (3) finally, the signal at  $\delta$  174.6 through its  $^2J_{CH}$  coupling with the multiplet at 2.50 allowed the assignment for the hexadecanoyl group that esterifies position C-4 of the terminal rhamose unit (Rha'') as indicated by the  $^3J_{CH}$  coupling with the signal at  $\delta_H$  5.81. Thanks to this spectroscopic analysis, it was possible to identify natural product **1** as 11(*S*)-hydrohexadecanoic acid 11-*O*-(4-



**Figure 1.** Growth inhibition of multidrug-resistant MCF-7/Vin (A) and drug-sensitive MCF-7 (B) cells after 48 h of combination therapy using an SRB assay. Cells were exposed to concentrations (50, 30, 25, 20, 15, 10, 5, and 1  $\mu\text{M}$ ) of halmitonin I (**1**) with a subinhibitory concentration of vinblastine (0.003  $\mu\text{M}$  in blue and 0.0001  $\mu\text{M}$  in orange). Each experiment was performed three times independently ( $n = 3$ ). Values are expressed as the percentage of the control and represent means  $\pm$  SEM.

*O*-*n*-hexadecanoyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2-*O*-*n*-dodecanoyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -D-fucopyranoside-(1,2-lactone).

This structural assignment is also in agreement with the observation that, so far, all the isolated resin glycosides exhibit the longest esterifying fatty acids in the external saccharide unit of the glycosidic nucleus, while those with a shorter length have been found as a substituent in the internal rhamnose of both tetrasaccharides and pentasaccharides.<sup>6</sup> The acyltransferase enzymes responsible for the esterification of oligosaccharide nuclei in the morning glory species are highly promiscuous in relation to the acylating substrates they use.<sup>11</sup> However, it has been observed that the steric hindrance imposed by the macrocyclic oligosaccharide nucleus usually limits the esterification of the macrolactone vicinal positions to short- and medium-chain fatty acids.<sup>6</sup> Therefore, this was an additional criterion used for the location of the *n*-hexadecanoyl residue in the terminal position of the oligosaccharide (Rha'' C-4). Hamiltonin I (**1**) represents the first resin glucoside with *n*-hexadecanoic acid as an acyl residue.

Compound **2** gave an HRESIMS  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ion at  $m/z$  1237.6909 (calcd for  $\text{C}_{59}\text{H}_{106}\text{O}_{25}\text{Na}$  requires 1237.6915,  $\delta = -0.5$  ppm (Figure S10, Supporting Information) with a difference of 28 mass units ( $\text{CH}_2 \times 2$ ) from **3** with an HRESIMS  $[\text{M} + \text{Na}]^+$  ion at  $m/z$  1209.6550 (calcd for  $\text{C}_{57}\text{H}_{102}\text{O}_{25}\text{Na}$  requires 1209.6602,  $\delta = -4.3$  ppm; (Figure S16, Supporting Information). The same difference was observed for compound **4** ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$   $m/z$  1205.6601, calcd for  $\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{O}_{24}\text{Na}$  requires 1205.6653,  $\delta = -4.3$  ppm (Figure S23, Supporting Information) and **5** ( $[\text{M} + \text{Na}]^+$   $m/z$  1177.6293, calcd for  $\text{C}_{56}\text{H}_{98}\text{O}_{24}\text{Na}$  requires 1177.6340,  $\delta = -4.2$  ppm (Figure S31, Supporting Information). This mass spectrometric analysis led to the conclusion that the only difference between each of these two pairs of individual resin glycosides was the length of the acylating residue. Compounds **2** and **4** were thus deduced as being esterified with decanoic acid, while **3** and **5** with dodecanoic acid. For example, in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum of compound **4** (Figure S22, Supporting Information), 23  $\text{CH}_2$  signals were identified in the region centered at  $\delta$  23–36, of which 13 corresponded to the aglycone of the oligosaccharide nucleus and the remaining 10 signals were assigned to the  $\text{CH}_2$  signals of the acylating organic acid. The length of the esterifying chain was determined by subtracting its corresponding signals when comparing the  $^{13}\text{C}$  NMR spectra between the peracetylated operculinic acid **6** and compound **4**, as both compounds have the same aglycone, namely, 11*S*-hydroxyhexadecanoic

acid (Figure S9, Supporting Information). The rest of the  $^{13}\text{C}$  NMR signals for this moiety corresponded to the terminal methyl ( $\delta$  14.6) and the carbonyl group C-1 ( $\delta$  174.4). In addition, compound **4** clearly demonstrated the restriction imposed in the macrocyclic structure through the signal dispersion observed in the  $^{13}\text{C}$  NMR spectrum for the methylene signals ( $\delta$  23–36). In contrast, the chemical shifts for the same methylene groups in the acyclic compounds **2** and **3** were barely resolved due to the high conformational freedom (Figure S22, Supporting Information). In this way, it was established that the esterifying portion is *n*-dodecanoyl, in congruence with the results from the GC-MS analysis of the organic phase soluble residue ( $t_{\text{R}}$  9.1 min; EIMS:  $m/z$   $[\text{M}]^+$  200,  $\text{C}_{12}\text{H}_{24}\text{O}_2$ ) produced by saponification of intact isolated compounds **2** and **4**. Saponification of compounds **3** and **5** afforded a peak with  $t_{\text{R}}$  7.4 min for *n*-decanoic acid (EIMS:  $m/z$   $[\text{M}]^+$  172,  $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ ).

Compounds **2** and **3** proved to be individual acyclic pentasaccharides since the triplet-like signal for the magnetically equivalent methylene protons at C-2 ( $\delta$  2.3) of the aglycone was observed. In addition, the methyl ester group ( $\delta$  3.6) for the terminal carboxylic moiety ( $-\text{CO}_2\text{CH}_3$ ) of the aglycone confirmed their acyclic structure, as previously found in the prescaprosides from beach morning glory (*I. pes-caprae*).<sup>20</sup> Thus, these acyclic compounds corresponded to the previously described cyclic batatinosides IX (**4**) and VI (**5**) from the sweet potato (*I. batatas*).<sup>17b,c</sup> The connectivity between the aglycone (Agl) and the sugar chain, as well as the sequence of glycosylation among the monosaccharides in all pentasaccharides and the position of esterification for each residue, was supported by their HMBC experiments ( $^2\text{J}_{\text{CH}}$ ). The same long-range correlations ( $^3\text{J}_{\text{CH}}$ ) were observed for all compounds **2**–**5**; for instance, the following contour plots were registered in compound **2** (Figure S15, Supporting Information): Agl C-11 ( $\delta_{\text{C}}$  78.2)/Fuc H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  4.78), Rha C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  101.7)/Fuc H-2 ( $\delta_{\text{H}}$  4.48), Rha' C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  100.1)/Rha H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4.23), Rha' C-1 ( $\delta_{\text{C}}$  103.1)/Rha'' H-4 ( $\delta_{\text{H}}$  4.26), and Glc H-1 ( $\delta_{\text{H}}$  5.14)/Rha' C-3 ( $\delta_{\text{C}}$  72.8). Thus, structural differences between the pairs of compounds **2** and **3** or **4** and **5** were evident in the position of the *n*-decanoic or *n*-dodecanoic residue at C-2 of the second rhamnose (Rha') on the glycosidic core.

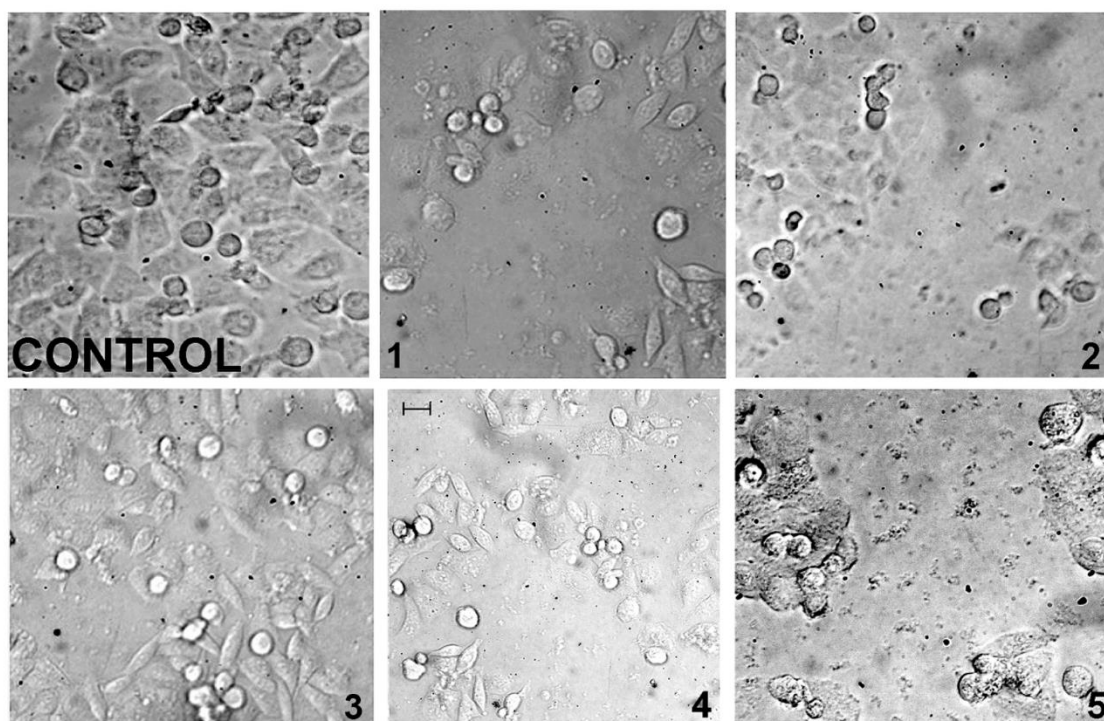
Accordingly, the acyclic structures for the hamiltoniosides I (**2**) and II (**3**) were established unambiguously as methyl ester 11(*S*)-hydroxyhexadecanoate 11-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 3)-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*-(2-*O*-*n*-dodecanoyl)- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 4)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1 $\rightarrow$ 2)- $\beta$ -



**Table 3.** Half-Maximal Inhibitory Concentration Registered for Different Combinations of a Subinhibitory Concentration of Vinblastine with Noncytotoxic Resin Glycosides in Cancer Cells

sample <sup>a</sup>	IC <sub>50</sub> (μM)			
	MCF-7	MCF-7/Vin <sup>b</sup>	HeLa	HCT-116
1	5.0 ± 0.4	10.9 ± 0.6	5.2 ± 0.8	10.7 ± 1.1
2	4.4 ± 0.8	3.1 ± 0.9	14.6 ± 2.9	6.8 ± 1.5
3	4.7 ± 0.7	10.0 ± 0.8	26.1 ± 0.7	8.6 ± 1.2
4	15.2 ± 1.4	18.4 ± 1.6	26.6 ± 1.4	17.7 ± 0.7
5	12.3 ± 1.6	19.4 ± 1.8	23.8 ± 0.5	12.8 ± 2.6
colchicine <sup>c</sup>	0.05 ± 0.002	1.57 ± 0.26	0.006 ± 2e-4	0.08 ± 0.02
vinblastine <sup>c</sup>	0.035 ± 0.01	1.63 ± 0.25	0.004 ± 2e-4	0.3 ± 0.02

<sup>a</sup>Compounds 1–5 were evaluated at concentrations of 50, 30, 25, 20, 15, 10, 5, and 1 mM to enhance vinblastine cytotoxic effects tested at 0.003 μM. <sup>b</sup>Vinblastine for the MDR cell line was tested at 0.4 μM. <sup>c</sup>IC<sub>50</sub> for control drugs in standard SRB assays. Abbreviations: MCF-7 = breast carcinoma; MCF-7/Vin = multidrug-resistant breast carcinoma; HeLa = cervix carcinoma, HCT-116 = colon carcinoma.

**Figure 2.** Microscopic visualization of MCF-7/Vin cells after 48 h of incubation with a subinhibitory concentration of vinblastine at 0.4 μM (control) in combination with isolated resin glycosides 1–5 at a concentration of 25 μM for each tested sample. Scale bar: 50 μm.

D-fucopyranoside for **2** and methyl ester 11(S)-hydroxyhexadecanoate 11-*O*-β-D-glucopyranosyl-(1→3)-*O*-[α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*O*-(2-*O*-*n*-decanoyl)-α-L-rhamnopyranosyl-(1→4)-*O*-α-L-rhamnopyranosyl-(1→2)-β-D-fucopyranoside for **3**.

**Enhancement of Vinblastine Cytotoxicity.** Compounds 1–5 were evaluated for their cytotoxicity against a panel of human cancer cell lines, namely, colorectal (HCT-116), cervical carcinoma (HeLa), and breast cancer (MCF-7 and multidrug-resistant MCF-7/Vin) cell lines using the sulforhodamine B (SRB) assay.<sup>25</sup> All tested compounds did not display any intrinsic cytotoxicity (IC<sub>50</sub> > 25 μM). The potential synergism of the individual isolated compounds 1–5 at the concentrations of 50, 30, 25, 20, 15, 10, 5, and 1 mM to enhance vinblastine cytotoxic effects at sublethal doses (0.003 or 0.0001 μM) was investigated. The number of surviving cells was determined and compared with an untreated control after 48 h. For instance, while 0.003 μM of vinblastine induced cell

death at 1.5%, addition of 5 μM of hamiltonin I (**1**) increased this value to 47% (IC<sub>50</sub> 5.0 μM) in MCF-7 cells (Figure 1). Also, 0.003 μM of vinblastine combined with varying concentrations of compound **1** showed high cell death levels even at low concentrations in MCF-7/Vin cells but with a higher range IC<sub>50</sub> value of 10.9 μM, as expected from the multidrug-resistant phenotype of this cell line.<sup>13a</sup>

The significance of the synergistic effect of various concentrations of all isolated compounds with vinblastine in four human cancer cell lines was next examined. Table 3 summarizes the half-maximal inhibitory concentration (IC<sub>50</sub>) values as the potency of the tested noncytotoxic resin glycosides 1–5 at different concentrations (1–50 μM). Figure 2 illustrates the growth inhibition of MCF-7/Vin cells after 48 h of combination assay by the SRB assay with a concentration of 25 μM for each tested sample of compounds 1–5 with vinblastine at the sublethal dose of 0.4 μM. All these resin glycosides even at 5 μM of the tested resin glycoside continued



to show significant vinblastine cytotoxicity enhancement in all evaluated cell lines. These results demonstrated that sublethal doses of vinblastine in combination with resin glycosides induced a more potent cytotoxic effect, while treatment with each of the resin glycosides alone did not cause cell death. This type of observation was also demonstrated previously for ipomeolide A, a macrolactone pentasaccharide of (11R)-hydroxyhexadecanoic acid composed by one unit of D-fucose and four units of L-rhamnose from the aerial parts of *I. pes-caprae*, which enhanced cytotoxicity (50%) significantly at the minimum concentration of 4  $\mu\text{M}$ , in combination with doxorubicin (1  $\mu\text{M}$ ), on survival of K-562 cells by increasing apoptotic responses.<sup>26</sup>

Compounds 1–5, in combination with vinblastine, were able to restore chemotherapeutic susceptibility in MCF-7/Vin cells (Figure 2), as previously reported for murucoidin V and purgin II.<sup>13</sup> Therefore, these highly amphiphilic compounds appear to facilitate interactions with potential efflux pump targets in the resistant breast carcinoma cells (MCF-7/Vin) as previously demonstrated for some individual resin glycosides by rhodamine-123 efflux experiments and flow cytometry after incubating with the UIC2 anti-MDR1 mouse monoclonal antibody, specific for an extracellular conformational epitope of P-glycoprotein (P-gp).<sup>14</sup>

Based on previous studies, the combination of resin glycosides with chemotherapeutic agents, such as vinblastine, additionally may interfere in important oncogenic pathways leading to the formation of reactive oxygen species, which sensitizes cancer cells and enhances antineoplastic drug activity.<sup>27</sup> The surfactant-like properties have also been commonly associated with the cytotoxicity of amphiphilic glycoconjugates like the major glycolipids of resin glycosides.<sup>28</sup> The observed synergistic effects can also be the result of the combined impact on autophagy, a catabolic cell process exerted in response to oxidative stress.<sup>29</sup> Combination therapy can also prevent cancer cell spread by inhibiting cell proliferation, damage to proteins/DNA (DNA-alkylation), cancer signaling pathways, and metastasis, which eventually can produce cell death. Nevertheless, studies are recommended for further evaluation of the cytotoxic synergistic mechanisms underlying these combinations with resin glycosides.

Finally, the lipophilicity/hydrophilicity balance<sup>14</sup> has been proved a critical consideration for cytotoxicity in resin glycosides as demonstrated by the  $\text{IC}_{50}$  values described for the natural ipomoeassins and some of their derivatives with nanomolar growth-inhibitory activity ( $\text{IC}_{50} = 4.2\text{--}36\text{ nM}$ ) against many cancer cell lines (Figure S46, Supporting Information). Ipomoeassin F represents the most cytotoxic glycolipid isolated so far from the morning glory family.<sup>30</sup> This small macrocyclic triacylated disaccharide binds to the central Sec61 $\alpha$  subunit of the Sec61 complex and induces cytotoxicity by disrupting multiple aspects of Sec61-mediated protein biogenesis at the endoplasmic reticulum, mainly protein translocation.<sup>31</sup> Therefore, research on these carbohydrate-based drugs has been expanded considerably during the past decade, and a great number of naturally occurring glycolipids as well as their synthetic modifications have exhibited interesting potency as potential drug leads.<sup>32</sup>

## CONCLUSIONS

The isolation procedure used for the structurally related compounds 1–5 from *O. hamiltonii* demonstrated once more that resin glycosides are not easy to purify, since they are

always present as complex mixtures of homologues. Recycling HPLC-IR provides a maximal resolution in a short-term analysis. The structural characterization of these novel macrocyclic resin glycosides allowed an increase in knowledge on the considerable structural diversity of these amphiphilic biodynamic glycolipids. Recently, the cytotoxic effects of resin glycosides against cancer cell lines have been tested in combination with clinically used chemotherapeutic agents. Consequently, due to the increasing popularity of carbohydrate-based compounds in drug discovery, drug combinations of this kind could represent a strategy to reduce anticancer drug concentrations needed for the therapeutic effects.

## EXPERIMENTAL SECTION

**General Experimental Procedures.** Melting points were determined on a Fisher-Johns 220 VAC apparatus (Thermo Scientific) and are uncorrected. Optical rotations were measured with a PerkinElmer model 341 polarimeter using methanol as solvent. NMR spectra were recorded in  $\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$  solution, using micro-NMR sample tubes (2.5 mm o.d. stem; sample volume 115  $\mu\text{L}$  at 30 mm height), on Bruker Avance III HD spectrometers at 900 and 700 MHz or on a Varian VNMRs instrument at 400 MHz, using tetramethylsilane as an internal standard. Low-resolution ESIMS data were measured using a Waters SQD2 system (Waters) equipped with an electrospray ionization source (ESI) by direct infusion of the purified compounds. Each sample (1 mg) was dissolved in 1 mL of MeOH, and 250  $\mu\text{L}$  was diluted with 100  $\mu\text{L}$  of MeOH– $\text{H}_2\text{O}$  (9:1, v/v) containing 0.1% formic acid to enhance the ionization process and was infused directly into the ESI source in the positive-ion mode at a flow rate of 5  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Each sample was analyzed in full-scan mode using an  $m/z$  100–3000 mass range, under the following instrumental conditions: AGC target  $5 \times 10^4$ , 500 ms maximum injection time, 1 microscan, scan time 1.9 s, resolving power 100,000, capillary temperature 270  $^\circ\text{C}$ ; spray voltage applied to the needle 3.7 kV, capillary voltage 37 V, nebulizer gas (nitrogen) flow rate set at 5 arbitrary units, acquisition time 1 min. High-resolution ESIMS of intact isolated compounds was carried out using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (MS Q-TOF G6530, Agilent Technologies). The finalized operating ESI source conditions were as follows: a  $m/z$  50–3200 mass range; capillary voltage set at 3500 V; skimmer voltage, 65 V; fragmentor voltage, 175 V; desolvation gas (325  $^\circ\text{C}$ ; 8 L/min) and nebulizing gas (nitrogen, 50 psi). Direct infusion ESIMS spectra were deconvoluted by Xcalibur for Qual Browser v. 2.2. SP1 2.2 (ThermoFisher Scientific). HPLC analyses were carried out on a Waters instrument (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) with a 600E multisolvent delivery system and a 996 photodiode array detector. GC-MS was performed on a Thermo-Electron equipment with a DB-5MS column, 5%-phenyl-methylpolysiloxane (30 m  $\times$  0.25 mm, 0.1  $\mu\text{m}$ ) as stationary phase, and He as mobile phase, with a linear velocity of 30 cm/s, isothermal at 50  $^\circ\text{C}$  during 4 min, and with a linear gradient of 40  $^\circ\text{C}/\text{min}$  until 300  $^\circ\text{C}$ , keeping the final temperature for 20 min. The analysis conditions for MS were ionization energy 70 eV, ionization source temperature 250  $^\circ\text{C}$ , interphase temperature 270  $^\circ\text{C}$ , and range of registered mass/charge 45–600 Da. Recycling HPLC was performed in a 600 E pump (Waters) equipped with a recycling valve and a refraction index detector 410 (Waters) integrated to a PC (OptiPlex 466, Dell).

**Plant Material.** The powdered roots of *Operculina hamiltonii* were purchased under the name of “jalapa” at the Municipal Market 2000 in Santarém, Pará, Brazil, in September 2015. Two of the present coauthors, S.L. and R.P.-M., identified the plant material by comparison with the microscopic anatomic features previously described for this species.<sup>5</sup> A sample (voucher BRM-OH 1) is on deposit at the Pharmacognosy Drug Collection, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos Dispensary, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro. This work received authorization from the Brazilian National System for the Management

of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (SISGEN) under the registration number CB8C853.

**Extraction and Isolation.** Powdered roots (866 g) were extracted by sequential maceration steps (4 × 4 L) with a mixture of CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (1:1). The combined extract was evaporated to dryness under reduced pressure to obtain a brown waxy residue. The extract (30 g) was later fractionated by CC with 200 g of silica gel, and mixtures of solvents of increasing polarity (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>, Me<sub>2</sub>CO, and MeOH) were used as the mobile phase. This procedure afforded 30 eluates that were monitored by TLC and combined into eight fractions. The fractions were analyzed by NMR spectroscopy, and those eluates rich in resin glycosides were labeled as F3 (3.6 g), eluted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>–Me<sub>2</sub>CO (1:1), and F4 (4.14 g), eluted with Me<sub>2</sub>CO–CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (4:1), were selected for their further purification. For this purpose, the following analytical conditions were established for the best resolution of both fractions using a C<sub>18</sub> column (4.6 × 250 mm, 5 μm; Waters Symmetry): mobile phase CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O (17:3), flow rate 0.4 mL/min. These parameters were extrapolated to the following preparative conditions: column C<sub>18</sub> (19 × 300 mm, 7 μm; Waters Symmetry), mobile phase CH<sub>3</sub>CN–H<sub>2</sub>O (17:3), flow rate 8.0 mL/min; sample injection volume 500 μL (50 mg/500 μL in MeOH). Column overloading was performed to increase the capacity for peak detection and for the preparative-scale recycling work by minimizing band broadening due to sample diffusion. Recycling procedures of the main peaks of fraction F3 afforded compound 1 (*t*<sub>R</sub> = 20.9 min), and fraction F4 afforded compounds 2 (*t*<sub>R</sub> = 26.8 min), 3 (*t*<sub>R</sub> = 14.6 min), 4 (*t*<sub>R</sub> = 21.2 min), and 5 (*t*<sub>R</sub> = 13.2 min).

**Hamiltonin I (1):** white solid; mp 110–112 °C; ORD (*c* 3.1, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>22</sup> –61.3, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> –63.5, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> –71.6, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> –117.4, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> –175.8; <sup>1</sup>H NMR (900 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (225 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 1263.8515 [M + MeOH + H]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>67</sub>H<sub>123</sub>O<sub>21</sub> requires 1263.8551,  $\delta$  = –2.8 ppm).

**Hamiltonioside I (2):** white solid; mp 123–125 °C; ORD (*c* 1.0, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>22</sup> –43.8, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> –47.5, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> –52.5, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> –85.0, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> –126.3; <sup>1</sup>H NMR (700 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (175 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 1237.6909 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>59</sub>H<sub>106</sub>O<sub>25</sub>Na requires 1237.6915,  $\delta$  = –0.5 ppm).

**Hamiltonioside II (3):** white solid; mp 105–107 °C; ORD (*c* 0.6, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>22</sup> –48.0, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> –51.0, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> –61.0, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> –87.0, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> –110.0; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Tables 1 and 2; HRESIMS *m/z* 1209.6550 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>57</sub>H<sub>102</sub>O<sub>25</sub>Na requires 1209.6602,  $\delta$  = –4.3 ppm).

**Batatinoside IX (4):** white solid; mp 118–120 °C; ORD (*c* 1.0, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>22</sup> –51.0, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> –54.0, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> –61.0, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> –99.0, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> –150.0; HRESIMS *m/z* 1205.6601 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>58</sub>H<sub>102</sub>O<sub>24</sub>Na requires 1205.6653; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Figures S24 and S27, Supporting Information. This compound was identified by comparison with literature data.<sup>7</sup>

**Batatinoside VI (5):** white amorphous solid; mp 140–142 °C; ORD (*c* 0.3, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>22</sup> –16.7, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> –20.0, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> –20.1, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> –30.0, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> –40.0; HRESIMS *m/z* 1177.6293 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd for C<sub>56</sub>H<sub>98</sub>O<sub>24</sub>Na requires 1177.6340; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Figures S32 and S36, Supporting Information. This compound was identified by comparison with literature data.<sup>7</sup>

**Alkaline Hydrolysis of Compounds.** Each compound (5 mg) was dissolved in 2.5 mL of 5% KOH. The mixture was refluxed at 95 °C for 3 h. The solutions were acidified to pH 5 with 1 N HCl and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 10 mL). The organic layer was washed with H<sub>2</sub>O, dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, and evaporated under reduced pressure. The residue from the organic phase was analyzed by GC-MS under the conditions described above. Compounds 2 and 4 afforded a peak with *t*<sub>R</sub> 9.1 min: *n*-dodecanoic acid [M]<sup>+</sup>• 200 (9), 183 (2), 171 (15), 157 (38), 143 (9), 129 (45), 115 (22), 101 (15), 85 (30), 73 (100), 60 (68), 57 (30), 55 (30). Compounds 3 and 5 afforded a peak with *t*<sub>R</sub> 7.4 min: *n*-decanoic acid [M]<sup>+</sup>• 172 (5), 155

(1), 143 (8), 129 (50), 115 (12), 112 (8), 87 (16), 73 (100), 60 (90), 57 (32), 55 (30). These conditions allowed two peaks to be identified for compound 1 with *t*<sub>R</sub> 7.4 min [*n*-decanoic acid [M]<sup>+</sup>• 172 (5), 155 (1), 143 (8), 129 (50), 115 (12), 112 (8), 87 (16), 73 (100), 60 (90), 57 (32), 55 (30)] and *n*-hexadecanoic acid (*t*<sub>R</sub> 10.42 min) [[M]<sup>+</sup>• 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)].

The aqueous layers from the saponification of compounds 1–5 were extracted individually with *n*-BuOH (3 × 50 mL) and concentrated to give a pale yellowish solid. The pentasaccharides hamiltoniosides I and II (2 and 3) afforded operculinic acid A (6: 172–175 °C and [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>22</sup> –60.3),<sup>17</sup> which was further acetylated (Ac<sub>2</sub>O–C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>N, 2:1) to give a residue that corresponded to a peracetylated derivative (8). In turn, the aqueous phase from the saponification of hamiltonin I (1) afforded operculinic acid C (7).

**Operculinic acid C (7):** white amorphous solid; mp 118–120 °C; ORD (*c* 0.2, MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub><sup>22</sup> –48.3, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> –50.4, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> –57.4, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> –93.9, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> –142.2; <sup>1</sup>H NMR (900 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta$ <sub>H</sub> 4.75 (1H, d, *J* = 7.7 Hz, Fuc-1), 4.49 (1H, dd, *J* = 9.4, 7.7 Hz, Fuc-2), 4.14 (1H, d, *J* = 9.4, 3.1 Hz, Fuc-3), 3.94 (1H, d, *J* = 3.56 Hz, Fuc-4), 3.77 (1H, d, *J* = 6.8 Hz, Fuc-5), 1.50 (3H, d, *J* = 6.3 Hz, Fuc-6), 6.29 (1H, d, *J* = 1.2 Hz, Rha-1), 4.66 (1H, dd, *J* = 2.9, 1.2 Hz, Rha-2), 4.61 (1H, dd, *J* = 9.0, 3.9 Hz, Rha-3), 4.27 (1H, dd, *J* = 9.0, 9.0 Hz, Rha-4), 4.86 (1H, dq, *J* = 9.0, 5.8 Hz, Rha-5), 1.57 (3H, d, *J* = 5.8 Hz, Rha-6), 6.21 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, Rha'-1), 4.77 (1H, dd, *J* = 3.4, 1.5 Hz, Rha'-2), 4.53 (1H, dd, *J* = 9.0, 3.0 Hz, Rha'-3), 4.42 (1H, dd, *J* = 9.1, 9.1 Hz, Rha'-4), 4.33 (1H, dq, *J* = 9.1, 6.1 Hz, Rha-5), 1.58 (3H, d, *J* = 6.1 Hz, Rha'-6), 6.23 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, Rha''-1), 4.81 (1H, dd, *J* = 3.1, 1.5 Hz, Rha''-2), 4.45 (1H, dd, *J* = 9.0, 2.9 Hz, Rha''-3), 4.22 (1H, dd, *J* = 9.0, 9.0 Hz, Rha''-4), 4.32 (1H, dq, *J* = 9.0, 6.0 Hz, Rha''-5), 1.51 (3H, d, *J* = 6.0 Hz, Rha''-6), 2.50 (2H, t, *J* = 7.3 Hz, Agl-2), 3.93 (1H, m, Agl-11), 0.92 (3H, t, *J* = 7.1 Hz, Agl-16); <sup>13</sup>C NMR (225 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N)  $\delta$ <sub>C</sub> 101.4 (CH, Fuc-1), 75.1 (CH, Fuc-2), 76.6 (CH, Fuc-3), 73.3 (CH, Fuc-4), 70.9 (CH, Fuc-5), 16.6 (CH<sub>3</sub>, Fuc-6), 101.4 (CH, Rha-1), 72.6 (CH, Rha-2), 73.2 (CH, Rha-3), 80.5 (CH, Rha-4), 67.1 (CH, Rha-5), 18.2 (CH<sub>3</sub>, Rha-6), 103.8 (CH, Rha'-1), 77.9 (CH, Rha'-2), 73.2 (CH, Rha'-3), 79.3 (CH, Rha'-4), 68.3 (CH, Rha'-5), 18.2 (CH<sub>3</sub>, Rha'-6), 103.8 (CH, Rha''-1), 72.5 (CH, Rha''-2), 72.6 (CH, Rha''-3), 73.8 (CH, Rha''-4), 70.1 (CH, Rha''-5), 16.6 (CH<sub>3</sub>, Rha''-6), 175.7 (CO, Agl-1), 35.4 (CH<sub>2</sub>, Agl-2), 78.1 (CH, Agl-11) (Figure S39, Supporting Information); HRESIMS *m/z* 855.4606 [M – H]<sup>–</sup> (calcd for C<sub>40</sub>H<sub>71</sub>O<sub>19</sub> requires 855.4595,  $\delta$  1.3 ppm (Figure S38, Supporting Information).

**Acetylated Operculinic Acid A (8):** white amorphous solid; mp 105–109 °C; ORD (*c* 0.09 MeOH) [ $\alpha$ ]<sub>589</sub> –22.2, [ $\alpha$ ]<sub>578</sub> –22.2, [ $\alpha$ ]<sub>546</sub> –26.7, [ $\alpha$ ]<sub>436</sub> –42.2, [ $\alpha$ ]<sub>365</sub> –61.1; positive HRESIMS *m/z* 1545.6392 [M + Na]<sup>+</sup> (calcd C<sub>70</sub>H<sub>106</sub>O<sub>36</sub>Na 1545.6356,  $\delta$  2.4 ppm), *m/z* 1581.66582 [M + Na + 2 H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup> (Figure S43, Supporting Information). <sup>1</sup>H and <sup>13</sup>C NMR (Figures S44 and S45, Supporting Information). This compound was identified by comparison with an authentic sample and literature data.<sup>5</sup>

**Acid Hydrolysis and Sugar Analysis.** A sample of each saponified resin glycoside 1–5 (2.5 mg) in 4 N HCl (10 mL) was heated at 90 °C for 2 h. The reaction mixture was diluted with H<sub>2</sub>O (5 mL) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 5 mL). The aqueous phase was neutralized with 1 N KOH and extracted with *n*-BuOH (2.5 mL), then washed with H<sub>2</sub>O (2 × 2.5 mL) and concentrated. The sugar residues (4.8 mg each) were reacted with L-cysteine hydrochloride (0.5 mg) in pyridine (150 μL) at 60 °C for 1 h. Then, the thiazolidine products were converted into volatile derivatives by treatment with chlorotrimethylsilane (0.5 mL, Sigma Sil-A). The reaction mixtures were dried individually, dissolved in CHCl<sub>3</sub> (100 μL), filtered, and then analyzed (injection volume: 1 μL) by GC: HPMS-5 (20 m × 0.18 mm, film thickness 0.18 μm); injector temperature 300 °C; oven temperature 100 °C isothermal for 3 min, linear gradient to 300 °C at 20 °C/min; carrier gas, He (1 mL/min). Retention times for TMS derivatives of common sugars were used for identification by coelution experiments: L-rhamnose (Rha), *t*<sub>R</sub> 11.10 min; D-fucose (Fuc), *t*<sub>R</sub> 11.60 min; D-glucose (Glc), *t*<sub>R</sub> 11.73 min; L-glucose, *t*<sub>R</sub> 14.85



min was used as a control sample. This analysis led to the identification of Rha, Fuc, and Glc (3:1:1) from the pentasaccharides (2–5) and from the tetrasaccharide (1) Rha and Fuc (3:1).

**Identification of Aglycones.** The organic layer residues obtained from the acidic hydrolysis of all the saponified resin glycosides were evaporated to dryness, dissolved in  $\text{CHCl}_3$  (5 mL), and treated with  $\text{CH}_2\text{N}_2$  to give a residue. All products were combined and separated by recycling HPLC using a previously reported methodology.<sup>5</sup> Each mixture (10 mg) was submitted to normal-phase HPLC (Isco, 21.2 × 250 mm, 10  $\mu\text{m}$ ), using an isocratic elution of *n*-hexane– $\text{CHCl}_3$ – $\text{Me}_2\text{CO}$  (6:3:1) and a flow rate of 6 mL/min to give methyl (11S)-hydroxyhexadecanoate ( $t_{\text{R}}$  16.8 min; 8.2 mg).

(11S)-Hydroxyhexadecanoic acid methyl ester: mp 42–43 °C;  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} +7.0$  (*c* 0.1,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H NMR}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta_{\text{H}}$  3.67 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.59 (1H, m, H-11), 2.30 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 1.62 (2H, m, H-3), 1.49–1.37 (8H, m), 1.28 (10H, m), 0.89 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-16);  $^{13}\text{C NMR}$   $\delta_{\text{C}}$  174.4 (C-1), 72.0 (C-11), 51.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 37.5 (C-10), 37.4 (C-12), 34.1 (C-2), 31.9 (C-14), 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (C-4 to C-8), 25.6 (C-9), 25.3 (C-13), 24.9 (C-3), 22.6 (C-15), 14.1 (C-16); LRESIMS (positive mode)  $m/z$  309  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 287  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 269  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ . This aglycone (1 mg) was derivatized by treatment with Sigma Sil-A for 5 min at 70 °C and analyzed by GC-MS to afford a peak with  $t_{\text{R}}$  14.3 min; EIMS (70 eV)  $m/z$  (rel int) 358 (0.3)  $[\text{M}]^{+}$ , 343 (0.5)  $[\text{M} - 15]^+$ , 311 (10.5), 287 (45,  $[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{TMS}]^+$ ), 173 (100,  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{OTMS}]^+$ ), 75 (38.2), 73 (46.3). The identification of this derivative was accomplished by comparison with an authentic sample.<sup>5</sup>

**Cytotoxicity Determination and Combination Testing with Vinblastine.** Human colorectal (HCT-116 ATCC CCL-247), cervical carcinoma (Hela ATCC CCL-2), and breast cancer (MCF-7 ATCC HTB-22) cell lines were obtained from the American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) and maintained according to ATCC's recommendations at 37 °C and 5%  $\text{CO}_2$  in an appropriate medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin G, and 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  streptomycin. The MDR MCF-7/Vin cell line was developed through continuous exposure to vinblastine during three consecutive years and maintained for a decade.<sup>13a</sup> All cancer cells were maintained in the logarithmic growth phase. The medium was changed every 2 days and trypsinized (0.25% trypsin-EDTA). A total of 200  $\mu\text{L}$  of HeLa (5000 cells/well), HT-29 cells (7500 cells/well), or MCF-7 cells (5000 cells/well) were seeded in 96-well plates and allowed to adhere overnight before test compound exposure. After 24 h, the cell culture medium was replaced with 200  $\mu\text{L}$  of drug-containing medium with the appropriate drug formulation: solution at the appropriate test compound concentration (30, 25, 20, 15, 10, 5, and 1 mM) and vinblastine at sublethal concentrations of 0.003 and 0.0001 mM.<sup>24</sup> For the MCF-7/Vin cell line, vinblastine was tested at 0.4  $\mu\text{M}$ . Cells were exposed to test compounds for 48 h, followed each by an SRB assay.<sup>22</sup> Results are expressed as the concentration that inhibited 50% control growth after the incubation period ( $\text{IC}_{50}$ ). The values were estimated from a semilog plot of the drug concentration ( $\mu\text{M}$ ) against the percentage of growth inhibition. Vinblastine and colchicine were included as positive-control compounds. After each treatment, cell morphology was assessed on an Iroscope SI-PH series 450 inverted microscope.

## ■ ASSOCIATED CONTENT

### Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.2c00594>.

Photographs for plant material and phytopharmaceuticals; TLC analysis for the fractionation of total extract; recycling HPLC-IR profile for the purification of compound 1; spectroscopic data of compounds 1–5 in addition to compounds 7 and 8 (PDF)

## ■ AUTHOR INFORMATION

### Corresponding Author

Rogelio Pereda-Miranda – Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico; [orcid.org/0000-0002-0542-0085](https://orcid.org/0000-0002-0542-0085); Email: [pereda@unam.mx](mailto:pereda@unam.mx)

### Authors

Armando Moreno-Velasco – Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico  
Pedro de Jesús Flores-Tafoya – Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico  
Mabel Frago-so-Serrano – Departamento de Farmacia, Facultad de Química and Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico  
Suzana Guimarães Leitão – Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; [orcid.org/0000-0001-7445-074X](https://orcid.org/0000-0001-7445-074X)

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.jnatprod.2c00594>

### Author Contributions

This article was taken in part from the Ph.D. thesis of Armando Moreno-Velasco and the M.Sc. thesis of Pedro de Jesús Flores-Tafoya in the Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas, UNAM.

### Notes

The authors declare no competing financial interest.

## ■ ACKNOWLEDGMENTS

Financial support was provided by the Dirección General de Asuntos del Personal Académico, (UNAM), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (314591/2021-4 and E-26/201.003/2021, Brazil). We are indebted to the technical personnel of Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, Facultad de Química (UNAM), especially to N. López Balbiaux and R. I. del Villar Morales for the recording of the 400 MHz NMR spectra. This study made use of the 900 and 700 MHz NMR instrument at the National Center for Nuclear Magnetic Resonance of Macromolecules (CNRMN Jiri Jonas, UFRJ).

## ■ REFERENCES

- (1) Staples, G. W.; Simões, A. R.; Austin, D. F. *Ann. Missouri Bot. Gard* **2020**, *105*, 64–138.
- (2) Lira-Ricárdez, J.; Pereda-Miranda, R.; Castañeda-Gómez, J.; Frago-so-Serrano, M.; Simas, R. C.; Leitão, S. G. *J. Nat. Prod* **2019**, *82*, 1664–1677.
- (3) (a) Ahmad, T.; Husain, M. K.; Tariq, M.; Siddiqui, J. I.; Khalid, M.; Ahmed, M. W.; Kazmi, M. H. *J. Pharmacog. Phytochem.* **2017**, *6*, 23–26. (b) Akbar, S. In *Handbook of 200 Medicinal Plants*; Springer: Cham, Switzerland, 2020; pp 359–1363.
- (4) (a) Pereda-Miranda, R.; Frago-so-Serrano, M.; Escalante-Sánchez, E.; Hernández-Carlos, B.; Linares, E.; Bye, R. *J. Nat. Prod*

- 2006, 69, 1460–1466. (b) Castañeda-Gómez, J.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2011**, 74, 1148–1153.
- (5) Montiel-Ayala, M. E.; Jiménez-Bárceñas, N. R.; Castañeda-Gómez, J.; Moreno-Velasco, A.; Lira-Ricárdez, J.; Fragoso-Serrano, M.; Leitão, S. G.; Pereda-Miranda, R. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2021**, 31, 698–708.
- (6) Pereda-Miranda, R.; Rosas-Ramírez, D.; Castañeda-Gómez, J. In *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*; Kinghorn, A. D., Falk, H., Kobayashi, J., Eds.; Springer-Verlag: New York, 2010; Vol. 92, Chapter 2, pp 77–152.
- (7) Castañeda-Gómez, J.; Llavias-Hernández, P.; Fragoso-Serrano, M.; Lorence, A.; Pereda-Miranda, R. *Phytochem. Lett.* **2019**, 32, 77–82.
- (8) Luu, V. T.; Weinhold, A.; Ullah, C.; Dressel, S.; Schoettner, M.; Gase, K.; Gaquerel, E.; Xu, S.; Baldwin, I. T. *Plant Physiol.* **2017**, 174, 370–386.
- (9) Leckie, B. M.; D'Ambrosio, D. A.; Chappell, T. M.; Halitschke, R.; De Jong, D. M.; Kessler, A.; Kennedy, G. G.; Mutschler, M. A. *PLoS One* **2016**, 11, No. e0153345.
- (10) Lotina-Hennsen, B.; King-Díaz, B.; Pereda-Miranda, R. *Molecules* **2013**, 18, 778–788.
- (11) Moghe, G. D.; Leong, B. J.; Hurney, S. M.; Jones, A. D.; Last, R. L. *eLife* **2017**, 6, No. e28468.
- (12) (a) Pereda-Miranda, R.; Kaatz, G. W.; Gibbons, S. J. *Nat. Prod.* **2006**, 69, 406–409. (b) Corona-Castañeda, B.; Pereda-Miranda, R. *Planta Med.* **2012**, 78, 128–131.
- (13) (a) Figueroa-González, G.; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2012**, 75, 93–97. (b) Castañeda-Gómez, J.; Figueroa-González, G.; Jacobo, N.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2013**, 76, 64–71. (c) Sarau, N.; Imeri, D.; Quiros-Guerrero, L.; Karimou, S.; Christen, P.; Cuendet, M. *J. Nat. Prod.* **2022**, 85, 56–62.
- (14) Lira-Ricárdez, J.; Pereda-Miranda, R. *Phytochem. Rev.* **2020**, 19, 1211–1229.
- (15) Castañeda-Gómez, J.; Rosas-Ramírez, D.; Cruz-Morales, S.; Fragoso-Serrano, M.; Pereda-Miranda, R. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2017**, 27, 434–439.
- (16) Pereda-Miranda, R.; Hernández-Carlos, B. *Tetrahedron* **2002**, 58, 3145–3154.
- (17) (a) Ono, M.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1989**, 37, 3209–3213. (b) Rosas-Ramírez, D.; Pereda-Miranda, R. *J. Agric. Food Chem.* **2013**, 61, 9488–9494. (c) Escalante-Sánchez, E.; Rosas-Ramírez, D.; Linares, E.; Bye, R.; Pereda-Miranda, R. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, 56, 9423–9428.
- (18) Ding, W.; Jiang, Z. H.; Wu, P.; Xu, L.; Wei, X. *Phytochemistry* **2012**, 81, 165–174.
- (19) (a) Chérigo, L.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2006**, 69, 595–599. (b) Ono, M. *J. Nat. Med.* **2017**, 71, 591–604.
- (20) Escobedo-Martínez, C.; Pereda-Miranda, R. *J. Nat. Prod.* **2007**, 70, 974–978.
- (21) (a) Gross, J. H. *Mass Spectrometry. A Textbook*; Springer Nature: Cham, Switzerland, 2017; p 767. (b) Demarque, D. P.; Crotti, A. E.; Vessecchi, R.; Lopes, J. L.; Lopes, N. P. *Nat. Prod. Rep.* **2016**, 33, 432–455.
- (22) Lie Ken Jie, M. S. F.; Mustafa, J. *Lipids* **1997**, 32, 1019–1034.
- (23) Rosas-Ramírez, D.; Escalante-Sánchez, E.; Pereda-Miranda, R. *Phytochemistry* **2011**, 72, 773–780.
- (24) Ono, M.; Fujimoto, K.; Kawata, M.; Fukunaga, T.; Kawasaki, T.; Miyahara, K. *Chem. Pharm. Bull.* **1992**, 40, 1400–1403.
- (25) (a) Vichai, V.; Kirtikara, K. *Nat. Protoc.* **2006**, 1, 1112–1116. (b) Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J. T.; Bokesch, H.; Kenney, S.; Boyd, M. R. *J. Natl. Cancer Inst.* **1990**, 82, 1107–1112.
- (26) Sura, M. B.; Ponnappalli, M. G.; Annam, S. C.; Bobbili, V. P. *J. Nat. Prod.* **2019**, 82, 1292–1300.
- (27) (a) Duarte, D.; Vale, N. *Biomolecules* **2020**, 10, 1623. (b) Duarte, D.; Cardoso, A.; Vale, N. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, 22, 7408. (28) Govindarajan, M. *Eur. J. Med. Chem.* **2018**, 143, 1208–1253. (29) (a) Devi, A.; Dwibedi, V.; Khan, Z. A. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2021**, 31, 387–407. (b) Anand, S.; Bharadvaja, N. *Rev. Bras. Farmacogn.* **2022**, 32, 211–220. (30) (a) Cao, S.; Norris, A.; Wisse, J. H.; Miller, J. S.; Evans, R.; Kingston, D. G. *Nat. Prod. Res.* **2007**, 21, 872–876. (b) Nagano, T.; Pospíšil, J.; Chollet, G.; Schulthoff, S.; Hickmann, V.; Moulin, E.; Herrmann, J.; Müller, R.; Fürstner, A. *Chem.—Eur. J.* **2009**, 28, 9697–9706. (c) Zong, G.; Aljewari, H.; Hu, Z.; Shi, W. Q. *Org. Lett.* **2016**, 18, 1674–1677. (31) Zong, G.; Hu, Z.; O'keefe, S.; Tranter, D.; Iannotti, M. J.; Baron, L.; Hall, B.; Corfield, K.; Paatero, A. O.; Henderson, M. J.; Roboti, P.; et al. *J. Am. Chem. Soc.* **2019**, 141, 8450–8461. (32) Fan, B. Y.; Jiang, X.; Li, Y. X.; Wang, W. L.; Yang, M.; Li, J. L.; Wang, A. D.; Chen, G. T. *Med. Res. Rev.* **2022**, 1–42.