



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**AISLAMIENTO POR HPLC Y ELUCIDACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS ÁCIDOS
GLICOSÍDICOS CONSTITUTIVOS DE LA RESINA COMERCIAL CONOCIDA COMO
ESCAMONEA, UN REMEDIO PURGANTE.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:

PEDRO SERRATO ARAOZ



MÉXICO, D.F.

2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor: MARIA ISABEL AGUILAR LAURENTS**
VOCAL: **Profesor: RACHEL MATA ESSAYAG**
SECRETARIO: **Profesor: ROGELIO GREGORIO PERADA MIRANDA**
1er. SUPLENTE: **Profesor: ISABEL DEL CARMEN RIVERO CRUZ**
2° SUPLENTE: **Profesor: MARIO ALBERTO FIGUEROA SALDIVAR**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO 123, DEPARTAMENTO DE FARMACIA, FACULTAD DE QUÍMICA

ASESOR DEL TEMA: _____

DR. ROGELIO PEREDA MIRANDA

SUPERVISOR TÉCNICO: _____

DR. FRANCISCO ELIHÚ BAUTISTA REDONDA

SUSTENTANTE: _____

PEDRO SERRATO ARAOZ

Agradecimientos

Agradezco el apoyo brindado a las siguientes instituciones y personas:

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN212813) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (proyecto 220535) por el financiamiento parcial de la investigación. Al Sistema Nacional de Investigadores por la beca concedida.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda por haberme abierto las puertas de su laboratorio, por su gran paciencia y su guía.

Al Dr. Elihú Bautista Redonda por haberme asesorado y apoyado durante todo el proyecto.

A la Dra. Mabel Fragosó Serrano por brindarme su tiempo y apoyo.

A Dr. Mario Alberto Figueroa Saldivar, por los análisis de Electrospray que hicieron posible los resultados.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) y su personal técnico, por el registro de los distintos espectros de RMN y masas.

Miembros del jurado, por sus correcciones y observaciones que permitieron la modificación y rectificación este texto

A la Facultad de Química, por contar con excelentes servicios e instalaciones, y gracias por brindarme una gran formación profesional.

A la prestigiosa Universidad Nacional Autónoma de México, por todos y cada uno de los años que me recibió. Por cada cosa que aprendí y que viví en la más grande institución educativa del país.

A todos mis compañeros de laboratorio, que estaban ahí para brindarme apoyo, guía, enseñanzas, pero sobre todo por los buenos momentos.

Dedicatorias

A mis padres, quienes han cumplido su compromiso más allá del deber.

A mi hermano Abraham quien siempre estuvo ahí para mí, ya sea como compañero de juegos o como apoyo moral en este y todos los eventos de mi vida.

A mis compañeros de la Facultad, quienes hicieron mi formación educativa el mejor proceso por el cual he pasado. En especial a Alejandro Martínez Lorenzo quien siempre me ayudó y nunca dudó que este día llegaría.

A mis amigos de toda la vida, como Omar Giordano García Ortega quien me ha acompañado desde los 12 años en todas mis aventuras.

Y a toda mi familia que me quiere y que me han enseñado que en este mundo todo el mundo necesita una familia.

INDICE

	Página
I. Lista de tablas y cuadros.	VI
II. Lista de figuras.	VII
III. Lista de abreviaturas.	VIII
1. Introducción.	1
2. Antecedentes.	4
2.1 Resinas Glicosídicas de la familia de las convolvuláceas	4
2.2 Antecedentes botánicos y descubrimiento	5
2.3 Diversidad Estructural	7
2.3.1 Composición química	7
2.4 <i>Ipomoea purga</i>	9
2.5 Diversidad estructural de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa (<i>Ipomoea purga</i>)	9
2.6 Resinas glicosídicas de <i>Ipomoea orizabensis</i>	11
2.7 Perfiles espectroscópicos del contenido de resinas glicosídicas	14
3. Justificación.	15
4. Objetivos.	15
5. Parte Experimental.	16
5.1 Procedimientos generales	16
5.1.1 Material vegetal	16
5.1.2 Preparación de los extractos orgánicos	16
5.2 Preparación de los derivados	16
5.2.1 Hidrólisis alcalina (saponificación)	16

5.2.2 Reacción de alquilación con diazometano	17
5.2.2.1 Generación del reactivo	17
5.2.3 Reacción de alquilación	17
5.2.4 Reacción de acetilación	17
5.3 Cromatografía líquida de alta resolución	17
5.3.1 Instrumentación	17
5.4 Procedimiento de preparación de la muestra problema	18
5.4.1 Cromatografía de líquidos a nivel analítico	18
5.4.2 Separación de los ácidos glicosídicos alquilados mediante HPLC	18
5.4.3 Cromatografía de líquidos a nivel preparativo	21
5.4.4 Purificación	22
5.5 Determinación de los espectros de RMN y EM.	22
5.6 Segunda Hidrólisis alcalina (2ª Saponificación)	22
6. Resultados y Discusión.	23
6.1 Análisis del extracto metanólico mediante HPLC	23
6.2 Fraccionamiento de la Fracción primaria V	24
6.3 Caracterización de los ácidos glicosídicos	26
6.3.1. Elucidación estructural del compuesto con clave IOEMBFNMA5	28
6.3.2. Espectrometría de masas	33
7. Conclusiones.	36
8. Bibliografía.	37

I. Lista de tablas y cuadros

Cuadro 1.	Condiciones cromatográficas del extracto crudo (frasco A)	19
Cuadro 2.	Condiciones cromatográficos después de la saponificación (IOEMBNM) y metilación (IOEMBM).	20
Cuadro 3.	Condiciones cromatográficas después de la saponificación (IOEMBNM), metilación (IOEMBM) y acetilación (IOEMBFA).	20
Cuadro 4.	Condiciones cromatográficas después de tomar muestra nueva y repetir la saponificación, metilación y acetilación.	21
Cuadro 5.	Se presentan las condiciones cromatográficas después de tomar muestra nueva y repetir la saponificación y acetilación (IOEMBFNMA).	22
Cuadro 6.	Rendimiento y puntos de fusión	26
Cuadro 7.	Desplazamiento químico (RMN ^1H y ^{13}C) para las señales anoméricas y los metilos de las pentosas.	29
Cuadro 8.	Asignación de señales de ^1H y ^{13}C NMR para el compuesto IOEMBFNMA5	30

II. Lista de figuras.

Figura 1.	Fotografía de <i>Packera candidissima</i> , <i>P. bellidifolia</i> , y sus presentaciones comerciales.	2
Figura 2.	Scamonia: (<i>Convolvulus scammonia</i> ; <i>Juliana Anicia</i> Codex, Viena, Biblioteca Nacional de Austria, Cod. Med. Gr. I, fol. 331v)	4
Figura 3.	Estructura de las resinas glicosídicas de <i>Exogonium purga</i> Benth. de acuerdo con Mannich y Schuman (1938).	7
Figura 4.	Estructuras químicas de los ácidos púrgicos A y B.	10
Figura 5.	Estructura química del jalapínosido.	11
Figura 6.	<i>Ipomoea orizabensis</i> .	12
Figura 7.	Principales resinas de <i>Ipomoea orizabensis</i> .	13
Figura 8.	Expansión de la región entre 90-110 ppm en el espectro de RMN ¹³ C de los extractos saponificados de las raíces de jalapa.	14
Figura 9.	Cromatograma a nivel analítico.	24
Figura 10.	Cromatograma a nivel preparativo.	25
Figura 11.	Espectros de RMN ¹ H (400 MHz, piridina-d ₅) para el derivado metilado peracetilado de los ácidos púrgico A y púrgico B.	28
Figura 12.	Espectro de RMN ¹ H del ácido púrgico D.	31
Figura 13.	Espectro de RMN ¹³ C del ácido púrgico D.	31
Figura 14.	Expansión de las señales correspondientes a los carbonos anoméricos del espectro de RMN ¹³ C en 98-105ppm.	32
Figura 15.	Patrón de fragmentación observado para el ácido púrgico D.	34
Figura 16.	Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) del ácido púrgico D.	34
Figura 17.	Estructura del ácido púrgico D	35

III. Lista de abreviaturas.

Abreviatura	significado
ACN	Acetonitrilo
cm	centímetro.
CH ₃ CN:	Acetonitrilo
COSY:	Correlation Spectroscopy
C:	grados centígrados
δ:	desplazamiento químico
d:	señal doble.
dd:	señal doble de dobles.
Dodeca	ácido Dodecanóico
dq:	señal doble de cuádruples.
EM:	espectrometría de masas.
ESI:	electrospray de masas
Fuc:	fucosa.
g:	gramo.
Gluc:	glucosa.
Gluc':	segunda unidad de glucosa.
HCl	ácido clorhídrico.

H ₂ O:	agua
Hz:	Hertzios.
iba	ácido isobutírico
IR:	índice de refracción.
<i>J</i> :	constante de acoplamiento.
Kg:	Kilogramo.
KOH	hidróxido de potasio
Ipur	ácido ipurólico
<i>m/z</i> :	relación masa carga.
m:	multiplete.
mba	ácido metil butírico
mg:	miligramo.
M:	masa
Mhz:	megahertzios.
mL:	mililitro.
N ₂ :	nitrógeno
N:	concentración Normal.
NaOH	hidróxido de sodio
nla	ácido nilicoesz
pf	punto de fusión.
ppm	partes por millón.
Qui:	quinovosa.

Qui':	segunda unidad de quinovosa.
Qui'':	tercera unidad de quinovosa.
Ram:	ramnosa.
RIU	Refractive Index Unit
RMN ¹³ C:	resonancia magnética nuclear de carbono 13.
RMN ¹ H:	resonancia magnética nuclear protónica
s:	señal simple
t:	triplete
t _R :	tiempo de retención
tga	ácido tiglico
μL:	microlitro
μm:	micrómetro

1. Introducción

En México, se tienen registradas unas cuatro mil especies de plantas medicinales, de las cuales sólo aproximadamente 250 están legitimadas desde el punto de vista farmacológico y clínico (Estrada Lugo, 2009) y son usadas con propósitos nutricionales, medicinales, rituales y económicos desde épocas inmemoriales. La efectividad de muchas de estas plantas medicinales ha resistido la prueba transcultural de franquear la aceptación de sociedades con diferentes conceptos etnomédicos y tradiciones. Las plantas medicinales de Mesoamérica y Europa, así como aquellas procedentes de fuentes no occidentales procesadas a través de los primeros contactos europeos, continúan siendo usadas en el México moderno, tanto en el ámbito rural como en las comunidades urbanas y presentes en todos los niveles socioeconómicos y educativos (Pereda-Miranda, 1995). Desde el punto de vista económico, en el Mercado de Sonora en la Ciudad de México se venden día con día aproximadamente unas 10 toneladas de plantas curativas. Se estima que la industria herbolaria del D.F. procesa y comercializa unas 2,000 toneladas mensuales. Si consideramos los demás mercados de todas las capitales, los mercados regionales, y las empresas naturistas de provincia, se calcula que al menos se comercializan 3,500 toneladas de plantas medicinales al mes en todo el país. Además, socioeconómicamente, la herbolaria le da empleo a varios miles de familias campesinas, rurales y urbanas; aunque por ahora es muy difícil calcular los números exactos, ya que la mayoría del comercio es informal. (Estrada Lugo, 2009). En efecto, la disponibilidad de plantas medicinales prehispánicas específicas en los mercados de barrio aún ubicuos, tales como los llamados *tianguis* (Nahuatl *tianquitzli*, mercado), muchos en el mismo sitio desde siglos antes de la llegada de los españoles al nuevo mundo, constituye una rica fuente de información etnomédica para la selección efectiva de plantas a ser documentadas y evaluadas por enfoques científicos modernos, debido a que la mayoría de ellas, no han sido estudiadas sistemáticamente (Pereda-Miranda, 1995).

La fitofarmacología moderna y la medicina herbolaria ya no aceptan sin cuestionamientos el supuesto conocimiento empírico que conlleva el manejo tradicional de hierbas con propósitos terapéuticos, pero en vez de eso, se preocupan por establecer una base científica que pueda proporcionar un entendimiento confiable del material herbolario y de sus componentes activos y efectos terapéuticos. La información etnomédica y farmacológica recopilada se aplica para elaborar guías de control de calidad para las drogas crudas, así como para el desarrollo de procedimientos analíticos para estandarizar las dosis de los remedios fitofarmacéuticos, las cuales serán de gran ayuda en programas de asistencia sanitaria en países en desarrollo (Fabricant y Farnsworth, 2001). Parte de estos estudios han permitido distinguir entre fitofármacos terapéuticos y aquellos potencialmente peligrosos, para seleccionar sólo aquellos fitomedicamentos que son

seguros y efectivos sin efectos secundarios dañinos (Bah et al., 1994). Un ejemplo de esta situación son las preparaciones comerciales del té milagro, un complejo de dos plantas medicinales, *Packera candidissima* y *P. bellidifolia* (Asteraceae), que se utilizan desde la época prehispánica para el tratamiento de problemas del hígado (bilis), las úlceras genitales, las heridas y las llagas de la piel. Análisis cromatográficos (HPLC y CG-MS) demostraron un alto contenido de alcaloides pirrolizidínicos (0.0005-0.94 %) que alcanza niveles tóxicos de hepatotoxicidad en las diferentes preparaciones comerciales que incluyen hojas y flores secas, extractos alcohólicos, cremas y jarabes (Fragoso-Serrano et al., 2012)(Figura 1).



Figura 1. Fotografía de *Packera candidissima*, *P. bellidifolia*, y sus presentaciones comerciales. A) Plantas de *Packera candidissima* en el bosque de Creel, Chihuahua. B) Planta recolectada. C) Plantas de “chucaca” y “lechuguilla” secas de venta en Mercado la Reforma, Chihuahua. D) Productos “Té Milagro”. E) Hierba medicinal: hojas y tallos selectos y secos sin raíces del “calancapatle”, *P. bellidifolia*.

Alguna vez considerados informales e ilegales por la comunidad científica, los remedios tradicionales de origen vegetal han ganado aceptación recientemente a través de su probada eficacia y se han convertido en un recurso importante en el tercer mundo, la denominada fitoterapia de uso racional (Bodeker, 2004). Algunos países como México, China e India, con una gran tradición en el uso de plantas medicinales, ahora pueden ostentar con orgullo la reivindicación de su conocimiento celosamente preservado y el cual servirá a la ciencia moderna en su acercamiento a la investigación de nuevas fuentes de plantas para el aislamiento de productos naturales biodinámicos (Pereda-Miranda y Bah, 2003; Chung Leung, 2004). Un ejemplo importante del desarrollo de fitofármacos basados en la medicina tradicional son los ginkgólidos, trilactonas diterpénicas altamente oxidadas, que son los principios activos de *Ginkgo biloba* (*Ginkgoaceae*), un árbol nativo de China que en la actualidad se cultiva en Korea, Francia y los Estados Unidos con fines medicinales. Los extractos estandarizados de las hojas de esta planta se comercializan para el tratamiento de las enfermedades vasculares cerebrales y la demencia senil. *Ginkgo* se puede combinar con ginseg (*Panax ginseng*; *Araliaceae*) para el tratamiento de los desórdenes geriátricos y cuyos principios bioactivos, denominados como ginsenósidos, son saponinas triterpénicas con un esqueleto de damarano (Cho, 2012).

2. Antecedentes

2.1 Resinas Glicosídicas de la familia de las convolvuláceas

Las resinas glicosídicas son parte de una extensa familia de metabolitos secundarios conocidos como glicolípidos (Langenheim, 2003), una clase de complejos metabolitos de origen mixto, únicos de la familia Convolvulaceae (Eich, 2008). Estos principios son responsables de la acción purgante de las raíces de convolvuláceas usadas en la medicina tradicional desde tiempos precristianos, e.g., *Convolvulus scammonia* o la escamonea, registrada por Dioscórides, un médico y botánico de la antigua Grecia, en su obra *De Materia Medica* (ca. 50-68 DC) que fue el principal manual de historia natural europea durante la Edad Media hasta el Renacimiento (Figura 2). Este manuscrito que describe cerca de 600 hierbas medicinales y remedios naturales conocidos en la antigüedad es el predecesor de los libros sobre hierbas (libros florísticos) o “herbarios” de uso entre los siglos XVI y XIX y del Recetario Florentino (1498), considerado la primera farmacopea (Puerto Sarmiento, 1993).



Figura 2. Scammonia: σκαμμονία (*Convolvulus scammonia*; Juliana Anicia Codex, Viena, Biblioteca Nacional de Austria, Cod. Med. Gr. I, fol. 331v). En la época medieval, se distribuyó *De Materia Medica* en latín, griego y árabe. En el Renacimiento, de 1478 en adelante, fue impreso en Italiano, alemán, español y francés. En 1655, John Goodyer hizo una traducción al inglés de una versión impresa no corregida del griego. Mientras se reproduce en forma de manuscrito iluminado a través de los siglos, el texto fue suplementado con frecuencia con comentarios y adiciones menores de fuentes árabes e hindús. Sobreviven varios manuscritos ilustrados de esta obra. El más famoso de éstos es el ricamente ilustrado “Viena Dioscórides” producido en Constantinopla en 512/513 DC.

Incluso, aunque las investigaciones fitoquímicas de los constituyentes de estas drogas fueron iniciadas durante la segunda mitad del siglo diecinueve, la estructura de sus principios activos permaneció desconocida para la mayoría de estas raíces medicinales (Pereda-Miranda & Bah, 2003). Durante las dos últimas décadas, la mejor capacidad de resolución en las técnicas analíticas para el aislamiento, en conjunto con métodos espectroscópicos más poderosos (resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas), ha facilitado la purificación de cantidades suficientes de estos principios para la elucidación de sus estructuras químicas (Pereda-Miranda et al., 2010).

2.2 Antecedentes botánicos y descubrimiento

El nombre botánico Convolvulaceae para esta familia de enredaderas conocidas en nuestro país como “campanitas” deriva del latín *convolvere*, que significa entrelazado, y describe el patrón de crecimiento de las plantas rastreras que se entrelazan alrededor de un soporte y que es característico de la mayoría de las especies trepadoras pertenecientes a esta familia. La característica anatómica más notable de esta familia es la presencia de células secretoras de resinas en los tejidos foliares y florales, así como en las semillas y el peridermo de las raíces tuberosas. El conocimiento etnofarmacológico de plantas que contienen resinas glicosídicas influenciaron fuertemente las investigaciones fitoquímicas tempranas y el descubrimiento de estos principios bioactivos. En Mesoamérica, remedios purgativos, conocidos por los aztecas como “*cacamotli tlanoquiloni*”, consistían en diversos tipos de raíces tuberosas, que variaban en sus características morfológicas, hábitat y potencia efectora. Investigaciones etnobotánicas recientes han identificado estas raíces como miembros pertenecientes al género *Ipomoea*. Los colonizadores españoles reconocieron las propiedades medicinales de estas enredaderas herbáceas perennes con raíces de sabor agrio y productoras de resinas con propiedades purgantes con las especies originarias del mediterráneo oriental y el oriente próximo que fueron importantes para la medicina galénica europea del siglo XVI (Huguet-Termes, 2001), (Worth Estes, 2000). Estas raíces purgativas mexicanas fueron rápidamente aceptadas como un remedio sucedáneo de la raíz de la escamonea (*Convolvulus scammonia*) del viejo mundo (Figura 2) y usada desde tiempos precristianos (Gunther, 1968). El efecto más leve de este nuevo fármaco, le ganó una rápida y amplia aceptación en Europa, tan buena como ser reconocida como una panacea (Frampton, 1925). La identificación precisa de esta raíz es todavía muy disputada, aunque en la actualidad se acepta que corresponde a *I. purga*. En reconocimiento a sus beneficios terapéuticos importantes, los colonizadores le otorgaron el nombre vulgar de “jalapa” a esta especie distintiva (“Jalapa officinal” o

“Rhizoma Jalapa”), porque la encontraron en abundancia en la región tropical de Xalapa, en el estado de Veracruz. El complejo de plantas medicinales conocido como la raíz de jalapa incluye: “jalapa hembra” u “officinal” (*I. purga*), “jalapa macho” (*I. orizabensis*) y “jalapa de tampico” (*I. simulans*) (Linares et al., 1994), aunque en la etnobotánica del neotrópico y en los ecosistemas de Indomalasia, muchas especies pertenecientes al género *Ipomoea*, *Merremia* y *Operculina* se emplean también como purgantes y depurativas (Eich, 2008).

El extracto activo catártico se prepara a partir de las raíces, las cuales son ricas en glicorresinas (10-18% del peso seco), y provoca movimientos peristálticos en el intestino delgado. Los productos farmacéuticos se comercializan en forma de extractos alcohólicos líquidos, la raíz o la resina en polvo se consumen individualmente o en combinación con otros ingredientes para modificar su efecto terapéutico (Pereda-Miranda et al., 2006).

En la década de 1980, la aplicación de la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) permitió, por primera vez, el aislamiento de cuatro constituyentes naturales puros provenientes de una mezcla de resinas glicosídicas. Fueron llamados colectivamente como las orizabinas a partir de la escamonea mexicana (*I. orizabensis*), su supuesta fuente (Noda et al., 1987). El uso de técnicas instrumentales modernas tal como la resonancia magnética nuclear de alto campo (NMR >300 MHz) y la espectrometría de masas de alta resolución, permitió la caracterización de la estructura de los compuestos anteriormente mencionados como macrolactonas individuales de un ácido glicosídico distintivo y, de esta forma, se replanteó de la hipótesis anteriormente sostenida de una estructura polimérica para este tipo de compuestos (Mannich & Schuman, 1938)(Figura 3).

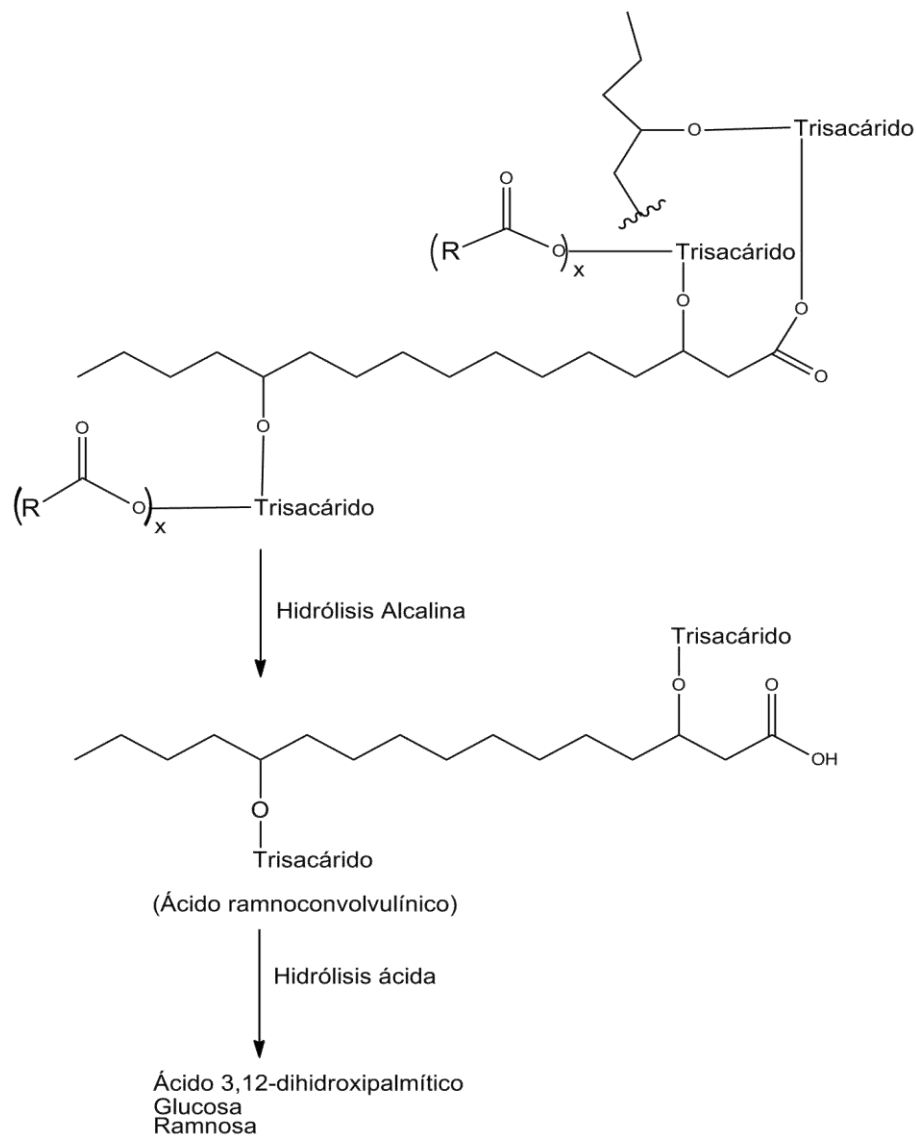


Figura 3. Estructura de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga* Benth de acuerdo con Mannich y Schuman (1938).

2.3 Diversidad Estructural

2.3.1 Composición química

Las resinas glicosídicas son glicolípidos derivados de ácidos grasos C-14 y C-16 monohidroxi- y dihidroxilados. Su estructura es inusual porque son metabolitos anfipáticos ya que contiene una fracción hidrofóbica (ácidos grasos, agliconas) así como una hidrofílica (azúcar o glicona). Esta última está compuesta por un heteropolisacárido de sólo unos cuantos residuos (hasta seis), que son de no más de cuatro monosacáridos diferentes. Las unidades de azúcar encontradas en estos metabolitos son D-glucosa, y

epímeros de pentosas (L-ramnosa, D-fucosa, D-quinovosa y D-xilosa) en su forma de piranósidos. El enlace *O*-glicosídico es el único tipo que conecta el residuo de monosacárido entre cada uno y con la aglicona. Los fragmentos L-Rha (1→2)-D-Fuc, L-Rha-(1→4)-L-Rha y D-Glc-(1→2)-D-Fuc representan subunidades disacáridas altamente conservadas. La complejidad estructural surge a partir de la posición para el establecimiento del enlace glicosídico como (1→2), (1→3), (1→4) y (1→6). Entre los sustituyentes tipo éster encontrados con mayor frecuencia enlazados al núcleo oligosacárido están: las cadenas cortas de los ácidos alifáticos, ej., acético (ác.), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2*S*)-metilbutírico, (–)-(2*R*,3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ác. nilico) y ácido tiglico (tga), arilalquilos como el ácido (E)-cinámico y los ácidos grasos saturados con diferente largo de cadena, ej., *n*-hexanoico o caproico, *n*-octanoico o caprílico, *n*-decanoico o cáprico, *n*-dodecanoico o laúrico, *n*-hexadecanoico o palmítico, *n*-octadecanoico o esteárico y *n*-eicosanoico o ácido araquídico. La mayoría contiene ácido jalapínico, ácido 11(*S*)-hidroxihexadecanoico, como la aglicona, la cual siempre se encuentra formando un anillo de macrolactona que abarca dos o más unidades del núcleo oligosacárido. La diversidad química de estos oligosacáridos se incrementa aún más por la posibilidad de modificar la posición de ciclización de los núcleos oligoglicosacáridos para establecer la correspondiente macrolactona. De hecho, en conjunto, un gran número de congéneres de las resinas glicosídicas individuales suceden en cada especie (Pereda-Miranda et al., 2010).

La presencia de resinas glicosídicas en las especies de convolvuláceas se ha establecido a través de dos enfoques: el primero fue por medio de un razonamiento etnomédico asociado con las propiedades laxativas resultado de su alto contenido de resinas glicosídicas (Pereda-Miranda & Bah, 2003); el segundo fue mediante el aislamiento de las resinas crudas y la identificación de sus productos de hidrólisis (Eich, 2008), principalmente, a través del aislamiento de los ácidos glicosídicos producidos bajo la saponificación (Pereda-Miranda et al., 2006). Las resinas glicosídicas se dividen en dos grupos basados en sus solubilidades en éter: la jalapina (resinas solubles) y la convolvulina (resinas insolubles). El grupo de las jalapinas comparte la estructura común de una macrolactona compuesta por un ácido glicosídico esterificado. Miembros del grupo de la convolvulina poseen un peso molecular mayor y son solubles en metanol, lo cual podría ser resultado de ser oligómeros de ácidos glicosídicos (Mannich & Schumann, 1938). Debido a la diversidad química de estas resinas, se han dividido en grupos basados en el tamaño de su núcleo oligosacárido. Hasta la fecha, 53 diferentes ácidos glicosídicos han sido identificados y a un gran número de ellos se les ha otorgado un nombre trivial basado en su fuente de origen, e.g., las tricolorinas y sus ácidos glicosídicos denominados como tricolóricos de *I. tricolor* (Pereda-Miranda et al., 2010).

2.4 *Ipomoea purga*

Ipomoea purga es una enredadera de hoja perenne de la familia Convolvulaceae nativa de México pero que sólo se distribuye en las pendientes de la Sierra Madre Oriental en el este del país, en los estados de Hidalgo, Puebla y Veracruz (McDonald, 1994). Es una de las tantas y bien conocidas especies de tubérculos del género *Ipomoea* del nuevo mundo que forman el complejo de plantas medicinales conocido como las “raíces de jalapa” la cuales también incluyen *I. jalapa*, *I. orizabensis*, *I. simulans*, *I. stans*, *I. batatas*, entre otras menos usadas (Pereda-Miranda et al., 2006). *I. purga* es la especie representativa (tanto así que se le llama “raíz oficial de jalapa”) y ha sido usada en la medicina tradicional como un catártico suave desde los tiempos prehispánicos (Pereda-Miranda et al., 2010).

En México, aparte del uso tradicional como un remedio purgante para expeler gusanos parásitos, la raíz de jalapa ha sido documentada, desde la época colonial y hasta los siglos XX y XIX, como un depurativo hidragogo para la evacuación de líquido, como sudorífico y diurético (Castañeda-Gómez & Pereda-Miranda, 2011). Una decocción de las partes aéreas de esta planta medicinal se recomienda como galactogogo (remedio para aumentar la producción de leche). Esta hierba también se emplea en el tratamiento de la gastritis y la inflamación abdominal, los desórdenes biliares, la disentería, la enteromeningitis, la hidrocefalia y la piel ulcerada. Las partes aéreas, las raíces y las semillas contienen resinas glicosídicas que tienen propiedades antiinflamatorias. Los extractos de las hojas exhiben actividad antibacterial contra cepas de *Staphylococci* resistentes a meticilina (Mitscher & Telikepalli, 1992). También, han demostrado ser moduladores del fenómeno de la resistencia cruzada a fármacos en células de carcinoma de mama en humano resistentes a vinblastina ya que se ha comprobado su potencial como inhibidores de las bombas de extrusión como la glicoproteína-P (Figueroa-González, 2012).

2.5 Diversidad estructural de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa (*Ipomoea purga*)

La proporción entre resinas glicosídicas solubles en éter (jalapinas) y solubles en alcohol (convulvulina) permite distinguir entre la auténtica y la falsa raíz de Jalapa; por ejemplo la raíz oficial de Jalapa (*I. purga*) contiene la mayor cantidad de resinas glicosídicas solubles en metanol (15-20% del peso seco), en comparación con el contenido de la falsa raíz de jalapa (*I. orizabensis*) con un contenido del 10-18% de resinas solubles en éter y menos del 1% soluble en alcohol (Pereda-Miranda et al., 2006).

La complejidad estructural de las resinas glicosídicas solubles en alcohol y su solubilidad en disolvente polares (MeOH y agua) han obstaculizado seriamente el aislamiento individual de los glicolípidos constitutivos, limitando sus estudios químicos a la

caracterización de sus productos de degradación (Pereda-Miranda et al., 2006) (Singh & Stacey, 1973); por ejemplo, la saponificación del extracto soluble en metanol contiene los ácidos púrgicos A y B como los ácidos glicosídicos mayoritarios (Pereda-Miranda et al., 2006)(Figura 4).

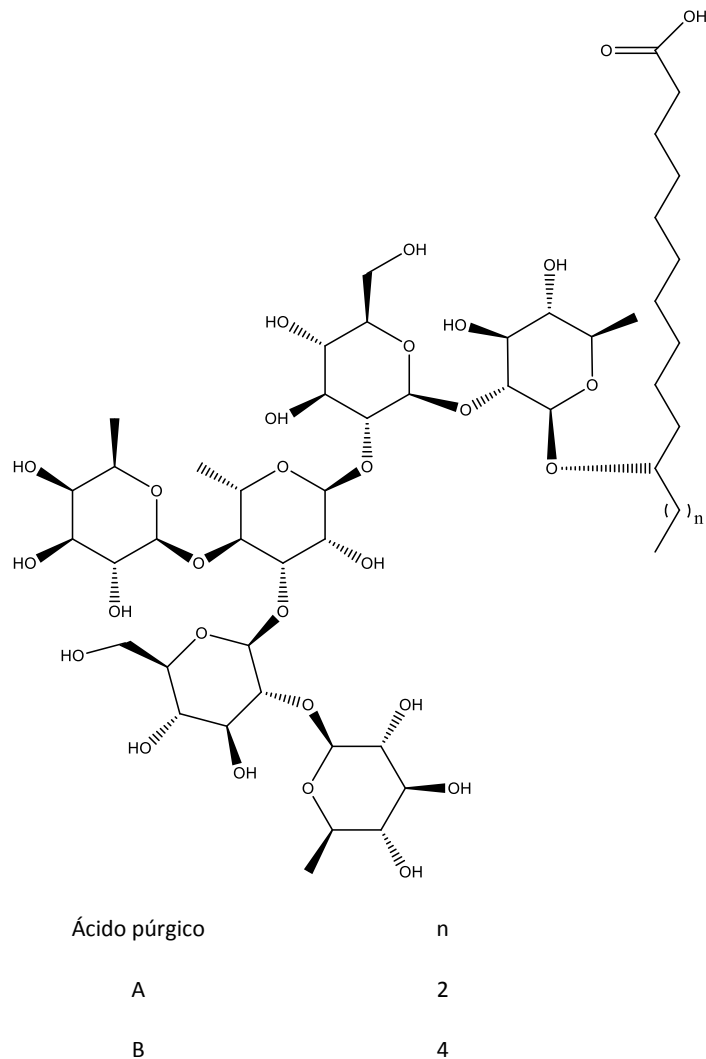


Figura 4. Estructuras químicas de los ácidos púrgicos A y B, monodesmósidos de los ácidos convolvulinólico (C₁₄) y jalapinólico (C₁₆) donde la cadena hexasacárida se une en la posición C-11.

En este contexto, la elucidación estructural de una resina glicosídica intacta bisdesmosídica, a partir de la fracción insoluble en agua del extracto metanólico, constituye una evidencia de la estructura macrocíclica no oligomérica de las resinas glicosídicas de la familia de las convolvuláceas. La purificación de este bisdesmósido

altamente polar, llamado jalapinosido (Figura 5), fue el resultado de un trabajo muy arduo empleando la cromatografía de líquidos en fase reversa ya que se purificó como un constituyente minoritario del extracto metanólico de la raíz de jalapa (Bautista et al., 2015).

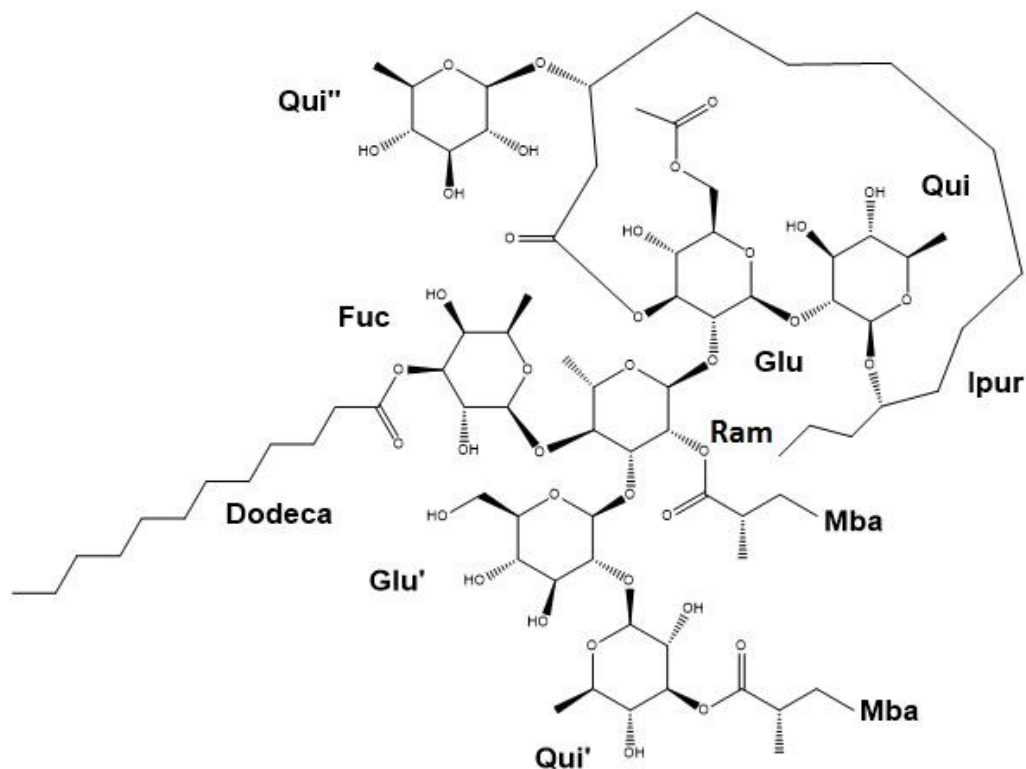


Figura 5. Estructura química del jalapinosido, bidesmósido del ácido ipurónico (C₁₄) donde un residuo monosacárido se une en la posición C-3 y el hexasacárido en la posición C-11.

2.6 Resinas glicosídicas de *Ipomoea orizabensis*

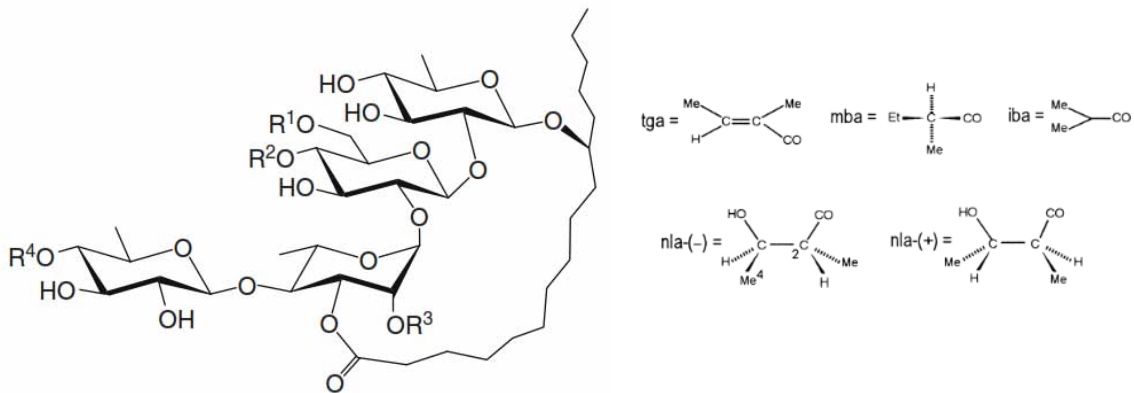
Ipomoea orizabensis (Pelletan) Ledebour ex Steudel (Figura 6) es parte del complejo de jalapas purgantes provenientes de la familia de las convolvuláceas (Hernández-Carlos, Bye, & Pereda Miranda, 1999). Esta raíz igualmente restringida a las áreas tropicales del Golfo de México y, conocida con el nombre de “jalapa de orizaba”, se ha usado como un sustituto o un adulterante para la verdadera jalapa, produciendo un efecto purgante menos fuerte. Incluso hoy en día, se le suele conocer como escamonea mexicana, falsa jalapa o jalapa ligera (Linares et al., 1994). Esta planta medicinal también se ha usado para el tratamiento de la fiebre abdominal, la disentería, la epilepsia, la hidrocefalia, las “manchas” (infección cutánea por espiroquetas), la meningitis y los tumores (Martínez, 1990).



Figura 6. Flor de *Ipomoea orizabensis*.

Durante la década de los 80, con la aplicación de la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR), se pudo aislar por primera vez cuatro componentes intactos provenientes de una mezcla de resinas glicosídicas a partir de esta falsa jalapa (Noda et al., 1987). Todas ellas fueron llamadas orizabinas en referencia al nombre científico de su fuente natural, la escamonea mexicana (*I. orizabensis*). Esta técnica de purificación demostró que el extracto crudo de las resinas representa mezclas complejas de isómeros involucrando un patrón de sustitución diferente para la lactonización y la posición de esterificación del núcleo oligosacárido constitutivo.

Como parte de un esfuerzo continuo para identificar diferentes principios bioactivos a partir del complejo de las jalapas medicinales mexicanas, se han aislado e identificado varias resinas glicosídicas con una estructura macrocíclica derivadas de los ácidos grasos C₁₄ y C₁₆ monohidroxi y dihidroxilados y que se encuentran glicosídicamente unidos a un núcleo homo o hetero oligosacárido (Hernández-Carlos et al., 1999). Estos componentes correspondieron a ésteres macrocíclicos individuales y no los supuestos oligómeros (Wagner, 1973) de alto peso molecular formados por la condensación de varios ácidos glicosídicos según la postulación de Mannich y Schuman (1938). Con la aplicación de nuevas tecnologías para la purificación como el reciclaje de la muestra, se confirmó que las resinas crudas representan una mezcla compleja de isómeros involucrando diferentes patrones de sustituciones para la lactonización y la posición de esterificación en el núcleo de oligosacárido (Pereda-Miranda & Hernández-Carlos, 2002) (Figura 7).



Compuesto	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄
Orizabina V	H	H	mba	nla
Orizabina VI	H	mba	nla	H
Orizabina VII	H	nla	mba	H
Orizabina IX	nla	H	mba	tga
Orizabina X	H	iba	nla	tga
Orizabina XI	H	iba	(+)-nla	tga
Orizabina XII	H	nla	iba	tga
Orizabina XIII	H	(+)-nla	iba	tga
Orizabina XIV	H	mba	nla	tga
Orizabina XV	H	mba	(+)-nla	tga
Orizabina XVI	H	nla	mba	tga
Orizabina XVII	H	(+)-nla	mba	tga
Orizabina XVIII	H	mba	nla	mba
Orizabina XIX	H	mba	(+)-nla	mba
Orizabina XX	H	nla	mba	mba
Orizabina XXI	H	(+)-nla	mba	mba

Figura 7. Principales resinas de *Ipomoea orizabensis*.

2.7 Perfiles espectroscópicos del contenido de resinas glicosídicas

Las resinas glicosídicas son un grupo de moléculas con propiedades anfipáticas que dificultan su separación y purificación. Una de las dificultades encontradas durante la purificación de las moléculas intactas es la presencia de estructuras isoméricas debido a la presencia de ácidos esterificando diversos sitios del núcleo oligosacárido, así como variaciones en la secuencia de glicosidación de los núcleos oligosacáridos (Pereda-Miranda & Bah, 2003; Pereda-Miranda et al., 2010). En muchos casos su alto peso molecular y sus propiedades anfipáticas han impedido el aislamiento por HPLC de muestras puras en cantidades suficientes para poder utilizarse como estándares cromatográficos para evaluar la calidad de algunas muestras comerciales (Pereda-Miranda et al., 2010). Por lo tanto, no todas las estructuras de estas moléculas son suficientemente distintivas para permitir una diferenciación cromatográfica o espectroscópica que distinga una especie de *Ipomoea* de otra a través de sus mezclas de resinas glicosídicas. Sin embargo, la resonancia magnética nuclear (RMN) de carbono ($C-13$) de los ácidos glicosídicos (productos de la saponificación de las resinas) genera datos que pueden utilizarse como “huellas digitales” para el reconocimiento del patrón oligosacárido de cada Jalapa. Estas señales anoméricas alrededor de δ 98-110, fuera de la región de mayor sobreposición (δ 60-80), permiten una estimación inmediata del número de los diferentes residuos monosacáridos en cada ácido glicosídico y se pueden utilizar como señales estructurales “reporteras” para cada resina: un tetrasacárido para *I. orizabensis*, un pentasacárido para *I. stans* y un hexasacárido para *I. purga* (Figura 8) (Pereda-Miranda et al., 2006).

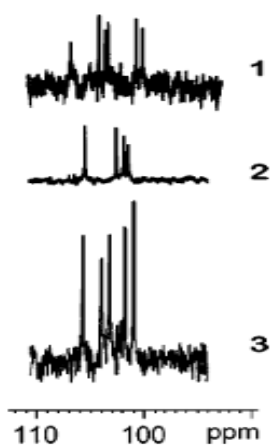


Figura 8. Expansión de la región entre 90-110 ppm en el espectro de RMN ^{13}C de los extractos saponificados para la identificación de cada una de las muestras de las raíces de jalapa: 1) *Ipomoea purga* (“Rhizoma Jalapae”); 2) *Ipomoea orizabensis* (“escamonea mexicana”); 3) *Ipomoea stans* (“tumbavaqueros”, un sustituto de la falsa jalapa).

Hoy en día, la demanda de la escamonea mexicana y la raíz de jalapa ha decaído debido al uso de otros laxantes derivados de los frutos de “psyllium” (*Plantago* spp.) y las hojas de “Cassia” (*Senna* spp.) así como la introducción de la raíz de jalapa de Brazil (*Operculina tuberosa*) al mercado mundial por industrias herbolarias italianas y alemanas.

3. Justificación

Debido a las actividades biológicas demostradas por las resinas glicosídicas y a la falta de estudios químicos sobre la composición de las muestras comerciales de los extractos preparados a partir de las jalapas, es necesario contar con una metodología experimental adecuada para lograr la purificación de los principios activos para posteriormente caracterizarlos y, de esta manera, contribuir al conocimiento de su diversidad estructural. Igualmente, las estructuras de los ácidos glicosídicos constitutivos de las mezclas de resinas glicosídicas son suficientemente distintivas para lograr una diferenciación cromatográfica (HPLC) o espectroscópica (RMN C-13) que permita distinguir entre las especies que conforman el complejo de las raíces de jalapas purgantes.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

El presente trabajo tiene como objetivo general desarrollar una metodología adecuada para el aislamiento, la purificación y la caracterización de los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas del extracto metanólico comercial de la *Ipomoea orizabensis* también conocida como escamonea mexicana o falsa jalapa, elaborado y distribuido por los Laboratorios Mixim S.A. de C.V.

4.2 Objetivos particulares

- Utilizar métodos químicos degradativos para obtener fracciones con diferentes polaridades para su análisis en HPLC
- Establecer las condiciones analíticas necesarias para obtener cromatogramas adecuados que permitan la comparación entre los derivados preparados
- Realizar el escalamiento a nivel preparativo de las fracciones seleccionadas para su purificación por HPLC
- Realizar la elucidación estructural de los derivados purificados por medio de la aplicación de análisis espectrométricos (ESI-MS) y espectroscópicos (RMN)

5. Parte experimental

5.1 Procedimientos generales

5.1.1 Material vegetal

La muestra analizada consistió en 370.3 g de la resina comercial de la escamonea adquirida a través de los Laboratorios Mixim S.A. de C.V., fabricantes de extractos botánicos.

5.1.2 Preparación de los extractos orgánicos

El material vegetal seco y pulverizado se sometió a una extracción con metanol. Una vez concluido el tiempo de maceración, se filtró el extracto y se concentró a sequedad a presión reducida. Así se obtuvieron dos extractos metanólicos y se almacenaron en dos frascos con un peso de 370.3 g para la muestra A y 628.4 g para la muestra B. Estos extractos fueron pulverizados y lavados con agua desionizada, para eliminar los compuestos más polares como azúcares, proteínas y sales. Se utilizó un sonicador *Fisher Scientific FS1104* para mejorar la eficiencia de los lavados. Se realizaron 3 lavados a la muestra A: el primero con 250 mL de agua desionizada, el segundo con 300 mL y el último con 250 mL. La muestra B también se sometió al mismo procedimiento: el primero de 600 mL, el segundo de 450 mL y el último de 800 mL. Después de estos procedimientos, se repusieron en forma individual en sus frascos de vidrio para volver a pesarlos una vez secos.

5.2 Preparación de los derivados

5.2.1 Hidrólisis alcalina (saponificación)

Se trabajó con la muestra A, se pesó aproximadamente un gramo (1.113 g) y se adicionaron 30 mL de una solución de KOH 5% (1.56 g). La mezcla de reacción se dejó a reflujo en un baño de aceite a 95°C durante tres horas. Se ajustó el pH a 5 con HCl 1N y, posteriormente, se extrajo con cloroformo (3 × 30 mL). La fase clorofórmica se desechó. La fase acuosa se sometió a extracciones con *n*-butanol (2 × 25 mL) y esta última fase se secó con sulfato de sodio anhidro y se filtró. Finalmente, se evaporó todo el *n*-Butanol presente con la ayuda de una bomba de alto vacío y se obtuvo un rendimiento final en esta etapa de 0.7118 g.

5.2.2 Reacción de alquilación con diazometano

5.2.2.1 Generación del reactivo

50 mL de éter en un baño de hielo, se colocan en un embudo de separación con 10 mL de una solución acuosa de NaOH al 40%. Después, se agregan 0.8 g de nitroso metilurea poco a poco durante una hora. La fracción acuosa se separa de la fracción etérea, la cual se seca con lentejas de NaOH. La solución etérea de color verde amarillenta que contiene al diazometano queda lista.

5.2.3 Reacción de alquilación

Se adicionó un exceso de la solución etérea de diazometano a la mezcla de la hidrólisis alcalina, solubilizada en 1 mL de metanol, para llevar a cabo la reacción de alquilación. La adición del agente alquilante se realizó durante varias horas hasta que cesó el desprendimiento de N₂ en el medio de reacción y se observó la desaparición del color amarillo. Por último, se concentró a sequedad con la ayuda de una bomba de alto vacío.

5.2.4 Reacción de acetilación

711.8 mg del compuesto se disolvieron en 13 mL de piridina y 23 mL de anhídrido acético. La mezcla de reacción se dejó en agitación a temperatura ambiente durante 24 hrs. Posteriormente, se adicionaron 20 mL de agua destilada y se dejó en agitación por 5 min. Se adicionaron 30 mL de agua y se realizaron 3 extracciones sucesivas, utilizando en cada una de ellas volúmenes de 50 mL de acetato de etilo. La fase orgánica fue tratada con HCl 0.1N (2 × 100 mL), seguida de un tratamiento alcalino con una solución saturada de NaHCO₃ (50 mL). Por último, la fase orgánica se lavó con H₂O (2 × 50 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró a presión reducida. Este compuesto se purificó por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), con un rendimiento final en esta etapa de 0.7264 g.

5.3 Cromatografía líquida de alta resolución

5.3.1 Instrumentación

La instrumentación estuvo conformada por un equipo Waters (Millipore Corp., Waters Chromatography Division, Milford, MA, USA) equipado con un sistema de distribución de

disolvente y un refractómetro diferencial Waters 410 integrado a un equipo de cómputo (DELL/Windows XP Profesional 2002). El control del equipo, los datos de adquisición, el proceso y el manejo de información cromatográficos se realizaron a través del programa de software Empower 2 Pro. Los tipos de columna utilizadas durante el presente estudio fueron los siguientes:

- Octadecilsilano (C-18) Columna Symetry C18 (4.6 x 250 mm, 5 μ m)
- Aminopropilmetilo (NH₂) Columna YMC (10 x 150 mm, 5 μ m)
- Aminopropilmetilo (NH₂) Columna μ Bondapak (7.8 x 300 mm, 10 μ m)

5.4 Procedimiento de preparación de la muestra problema

5.4.1 Cromatografía de líquidos a nivel analítico

Se realizaron pruebas a nivel analítico con el fin de obtener un perfil cromatográfico de la muestra bajo las condiciones de trabajo planteadas y descritas en el cuadro 1. De esta forma, se realizaron numerosos ensayos a nivel analítico para establecer las condiciones óptimas de separación de las muestras problema.

5.4.2 Separación de los ácidos glicosídicos alquilados mediante HPLC

En primer lugar, se intentó separar la mezcla del extracto crudo (frasco A) bajo las condiciones establecidas en el cuadro 1, sin éxito en la separación. La fracción del frasco A, porción insoluble en agua del extracto de MeOH, se saponificó y se metiló, después se analizó de forma directa a través de HPLC, empleando las fases estacionarias y sistemas de elución incluidos en la Cuadro 2. Después la muestra se peracetiló y se volvieron a probar diferentes sistemas de elución (Cuadro 3). Posteriormente, se logró una completa separación de los productos de saponificación acetilados mediante el empleo de la columna aminopropilmetilo en el sistema CH₃CN-H₂O, 3:1 (cuadro 4).

Cuadro 1. Condiciones cromatográficos del extracto crudo (frasco A)

Tipo de columna	Fase móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de Inyección	Detector
Octadecilsilano (C ₁₈)	ACN/ H ₂ O 3:1	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
C ₁₈	ACN/ H ₂ O 3:2	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
C ₁₈	ACN/ H ₂ O 1:1	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
C ₁₈	ACN/ H ₂ O 3/7	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
C ₁₈	ACN/ H ₂ O 1/3	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeOH/H ₂ O 3:1	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeOH/H ₂ O 1:1	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
C ₁₈	MeOH/H ₂ O 1:3	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
Aminopropil metilo (NH ₂)	ACN/ H ₂ O 1:1	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 3/7	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR
NH ₂	MeOH/H ₂ O 1:1	0.4 mL/min	0.5 mg/10 µL	10 µL	IR

Cuadro 2. Condiciones cromatográficas después de la saponificación (IOEMBNM) y metilación (IOEMBM).

Tipo de columna	Fase móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de Inyección	Detector
Aminopropilmetilo (NH ₂)	ACN/ H ₂ O 3:1	0.4 mL/min	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 30:20	0.4 mL/min	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 3:1	0.8 mL/min	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 3:2	0.8 mL/min	0.5 mg/10µL	10 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 3:1	0.8 mL/min	0.02 mg/10µL	50 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 3:2	0.8 mL/min	0.02 mg/10µL	50 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 2:3	0.8 mL/min	0.02 mg/10µL	50 µL	IR

Cuadro 3. Condiciones cromatográficas después de la saponificación (IOEMBNM), metilación (IOEMBM) y acetilación (IOEMBFA).

Tipo de columna	Fase móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de Inyección	Detector
Aminopropilmetilo (NH ₂)	ACN/ H ₂ O 3:1	0.8 mL/min	0.02 mg/10µL	50 µL	IR
NH ₂	ACN/ H ₂ O 2:3	0.8 mL/min	0.02 mg/10µL	50 µL	IR

Cuadro 4. Condiciones cromatográficas después de tomar muestra nueva y repetir la saponificación, metilación y acetilación. Primeros cortes.

Tipo de columna	Fase móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de Inyección	Detector
Aminopropilmetilo (NH ₂) analítico	ACN/ H ₂ O 3:1	0.8 mL/min	0.5mg/10 µL	10 µL	IR
(NH ₂) preparativo	ACN/ H ₂ O 3:1	1.4 mL/min	0.5 mg/10µL	200 µL	IR

5.4.3 Cromatografía de líquidos a nivel preparativo

Una vez encontradas las condiciones a nivel analítico para la resolución de la muestra problema, se procedió a extrapolar las condiciones analíticas a un nivel preparativo para lograr el aislamiento y la purificación de los constituyentes individuales presentes en la muestra. Este escalamiento se efectuó mediante la siguiente ecuación.

Flujo nivel preparativo (Fp)

$$F_p = F_a(L_p/L_a)(d_p^2/d_a^2)$$

Fp = Flujo a nivel Preparativo (mL/min)

Fa = Flujo a nivel analítico (mL/min)

Lp = Longitud de la columna preparativa (mm)

La = Longitud de la columna analítica (mm)

dp = diámetro interno de la columna preparativa (mm)

da = diámetro interno de la columna analítica (mm)

Las condiciones para el aislamiento y la purificación de cada uno de los constituyentes presentes en la mezcla a nivel preparativo fueron los siguientes: columna aminopropilmetilo (NH₂), Columna YMC (10 µm x 150 mm, 5 µm); fase móvil, CH₃CN-H₂O (75/25); flujo 1.4 mL/min; detector, índice de refracción (sensibilidad 512 RIU); concentración de la muestra: 1 mg/10 µL, volúmenes de inyección, 200 µL.

5.4.4 Purificación

Para lograr la purificación de los compuestos, se realizaron varias inyecciones a nivel preparativo, sólo que en esta ocasión se utilizó la técnica de corte de núcleo de la muestra para lograr una máxima separación y pureza. Se inyectaron 20 mg en volúmenes de 200 μL de la mezcla en una columna amino (YMC, 10 μm x 150 mm, 5 μm). La fase móvil utilizada fue una mezcla binaria de $\text{CH}_3\text{CN}-\text{H}_2\text{O}$ (3:1), a un flujo de 1.4 mL/min (cuadro 5). Estas condiciones permitieron la resolución de 726.4 mg de la muestra problema en cinco diferentes eluatos. Se determinó el punto de fusión en un aparato Fisher-Johns.

Cuadro 5. Se presentan las condiciones cromatográficas después de tomar muestra nueva y repetir la saponificación y acetilación (IOEMBFNMA).

Tipo de columna	Fase móvil	Flujo y Sensibilidad	Concentración de la muestra	Volumen de Inyección	Detector
Aminopropilmetilo (NH ₂)	ACN/ H ₂ O 3:21	1.4 mL/min	0.5 mg/10 μL	200 μL	IR

5.5 Determinación de los espectros de RMN y EM.

Los espectros de RMN ^1H y ^{13}C se generaron en los equipos Varian, modelos VNMRS y MR, operando a una frecuencia de 400 MHz en ^1H y 100 MHz en ^{13}C . Se utilizó piridina deuterada ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$) y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en partes por millón (ppm) utilizando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas se registraron en un aparato SQD2 Waters acoplado a un UPLC mediante el método de ionización por electroespray (ESI-MS) en modo positivo.

5.6 Segunda Hidrólisis alcalina (2ª Saponificación)

A 20.8 mg de la muestra 5 (IOEMBFNMA-5), se adicionaron 3 mL de una solución de KOH 5% (0.1257 g) y la mezcla de reacción se dejó a reflujo en un baño de aceite a 95°C durante tres horas. Se ajustó el pH a 5 con HCl 1N. Posteriormente, se extrajo con cloroformo (3 x 3 mL). La fase clorofórmica se desechó. La fase acuosa se sometió a extracciones con *n*-butanol (3 x 3 mL) y se secó con sulfato de sodio. Finalmente, el producto de reacción se evaporó a sequedad con la ayuda de una bomba de alto vacío y generó un rendimiento final en esta etapa de 18.3 mg.

6. Resultados y Discusión.

6.1 Análisis del extracto metanólico mediante HPLC

Debido a la gran similitud estructural de los glicolípidos constitutivos de las resinas de la familia Convolvulaceae, se presentan serias dificultades para su purificación mediante el uso de técnicas cromatográficas convencionales como la cromatografía en columna abierta sobre gel de sílice o el empleo de sephadex. Así, es necesaria, la aplicación de la cromatografía de líquidos (HPLC) a nivel preparativo para lograr la separación y la purificación de estos compuestos (Bah & Pereda-Miranda, 1997; Pereda-Miranda et al., 2010). Esta técnica analítica también representa la herramienta de elección para la purificación de los ácidos glicosídicos generados durante los procesos de saponificación (Pereda-Miranda et al., 2006). En la literatura, se ha descrito la separación de ácidos glicosídicos empleando una columna empacada con gel de sílice enlazada con aminopropilmetilsilicio y un sistema de elución que consiste de CH₃CN-H₂O en una proporción de aproximadamente 4:1 (Pereda-Miranda & Hernández-Carlos, 2002).

Se realizaron pruebas preliminares a nivel analítico con la muestra cruda (IOEMR) de acuerdo con el cuadro 1 pero sin resultados satisfactorios; por lo que se procedió a la saponificación de una muestra de 1.0651g del frasco A y con un rendimiento de 0.4375 g (clave de esta muestra: IOEMBNM), de acuerdo a las condiciones descritas en el inciso 5.2.1. Para efectuar la separación de los constituyentes presentes en las fracciones primarias, un sistema cromatográfico con un detector de índice de refracción fue necesario ya que los ácidos glicosídicos resultantes no cuentan con un grupo cromóforo importante que facilite su monitoreo mediante el empleo de su absorción en el ultravioleta. Se utilizó la columna analítica de fase reversa enlazada con aminopropilmetilsilicio (Bondapak-NH₂) bajo las condiciones enumeradas en la sección 5.4.2 (Cuadro 2) ya que el uso de estas columnas se describió para la purificación de productos naturales anfipáticos similares (Bah & Pereda-Miranda, 1997; Bautista et al., 2015).

Con la finalidad de disminuir la polaridad de la muestra IOEMBNM, se realizó la metilación de 0.1005g de la muestra IOEMBNM antes de ser analizada por HPLC, de acuerdo con los procedimientos descritos en la sección 5.2.3 con un rendimiento final de 75 mg y con la clave asignada de IOEMBM. Posteriormente, se procedió a realizar nuevos ensayos cromatográficos analíticos y los resultados no fueron completamente satisfactorios debido a que no se lograron encontrar las condiciones instrumentales que permitieran una resolución adecuada. Por este motivo, se dispuso la preparación del derivado peracetilado

de toda la muestra restante, de acuerdo al procedimiento descrito en la sección 5.2.4. Al final, se obtuvo un rendimiento de 0.059 g y se decidió inyectar al producto de reacción en el HPLC de acuerdo a las condiciones descritas anteriormente en el cuadro 3 en la sección de Parte Experimental. Estas condiciones proporcionaron un resultado satisfactorio; sin embargo, la cantidad de muestra era insuficiente para permitir la purificación de los compuestos constitutivos de la mezcla de reacción en cantidades suficientes para su posterior caracterización espectroscópica mediante resonancia magnética nuclear. Se decidió reiniciar la secuencia de reacciones químicas antes descritas pero, en esta ocasión, utilizando 1.1131g de la muestra A. En este escalamiento de la reacción se decidió omitir la alquilación y al final se obtuvo un rendimiento de 0.7264g. Con este nuevo material se probaron las condiciones reportadas en el cuadro 4 a nivel analítico, el cromatograma resultante se muestra en la Figura 9.

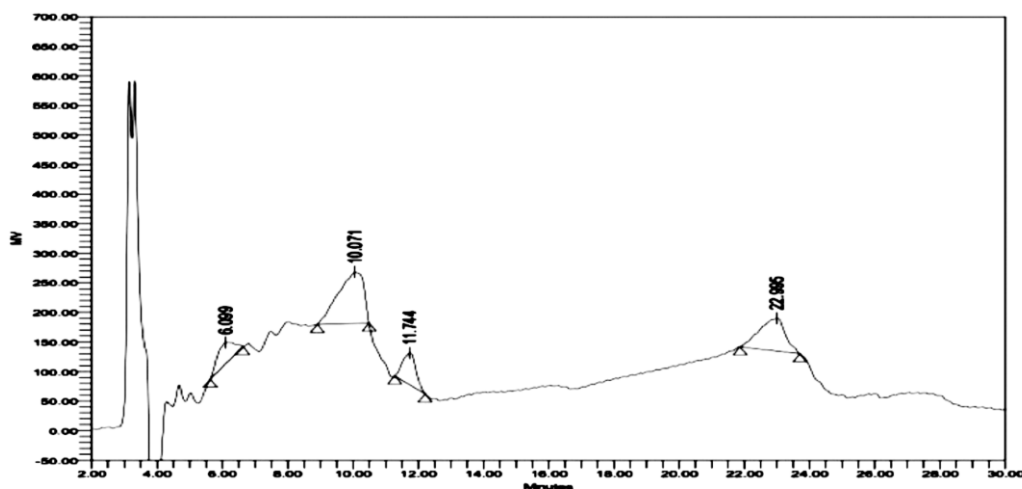


Figura 9. Cromatograma a nivel analítico.

6.2 Fraccionamiento de la Fracción primaria V

Una vez que se encontraron las condiciones instrumentales a nivel analítico apropiadas para la separación (sección 5.4.2), se procedió a realizar el escalamiento a nivel preparativo para aislar y purificar algunos de los constituyentes individuales presentes en dichas fracciones. Se resolvió la siguiente ecuación para conocer el flujo de elución a nivel preparativo (Fp): $F_p = F_a(L_p/L_a)(d_p^2/d_a^2)$

Donde $F_a = 0.8 \text{ mL/min}$; $L_p = 150 \text{ mm}$; $L_a = 300 \text{ mm}$; $d_p = 7.8 \text{ mm}$; $d_a = 3.9 \text{ mm}$

$$F_p = (0.8 \text{ mL/min}) * \frac{150 \text{ mm}}{300 \text{ mm}} * \frac{(10 \text{ mm})^2}{(3.9 \text{ mm})^2}$$

$$F_p = (0.8 \text{ mL/min}) * (1/2) * \frac{100}{15.21}$$

$$F_p = 2.6 \text{ mL/min}$$

Si bien, la ecuación indicó un flujo de 2.6 mL/min para mantener la resolución de la muestra problema (concentración de la muestra: 20 mg/200 μ L); éste incrementaría la presión del sistema cromatográfico y podría ocasionar daño en la celda del detector por lo que se decidió disminuirlo hasta 1.4 mL/min. La figura 10 muestra el perfil cromatográfico en las fracciones I-V a nivel preparativo después de haber realizado el escalamiento y tomando en cuenta que hubo una disminución del flujo que ocasionó que los tiempos de retención aumentarían, es decir se observó un corrimiento de los picos a la derecha del cromatograma. En las condiciones analíticas (Figura 9), la corrida terminó al minuto 25, en tanto que en el análisis preparativo, el último pico terminó de eluir hasta el minuto 43 (Figura 10). Las condiciones instrumentales utilizadas para la generación del cromatograma de la Figura 10 se describieron anteriormente en la sección 5.4.4.

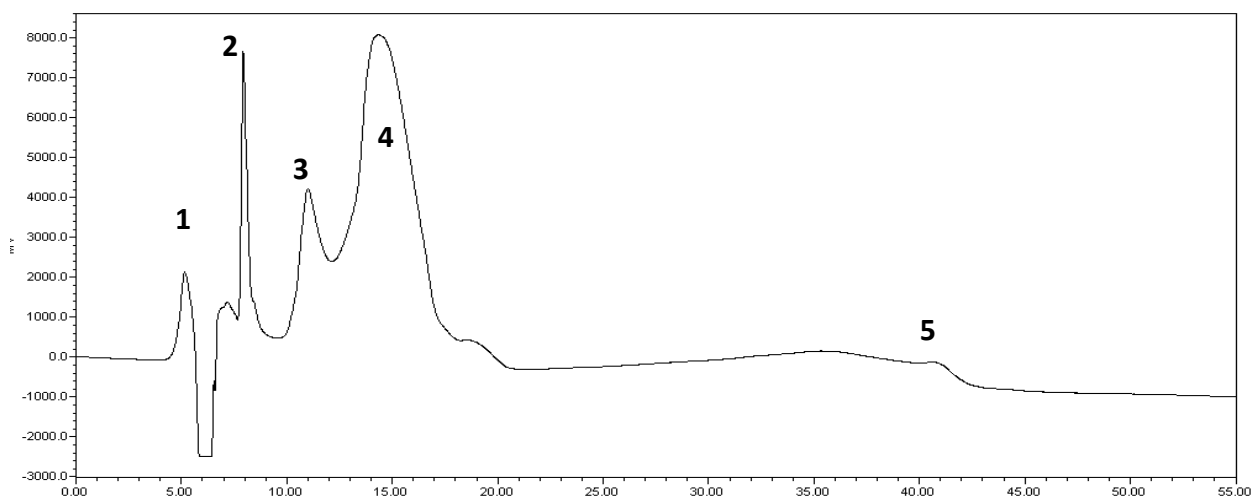


Figura 10. Cromatograma a nivel preparativo. Se indican con números cada uno de los 5 picos que corresponden a los eluatos colectados.

Una vez realizado el corte de núcleo para cada uno de los picos eluidos, las cantidades que se obtuvieron se enumeran en el cuadro 6. Para cada una de estas muestras, se registró el punto de fusión. Posteriormente, se registró el espectro de RMN H^1 para comprobar su pureza y, de esta manera, se seleccionó el compuesto más puro y abundante, que en este caso fue IOEMBFNMA5 para continuar con la elucidación de su estructura química. Para esto, se tomaron 20.8 mg y se sometieron a una segunda saponificación, de acuerdo con

lo descrito en la sección 5.6 de la Parte Experimental. El objetivo de esta segunda saponificación fue la generación del núcleo glicosídico mediante la remoción de los acetatos ya que la mezcla de ácidos glicosídicos constitutivos no puede resolverse debido a su polaridad extrema. Al final, se obtuvo un rendimiento de 18.3 mg de la muestra IOEMBFNMA5 saponificada. La cual se dividió en dos porciones para el registro de los espectros de masas (6.2 mg) y RMN (11.7 mg). Se metilaron los eluatos 2 y 3 en forma individual para realizar su caracterización estructural mediante la comparación de sus constantes físicas, espectrométricas y espectroscópicas con los datos descritos en la literatura (Pereda-Miranda et al., 2006).

Cuadro 6. Rendimiento y puntos de fusión

Número de eluato	clave de la muestra	Cantidad (g)	Punto de Fusión
1	IOEMBFNMA1	0.0096	120-122 C
2	IOEMBFNMA2	0.1061	114-116 C
3	IOEMBFNMA3	0.0521	113-116 C
4	IOEMBFNMA4	0.1797	92-95 C
5	IOEMBFNMA5	0.1780	89-90 C

6.3 Caracterización de los ácido glicosídicos

La caracterización estructural de los ácidos glicosídicos se realizó mediante el empleo de las técnicas espectroscópicas unidimensionales (RMN ^1H y ^{13}C) y bidimensionales (RMN HSQC, COSY, TOCSY y HMBC). La asignación de señales de RMN ^1H y ^{13}C (cuadro 8) de los ácidos glicosídicos individuales se ejecutó empleando los espectros unidimensionales de ^1H y ^{13}C . (Figuras 10 y 11) y bidimensionales: homonucleares (COSY y TOCSY) y heteronucleares (HSQC). Los picos 1 y 2 se caracterización como los ácidos púrgicos A y B mediante la comparación de las constantes físicas y propiedades espectrocópicas (RMN) para sus derivados metilados peracetilados (Pereda-Miranda et al., 2006). La figura 11 ilustra los espectros de RMN ^1H para los derivados de los picos 2 y 3.

Caracterización del éster metílico peracetilado del ácido púrgico A: pf. 98–100 °C; $[\alpha]_D -50$ (c 1.0, CHCl_3); FABMS negativo m/z 1795 $[\text{M} - \text{H}]^-$; RMN ^1H ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$, 500 MHz) δ 4.71 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Qui-1), 4.22 (1H, dd, $J = 9.5, 7.5$ Hz, Qui-2), 5.78 (1H, dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Qui-3), 5.07 (1H, dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Qui-4), 4.13 (1H, dq, $J = 9.5, 6.0$ Hz, Qui-5), 1.34 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Qui-6), 5.12 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc-1), 4.22 (1H, dd, $J = 9.5, 8.0$ Hz, Glc-2), 5.67 (1H, dd, $J = 10.0, 9.5$ Hz, Glc-3), 5.33 (1H, dd, $J = 10.0, 10.0$ Hz, Glc-4), 4.09 (1H, ddd, $J = 10.0, 5.0, 3.0$ Hz, Glc-5); 4.64-4.58 (1H, m, Glc-6a), 4.35-

4.26 (1H, m, Glc-6b), 5.45 (1H, d, $J = 1.5$ Hz, Rha-1), 5.66 (1H, m, Rha-2), 4.60 (1H, dd, $J = 9.0, 3.4$ Hz, Rha-3), 4.35-4.26 (1H, m, Rha-4), 4.55-4.50 (1H, m, Rha-5), 1.85 (3H, d, $J = 6.5$ Hz, Rha-6), 5.45 (1H, m, Glc'-1), 4.24 (1H, dd, $J = 8.5, 7.5$ Hz, Glc'-2), 5.57 (1H, dd, $J = 9.0, 8.5$ Hz, Glc'-3), 5.29 (1H, dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Glc'-4), 4.35-4.26 (1H, m, Glc'-5), 4.55-4.50 (1H, m, Glc'-6a), 4.39 (1H, dd, $J = 11.7, 2.0$ Hz, Glc'-6b), 5.24 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Qui'-1), 5.50 (1H, dd, $J = 9.0, 8.3$ Hz, Qui'-2), 5.66 (1H, dd, $J = 10.0, 9.0$ Hz, Qui'-3), 5.46 (1H, dd, $J = 10.0, 9.5$ Hz, Qui'-4), 3.96 (1H, dq, $J = 9.5, 6.0$ Hz, Qui'-5), 1.44 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Qui'-6), 5.59 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Fuc-1), 5.80 (1H, dd, $J = 10.0, 8.0$ Hz, Fuc-2), 5.59 (1H, dd, $J = 10.0, 3.0$ Hz, Fuc-3), 5.90 (1H, d, $J = 3.0$ Hz, Fuc-4), 4.35-4.26 (1H, m, Fuc-5), 1.33 (3H, d, $J = 7.0$ Hz, Fuc-6), 2.34 (2H, t, $J = 7.4$ Hz, Con-2), 3.65 (1H, m, Con-11), 0.89 (3H, t, $J = 7.2$ Hz, Con-14), 3.56 (3H, s, OCH₃); RMN ¹³C (125 MHz, C₅D₅N) δ 100.9 (CH, Qui-1), 77.1 (CH, Qui-2), 75.8 (CH, Qui-3), 74.5 (CH, Qui-4), 69.4 (CH, Qui-5), 18.0 (CH₃, Qui-6), 101.3 (CH, Glc-1), 72.7 (CH, Glc-2), 76.2 (CH, Glc-3), 70.0 (CH, Glc-4), 72.4 (CH, Glc-5), 63.4 (CH₂, Glc-6), 97.4 (CH, Rha-1), 73.9 (CH, Rha-2), 78.6 (CH, Rha-3), 77.1 (CH, Rha-4), 67.8 (CH, Rha-5), 19.2 (CH₃, Rha-6), 102.5 (CH, Glc'-1), 78.4 (CH, Glc'-2), 75.8 (CH, Glc'-3), 70.0 (CH, Glc'-4), 69.6 (CH, Glc'-5), 62.8 (CH₂, Glc'-6), 101.7 (CH, Qui'-1), 72.2 (CH, Qui'-2), 74.0 (CH, Qui'-3), 74.2 (CH, Qui'-4), 71.2 (CH, Qui'-5), 18.2 (CH₃, Qui'-6), 101.1 (CH, Fuc-1), 69.6 (CH, Fuc-2), 72.7 (CH, Fuc-3), 71.2 (CH, Fuc-4), 71.7 (CH, Fuc-5), 16.3 (CH₃, Fuc-6), 174.0 (CO, Con-1), 34.3 (CH₂, Con-2), 80.8 (CH, Con-11), 14.7 (CH₃, Con-14), 51.4 (OCH₃).

Caracterización del éster metílico peracetilado del ácido púrgico B: mp 88–90 °C; $[\alpha]_D -9$ (c 0.1, CHCl₃); FABMS negativo m/z 1823 $[M - H]^-$; RMN ¹H (C₅D₅N, 500 MHz) δ 4.65 (1H, d, $J = 7.5$ Hz, Qui-1), 4.14 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, Qui-2), 5.54 (1H, dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Qui-3), 5.02 (1H, dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Qui-4), 4.01 (1H, dq, $J = 9.4, 6.0$ Hz, Qui-5), 1.27 (3H, d, $J = 6.2$ Hz, Qui-6), 5.06 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Glc-1), 4.14 (1H, dd, $J = 8.0, 8.0$ Hz, Glc-2), 5.62 (1H, dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Glc-3), 5.28 (1H, dd, $J = 9.8, 9.8$ Hz, Glc-4), 4.00 (1H, ddd, $J = 10.0, 6.0, 3.0$ Hz, Glc-5); 4.60-4.55 (1H, m, Glc-6a), 4.25-4.21 (1H, m, Glc-6b), 5.40 (1H, brs, Rha-1), 5.61 (1H, m, Rha-2), 4.60-4.55 (1H, m, Rha-3), 4.30-4.21 (1H, m, Rha-4), 4.50-4.45 (1H, m, Rha-5), 1.78 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Rha-6), 5.41-5.40 (1H, m, Glc'-1), 4.17 (1H, dd, $J = 8.3, 8.3$ Hz, Glc'-2), 5.52 (1H, dd, $J = 8.6, 8.6$ Hz, Glc'-3), 5.24 (1H, dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Glc'-4), 4.30-4.21 (1H, m, Glc'-5), 4.50-4.45 (1H, m, Glc'-6a), 4.34 (1H, dd, $J = 12.0, 2.0$ Hz, Glc'-6b), 5.18 (1H, d, $J = 8.3$ Hz, Qui'-1), 5.48 (1H, dd, $J = 9.0, 9.0$ Hz, Qui'-2), 5.61 (1H, dd, $J = 9.5, 9.5$ Hz, Qui'-3), 5.42 (1H, dd, $J = 9.4, 9.4$ Hz, Qui'-4), 3.91 (1H, dq, $J = 9.5, 6.0$ Hz, Qui'-5), 1.38 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Qui'-6), 5.53 (1H, d, $J = 8.0$ Hz, Fuc-1), 5.73 (1H, dd, $J = 10.0, 8.0$ Hz, Fuc-2), 5.54 (1H, dd, $J = 10.0, 3.3$ Hz, Fuc-3), 5.83 (1H, d, $J = 3.3$ Hz, Fuc-4), 4.30-4.21 (1H, m, Fuc-5), 1.33 (3H, d, $J = 6.0$ Hz, Fuc-6), 2.24 (1H, t, $J = 7.4$ Hz, Jal-2), 3.62 (1H, m, Jal-11), 0.90 (3H, t, $J = 7.0$ Hz, Jal-16), 3.56 (3H, s, OCH₃); ¹³C NMR (125 MHz, C₅D₅N) δ 100.9 (CH, Qui-1), 76.9 (CH, Qui-2), 76.0 (CH, Qui-3), 74.2 (CH, Qui-4), 69.2 (CH, Qui-5), 17.7 (CH₃, Qui-6), 101.1 (CH, Glc-1), 72.6 (CH, Glc-2), 76.0 (CH, Glc-3), 69.8 (CH, Glc-4), 72.2 (CH, Glc-5), 63.2 (CH₃, Glc-6), 97.3 (CH, Rha-1), 73.8 (CH, Rha-2), 78.4 (CH, Rha-3), 76.9 (CH, Rha-4), 67.6 (CH, Rha-5), 19.0 (CH₃, Rha-6), 102.3 (CH, Glc'-1), 78.2 (CH, Glc'-2), 75.6 (CH, Glc'-3), 69.8 (CH, Glc'-4), 69.7 (CH, Glc'-5), 62.6 (CH₃, Glc'-6), 101.5 (CH, Qui'-1), 72.1 (CH, Qui'-2), 73.7 (CH, Qui'-3), 74.0 (CH, Qui'-4), 71.0 (CH, Qui'-5), 17.9 (CH₃, Qui'-6), 101.0 (CH, Fuc-1), 69.4 (CH, Fuc-2), 72.5 (CH, Fuc-3), 71.0 (CH, Fuc-4), 69.4 (CH, Fuc-5), 16.1 (CH₃, Fuc-6), 173.4 (CO, Jal-1), 34.1 (CH₂, Jal-2), 81.0 (CH, Jal-11), 14.2 (CH₃, Jal-16), 51.2 (OCH₃).

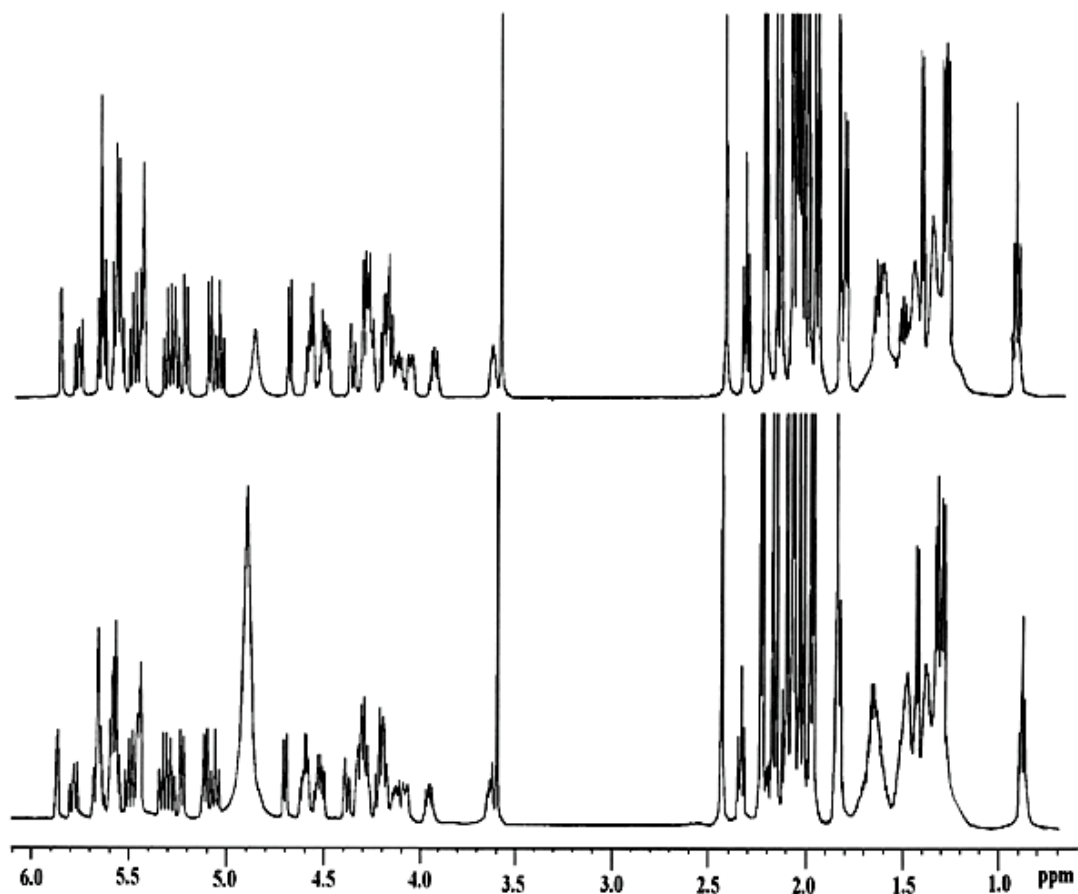


Figura 11. Espectros de RMN ¹H (400 MHz, piridina-d₅) para el derivado metilado peracetilado de los ácidos púrgico A (trazo superior) y púrgico B (trazo inferior).

6.3.1. Elucidación estructural del compuesto con clave IOEMBFNMA5

El registro de los espectros unidimensionales de ^1H (Figura 12) y ^{13}C (Figura 13) fue el primer paso para obtener una información general acerca de la estructura novedosa para el ácido glicosídico D. Los desplazamientos químicos alrededor de 98-105 ppm en el espectro de ^{13}C correspondientes a los carbonos anoméricos (Figura 14c) permitieron establecer el número de unidades monosacáridas presentes en el núcleo del compuesto IOEMBFNMA5. Esta zona mostró siete señales anoméricas y, por lo tanto, la presencia de siete monosacáridos en la muestra. Otras señales características en el espectro de ^{13}C son las que aparecen alrededor de 57.7 a 64.7 ppm las cuales corresponden a hidroximetilenos no sustituidos. En el espectro de la muestra aparecieron dos señales en esta zona, junto con una señal adicional para un hidroxilo de la aglicona (63.6 ppm). El único azúcar descrito en las hexosas de las convolvuláceas que posee hidroximetilenos es la glucosa (Eich, 2008), por lo que la muestra IOEMBFNMA5 posee dos unidades de este monosacárido. La señal presente en la región de 176.6 ppm justifica la presencia del grupo carbonilo correspondiente al ácido glicosídico que confirma la aglicona.

El análisis del espectro de RMN- ^1H reveló la presencia de siete señales dobles en la zona de 4.7 a 6.5 ppm correspondientes a los protones anoméricos lo cual confirmó la presencia de siete unidades monosacáridas en la molécula como se había propuesto con base en el número de señales observadas para los carbonos anoméricos. Las señales dobles presentes en la zona 1.4 a 1.9 ppm son características de los grupos metilo de 6-desoxihexosas en el espectro de RMN- ^1H de la muestra IOEMBFNMA5 se observan cinco señales dobles en la zona, lo que indica que de los siete monosacáridos de la misma, cinco son metilpentosas. El auxilio de la técnicas espectroscópicas bidimensionales en la RMN (COSY) permitió la asignación de cada uno de los protones vecinales de las unidades monosacáridas y, con ello, resolver la zona tan compleja producida por la sobreposición de los protones metinos (3.5-6.0 ppm).

Cuadro 7. Desplazamiento químico (RMN ^1H y ^{13}C) para las señales anoméricas y los metilos de las pentosas.

^1H	^{13}C	H-6 (ppm)
4.83 d (7.6)	103.7	1.67 d (6.2)
5.10 d (7.6)	102.5	1.45 d (6.0)
5.10 d (7.6)	105.2	1.64 d (5.4)
5.74 d (7.6)	102.6	
5.79 d (7.5)	103.2	1.53 d (6.3)
6.25 d (7.8)	100.9	
6.45 br s	100.4	1.95 d (6.0)

Cuadro 8. Asignación de señales de ^1H y ^{13}C NMR para el compuesto IOEMBFNMA5

position	δ_{H}	δ_{C}	position	δ_{H}	δ_{C}
Qui-1	5.10 d (7.6)	102.5	Qui'-1	5.10 d (7.6)	105.2
2	4.10-4.04 ^a	80.9	2	4.08-4.01 ^a	77.4
3	4.63 dd (8.4, 8.3)	78.8	3	4.03-3.97 ^a	77.7
4	3.53 dd (9.0, 8.4)	77.1	4	3.63 dd (9.0, 8.8)	76.9
5	3.73-3.67 ^a	72.9	5	3.78-3.73 ^a	77.2
6	1.45 d (6.0)	18.4	6	1.64 d (5.4)	18.8
Glc-1	5.74 d (7.6)	102.6	Fuc-1	5.79 d (7.5)	103
2	4.29-4.22 ^a	78.1	2	4.35-4.24 ^a	73.6
3	4.19-4.12 ^a	73.8	3	4.35-4.24 ^a	4444
4	4.07-4.01 ^a	72.9	4	4.05-3.97 ^a	72.8
5	3.81-3.75 ^a	77.1	5	4.20-4.13 ^a	71.2
6a	4.43 dd (9.1, 3.0)	62.0	6	1.53 d (6.3)	17.1
6b	4.36-4.29 ^a		Qui"-1	4.83 d (7.6)	103.7
Rha-1	6.45 br s	100.4	2	4.05-3.97 ^a	75.8
2	4.82 dd (3.0, 1.5) ^a	71.9	3	4.20-4.13 ^a	78.4
3	5.31 dd (9.1, 3.0)	78.1	4	3.80-3.72 ^a	73.9
4	4.80-4.76 ^a	79.3	5	3.83-3.78 ^a	77.3
5	5.20 dd (9.0, 6.0)	68.0	6	1.67 d (6.2)	18.7
6	1.95 d (6.0)	19.0	Ipur-1 (aglicona)		176.6
Glc'-1	6.25 d (7.8)	100.9	2a	2.55-2.51 ^a	34.8
2	4.07-3.97 ^a	84.9	2b	2.50-2.46 ^a	
3	4.54 dd (9.0, 8.6) ^a	76.8	3	4.30-4.25 ^a	63.6
4	4.08-4.02 ^a	72.7	11	3.91 m	78.6
5	4.20-4.13 ^a	78.2	14	0.95 t (7.1)	14.4
6a	4.57-4.51 ^a	63.1			
6b	4.20-4.14 ^a				

^aOverlaped signal

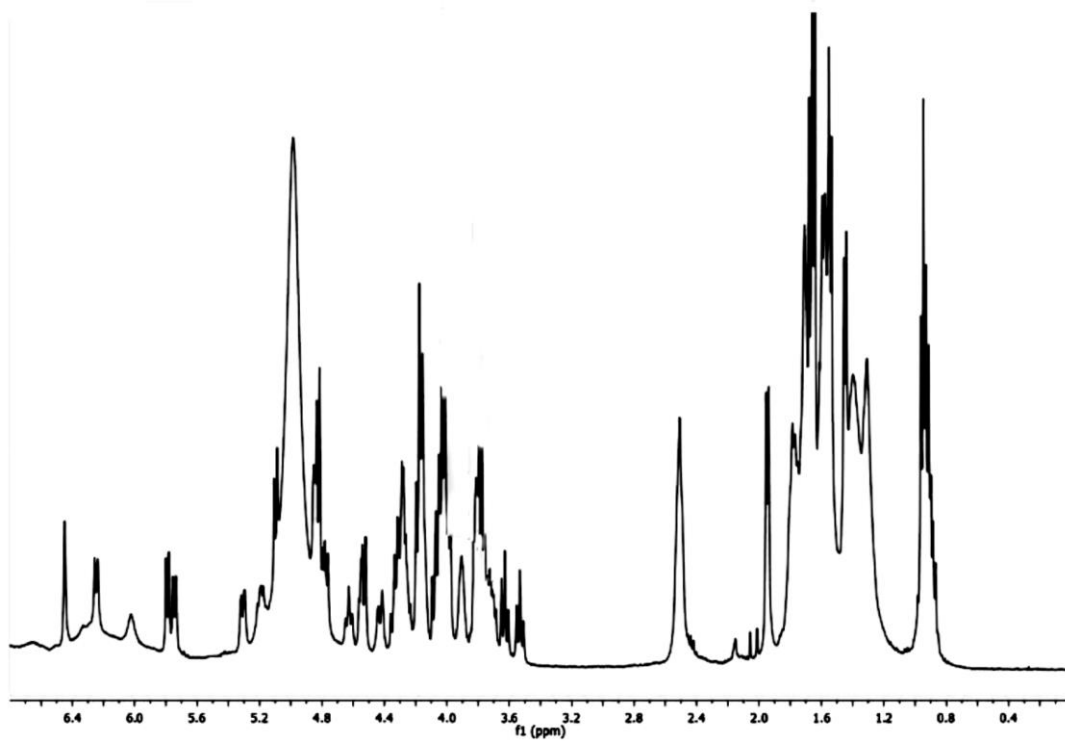


Figura 12. Espectro de RMN ^1H del ácido púrgico D.

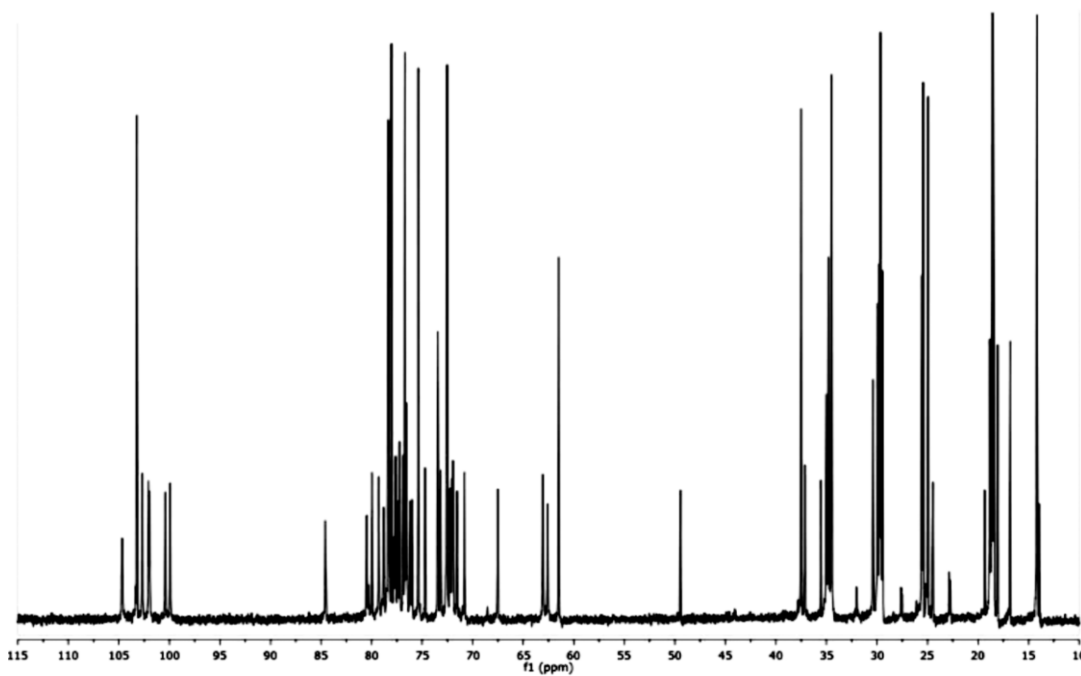


Figura 13. Espectro de RMN ^{13}C del ácido púrgico D.

El número de carbonos anoméricos (Figura 14c) estableció la presencia de siete monosacáridos, debido a que este tipo de carbonos dan una señal única y específica en el rango de 98-110 ppm. De esta forma, los desplazamientos químicos de los carbonos anoméricos constituyen señales diagnósticas de utilidad para el reconocimiento del patrón oligosacárido y se han utilizado como “huellas digitales” para el reconocimiento del patrón oligosacárido de cada resina glicosídica (Pereda-Miranda et al., 2006). La figura 5 muestra las resonancias resonancias anoméricas alrededor de δ 98-110 para el ácido glicosídico en estudio y la correspondiente a los dos ácidos glicosídicos previamente caracterizados a partir de la raíz de jalapa, los ácidos púrgicos A y B. Esta comparación permitió una estimación inmediata del número de los residuos monosacáridos diferentes en cada ácido glicosídico y permitió, mediante el cotejo los desplazamientos químicos entre los tres ácidos, la asignación de las señales para la RMN H1 y C13 del nuevo núcleo oligosacárido, denominado como ácido púrgico D.

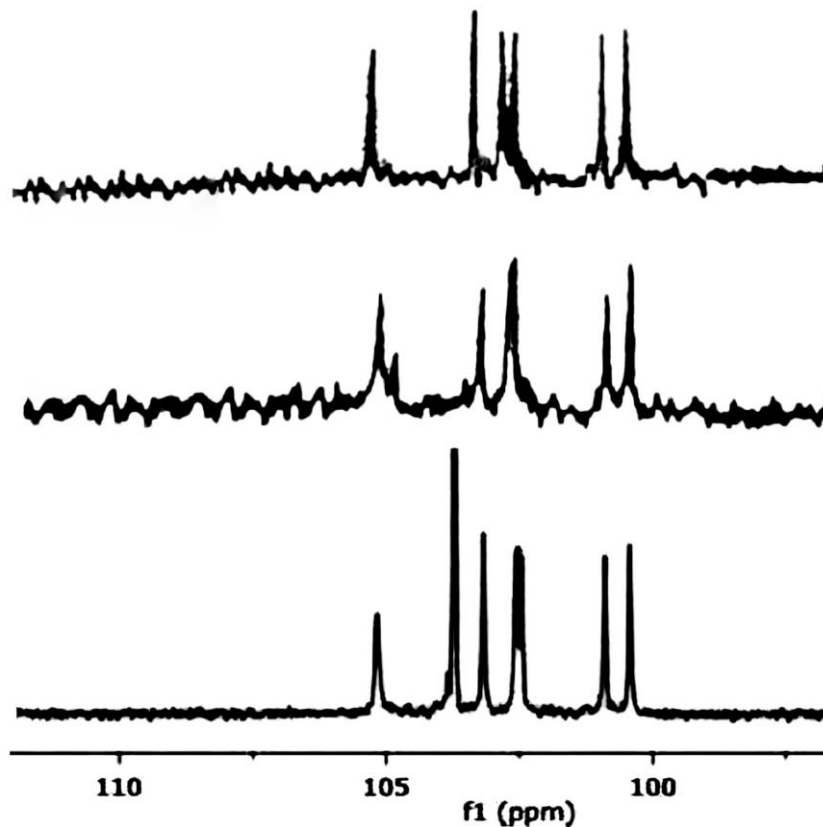


Figura 14. Expansión de las señales correspondientes a los carbonos anoméricos del espectro de RMN ¹³C en 98-105ppm. A) Hexasacárido del ácido Púrgico A; B) Hexasacárido del ácido Púrgico B; C) Es un heptasacárido de la muestra IOEMBFNMA5.

6.3.2. Espectrometría de masas

El análisis por espectrometría de masas del compuesto IOEMBFNMA5 se realizó mediante el empleo de una técnica de ionización suave, porque permite el análisis de los glicósidos sin necesidad de generar derivados volátiles (Pereda-Miranda et al., 2010). Además la espectrometría de masas, en sus variantes de electrospray (ESI) y por átomos acelerados (FAB), representa una técnica analítica esencial en la elucidación estructural de los glicolípidos de las convolvuláceas y de sus correspondientes ácidos glicosídicos ya que permite la detección de los iones quasimoleculares, tanto en su modalidad de detección de iones positivos, $[M + H]^+$ y/o $[M + Na/K]^+$, como negativos $[M - H]^-$. Estas especies cargadas son de utilidad para el establecimiento de la fórmula molecular (Pereda-Miranda et al., 2010).

En el espectro ESI-MS se observaron los picos que con mayor frecuencia se generan como productos de las fragmentaciones que provoca cada uno de los enlaces glicosídicos. Los resultados de esta técnica espectrométrica revelaron que el peso molecular del ácido glicosídico (IOEMBNMA5) corresponde a 1342 Da $[M + H]^+$. El patrón de fragmentación evidenció la pérdida consecutiva de unidades de metilpentosa 1197 $[M - 146]^+$, metilpentosa 1051 $[1197 - 146]^+$, hexosa 889 $[1051 - 162]^+$, metilpentosa 743 $[889 - 146]^+$, metilpentosa 597 $[743 - 146]^+$, hexosa 435 $[597 - 162]^+$, y metilpentosa 289 $[435 - 146]^+$. Este análisis confirma las observaciones previas de la presencia de cinco unidades de metilpentosa y dos unidades de hexosa. La formación del ión correspondiente a la aglicona m/z 289 permitió la identificación de la aglicona como el ácido hidroxihexadecanoico (Bautista et al., 2015).

Estos resultados se ajustaron a la siguiente fórmula molecular $C_{58}H_{102}O_{34}$, la cual corresponde al bidesmósido del ácido (3S,11S)-dihroxihexadecanoico conteniendo siete unidades monosacáridas, cinco de ellas metilpentosas y las dos restantes son hexosas. El patrón de fragmentación observado en el espectro de masas estableció que la unidad monosacárida adicional de metilpentosa se ubicaba en C-3 de la aglicona y el heterohexasacárido en C-11. Este análisis confirmó que la secuencia de glicosilación para el oligosacárido era similar al descrito para los ácidos púrgicos A y B (Figura 13). Así, las evidencias espectrométricas se encuentran en total concordancia con los resultados espectroscópicos (RMN), mismos que permitieron establecer la secuencia de glicosilación que se ilustra en la Figura 15. El espectro de masas generado por electrospray en el modo positivo para el ácido púrgico D se ilustra en la Figura 16.

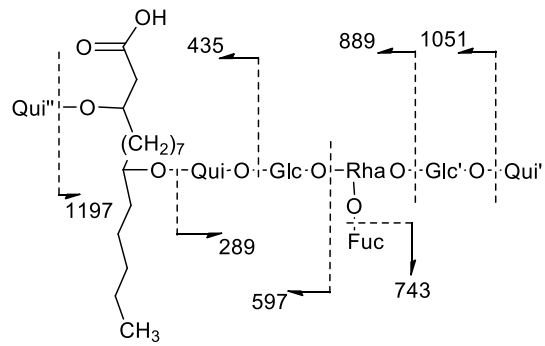


Figura 15. Patrón de fragmentación observado para el ácido púrgico D.

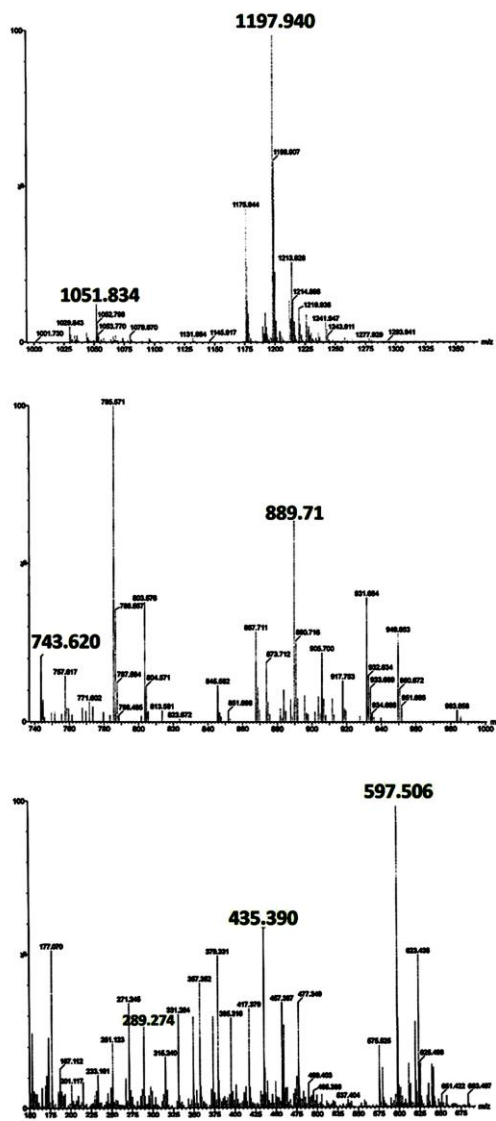


Figura 16. Espectro de masas (ESI-MS, modo positivo) del ácido púrgico D.

Los resultados anteriores permitieron establecer la estructura del ácido púrgico D (IOEMBFNMA5) como el 11-*O*-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[β-D-fucopiranosil-(1→4)]-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-quinovopiranosido del ácido 3*S*,11*S*-dihidroxihexadecanóico (Figura 17). La presencia de este núcleo oligosacárido, junto con los ácidos púrgicos A y B, permiten concluir que el material vegetal que utiliza la empresa Mixim S.A. de C.V. para la elaboración del extracto comercial de la escamonea no corresponde a la especie *Ipomoea orizabensis* (escamonea mexicana o falsa jalapa) ya que los núcleos glicosídicos de esta especie deberían corresponder a tetrasacáridos (Pereda-Miranda et al., 2006). Así, el empleo de la RMN ¹³C de los ácidos glicosídicos, es decir los productos de la saponificación de las resinas glicosídicas totales, generó los perfiles característicos que se utilizaron como “huellas digitales” para el reconocimiento del patrón hexasacárido para la porción oligomérica de los ácidos glicosídicos constitutivos de la auténtica raíz de jalapa (*Ipomoea purga*).

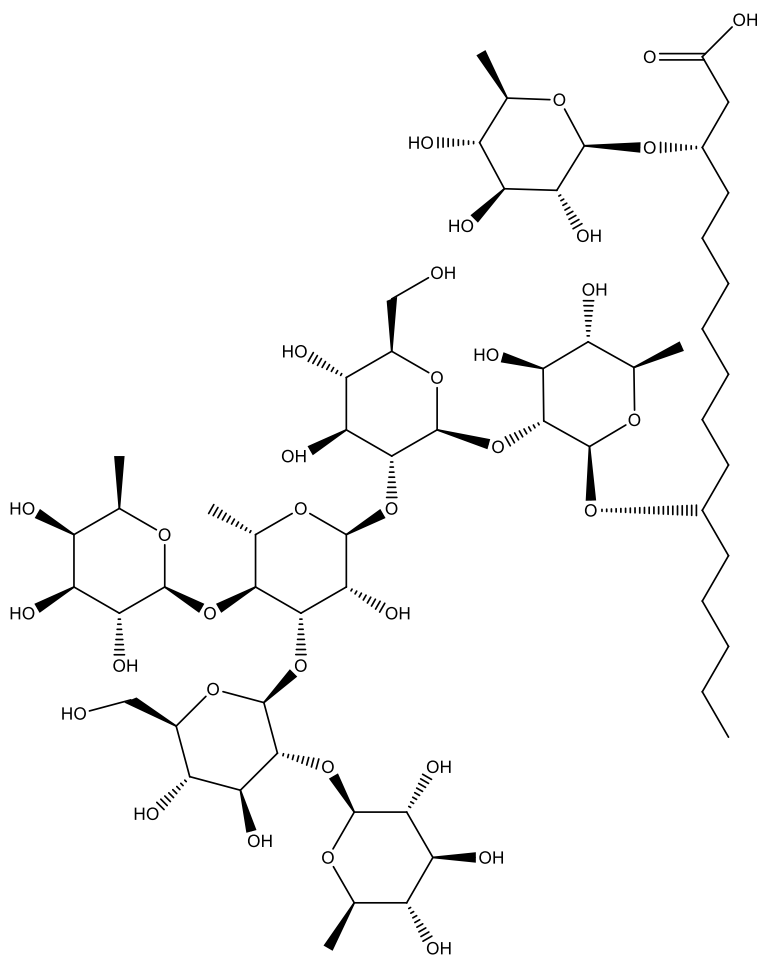


Figura 17. Estructura del ácido púrgico D, un nuevo ácido glicosídico presente en la muestra comercial del extracto metanólico de la escamonea.

7. Conclusiones

1.- El extracto metanólico (convolvulina) de la mezcla de resinas glicosídicas comercializado como la escamonea por los Laboratorios Mixim S.A. de C.V. reveló la presencia de una mezcla compleja de los glicolípidos responsables de su actividad purgante.

2.- Se logró el aislamiento de un nuevo ácido glicosídico constitutivo, el ácido púrgico D, que corresponde a uno de los núcleos oligosacáridos minoritarios de esta mezcla mediante el empleo de métodos químicos degradativos y la aplicación de técnicas cromatográficas de alta resolución (HPLC). Este análisis por cromatografía de líquidos fue el único camino posible para obtener una máxima pureza del compuesto de interés. El mejor soporte cromatográfico para el procedimiento de purificación de los ácidos glicosídicos fue una columna de fase reversa NH₂, es decir, un soporte de gel sílice desactivado con grupos aminopropilmetilsilano.

3.- La estructura del ácido glicosídico minoritario (IOEMBFNMA5) corresponde al 11-*O*-β-D-quinovopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→3)-*O*-[β-D-fucopiranosil-(1→4)]-*O*-α-L-ramnopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-glucopiranosil-(1→2)-*O*-β-D-quinovopiranosido del ácido 3*S*,11*S*-dihidroxihexadecanoico (ácido ipurólico). Este ácido es poco característico en las resinas glicosídicas ya que la mayoría contiene como aglicona al ácido jalapínico, ácido 11(*S*)-hidroxihexadecanoico.

4.- La presencia de este núcleo oligosacárido, junto con los ácidos púrgicos A y B, permiten concluir que el material vegetal que utiliza la empresa Mixim S.A. de C.V. para la elaboración del extracto comercial de la escamonea no corresponde a la especie *Ipomoea orizabensis* (escamonea mexicana o falsa jalapa) ya que los núcleos glicosídicos de esta especie deberían corresponder a los tetrasacáridos de los ácidos escamónicos y orizábicos.

8. Bibliografía

- Bah, M., Pereda-Miranda, R. (1996). Detailed FAB-mass spectrometry and high resolution NMR investigations of tricolorins A-E, individual oligosaccharides from the resins of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* 41, 13063-13080.
- Bah, M., Pereda-Miranda, R. (1997). Isolation and structural characterization of new glyclipid ester type dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron* 53, 9007-9022.
- Bah, M., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (1994). Hepatotoxic Pyrrolizidine Alkaloids in the Mexican Medicine Plant *Packera candidissima* (Asteraceae: Senecioneae). *Journal of Ethnopharmacology* 43, 19-30.
- Bautista, E., Fragoso-Serrano, M., Pereda-Miranda, R. (2015). Jalapinoside, a Macrocyclic Bisdesmoside from the Resin Glycosides of *Ipomoea purga*, as a Modulator of Multidrug Resistance in Human Cancer Cells. *Journal of Natural Products* 78, 168–172.
- Bodeker, G. (2004) Integrating Traditional and Complementary Medicine into National Health Care. En: *Herbal and Traditional Medicine. Molecular Aspects of Health*. Packer, L., Nam Ong, Ch., Halliwell, B. (Eds.) MerceL Dekker, New York, pp. 1-31.
- Castañeda-Gómez, J., Pereda-Miranda, R. (2011). Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (*Ipomoea purga*). *Journal of Natural Products* 74, 1148-1153.
- Cho, I.-H. (2012). Effects of *Panax ginseng* in Neurodegenerative Diseases. *Journal of Ginseng Research* 36, 342-353.
- Chung Leung, P. (2004) Can Traditional Medicine Coexist with Modern Medicine in the same Health care System. En: *Herbal and Traditional Medicine. Molecular Aspects of Health*. Packer, L., Nam Ong, Ch., Halliwell, B. (Eds.) MerceL Dekker, New York, pp. 33-52.
- Eich, E. (2008). Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites. . *Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook)*., 532 pp.
- Estrada Lugo, E. Plantas medicinales: Un complemento vital para la salud de los mexicanos. (P. M. Pérez, Ed.) *Revista Digital Universitaria*, 10 (9).
- Fabricant, D. S., Farnsworth, N. R. (2001). The Value of Plants Used in Traditional Medicine for Drugs Discovery. *Environment Health Perspective* 109, 69-75.
- Fragoso-Serrano, M., Figueroa-Gonzalez, G., Castro-Carranza, E., Hernandez-Solis, F., Linares, E., Bye, R., Pereda-Miranda, R. (2012). Profiling of Alkaloids and Eremophilanes in Miracle Tea

- (*Packera candidissima* and *P. bellidifolia*) Products. *Journal of Natural Products* 75, 890-895.
- Frampton, J. (1925). Joyfull Newes out of the Newe Founde World Written in Spanish by Nicholas Monardes. Vol. 1, Constable London, p. 54.
- Figueroa-González, G.; Jacobo-Herrera, N.; Zentella-Dehesa, A.; Pereda-Miranda, R. (2012) Reversal of Multidrug Resistance by Morning Glory Resin Glycosides in Human Breast Cancer Cells. *Journal of Natural Products* 75, 93–97.
- Gunther, R. (1968). The Greek Herbal of Dioscorides. Hafner, London.
- Hernández-Carlos, B., Bye, R., Pereda Miranda, R. (1999). Orizabins V–VIII, Tetrasaccharide Glycolipids from the Mexican Scammony Root (*Ipomoea orizabensis*). *Journal of Natural Products* 62, 1096-1100.
- Huguet-Termes, T. (2001). New World Materia Medica in Spanish Renaissance Medicine: From Scholarly Reception to Practical Impact. . *Medical History* 45, 359.
- Langenheim, J. (2003). Plant Resins. *Chemistry, Evolution, Ecology, and Ethnobotany.*, 418 pp.
- Linares, A., Rico-Gray, V., Carrión, G. (1994). Traditional Production System of the Root of Jalap, *Ipomoea purga* (Convolvulaceae), in Central Veracruz, Mexico. *Economic Botany* 48:84-89.
- Mannich C., Schumann P. (1938). Über Jalapenharz und dessen Hauptbestandteil, das Convolvulin. *Arch Pharm Ber Dtsch Pharm Ges* 276, 211-226.
- Martínez, M. (1990). En *Las Plantas Medicinales de México*. Ediciones Botas: México: pp. 276-279.
- McDonald, A. (1994). *Flora de Veracruz*. University of California: Riverside, CA: Instituto de Ecología, A.C. Xalapa.
- Mitscher, L. A., Telikepalli, H. (1992). Bioassay-directed Discovery of Natural Products Leads. Antibacterial and antifungals from unusual sources. En *In advances in Natural Product Chemistry*. Chur, Switzerland: Harwood Academic Publishers. pp. 281-309.
- Noda, N., Ono, M., Miyahara, K., Kawasaki, T., Okabe, M. (1987). Resin Glycosides. I. Isolation and Structure Elucidation of Orizabin-I, II, III and IV, Genuine Resin Glycosides from the Root of *Ipomoea orizabensis*. . *Tetrahedron* 43, 3889-3902.
- Pereda-Miranda, R. (1995). Bioactive Natural Products from Traditional Used Mexican Plants. (J. T. Arnason, R. Mata, & T. Romeo, Edits.) In: *Phytochemistry of Medical Plants*, 83-112.
- Pereda-Miranda, R., Bah, M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Curr Top Med Chem* (3), 111-131.

- Pereda-Miranda, R., Hernández-Carlos, B. (2002). HPLC Isolation and structural elucidation of diastereomeric niloyl ester tetrasaccharides from Mexican scammony root. *Tetrahedron* 58, 3145-3154.
- Pereda-Miranda, R., Kaatz, G. W., Gibbons, S. (2006). High-purity oligosaccharides are required for structure elucidation by NMR or MS and for use as substrates to determine their biological activity. *Journal of Natural Products* 69, 406-409.
- Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramírez, D., Castañeda-Gómez, J. (2010). Resin Glycosides from the Morning Glory. En A. D. Kinghorn, H. Falk, & J. Kobayashi (Edits.), *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Springer-Wien: New York, Vol. 92, pp. 77–152.
- Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M, Escalante-Sánchez, E., Hernández-Carlos, B, Linares, E., Bye, R. (2006). Profiling of the Resin Glycoside Content of Mexican Jalap Roots with Purgative Activity. *Journal of Natural Products* 69, 1460-1466.
- Pereda-Miranda, R., Bah, M. (2003). Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies Transcending Boundaries. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3, 111-131.
- Puerto Sarmiento FJ (1993). La Farmacia Renacentista Española y la Botica de El Escorial. Universidad Complutense de Madrid, pp. 97-108.
- Singh, S., Stacey, B. E. (1973). A new β -D-quinovoside from commercial Ipomoea purga. *Phytochemistry* 12, 1701-1705.
- Wagner, H. (1973). The Chemistry of Resin Glycosides of the Convolvulaceae Family. En G. Bendz, J. Santesson (Eds.), *In Medicine and Natural Sciences. Chemistry in Botanical Classification*. New York: Academic Press, pp. 235-240.
- Worth Estes, J. (2000). The Reception of American Drugs in Europe, 1500-1650. In: Varey S, Chabrán R, Weiner DB (eds). *Searching for the Secrets of Nature. The Life and Works of Dr. Francisco Hernández*, Stanford University Press, Stanford, California, p111-117.