



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

“Elucidación estructural de una resina glicosídica de
Operculina hamiltonii (Convolvulaceae)”

T E S I S

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

CITLALI BUENDÍA IZQUIERDO



CDMX

2019



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

Presidente	Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda
Primer Vocal	Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz
Secretario	Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar
Primer Suplente	Dra. Berenice Ovalle Magallanes
Segundo Suplente	Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor

Dr. Rogelio Pereda Miranda

Supervisor técnico

Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano

Sustentante

Citlali Buendía Izquierdo

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) por brindarme la oportunidad de ser parte de esta comunidad universitaria, de ser mi segundo hogar, así como de darme las herramientas necesarias para la culminación de una carrera profesional.

A la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (IN215016; IN208019) y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación.

Al Dr. Rogelio Pereda Miranda brindarme la oportunidad de participar en su equipo de investigación, así como compartir sus conocimientos y la dedicación durante la dirección de la investigación.

A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano por su apoyo, paciencia y constante asistencia técnica en cada procedimiento experimental y escrito de este trabajo.

A la M. en C. Nayeli López Balbiaux de la Unidad de Servicios y Apoyo a la investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM, por el registro de los espectros de resonancia magnética nuclear.

Al Dr. Carlos Martín Cerda del Departamento de Química del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional por el registro y determinación de rotación óptica.

A la Dra. Suzana G. Leitão (Facultad de Farmacia, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Brasil) por el registro de espectrometría de masas.

A los miembros del Jurado quienes, me brindaron las observaciones objetivas que contribuyeron al enriquecimiento de este escrito: Dra. Isabel del Carmen Rivero Cruz y Dr. Mario Alberto Figueroa Saldívar.

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE CUADROS.....	V
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO 2.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1. Familia Convolvulaceae.....	3
1.1. Propiedades.....	3
1.2. Género <i>Ipomoea</i>	4
1.3. Especies de jalapas endémicas de Brasil.....	6
1.3.1. <i>Operculina macrocarpa</i>	7
1.3.2. <i>Operculina hamiltonii</i>	8
1.3.3. Clasificación taxonómica de <i>Operculina hamiltonii</i>	11
2. Usos medicinales y preparados fitofarmacéuticos.....	12
2.1. Preparados fitofarmacéuticos.....	12
2.1.1. Administración y dosificación.....	13
3. Resinas glicosídicas en familia Convolvulaceae.....	13
3.1. Características estructurales.....	13
3.2. Composición Química.....	16
3.3. Ácidos Operculínicos.....	19
4. Métodos analíticos.....	21
4.1. Métodos de separación.....	21
4.2. Método de Elucidación Estructural.....	23
CAPÍTULO 3.....	24
JUSTIFICACIÓN.....	24
CAPÍTULO 4.....	25
OBJETIVOS.....	25
OBJETIVOS ESPECIFICOS:.....	25

CAPÍTULO 5	26
PARTE EXPERIMENTAL	26
5. Métodos cromatográficos.	26
5.1. Material vegetal.....	26
5.1.1. Preparación del extracto orgánico.	27
5.2. Fraccionamiento primario del extracto orgánico.	27
5.3. Separación y purificación.	28
5.3.1. Cromatografía en capa fina.	28
5.3.2. Purificación de muestra.	28
5.4. Determinación de las constantes físicas y propiedades espectroscópicas.	29
5.5. Determinación de las propiedades espectrométricas.	29
CAPÍTULO 6	31
RESULTADOS.....	31
6.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico.	31
6.2 Aislamiento y purificación.....	31
6.2.1 HPLC a escala analítica.	31
6.2.2 HPLC a escala preparativa.....	32
6.2.3 Purificación del pico F4P9.	33
6.2.4 Elucidación estructural del pico F4P9.	34
6.2.5 Elucidación de los constituyentes intactos.	36
CAPÍTULO 7	47
CONCLUSIONES	47
CAPÍTULO 8	48
REFERENCIAS	48

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Forma de crecimiento de las convolvuláceas (Watson & Dallwitz, 2000).	3
Figura 2. Material herbal de la especie <i>Ipomoea purga</i> : flor de lado izquierdo y raíces tuberosas del lado derecho (Castañeda-Gómez, 2011, 2012).....	4
Figura 3. La raíz de jalapa fue el principal ingrediente purgante en la medicina herbolaria prehispánica. <i>Ipomoea purga</i> conocida como <i>huelicpathli</i> en náhuatl con la descripción latina de su uso como purga para el vientre (<i>purgatio ventris</i>) en esta ilustración del Manuscrito Badiano (F.32r).	5
Figura 4. Distribución de la raíz de jalapa brasileña <i>Operculina macrocarpa</i>	7
Figura 5. Raíz de la jalapa brasileña, <i>Operculina macrocarpa</i>	8
Figura 6. Distribución geográfica de la batata de purga <i>Operculina hamiltonii</i>	9
Figura 7. Raíces tuberosas de <i>Operculina hamiltonii</i>	9
Figura 8. <i>Operculina hamiltonii</i> . (A) Flor amarilla; (B) Cáliz pedúnculo y brácteas; (C) Hojas con forma puntiaguda; (D) Fruto seco y semillas.....	10
Figura 9. Raíz tuberosa de jalapa en rodajas (A); Batata de purga en fragmentos para infusiones (B); Extracto hidroalcohólico Sobral para una acción laxante disolviendo en agua (C); Batata de purga en polvo para disolver en agua (D).....	12
Figura 10. Estructura general de un glicolípido (Castañeda-Gómez et al., 2013).	14
Figura 11. Grabado europeo del siglo XVI de la raíz de Michoacán (<i>I. jalapa</i>), que debido a la suavidad de sus efectos purgantes se hizo popular en la medicina galénica como un sustituto de la escamonea (<i>C. scammonia</i>) del Viejo Mundo (Pereda-Miranda & Bah, 2003).	15
Figura 12. Diversidad estructural de las resinas en la raíz de la jalapa mexicana (<i>I. purga</i>). Donde el mismo pentasacárido del ácido 11 S-hidroxihexadecanoico se incorpora tanto en las macrolactonas individuales (purginósidos) y en las estructuras diméricas de tipo éster (purginas), la variación se observa en el número y la longitud de los residuos de acilación. Abreviaturas: mba, metilbutiroilo; Cna, trans-cinamoilo; hexa, hexanoilo.....	17
Figura 13. Estructura molecular de los ácidos operculínicos A-C.	20

Figura 14. CCF en gel de sílice del extracto de cloroformo del camote amarillo que ilustra la complejidad de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas y el fraccionamiento de las mismas. La purificación de la banda de mayor polaridad se realizó mediante HPLC.	22
Figura 15. Raíces pulverizadas de la jalapa brasileña comercializadas como "pó de batatão" y jalapa en el Mercado 2000 (Fotografía: R. Pereda).	27
Figura 16. A. Diagrama del sistema de reciclaje para un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC); B. Válvula de reciclaje.	30
Figura 17. Cromatograma por HPLC en condiciones analíticas.....	31
Figura 18. Perfil cromatográfico a escala preparativa mostrando los picos aislados por la técnica "corte de núcleo" (Moreno-Velasco, 2019).	32
Figura 19. Purificación del pico mayoritario de la fracción F4P9, utilizando la técnica de "reciclaje" así como "corte y rasurado de pico" (líneas punteadas).	33
Figura 20. Espectro de masas generado por electrospray en modo positivo del compuesto F4P9 donde se muestra la distribución isotópica y las abundancias relativas del aducto de sodio $[C_{59}H_{106}O_{25} + Na]^+$	34
Figura 21. Estructura molecular del ácido operculínico A.	35
Figura 22. Espectro RMN 1H del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).	36
Figura 23. Espectro de RMN 1H del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).	37
Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).	38
Figura 25. Cuadros de conectividad observados en espectro COSY para las unidades sacáridas (400 MHz, piridina – d_5).	39
Figura 26. Espectro TOCSY de la porción oligosacárida del compuesto F4P9 (400 MHz, piridina – d_5).	40
Figura 27. Espectro HSQC de la porción oligosacárida del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).	42
Figura 28. Espectro HMBC indicando la secuencia de glicosidación del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).	43
Figura 29. Espectro HMBC indicando la secuencia de glicosidación del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).	44
Figura 30. Estructura del compuesto F4P9.....	45

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de <i>O. hamiltonii</i>	11
Cuadro 2. Algunos sinónimos para la especie <i>O. hamiltonii</i> (Austin & Staples, 1983)..	11
Cuadro 3. Constantes físicas del compuesto puro F4P9.....	34
Cuadro 4. Constantes espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto F4P9.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS

Å	(Ángstrom) Unidad de longitud para expresar longitudes de onda, distancias moleculares y atómicas
CCA	Cromatografía en columna abierta
CCF	Cromatografía en capa fina
CG	Cromatografía de gases
CH ₃ CN	Acetonitrilo
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CH ₃ OH	Metanol
C ₆ H ₁₄	Hexano
cm	Centímetro
COSY	Espectroscopía de correlación homonuclear
d	Doblete
dd	Doble de doble
ddd	Doble de doble de doble
dq	Doble cuarteto
EM	Espectrometría de Masas
ESI	Ionización mediante “electrospray”
g	Gramo
GC-EIMS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.
HMBC	Correlación heteronuclear a múltiples enlaces
HPLC	Cromatografía de líquidos de alta resolución

HSQC	Espectroscopía de correlación heteronuclear de sistemas cuánticos simples.
IR	Índice de refracción
<i>J</i>	Constante de acoplamiento
kV	Kilovoltio
mg	Miligramo
MHz	Megahertz
min	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
<i>m/z</i>	Relación masa carga
piridina- <i>d</i> ₅	Piridina deuterada
ppm	Partes por millón
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13
t	Triplete
TOCSY	Espectroscopía de correlación homonuclear total
<i>t_r</i>	Tiempo de retención
uma	Unidad de masa atómica

UPLC-MS	Cromatografía de líquidos de alta eficiencia acoplado a espectrometría de masas
μL	Microlitro
μm	Micrómetro
δ	Desplazamiento químico
2D	Dos dimensiones
$[\text{M} + \text{H}]^+$	Catión de la molécula protonada
$[\text{M} - \text{H}]^-$	Anión de la molécula desprotonada
$(\text{CH}_3)_2\text{CO}$	Acetona

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN

El uso de plantas medicinales ha estado presente en todas las civilizaciones, de generación en generación, siendo una práctica muy común transmitir los conocimientos, para curar los malestares de la salud. En el siglo XXI, el uso de las plantas medicinales en las prácticas tradicionales médicas persiste en todo el mundo y, en nuestro país, el comercio de las plantas medicinales ha experimentado un intenso crecimiento debido al apogeo que han experimentado los remedios herbolarios a nivel mundial (Alonso-Castro *et al.*, 2017). También, en las últimas dos décadas, se ha observado un incremento en los estudios sobre las terapias naturales, principalmente de origen vegetal, de diversos sectores de las poblaciones latinoamericanas (Lobo *et al.*, 2010) y que han contribuido en el desarrollo de las prácticas de salud pública en países en vía de desarrollo como el nuestro. Según una encuesta reciente en nuestro país, el 54% de los profesionales de la salud y el 49% de los practicantes y fitoterapeutas han utilizado a las plantas medicinales como una alternativa para el tratamiento de numerosas enfermedades. El 28% de los profesionales de la salud y el 26% de los practicantes de la fitoterapia han recomendado o prescrito plantas para las dolencias digestivas y respiratorias (Alonso-Castro *et al.*, 2017).

México tiene miles de especies de plantas, en particular, los géneros *Ipomoea* y *Operculina* (Convolvulaceae) han estado en uso continuo para diferentes propósitos, tales como: nutricionales, medicinales, rituales y agrícolas (Meira *et al.*, 2012). La eficacia de muchas de estas plantas medicinales ha resistido el paso del tiempo entre las culturas por la aceptación de las personas con diferentes conceptos ideológicos-religiosos y tradiciones etnomédicas. Las plantas medicinales de Mesoamérica y Europa, así como de fuentes no occidentales fueron trasladadas a través de contactos europeos tempranos y se siguen utilizando en el México moderno en las comunidades rurales y urbanas, y en todos los niveles socioeconómicos y educativos (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

Los medicamentos derivados de origen vegetal ocupan un importante lugar tanto en la medicina tradicional como en la moderna. Se calcula que alrededor del 80% de los habitantes del planeta cubren principalmente con medicamentos tradicionales sus

necesidades de atención primaria de salud, por lo tanto, se puede asegurar sin temor a equivocarse que una gran parte de los tratamientos tradicionales entrañan el uso de extractos de plantas o de sus principios activos (Olayiwola, 1993).

El registro más antiguo de las prácticas médicas mesoamericanas es el Códice Badiano, un manuscrito de 1552, y constituye un compendio pequeño de algunas hierbas y remedios medicinales herbolarios aztecas con los nombres de las plantas en náhuatl e ilustraciones, aunque también refleja la influencia cultural de la tradición herbolaria europea a través de los textos escritos en latín (Bye & Linares, 2016). De un estimado de 5,000 plantas medicinales mexicanas, este compendio refiere 227 plantas medicinales, de las cuales hay imágenes de 185, incluyendo cinco especies de convolvuláceas, junto con sus respectivas propiedades terapéuticas (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

Las resinas glicosídicas se encuentran principalmente en la familia Convolvulaceae, siendo estos metabolitos anfipáticos inusuales con una estructura hidrofóbica (aglicona de ácidos grasos) y restos hidrófilos (oligosacáridos). Hasta la fecha, cientos de resinas glicosídicas han sido aisladas de diferentes géneros (Pereda-Miranda *et al.*, 2010). Estas resinas han demostrado diversas actividades biológicas y farmacológicas, tales como citotoxicidad en contra de diversas líneas celulares derivadas de tumores humanos (Nagano *et al.*, 2009), inhibidores de las bombas de flujo responsables de la resistencia a fármacos en células procarióticas (Pereda-Miranda *et al.*, 2006) y eucarióticas (Figueroa-González, *et al.*, 2012), actividad ionofórica (Pereda-Miranda *et al.*, 2009) y actividades inhibitoras del crecimiento vegetal (Lotina-Hennsen *et al.*, 2013), así como efectos sobre el sistema nervioso central (Song, 2015). Las investigaciones químicas de las resinas glicosídicas se iniciaron a mediados del siglo XIX; sin embargo, no fue hasta mediados de siglo XX que se logró la purificación de los primeros constituyentes intactos de las resinas glicosídicas (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

En el presente trabajo, se presenta la purificación y la caracterización estructural de una resina glicosídica purificada en la raíz de la jalapa brasileña de flores amarilla, *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples (Austin & Staples, 2011).

CAPÍTULO 2

ANTECEDENTES

1. Familia Convolvulaceae.

1.1. Propiedades.

El nombre de esta familia deriva del latín *convolvere* que significa entrelazado y se refiere a su crecimiento en forma de enredaderas que se entrelazan en un soporte (**Figura 1**). Esta familia se distribuye en las regiones tropicales y subtropicales del mundo; varias de estas especies han sido utilizadas como plantas ornamentales, alimentos, medicinas o en rituales mágico-religiosos (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).



Figura 1. Forma de crecimiento de las convolvuláceas (Watson & Dallwitz, 2000).

La familia Convolvulaceae comprende casi 1,600 especies con predominancia tropical, una de las características anatómicas más notables de la familia es la existencia de células que secretan resinas glicosídicas en los tejidos foliares y en las raíces de las plantas. Estas resinas constituyen un importante marcador taxonómico en la familia y son los responsables de las propiedades purgantes. La resina es un complejo de productos químicos sólidos anfipáticos denominados colectivamente como jalapina (soluble en éter) o convolvulina (insoluble en éter) que ocurren en el peridermo (tejido fino que reviste al cuerpo vegetativo secundario de la corteza) de las raíces tuberosas. Las resinas glicosídicas son partes de una familia extensa de metabolitos secundarios conocidos como glicolípidos, una clase de metabolitos de origen biosintético mixto, de alto peso molecular y con una elevada complejidad estructural, únicos de la familia de las convolvuláceas (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

1.2. Género *Ipomoea*.

El género *Ipomoea* cuenta con al menos 600-700 especies, el cual comprende el mayor número de especies dentro de la familia Convolvulaceae. Este género presenta a menudo hojas en forma de corazón y flores en forma de embudo. El género *Ipomoea* se produce en los trópicos del mundo, aunque algunas especies también alcanzan las zonas templadas. Las especies de este género se distribuyen principalmente en todos los territorios de África tropical y en los países de América del Sur y Central, incluyendo México (Meira *et al.*, 2012).

“Cacamotitlanoquiloni” es el término azteca para los remedios purgantes que consistían principalmente de raíces en forma de tubérculos, conocidos colectivamente como “cacamotli”, que se traduce como papa (camotli = camote o raíz comestible) (**Figura 2**). Aunque en el Códice Badiano, se agrupa a las plantas medicinales de acuerdo con su hábitat, apariencias y efectos, las investigaciones contemporáneas han identificado a todas estas raíces como pertenecientes al mismo género *Ipomoea*.



Figura 2. Material herbal de la especie *Ipomoea purga*: flor de lado izquierdo y raíces tuberosas del lado derecho (Castañeda-Gómez, 2011, 2012).

El conocimiento etnofarmacológico de las especies que contienen resinas glicosídicas influyó fuertemente en la investigación química temprana de estos principios activos y la caracterización de su estructura química (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

Investigaciones contemporáneas han identificado la composición química de las raíces pertenecientes al complejo medicinal de la raíz de jalapa y permitieron el reconocimiento botánico de la especie oficial o raíz de Jalapa a la especie *I. purga* y como falsas jalapas a las especies *I. orizabensis* (escamonea mexicana), *I. stans* (raíz de tumbavaqueros) e *I. jalapa* (Raíz de Michoacán) (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).

Las raíces de jalapa productora de resinas de sabor acre atrajeron la atención de los colonos españoles (**Figura 3**), ya que sus propiedades purgantes eran importantes para la medicina galénica europea del siglo XVI y se convirtieron en un sustituto de la raíz de escamonea (*Convolvulus scammonia*), un remedio purgante utilizado en el imperio romano desde la época precristiana. La identificación precisa de esta raíz fue muy discutida, aunque ahora se acepta que corresponde a la especie *I. purga* (Pereda-Miranda *et al.*, 2006).



Figura 3. La raíz de jalapa fue el principal ingrediente purgante en la medicina herbolaria prehispánica. *Ipomoea purga* conocida como *huelicpathli* en náhuatl con la descripción latina de su uso como purga para el vientre (*purgatio ventris*) en esta ilustración del Manuscrito Badiano (F.32r).

Ipomoea es un género que ha demostrado potencial como una fuente de agentes terapéuticos. Estas especies se utilizan en diferentes partes del mundo para el tratamiento de numerosas enfermedades, tales como: diabetes, hipertensión, disentería, estreñimiento, fatiga, artritis, reumatismo, hidrocefalia, meningitis, enfermedades renales e inflamatorias. Los estudios químicos y evaluaciones biológicas de algunas de estas especies han demostrado actividad antimicrobiana, analgésica, espasmolítica, espasmogénica, hipoglucemiante, hipotensora, anticoagulante, antiinflamatoria, psicotomimética y anticancerígena (Meira *et al.*, 2012).

1.3. Especies de jalapas endémicas de Brasil.

Brasil es uno de los países más megadiversos en el mundo, con 46,096 especies de plantas en más de nueve ecosistemas diferentes. A pesar de la tradición de uso y aceptación de las plantas medicinales por la población brasileña, el número de productos herbolarios con licencia en el país es pequeño en comparación con otras naciones como las europeas. En la actualidad, hay 101 especies de plantas con licencias autorizadas por el organismo de salubridad brasileño autorizado, la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, como productos medicinales herbolarios (Bezerra *et al.*, 2018). *Operculina hamiltonii* es una de estas especies endémicas nativas reconocida como un principio medicinal irritante o estimulante de la mucosa intestinal como laxante y se comercializa ampliamente en el norte y noreste del territorio brasileño.

El complejo medicinal de las jalapas brasileñas está constituido por dos especies del género *Operculina*: *O. macrocarpa* (jalapa de flores blancas) y *O. hamiltonii* (jalapa de flores amarillas), ambas son plantas “trepadoras” que pertenecen a la familia Convolvulaceae y son comunes en la vegetación secundaria de las zonas costeras, en áreas fangosas y de suelo profundo de la cuenca del río Amazonas. Publicaciones etnobotánicas y fitofarmacéuticas citan los usos de las especies de *Operculina* como purgativo, antihelmíntico, purificador de la sangre, remedio contra el derrame cerebral y como un tratamiento para las infecciones uterinas en forma de rodajas de raíces secas y drogas crudas en polvo; además, numerosos productos que incluyen soluciones alcohólicas y píldoras se comercializan ampliamente (Lira-Ricárdez *et al.*, 2019).

1.3.1. *Operculina macrocarpa*.

La jalapa brasileña conocida como “batata de purga” tiene como especie oficial a *O. macrocarpa* (L.) Urb., cuyos sinónimos son *Ipomoea operculata* Mart. y *Convolvulus macrocarpus* L. Se utiliza debido a sus propiedades laxantes y purgantes, contra enfermedades de la piel y en el tratamiento de leucorrea (Gomes *et al.*, 2009). Además, los productos tradicionales de las raíces de esta especie se utilizan para tratar las alteraciones circulatorias, como la trombosis que mediante estudios experimentales han mostrado actividades antiplaquetarias y anticoagulantes (Pierdoná *et al.*, 2014). Con respecto a su actividad laxante, varios estudios atribuyen esta propiedad a las resinas glicosídicas presentes en las raíces (Galvao *et al.*, 2014).

Operculina macrocarpa es herbácea con tallos lisos, retorcidos, rojizos, circulares a estrecho; su hoja con peciolo de 2.5-7.5 cm de largo, palmeada de 5-7 lóbulos o en partes, los lóbulos laterales menos diferenciados que los terminales y más cortos, todos oblongos a elípticos, atenuados de forma basal y apical. Sus flores tienen una forma de embudo radial y simétrico con corolas blancas. Esta especie se distribuye en la costa de Brasil en el bioma de la “mata atlántica” (Austin & Staples, 1983) (**Figura 4**).



Figura 4. Distribución de la raíz de jalapa brasileña *Operculina macrocarpa*.

Las resinas glicosídicas se encuentran en todas las especies de la familia Convolvulaceae y son los ingredientes activos relacionados con las actividades purgantes o laxantes en varias plantas medicinales que se usan tradicionalmente como laxantes, incluyendo *O. macrocarpa* (**Figura 5**). La composición química de la resina se puede dividir en dos grupos: las resinas glicosídicas solubles en éter, conocida como jalapa; y las resinas glicosídicas insolubles en éter, llamada convolvulina. Aunque hay varios estudios científicos de jalapa, la convolvulina sigue siendo poco conocida (Galvao *et al.*, 2014).



Figura 5. Raíz de la jalapa brasileña, *Operculina macrocarpa*.

1.3.2. *Operculina hamiltonii*.

Esta enredadera es una planta perenne, en forma de liana, con raíz tuberosa y lisa, los tallos aéreos, las porciones más viejas se estrían en espiral longitudinalmente, hasta al menos 5 mm de diámetro, lisas a escasamente pubescentes (pelos finos y cortos). Se encuentra distribuida en América Central, las Antillas y norte de América del Sur (**Figura 6**) (Staples, 2011). Sus flores, también, tienen una forma de embudo de color amarillo. Los peciolos presentan expansiones membranosas o al menos estriados de 8-35 mm de largo. Sus hojas son simples, en forma de corazón, amplias en su mayoría, a veces con figura puntiaguda, concavidad profunda y ocasionalmente tan superficial como para dar a la base de la hoja una apariencia redonda con márgenes enteros (Staples, 2011). Al igual que para todas las especies medicinales purgantes, una de las características

anatómicas notables en *O. hamiltonii* es la presencia de células en los tejidos foliares, florales y el peridermo de las raíces tuberosas y semillas que secretan resinas glicosídicas (**Figura 7**).

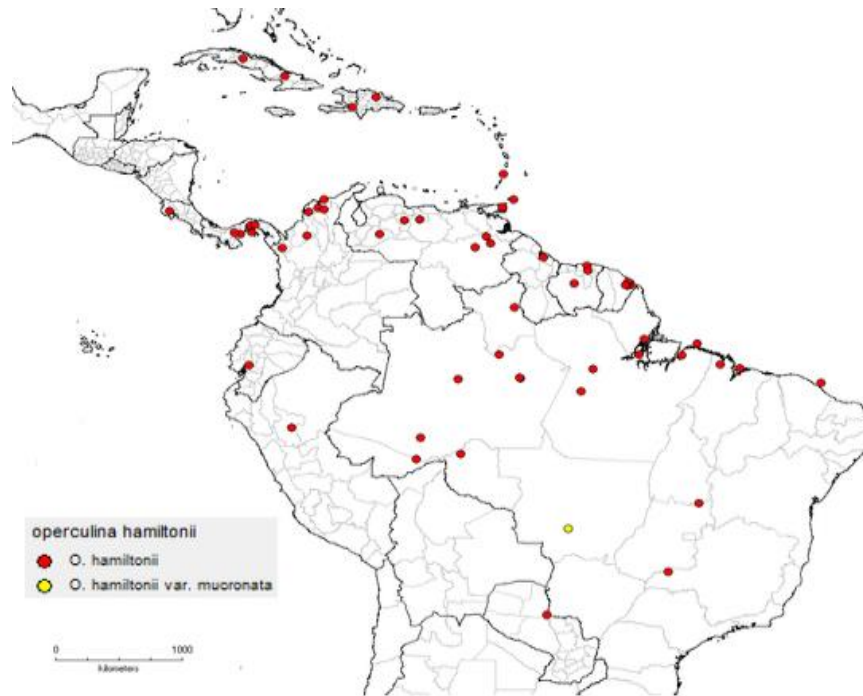


Figura 6. Distribución geográfica de la batata de purga *Operculina hamiltonii*.



Figura 7. Raíces tuberosas de *Operculina hamiltonii*.

Las flores son axilares, solitarias; con pedúnculos estriados de forma angular, a veces con alas distales, lisas, que exceden en gran medida el peciolo sutil, 33-80 mm de largo; dos brácteas avadas, base redondeada, lámina membranosa, cuando están presentes en estado seco son marrón rojizo, 7-16 mm de largo y 3-6.5 mm de ancho; pedicelos claviformes, angulados y lisos, de 15-25 mm de largo, engrosados en la fruta, que se tornan fuertemente en cinco ángulos; sépalos iguales, ampliamente ovados; corola campanulada dentada, amarillo brillante, hirsuta (cubierta de pelos rígidos y ásperos al tacto), punta pequeña y corta o de lo contrario, lisas, 35-52 mm de largo y 33-51 mm de ancho; estambres incluidos, filamentos que se adhieren de 2/3 a 3/4 de su longitud; el fruto capsular cónico color pardo al secarse de 7-10 mm de largo y de 5-8 mm de ancho en la base con cinco valvas y de una a cuatro semillas redondas negras de 4-5 mm (**Figura 8**) (Staples, 2011).

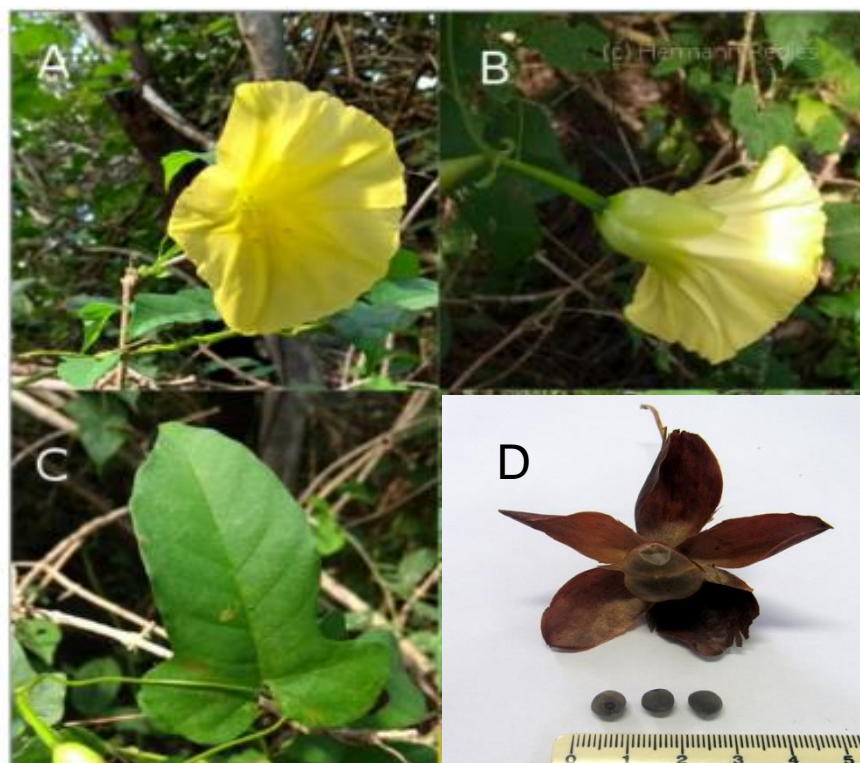


Figura 8. *Operculina hamiltonii*. (A) Flor amarilla; (B) Cáliz pedúnculo y brácteas; (C) Hojas con forma puntiaguda; (D) Fruto seco y semillas.

1.3.3 Clasificación taxonómica de *Operculina hamiltonii*.

Las especies del género *Operculina* (Convolvulaceae) se citan en estudios etnobotánicos como recursos terapéuticos en el tratamiento de enfermedades parasitarias. *Operculina hamiltonii* (**Cuadro 1**) es también una planta ornamental, cuyos nombres comunes varían según la región: *batata purga*, jalapa brasileña, jalapa, *raíz-do-jeticucu* y *mechoacam*. Algunas sinonimias se incluyen en el **Cuadro 2**. Su uso etnomedicinal está asociado con propiedades antiparasitarias y purificadoras de la sangre, como lo reconocen las poblaciones locales de noreste brasileño que la emplean (Bitu *et al.*, 2017).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *O. hamiltonii*.

Especie (Nombre científico)	<i>Operculina hamiltonii</i>
Reino	Plantae
Phylum	Tracheophyta
Clase	Magnoliopsida
Orden	Solanales
Familia	Convolvulaceae
Género	<i>Operculina</i> Silva Manso
Epíteto específico	<i>hamiltonii</i>

Cuadro 2. Algunos sinónimos para la especie *O. hamiltonii* (Austin & Staples, 1983).

<i>Operculina hamiltonii</i> (G. Don) D.F. Austin & Staples
<i>Convolvulus triqueter</i> Vahl <i>Ipomoea alulata</i> Miq. <i>Ipomoea hamiltonii</i> G. Don <i>Ipomoea pterodes</i> Choisy <i>Ipomoea triquetra</i> (Vahl) Roem. & Schult. <i>Operculina alata</i> Urb. <i>Operculina altissima</i> Meisn. <i>Operculina pterodes</i> (Choisy) Meisn. <i>Operculina triquetra</i> (Vahl) Hallier f.

2. Usos medicinales y preparados fitofarmacéuticos

2.1 Preparados fitofarmacéuticos.

Estos preparados fitofarmacéuticos se pueden encontrar en el mercado como droga cruda en rodajas o bien pulverizada, soluciones hidroalcohólicas, jarabes, píldoras, entre otros (**Figura 9**). Los medicamentos crudos catárticos se derivan de las raíces que son ricas en resinas (10-18%) y provocan movimientos peristálticos en el intestino delgado. Los remedios caseros se preparan como decocción, normalmente una sección de 2 cm de raíz por litro de agua. Los productos fitofarmacéuticos se presentan en forma de extractos alcohólicos líquidos, polvos de raíz o resinas que se consumen individualmente o en combinación con otros ingredientes para modificar el efecto terapéutico (Pereda-Miranda & Bah, 2003).



Figura 9. Raíz tuberosa de jalapa en rodajas (A); Batata de purga en fragmentos para infusiones (B); Extracto hidroalcohólico Sobral para una acción laxante disolviendo en agua (C); Batata de purga en polvo para disolver en agua (D).

2.1.1. Administración y dosificación.

1. Se usa como infusión (agua de tiempo) -dejando la droga cruda en agua fría; o la raspadura de la raíz seca en agua, revolviendo y obteniendo el agua para beber, así el efecto será suave y se podrá utilizar como un depurativo sanguíneo, provocando que los riñones trabajen mejor.
2. Se hace una harina con la raíz rallada, dejando secar el polvo y se pulveriza en un mortero. Se colocan dos gramos del polvo en agua fría, se mezclan y se bebe hasta dos veces al día para obtener un efecto depurativo y laxante. Si se requiere un efecto purgante fuerte, se adicionan dos cucharadas soperas de polvo.
3. Se puede preparar en dulce como el camote (*I. batata*) para comer y su efecto será suave en menores de edad.
4. La posología de la tintura de jalapa Sobral indica que para tener una acción laxante se debe tomar una cucharada sobera o 15 mL de la tintura disuelta en agua azucarada. Para una acción purgante, se deben tomar de dos a tres cucharadas soperas o de 30-45 mL disolviendo la tintura en agua azucarada.

3. Resinas glicosídicas en familia Convolvulaceae.

3.1. Características estructurales.

Las investigaciones químicas sobre estos glicósidos se iniciaron a mediados del siglo XIX. Las resinas glicosídicas constituyen un conjunto de glicolípidos de alto peso molecular, cuya porción hidrofílica está compuesta de un núcleo oligosacárido y la porción hidrofóbica por una aglicona que está representada por un ácido graso mono o dihidroxilado de 16 ó 14 átomos de carbono unidos a través de un éster cíclico intramolecular. La mayoría de las veces, el núcleo oligosacárido se encuentra esterificado por ácidos grasos saturados con diferentes longitudes de cadena (**Figura 10**) (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013).

- Porción hidrofílica: oligosacárido.
- Porción hidrofóbica: aglicona.
- Ácidos orgánicos.

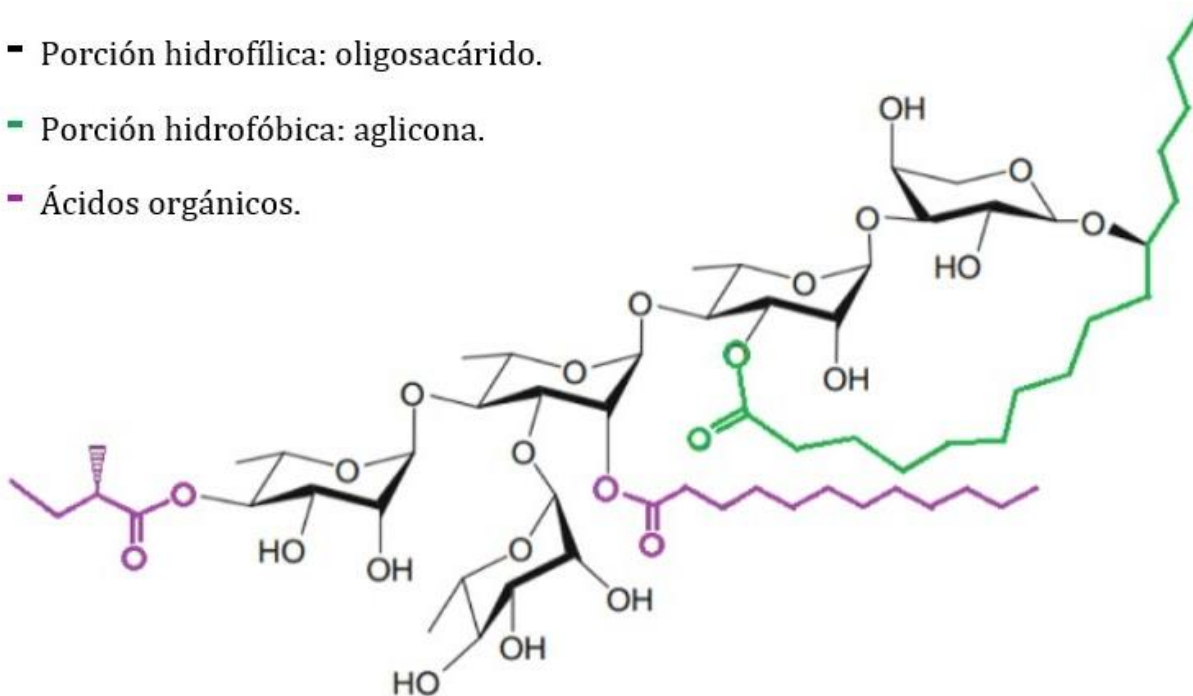


Figura 10. Estructura general de un glicolípido (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013).

Las resinas glicosídicas son constituyentes característicos de las resinas complejas. Estos compuestos representan metabolitos únicos en el reino vegetal confinados a las convolvuláceas. Además, pueden considerarse como los compuestos más específicos de su metabolismo secundario, ya que ocurren con frecuencia en esta familia y muestran una amplia distribución. La historia de su descubrimiento dependió principalmente de sus efectos farmacológicos, especialmente como remedios purgantes de interés de relevancia. Cabe señalar que las convolvuláceas, en general, se caracterizan por la aparición de estos fluidos lactíferos, como savia lechosa (**Figura 5**); en principio todas las partes de la planta pueden contener estos metabolitos; sin embargo, se localizan particularmente en la raíz (Eich, 2007); por lo tanto, estos órganos son adecuados como remedios (**Figura 11**). La presencia de las resinas glicosídicas se ha establecido a través de dos enfoques. El primero es por medio de un razonamiento etnomédico asociado con las propiedades laxantes de las drogas. El segundo corresponde al aislamiento de las resinas y la identificación de sus productos de hidrólisis, principalmente a través del aislamiento del ácido glicosídico producido mediante saponificación.

El grupo de las jalapinas comparte la estructura común de una macrolactona compuesta por un ácido glicosídico de hasta cinco unidades sacáridas poliacilado. Los miembros del grupo de la convolvulina poseen pesos moleculares mayores, *i.e.*, hexasacáridos y heptasacáridos, con un menor grado de acilación y, en su mayoría, corresponden a estructuras acíclicas (Lira-Ricárdez *et al.*, 2019).



Figura 11. Grabado europeo del siglo XVI de la raíz de Michoacán (*I. jalapa*), que debido a la suavidad de sus efectos purgantes se hizo popular en la medicina galénica como un sustituto de la escamonea (*C. scammonia*) del Viejo Mundo (Pereda-Miranda & Bah, 2003).

3.2. Composición Química.

Los componentes de las resinas glicosídicas se explican estructuralmente mediante la descomposición de la droga cruda. La hidrólisis alcalina de una resina glicosídica produce la escisión del macrociclo formado por el ácido glicosídico correspondiente, un ácido graso hidroxilado unido a un oligosacárido; la hidrólisis ácida del ácido glicosídico origina el ácido graso hidroxilado correspondiente (la aglicona, porción hidrofóbica) y los monosacáridos como compuestos individuales del oligosacárido original (porción hidrofílica). La mayoría de las veces los ácidos glicosídicos representan los glicósidos acíclicos naturales de una resina. Sin embargo, las unidades monosacáridas se encuentran aciladas adicionalmente por ácidos específicos (Eich, 2007).

La diversidad química de las resinas glicosídicas se ha dividido según el tamaño de sus núcleos oligosacáridos, lo que impone una secuencia lógica en su complejidad estructural entre los congéneres que se encuentran presentes en una misma especie. Numerosas especies acumulan núcleos de tetrasacáridos o pentasacáridos con una diversidad sustancial en el número y la longitud de los ácidos alifáticos de las cadenas acilantes. El número de cadenas esterificantes en los núcleos de azúcar normalmente oscila entre uno y cuatro con longitudes de cadena de 2 a 12 carbonos (Pereda-Miranda *et al.*, 2010). Muchas especies incorporan al menos una cadena de oligosacáridos en todas sus resinas y un ácido alifático común como residuo esterificante, por ejemplo, ácido 2-metilbutírico en *Ipomoea tricolor*, la “campanita” mexicana –*Mexican morning glory*– (Bah & Pereda-Miranda, 1996; Castañeda-Gómez *et al.*, 2019). Hasta la fecha, se han identificado un poco más de 60 ácidos glicosídicos diferentes para los cuales un gran número ha recibido nombres triviales basados en su fuente vegetal (Pereda-Miranda *et al.*, 2010), por ejemplo, ácidos tricolóricos, (*I. tricolor*), púrgicos (*I. purga*), escamónicos (*C. scammonia*) y operculínicos (*O. macrocarpa*), *inter alia* (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

La diversidad estructural de las resinas glicosídicas surge de las variaciones en el número y tipo de unidades sacáridas que componen el núcleo oligosacárido, en la secuencia de glicosidación, en la posición de lactonización y en el tipo, número y posición de los ácidos que se encuentran acilando al núcleo. Así, se han podido identificar desde disacáridos hasta heptasacáridos y dímeros tipo éster constituidos por tres hasta cinco

azúcares en cada unidad oligomérica. Estos núcleos se componen principalmente de cuatro carbohidratos, cuatro 6-desoxihexosas como son la D-fucosa, D-quinovosa, L-ramnosa, D-xilosa, y la D-glucosa como la única hexosa presente en esta clase de metabolitos aislados de plantas pertenecientes a la familia Convolvulaceae (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013). La **Figura 12** ilustra la diversidad estructural de las resinas glicosídicas de la raíz jalapa mexicana (*I. purga*). El mismo pentasacárido del ácido jalapínico, el ácido operculínico A -originalmente aislado de *O. macrocarpa* (Ono, 2017) se incorpora tanto en las macrolactonas individuales y las estructuras diméricas de tipo éster, mientras que las variaciones se observan en el número y la longitud de los residuos acilantes del núcleo oligosacárido (Castañeda-Gómez & Pereda-Miranda, 2011).

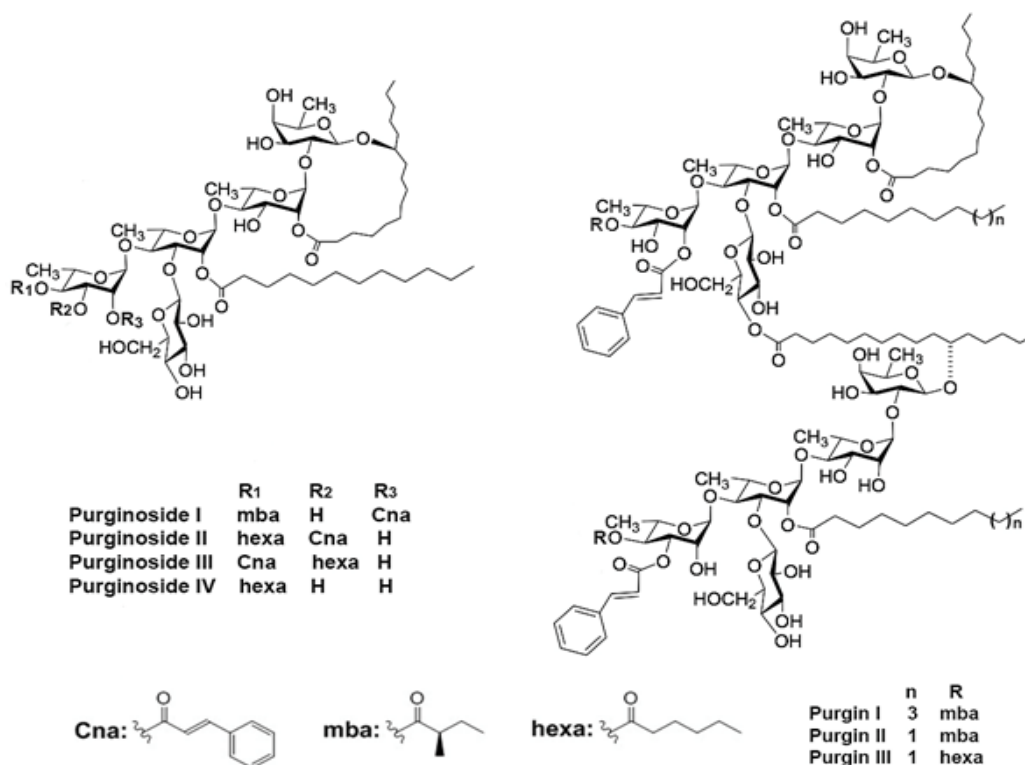


Figura 12. Diversidad estructural de las resinas en la raíz de la jalapa mexicana (*I. purga*). Donde el mismo pentasacárido del ácido 11 S-hidroxihexadecanoico se incorpora tanto en las macrolactonas individuales (purginósidos) y en las estructuras diméricas de tipo éster (purginas), la variación se observa en el número y la longitud de los residuos de acilación. Abreviaturas: mba, metilbutiroilo; Cna, *trans*-cinamoilo; hexa, hexanoilo.

En cuanto a la secuencia de glicosidación, se han encontrado oligosacáridos lineales o ramificados y los ácidos que con mayor frecuencia representan a la aglicona de las macrolactonas son los ácidos (11S)-hidroxihexadecanoico (ácido jalapινόlico) y el (11S)-hidrotetradecanoico (ácido convolvulinólico). Los ácidos carboxílicos que frecuentemente se encuentran acilando los núcleos oligosacáridos son derivados de cadena corta que incluyen a los ácidos acético (ac), propiónico (pa), *n*-butírico (ba), isobutírico (iba), (2S)-2-metilbutírico (mba), 3-metilbutírico (3-mba), (-)-(2*R*, 3*R*)-3-hidroxi-2-metilbutírico (ácido nilico, nla), y 2-metilbutenoico (tiglico, tga). También, se han encontrado ésteres derivados de ácidos grasos como el (2*E*)-3-fenil-2-propenoico (ácido cinámico, CA) y ésteres derivados de ácidos grasos con diferentes longitudes de cadena, tales como, el *n*-hexanoico (hexa) o caproico, *n*-octanoico (octa) o caprílico, *n*-decanoico (deca) o cáprico, *n*-dodecanoico (dodeca) o láurico, *n*-hexadecanoico (hexadeca) o palmítico, *n*-octadecanoico (octadeca) o esteárico, y *n*-eicosanoico (eicosa) o ácidos araquidónicos.

Las estructuras de las resinas glicosídicas son inusuales porque son metabolitos anfipáticos, lo que significa que contienen unidades hidrofóbicas (aglicona de ácidos grasos), así como restos hidrofílicos (azúcar o glicona). Los últimos están compuestos por un heteropolisacárido de sólo unos pocos residuos (hasta seis) y que no contienen más de cuatro unidades monosacáridas diferentes. La complejidad estructural surge de las variaciones en las posiciones de los enlaces glicosídicos como (1→2), (1→3), (1→4) y (1→6). El enlace O-glicosídico es el único que conecta los residuos de monosacáridos entre sí y con la aglicona. Los restos L – Rha – (1→2) – D – Fuc, L – Rha – (1→4) – L – Rha y D – Glc – (1→2) – D – Fuc representan subunidades de disacáridos altamente conservadas (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

La mayoría de estos glicolípidos contiene ácido jalapινόlico, (11S)-hidroxihexadecanoico, como la aglicona, que siempre está dispuesta para formar un anillo de macrolactona que abarca dos o más unidades de los esqueletos oligosacáridos. La diversidad química de éstos se incrementa aún más por las posibilidades divergentes de ciclación de los ácidos glicosídicos en sus macrolactonas correspondientes (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

3.3. Ácidos Operculínicos.

En el año de 1989, Ono y colaboradores estudiaron los compuestos que se encuentran en las resinas glicosídicas en la raíz de jalapa brasileña, en donde se describieron las estructuras de siete ácidos glicosídicos, los ácidos operculínicos A-G y dos ácidos orgánicos como las unidades esterificantes, *n*-decanoico y *n*-dodecanoico, siendo productos de una hidrólisis alcalina de las resinas glicosídicas solubles en éter. También, se describieron macrociclos intactos llamados como las operculinas que su elucidación estructural permitió establecer que tienen un ácido glicosídico en común, el ácido operculínico A (**Figura 13**) (Ono, 1989, 1990). Este ácido fue descubierto por Votocek & Prelog (1929) pero fue nombrado trivialmente 30 años después por Shellard (1961b) de acuerdo con su aislamiento a partir de *O. macrocarpa*. Votocek y Prelog creyeron haber aislado este compuesto también de la resina de *I. purga*; sin embargo, Shellard probó que había sido de la resina de *O. macrocarpa* (Eich, 2007).

Las estructuras químicas de los ácidos operculínicos mayoritarios corresponden a derivados oligosacáridos del ácido jalapínico: **A** (ácido hexadecanoico, (11S)-[(O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4))-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-galactopiranosil)oxi]), **B** (ácido hexadecanoico, (11S)-[(O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-glucopiranosil)oxi]), **C** (ácido hexadecanoico, (11S)-[(O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-galactopiranosil)oxi]), y **D** (ácido hexadecanoico, (11S)-[(O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)- β -D-xilopiranosil)oxi]) y **G** (ácido hexadecanoico, (11S)-[(O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-[2-O-metil- β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-galactopiranosil)oxi]) (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

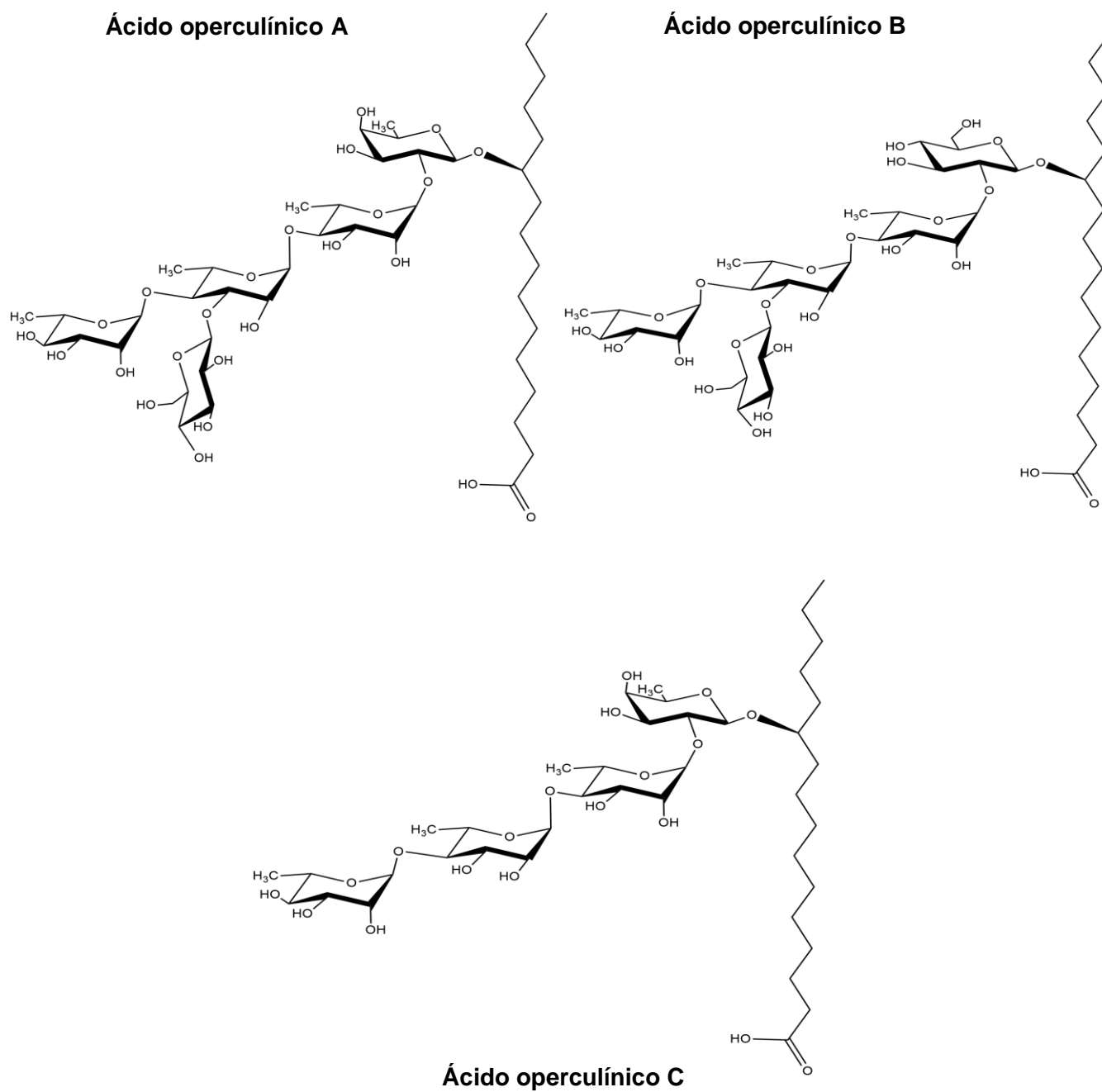


Figura 13. Estructura molecular de los ácidos operculínicos A-C.

Sus estructuras son similares, sólo se diferencian en la primera unidad monosacárida: para el ácido operculínico **A** es la unidad de D-fucosa del pentasacárido, para el ácido **B** es la D-glucosa de un pentasacárido y para el **C**, es D-fucosa de un tetrasacárido. (Pereda-Miranda *et al.*, 2010). Se han aislado treinta y ocho glicósidos acilados de resinas derivadas del ácido operculínico A y B. El sitio de lactonización de la aglicona se colocó en C-2 de la segunda unidad de sacáridos en todos los compuestos, excepto de la operculina V donde se colocó en C-3. Los diferentes de grupos acilantes en C-2 de la tercera unidad de sacáridos, y en C-2, C-3 y/o C-4 de cuarto sacárido, contribuyen a la diversidad química de estos pentasacáridos (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

4. Métodos analíticos

4.1. Métodos de separación.

Esta clase de moléculas anfipáticas no es muy fácil de aislar y purificar, ya que siempre se presentan como mezclas complejas de homólogos constituidas por el mismo núcleo oligosacárido, pero con diferentes sustituyentes alquilo o arilo que difieren en la longitud de la cadena. Aunque, existen muy pocas investigaciones sobre el aislamiento de glicolípidos a través de la cromatografía de capa delgada (**Figura 14**), este procedimiento no es adecuado para la purificación de los constituyentes individuales.

Los métodos de separación como la cromatografía de columna abierta usando gel de sílice, sephadex, intercambio iónico y filtración en gel fueron también empleados para la separación de estos compuestos, pero sin resultados exitosos. La naturaleza química (moléculas anfipáticas) y la complejidad de las resinas establecen la necesidad del empleo de métodos cromatográficos y espectroscópicos modernos de alta resolución para el aislamiento de los constituyentes individuales y su caracterización estructural (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013).

En la década de 1980, la aplicación de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) condujo al aislamiento de cuatro constituyentes naturales puros de una mezcla de resinas glicosídicas por primera vez. El uso de técnicas contemporáneas como la resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectrometría de masas de alta resolución (MS) permitió la caracterización de la estructura de compuestos macrolactónicos

individuales y forzó el replanteamiento de la hipótesis sostenida de una estructura polimérica para esta clase de compuestos (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

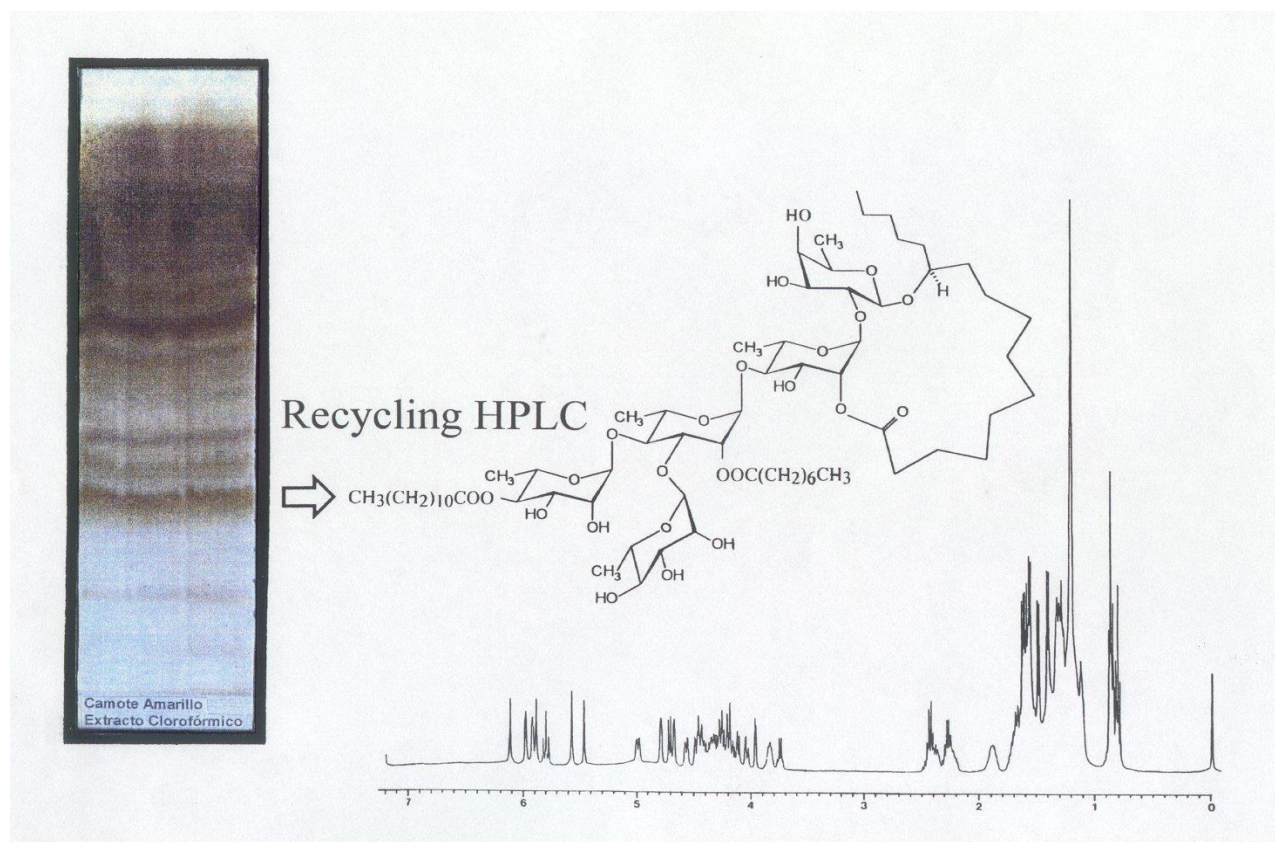


Figura 14. CCF en gel de sílice del extracto de cloroformo del camote amarillo que ilustra la complejidad de las resinas glicosídicas de las convolvuláceas y el fraccionamiento de las mismas. La purificación de la banda de mayor polaridad se realizó mediante HPLC.

La técnica de (HPLC) permite la separación de componentes de una mezcla, proporcionando una resolución máxima en tiempos cortos de análisis a través de la disponibilidad de pequeños tamaños de partículas (< 25 μm en formas irregulares y esféricas), tamaños de poros (60 y 130 \AA) y fases estacionarias modificadas (de gel de sílice). Los principales desafíos técnicos se presentan para encontrar los factores analíticos más favorables (fases estacionarias y móviles, modos de elución isocrático o gradiente y concentración de la muestra) y luego escalarlos a condiciones preparativas sin perder la resolución. La fase normal de gel de sílice y las fases reversas gel de sílice

(C₈, C₁₈, ciano y fenilo) se han utilizado ampliamente. La fase más exitosa y comúnmente empleada es la columna amino (fase unida a sílice aminopropilmetilo), este tipo de columna también se utiliza para el análisis de carbohidratos (Pereda-Miranda *et al.*, 2010).

4.2. Método de Elucidación Estructural.

Los principales métodos para la elucidación de las resinas glicosídicas involucran el uso de reacciones químicas degradativas o la aplicación de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013). Así, el método más empleado para la ruptura de los polisacáridos en moléculas simples mediante una reacción química es la saponificación, que permite obtener a los ácidos grasos correspondientes que se encuentran esterificando a los núcleos de oligosacáridos. Los ácidos glicosídicos obtenidos se someten a una reacción de hidrólisis en medio ácido para liberar así a los carbohidratos individuales y la aglicona correspondiente al fragmento que forma la macrolactona en la resina glicosídica. Los ácidos grasos libres, así como sus derivados metilados o ésteres se analizan mediante cromatografía de gases acoplada a la espectrometría de masas (GC-EIMS).

La longitud de la cadena de la aglicona que forma la macrolactona y su patrón de hidroxilación se determinan mediante el análisis directo por espectrometría de masas de impacto electrónico (EIMS) de la aglicona (ácidos grasos hidroxilados C₁₄ o C₁₆) o por (GC-EIMS) de sus derivados metilados o sililados (Castañeda-Gómez *et al.*, 2013).

CAPÍTULO 3

JUSTIFICACIÓN

Las resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae poseen múltiples actividades biológicas, tales como: antimicrobiana, analgésica, antiinflamatoria, siendo la más destacada su propiedad purgante que tiene una acción terapéutica sobre el intestino delgado. Debido a la resistencia microbiana, ha surgido el interés para el desarrollo de nuevos fitofármacos, lo que ha generado un incremento en el estudio de los productos naturales, permitiendo el aislamiento y la purificación de nuevos principios activos. En este contexto, el presente trabajo se enfocará en la purificación y la elucidación estructural de un ácido glicosídico constitutivo de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa brasileña de flores amarillas, *O. hamiltonii*. La presente disertación constituye una parte de la investigación química de las dos jalapas brasileñas purgantes en curso en la Facultad de Química (Lira-Ricárdez *et al.*, 2019; Moreno-Velasco, 2019).



CAPÍTULO 4

OBJETIVOS

- Realizar mediante el empleo de técnicas espectroscópicas y espectrométricas de alta resolución la caracterización estructural del componente purificado presente en las resinas lipofílicas de *O. hamiltonii*, raíz de jalapa brasileña de flores amarillas.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Establecer las condiciones instrumentales en HPLC, tanto a nivel analítico como preparativo para la purificación de al menos un compuesto en cantidades suficientes, para llevar a cabo su análisis estructural mediante RMN.
- Caracterizar el ácido glicosídico que constituye a la molécula aislada.
- Obtener las constantes físicas (punto de fusión, rotación óptica) de la molécula aislada.
- Caracterizar de manera inequívoca la estructura del producto aislado.

CAPÍTULO 5

PARTE EXPERIMENTAL

5. Métodos cromatográficos.

Mediante cromatografía en columna se realizó el fraccionamiento primario del extracto orgánico. Se utilizó 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). Se emplearon diferentes mezclas de disolventes de polaridad creciente desde hexano (C₆H₁₄), diclorometano (CH₂Cl₂), acetona (Me₂CO), metanol (CH₃OH), así como mezclas proporcionales entre éstos.

Para identificar a los compuestos de interés, cada fracción se analizó por una cromatografía en capa fina (CCF), utilizando como fase estacionaria cromatoplasmas de gel sílice F₂₅₄ (Merck) y como fase móvil de Me₂CO-CH₃OH (9:1). Se aplicó en placa cada una de las fracciones eluyendo en la fase móvil, se dejó secar y se utilizó una solución de sulfato cérico en ácido sulfúrico como agente cromógeno, y se calentó a 80 °C para la visualización de las placas.

Enseguida, todas las fracciones fueron analizadas por HPLC en un equipo (Waters) que consta de un sistema de liberación de disolventes, una bomba 600 E, un detector de índice de refracción Modelo 2414 y una válvula de recirculación de la muestra. Este sistema está integrado a un equipo de cómputo (OptiPlex 466, Dell). El control del equipo, la adquisición y el procesamiento de la información cromatográfica se realizaron a través del software Empower 2 (Waters).

5.1. Material vegetal.

El material vegetal corresponde a una muestra comercial de raíces pulverizadas de *O. hamiltonii* adquiridas bajo el nombre de jalapa (“batata de purga”) en el Mercado 2000 (**Figura 15**), ubicado en Santarém, Pará, Brasil, el 28 de septiembre de 2015. Este material fue identificado por la Dra. Suzana Leitão (Facultad de Farmacia, Universidad Federal de Río de Janeiro, Brasil) mediante la comparación de sus características anatómicas microscópicas descritas para esta especie (Michelin *et al.*, 2010).

5.1.1. Preparación del extracto orgánico.

La muestra comercial (868.5 g), se sometió a un proceso de maceración exhaustiva utilizando una mezcla de disolventes $\text{CH}_2\text{Cl}_2\text{-CH}_3\text{OH}$ (1:1). El extracto se llevó a sequedad para su posterior análisis, obteniéndose 48.8 g de muestra resultante, de acuerdo a los procedimientos descritos previamente por (Moreno-Velasco, 2019).



Figura 15. Raíces pulverizadas de la jalapa brasileña comercializadas como "pó de batatão" y jalapa en el Mercado 2000 (Fotografía: R. Pereda).

5.2. Fraccionamiento primario del extracto orgánico.

El fraccionamiento primario del extracto (30 g) se llevó a cabo mediante la técnica de cromatografía en columna abierta, utilizando como fase estacionaria 200 g de gel de sílice y como fase móvil mezclas de disolventes con polaridad creciente, entre C_6H_{14} y CH_3OH . Cada una de las fracciones obtenidas fue analizada por CCF para establecer su complejidad (Moreno-Velasco, 2019).

5.3. Separación y purificación.

5.3.1. Cromatografía en capa fina.

Se realizó un análisis por CCF de cada una de las fracciones para visualizar a los compuestos de interés. Este análisis permitió seleccionar la fracción F4 para su purificación, eluida con $(\text{CH}_3)_2\text{CO}:\text{CH}_3\text{OH}$, (9:1).

Para determinar las condiciones instrumentales a escala analítica que permitieran la óptima resolución de los picos presentes en la muestra, se realizaron una serie de experimentos en un sistema isocrático y utilizando diferentes fases móviles de acuerdo a los procedimientos descritos por (Moreno-Velasco, 2019).

5.3.2. Purificación de muestra.

Al obtener los perfiles cromatográficos en escala analítica, se lograron establecer las condiciones que mostraban la mejor resolución, correspondiendo a: Columna (Waters Symmetry, C-18 (4.6×250 mm)); fase móvil, $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (17:3); volumen de inyección $20 \mu\text{L}$ [1 mg/1 ml] (Moreno-Velasco, 2019). Las condiciones en escala analítica se escalaron aquellas condiciones preparativas para poder separar y purificar la mayor cantidad de muestra posible utilizando la siguiente ecuación:

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

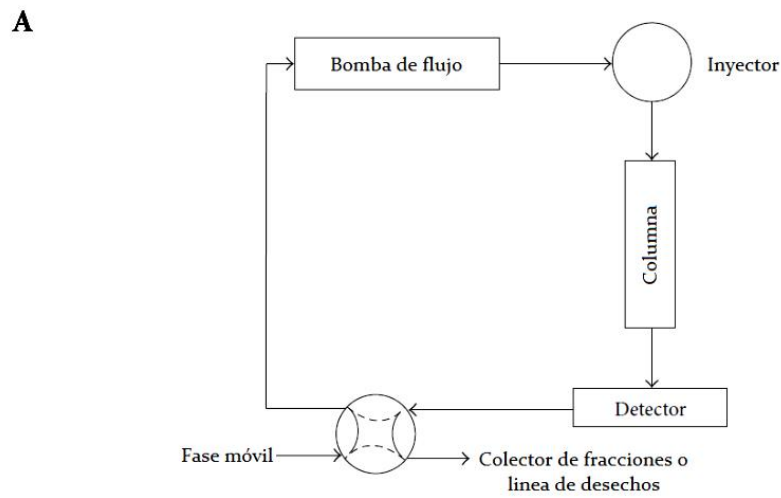
Donde F_p = flujo a nivel preparativo; F_a = flujo a nivel analítico; L_p = longitud de la columna preparativa; L_a = longitud de la columna analítica; d_p = diámetro interno de la columna preparativa; d_a = diámetro interno de la columna analítica. Se utilizó la técnica de “corte de núcleo” para separar los compuestos y la técnica de “reciclaje” (**Figura 16**) para purificarlos (Pereda Miranda & Hernández-Carlos, 2002).

5.4. Determinación de las constantes físicas y propiedades espectroscópicas.

Se determinaron los puntos de fusión en un aparato de Fisher-Jones sin corrección. Los experimentos de RMN ^1H y ^{13}C se registraron en un equipo Bruker operando a una frecuencia de 900 MHz para ^1H y ^{13}C . Se empleó piridina deuterada (piridina- d_5) como disolvente y los desplazamientos químicos (δ) se expresaron en ppm utilizando como referencia interna la señal del tetrametilsilano (TMS).

5.5. Determinación de las propiedades espectrométricas.

La masa exacta de los compuestos en estudio se obtuvo por infusión directa en un espectrómetro de masa LTQ-Orbitrap XL Hybrid FT (Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, USA) equipado con una fuente para la ionización tipo Electrospray Finnigan Ion Max. Cada muestra (1 mg) se disolvió en 1 mL de CH_3OH y 250 μL se diluyeron con 100 μL de $\text{CH}_3\text{OH-H}_2\text{O}$ (9:1, v/v) que contenía 0,1% de ácido fórmico para mejorar el proceso de ionización. La muestra (150 μL) se inyectó directamente en la fuente de ESI en el modo iónico positivo y negativo a un flujo de 5 mL/min. El voltaje para ambos modos de ionización positivo y negativo fue de 3.7 kV, con nitrógeno como gas nebulizador a 25 bar. Cada muestra se analizó en el modo de exploración completa utilizando un rango de m/z 100–3000. Se determinó el peso molecular mediante los valores de m/z para las especies $[\text{M} + \text{Na}]^+$ y $[\text{M} - \text{H}]^-$ en los espectros generados (Lira-Ricárdez *et al.*, 2019).



B

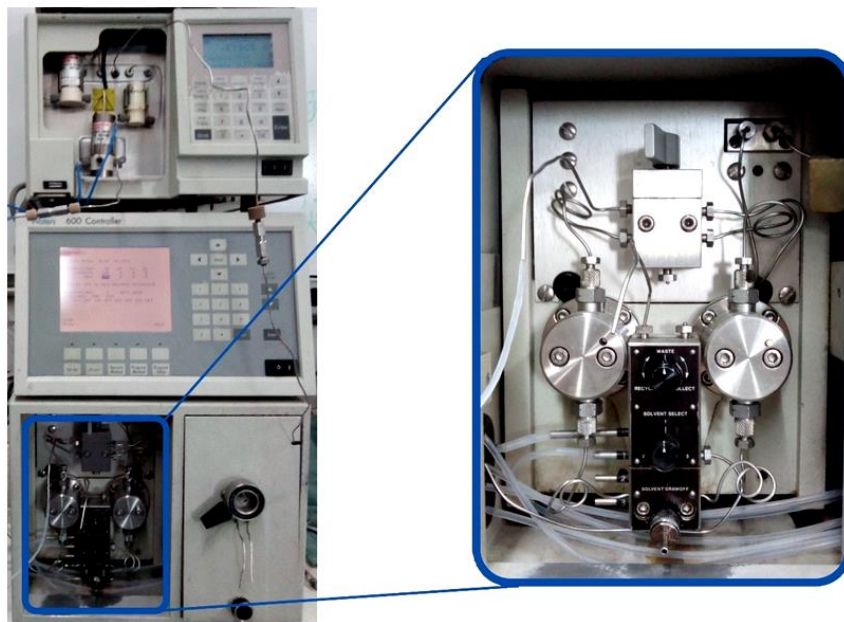


Figura 16. A. Diagrama del sistema de reciclaje para un equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC); B. Válvula de reciclaje.

CAPÍTULO 6

RESULTADOS

6.1 Fraccionamiento primario del extracto orgánico.

Del fraccionamiento primario por CCA se obtuvieron ocho fracciones que, al ser visualizados en CCF y con el agente cromógeno, éstas podrían contener resinas glicosídicas (Moreno-Velasco, 2019). La fracción F4 (4.14 g) se seleccionó para su purificación (Moreno-Velasco, 2019).

6.2 Aislamiento y purificación.

6.2.1 HPLC a escala analítica.

Se decidió analizar a la fracción F4 mediante HPLC para obtener los perfiles cromatográficos y encontrar las condiciones analíticas que permitan su adecuada resolución. Al obtener los perfiles, se concluyó que las condiciones analíticas que permitieron la mejor resolución de la muestra son: columna Waters Symmetry C-18 (4.6 × 250 mm, 5 μm); una fase móvil de CH₃CN:H₂O (17:3); flujo de 0.4 mL/min; detector de índice de refracción con una sensibilidad 1024; volumen de inyección de la muestra de 20 μL (1 mg/μL) (**Figura 17**).

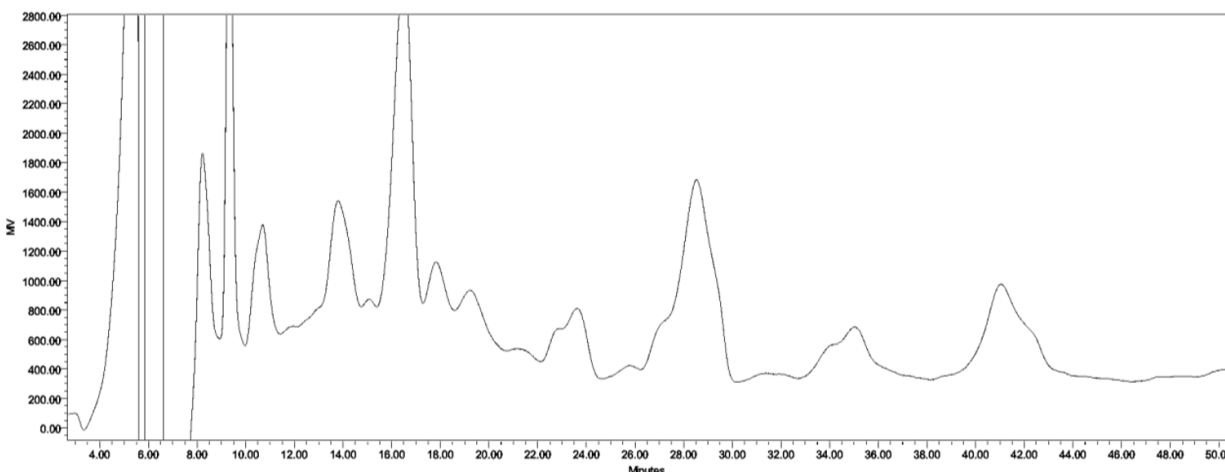


Figura 17. Cromatograma por HPLC en condiciones analíticas.

6.2.2 HPLC a escala preparativa.

Las condiciones analíticas adecuadas que permitieron la resolución del perfil cromatográfico de la muestra (Sección 5.3.1), se escalaron a condiciones preparativas para aislar a los compuestos. Dichas condiciones fueron las siguientes: columna Waters Symmetry C-18 (19 × 300 mm, 7 μm); fase móvil $\text{CH}_3\text{CN}:\text{H}_2\text{O}$ (17:3); flujo 8.0 mL/min; detector de índice de refracción con alta sensibilidad (1024); volumen de inyección, 500 μL (0.1 mg / μL en metanol). Al realizar 20 inyecciones (500 μL) de la fracción F4 y cortar cada uno de los picos que se muestran en el cromatograma de la **Figura 18**, se obtuvieron once fracciones con una menor complejidad (Moreno-Velasco, 2019).

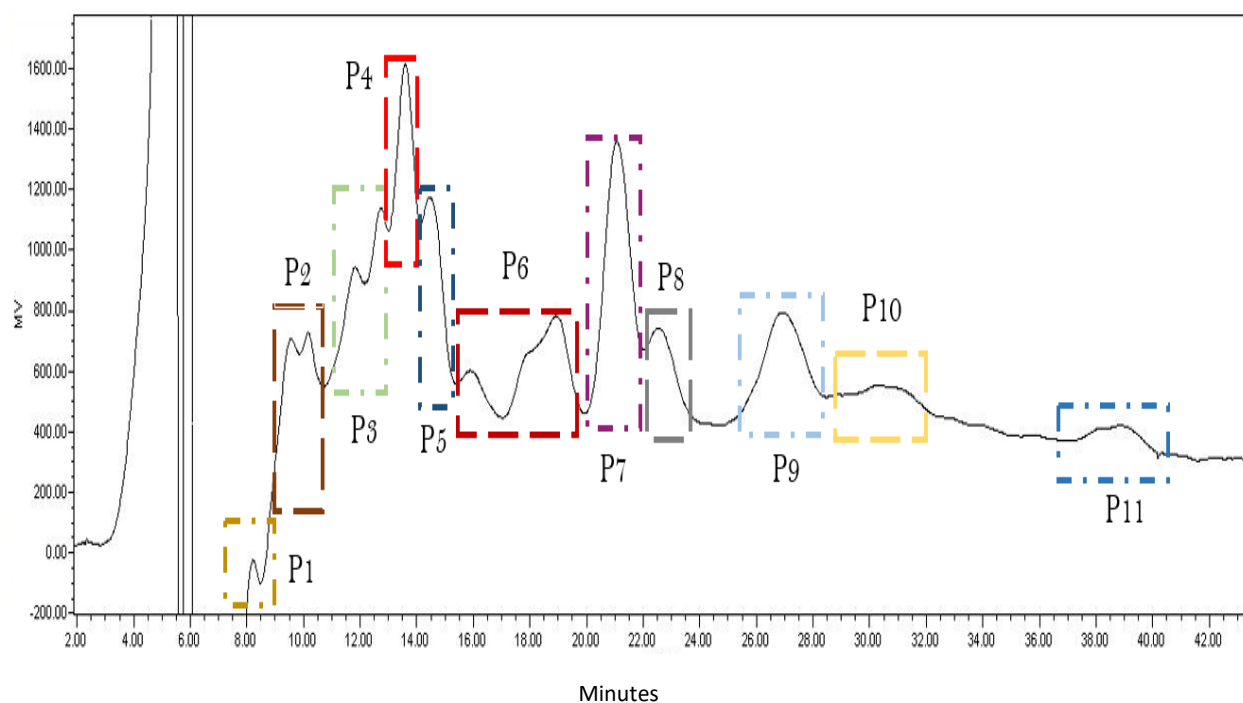


Figura 18. Perfil cromatográfico a escala preparativa mostrando los picos aislados por la técnica "corte de núcleo" (Moreno-Velasco, 2019).

6.2.3 Purificación del pico F4P9.

De las fracciones obtenidas, la fracción 9 (F4P9: 12.1 mg), se sometió a las técnicas ya descritas para aislar y purificar al componente mayoritario, mediante HPLC en condiciones semipreparativas, utilizando una columna C-18 Waters SymmetryPrep (19 × 150 mm, 7 μ m), fase móvil CH₃CN:H₂O (17:3), flujo 4.00 mL/min), detector (índice de refracción Waters 2440) a alta sensibilidad de 1024, volumen de inyección: 500 μ L (12 mg/500 μ L). Para obtener la mayor cantidad del pico mayoritario, se usó la técnica de rasurado de pico con la que se logró eliminar a los picos minoritarios. En la **Figura 19** se ilustra el cromatograma con el número total de siete ciclos empleados para la purificación del pico F4P9 con un rendimiento de 4 mg.

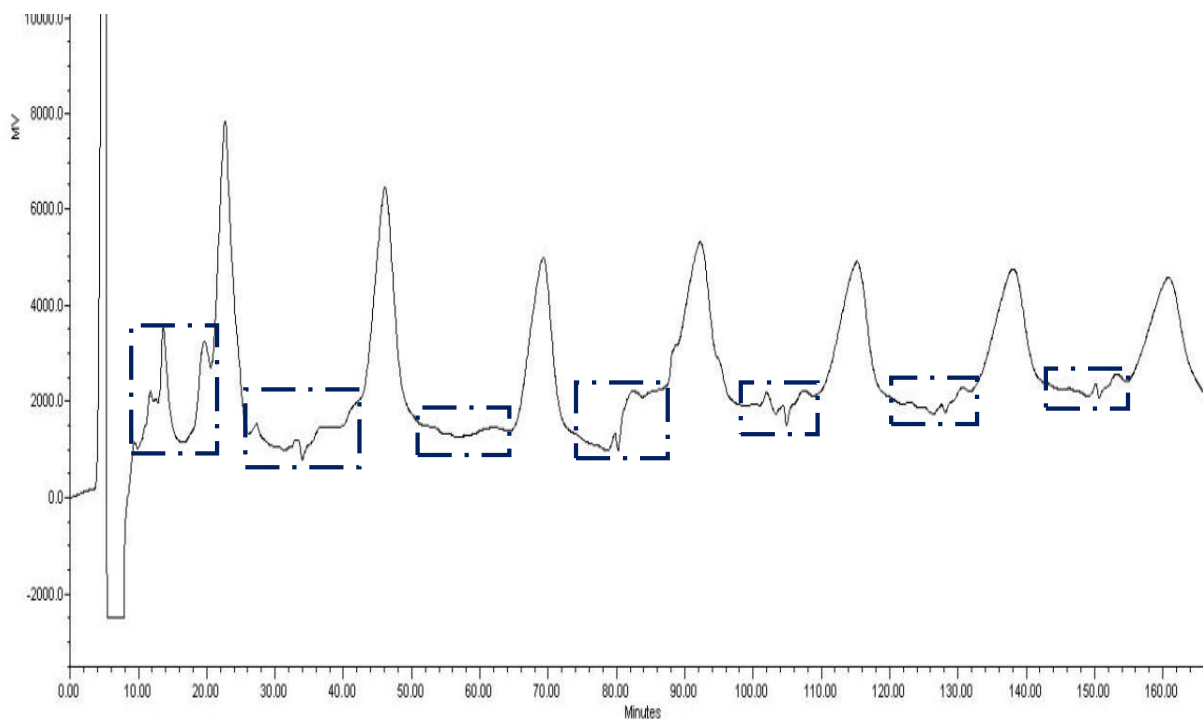


Figura 19. Purificación del pico mayoritario de la fracción F4P9, utilizando la técnica de "reciclaje" así como "corte y rasurado de pico" (líneas punteadas).

6.2.4 Elucidación estructural del pico F4P9.

El compuesto F4P9 se purificó en forma de un sólido blanco cuyas constantes físicas se incluyen en el **Cuadro 3**. El espectro de masas generado mediante electrospray en el modo negativo registró un anión $[M - H]^-$ de m/z 1213.69666 (error = 1.3 ppm) que permitió calcular la fórmula molecular $C_{59}H_{106}O_{25}$. Esta fórmula se confirmó por el catión $[M + Na]^+$ de m/z 1237.69091 registrado mediante ionización positiva (**Figura 20**).

Cuadro 3. Constantes físicas del compuesto puro F4P9.

Punto de fusión	123-125 °C
$[\alpha]_D$ (c 0.1, CH ₃ OH)	-43.8
Fórmula molecular calculada	$C_{59}H_{106}O_{25}$

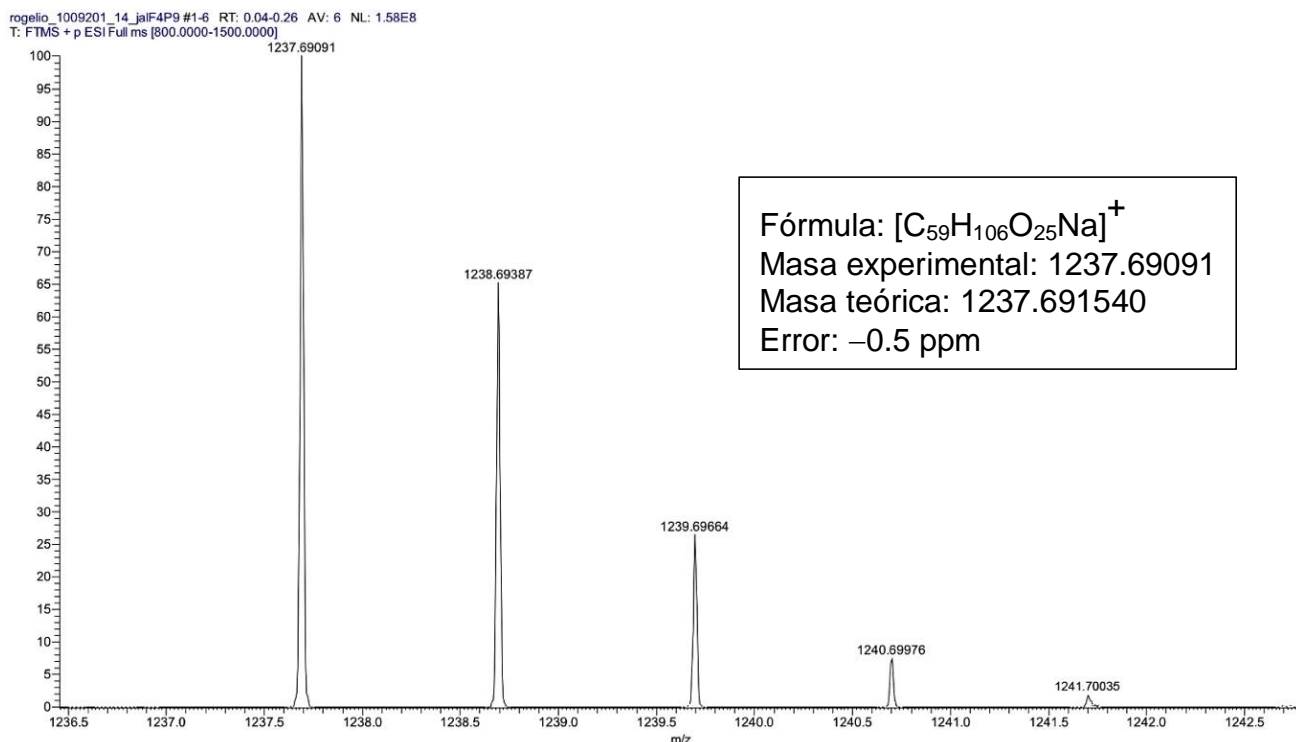


Figura 20. Espectro de masas generado por electrospray en modo positivo del compuesto F4P9 donde se muestra la distribución isotópica y las abundancias relativas del aducto de sodio $[C_{59}H_{106}O_{25} + Na]^+$.

Se realizó la técnica de “rasurado del núcleo” para contar con la mayor cantidad de la fracción F4P9 (t_R de 22.0 min), el total de esta elución se concentró y mediante RMN 1H y ^{13}C se analizó para poder identificar el núcleo oligosacárido de la resina glicosídica intacta. Al obtener los espectros de RMN de una y dos dimensiones, estos se compararon con los espectros ya descritos previamente del derivado peracetilado del ácido operculínico A presente en las resinas glicosídicas de la raíz de la jalapa (**Figura 21**) (Castañeda-Gómez & Pereda-Miranda, 2011).

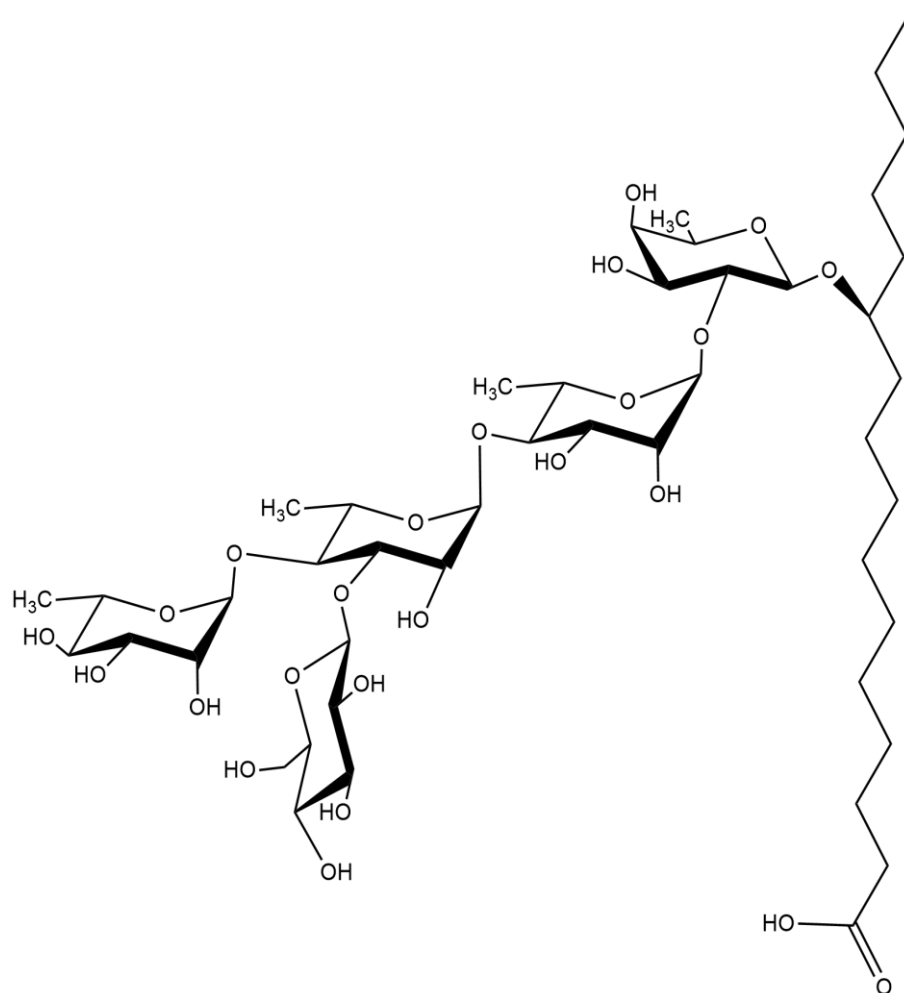


Figura 21. Estructura molecular del ácido operculínico A.

6.2.5 Elucidación de los constituyentes intactos.

El espectro de RMN ^1H del compuesto F4P9 (**Figura 22**) muestra la región entre δ_{H} 3.7 – 6.4 ppm que corresponde a la región oligosacárida de la molécula F4P9.

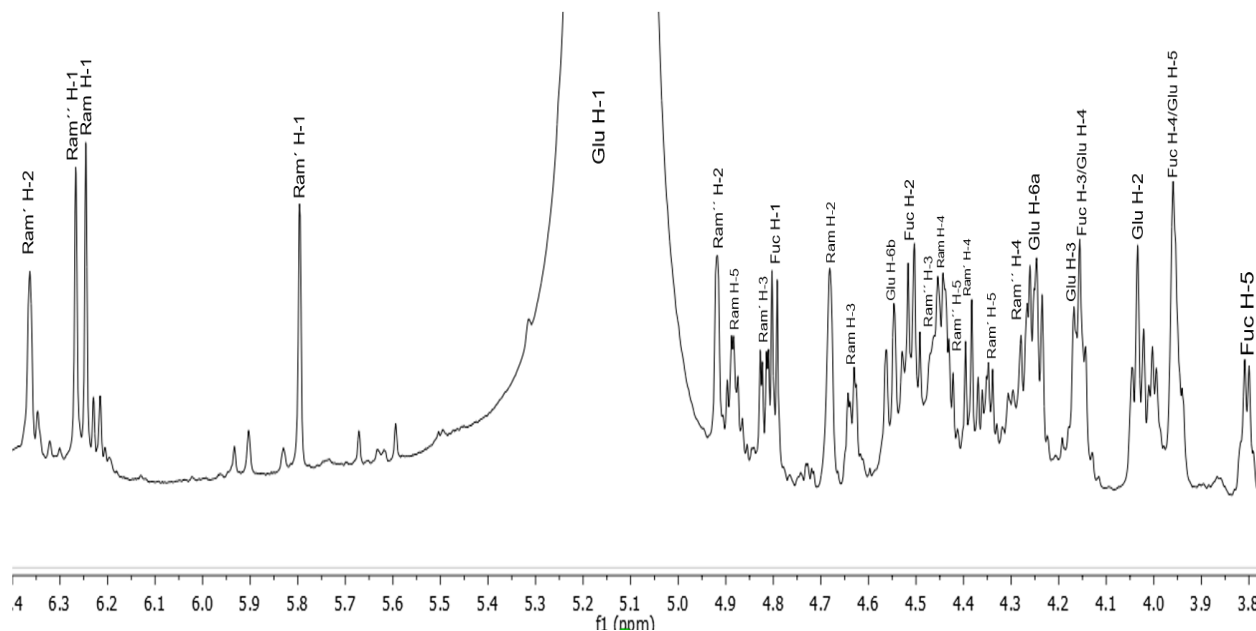


Figura 22. Espectro RMN ^1H del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).

El núcleo pentasacárido más común descrito en las resinas glicosídicas de las especies del género *Operculina* corresponde al ácido operculínico A (Moreno-Velasco, 2019), siendo que las dos únicas diferencias observada entre este compuesto y la molécula F4P9 son una porción alifática que se encuentra esterificando alguna de las unidades monosacáridas y la presencia de un éster metílico. Por la diferencia en peso entre el éster metílico del ácido operculínico A ($\text{C}_{46}\text{H}_{82}\text{O}_{24}$: $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 1031; Ono *et al.*, 1989; Castañeda-Gómez & Pereda-Miranda, 2011) y el compuesto F4P9, permitió establecer que el residuo de ácido esterificante correspondía con el ácido dodecanoico.

En el espectro de RMN ^1H , en la región de δ_{H} 0.8 – 1.0 ppm, se observan dos tripletes que corresponden a los metilos de la aglicona y del ácido acilante. En la región δ_{H} 1.5 – 1.7 ppm, se observan cuatro dobletes que establecen la presencia de cuatro metilpentosas, las cuales corresponden a tres unidades de L-ramnosa y una de D-fucosa (**Figura 23**). En la región de δ_{H} 5.1 – 6.4 ppm se identificaron las señales que corresponden a los hidrógenos enlazados a los carbonos anoméricos, así como a las posiciones de esterificación (**Figura 23**).

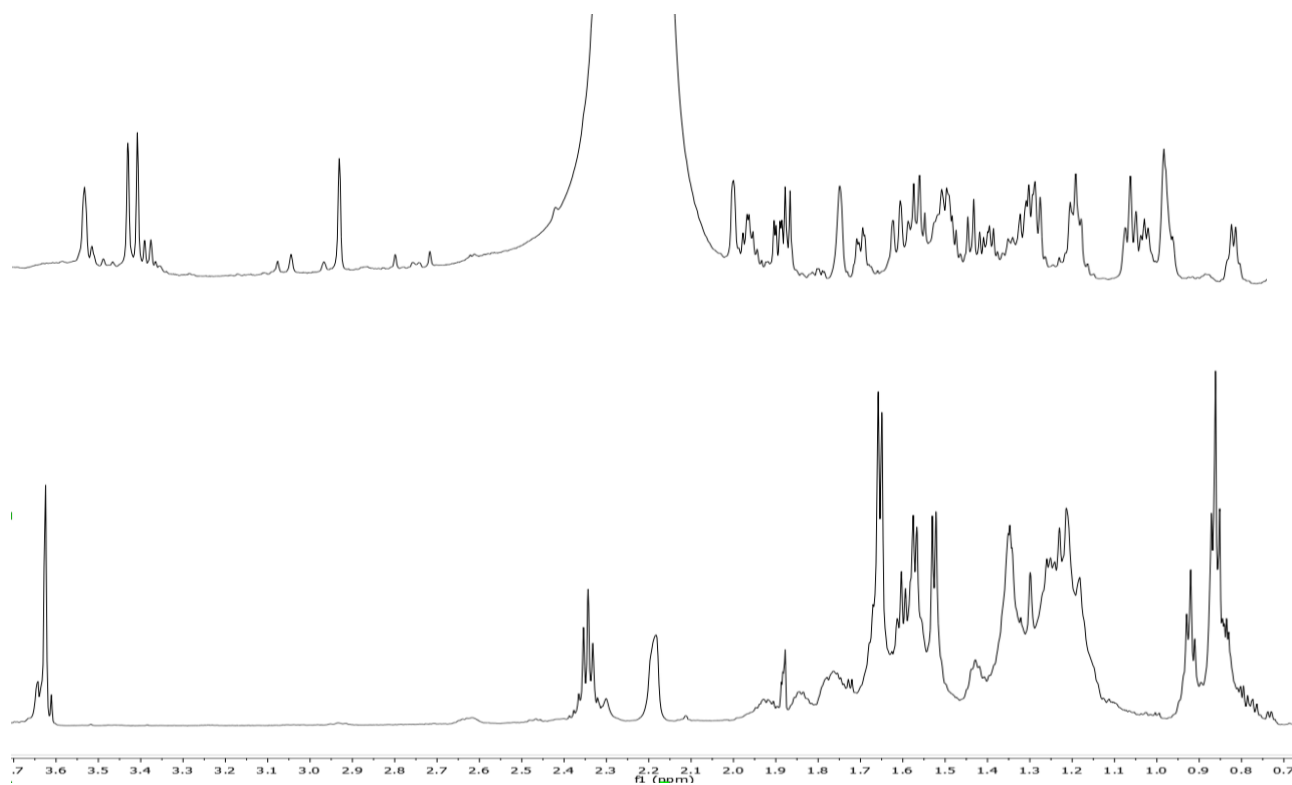


Figura 23. Espectro de RMN ^1H del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).

La primera señal anomérica que se muestra a campos altos está centrada en δ_{H} 4.80 ppm y posee un patrón de acoplamiento como un doblete ($^3J_{\text{H-H}} = 7.7$ Hz) característico de la D-fucosa; la señal de δ_{H} 5.14 ppm, se encuentra oculta por la señal de humedad del disolvente y debe corresponder a un doblete con una constante de acoplamiento característica de la D-glucosa de $^3J_{\text{H-H}} = 7.9$ Hz. Por último, las tres señales en δ_{H} 5.80,

6.25 y 6.27 ppm corresponden a los singuletes anchos de los protones anoméricos de las tres unidades de L-ramnosa.

En el espectro de RMN ^{13}C (**Figura 24**), en la zona de δ_{C} 10 – 40 ppm, se identificaron las señales de los carbonos alifáticos, tanto de la aglicona como del éster que sustituye al núcleo oligosacárido; también, se observan las señales de los carbonos que conforman las unidades de los carbohidratos entre δ_{C} 60-110 ppm. A campos bajos entre 100-110 ppm, se aprecian cinco señales atribuibles a los carbonos anoméricos de cada una de las unidades sacáridas. En resumen, la resina está compuesta de cuatro metilpentosas y una hexosa (D-glucosa), confirmado a través de la señal centrada en δ_{C} 63.3 ppm (C-6). Las dos señales para los carbonos de los carbonilos se observaron en δ_{C} 173.9 ppm para la aglicona y en δ_{C} 174.4 ppm para el éster que acila el núcleo oligosacárido.

100 – 110 ppm
Carbonos Anoméricos

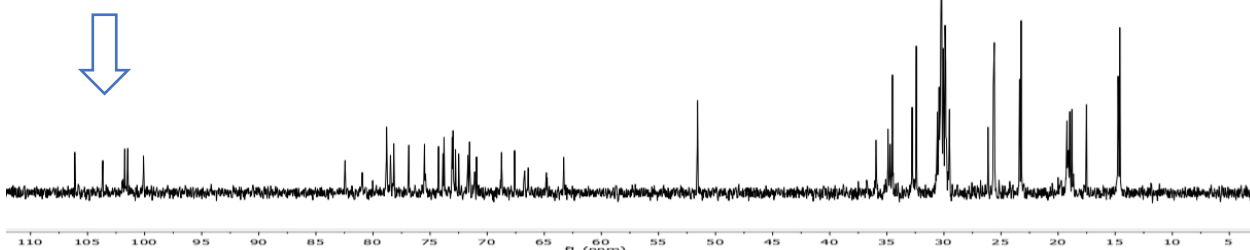


Figura 24. Espectro de RMN ^{13}C del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina – d_5).

Al analizar las correlaciones en el espectro bidimensional HSQC, se identificó una señal que está más desprotegida que las señales anoméricas del núcleo oligosacárido y que indicó la posición de esterificación (Ram' H-2) del núcleo oligosacárido. Las señales anoméricas (H-1), permitieron identificar mediante las correlaciones vecinales en el experimento COSY ($^3J_{\text{H-H}}$) para cada unidad sacárida, trazando los cuadros de conectividad para cada señal que forma el núcleo piranósido como se muestra en el ejemplo de la (**Figura 25**). Estas conectividades se verificaron en el experimento TOCSY que permitió asignar el total de las correlaciones para cada una de las unidades sacáridas (**Figura 26**).

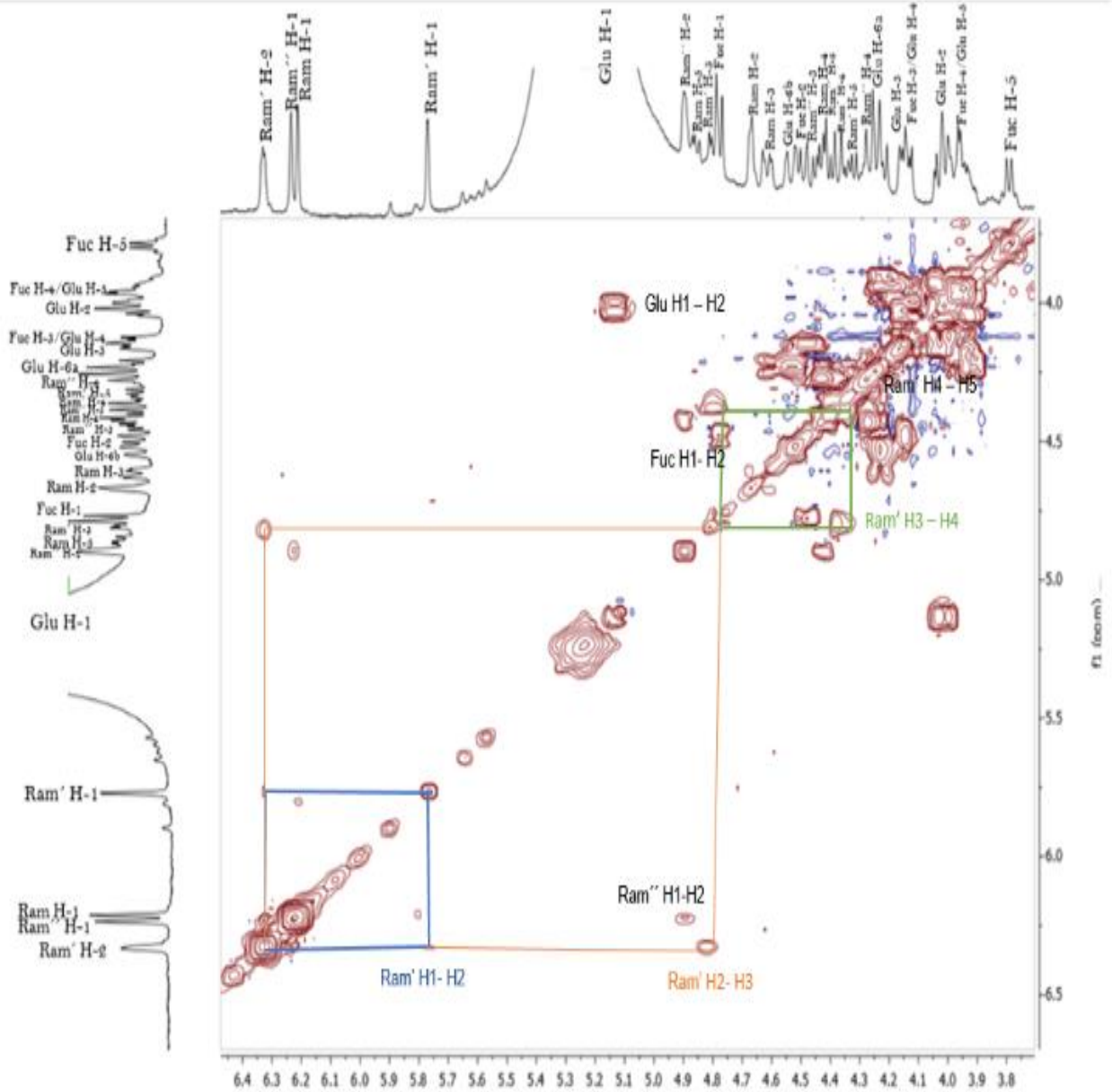


Figura 25. Cuadros de conectividad observados en espectro COSY para las unidades sacáridas (400 MHz, piridina – d_5).

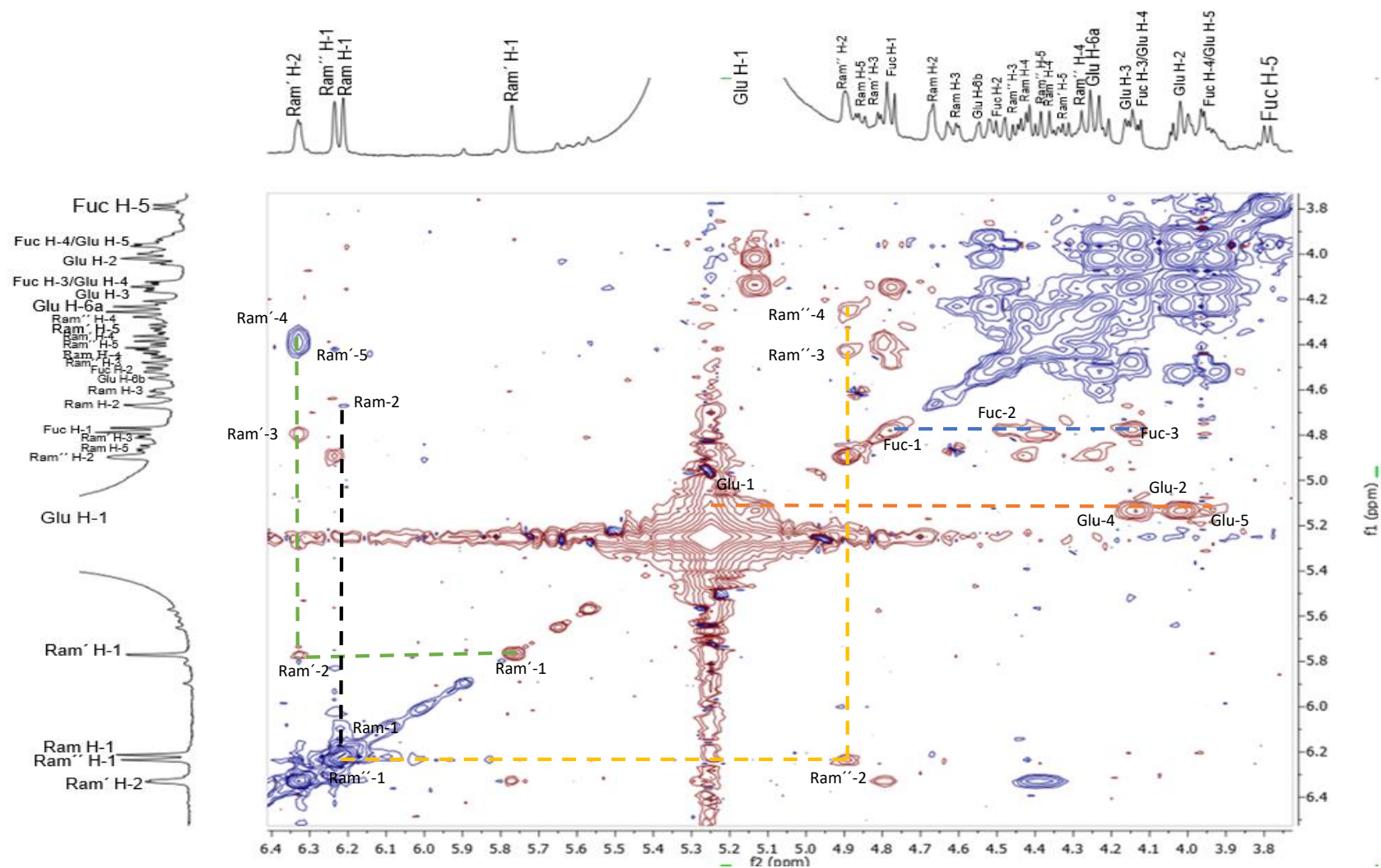


Figura 26. Espectro TOCSY de la porción oligosacárida del compuesto F4P9 (400 MHz, piridina - d_5).

Mediante el análisis del espectro de RMN 2D HSQC, que identifica las correlaciones heteronucleares $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ ($^1J_{\text{CH}}$), se designaron los desplazamientos químicos de cada protón con su respectivo carbono (**Figura 27**). De esta forma, se identificaron 27 señales unidas a grupos electroattractores de las cuales, 26 señales son parte del oligosacárido. Cada unidad sacárida de metilpentosa cuenta con 5 carbonos oxigenados (5×4 unidades) y la unidad de glucosa contribuye con cinco metinos y un metileno base de oxígeno (6 señales). Las correlaciones identificadas para las unidades anoméricas son Fuc-1 ($\delta_{\text{H}} 4.80$, $\delta_{\text{C}} 101.5$), Ram-1 ($\delta_{\text{H}} 6.25$, $\delta_{\text{C}} 101.7$), Ram'-1 ($\delta_{\text{H}} 5.80$, $\delta_{\text{C}} 100.1$) y Ram''-1 ($\delta_{\text{H}} 6.27$, $\delta_{\text{C}} 103.6$) así como para la hexosa Glu-1 ($\delta_{\text{H}} 5.16$, $\delta_{\text{C}} 106.1$).

En el espectro HSQC, la región de ($\delta_{\text{H}} 4.80 - 6.27$) se identificaron las cinco señales anoméricas que correlacionan con los carbonos en ($\delta_{\text{C}} 100 - 106$) (**Figura 27**). La secuencia de glicosilación se establecieron mediante el análisis de las interacciones $^{2,3}J_{\text{CH}}$ en el experimento HMBC (**Figura 28**), identificándose las posiciones de la secuencia de los azúcares en el núcleo pentasacárido de la siguiente forma: Fuc H-1 ($\delta_{\text{H}} 4.80$) interacciona con la H-11 ($\delta_{\text{C}} 78.2$) de la aglicona, la cual nos indica que hay una unión mediante un enlace O-glucosídico, así como las uniones entre: Fuc H-2 ($\delta_{\text{H}} 4.52$) y Ram C-1 ($\delta_{\text{C}} 101.7$); Ram' H-1 ($\delta_{\text{H}} 5.80$) y Ram C-4 ($\delta_{\text{C}} 73.3$); Ram' H-3 ($\delta_{\text{H}} 4.82$) y Glu C-1 ($\delta_{\text{C}} 106.1$); Ram' H-4 ($\delta_{\text{H}} 4.82$) y Ram'' C-1 ($\delta_{\text{C}} 103.6$); y la interacción entre Ram' H-2 ($\delta_{\text{H}} 6.36$) y el carbonilo del residuo del ácido dodecanoico C-1 ($\delta_{\text{C}} 174.4$) corroboró la esterificación de esta posición C-2 de la Ram' mediante un enlace éster. Finalmente, el espectro HMBC ayudó a identificar la asignación para el carbonilo de la aglicona en ($\delta_{\text{C}} 173.9$) mediante su acoplamiento $^{2,3}J_{\text{C-H}}$ con el grupo metoxilo ($\delta_{\text{H}} 3.62$) y el grupo metileno C-2 de la aglicona en 2.34 (**Figura 29**). Al establecerse esta secuencia se pudo determinar la estructura molecular del oligosacárido mayoritario presente en la fracción F4P9 (**Figura 30**). En el **Cuadro 4** se enumeran los desplazamientos químicos y las constantes de acoplamiento del producto F4P9. Este producto natural se relaciona estructuralmente con el éster metílico que se produciría mediante la apertura hipotética del macrociclo F4P7 ($\text{C}_{58}\text{H}_{102}\text{O}_{24}$: $[\text{M} - \text{H}]^-$ m/z 1181), lactonalizado en la posición C-3 de la tercera unidad de ramnosa, por acción del metanol (diferencia de 32 uma). La estructura del compuesto F4P7 fue descrita previamente por Moreno-Velasco (2019).

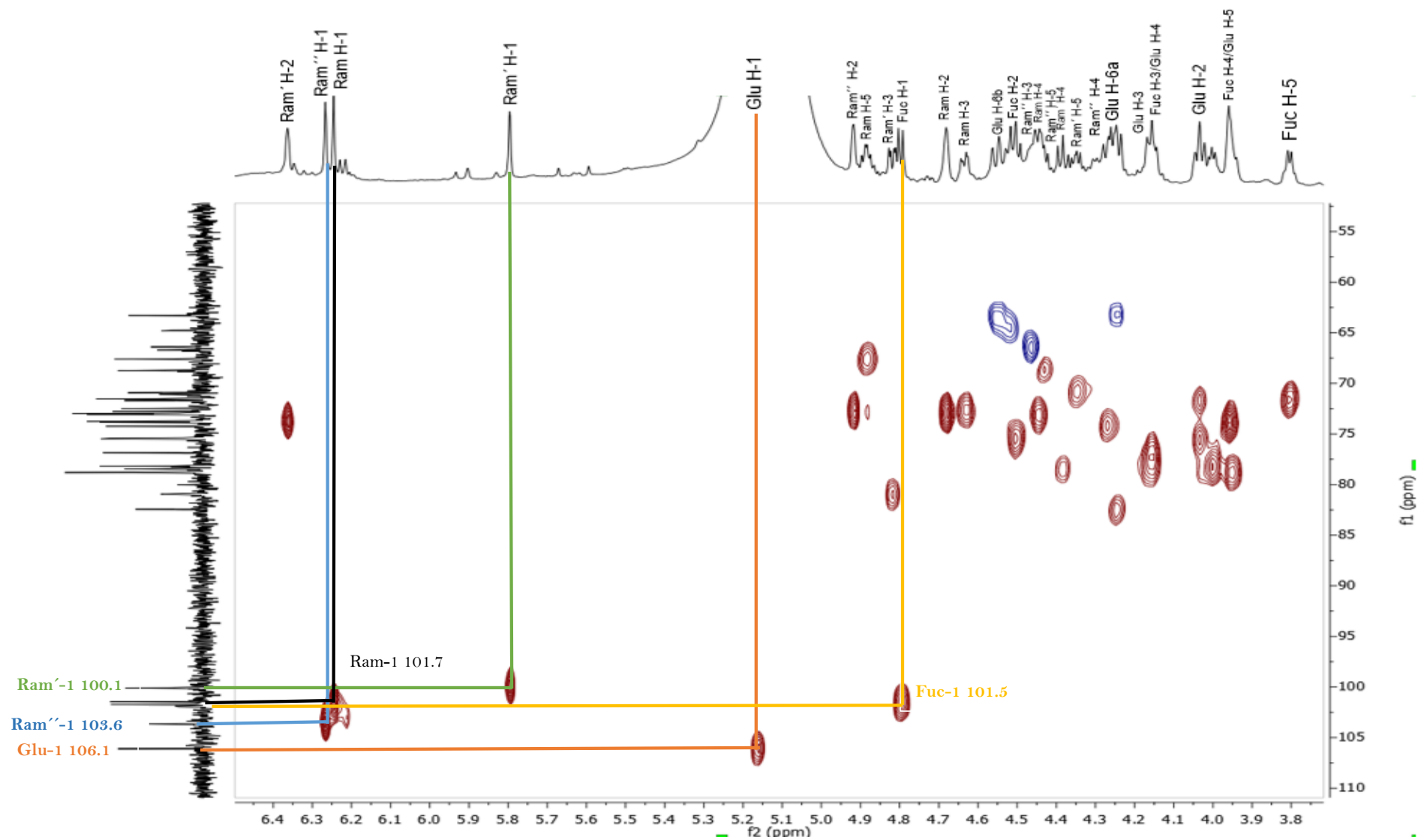


Figura 27. Espectro HSQC de la porción oligosacárida del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina - d_5).

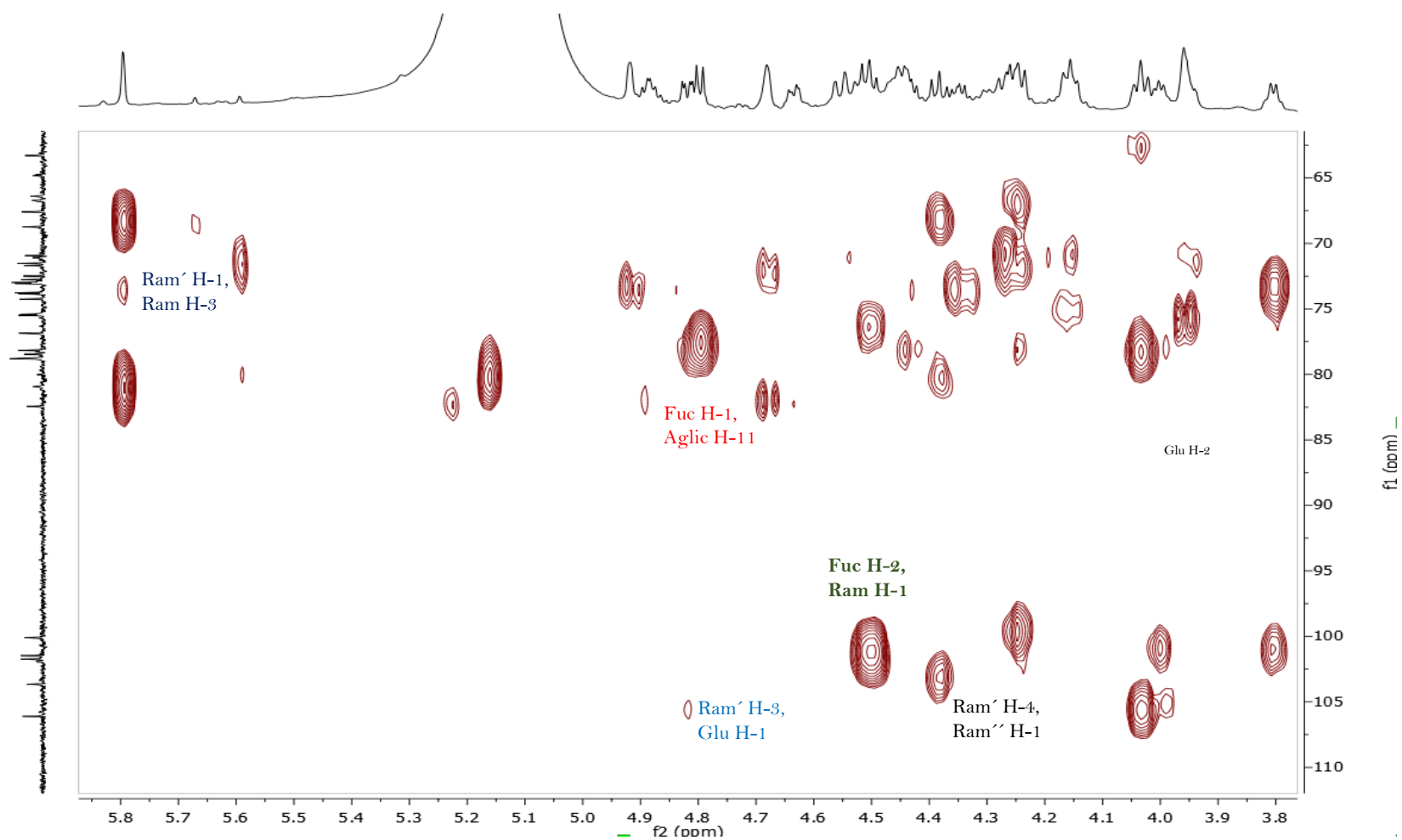


Figura 28. Espectro HMBC indicando la secuencia de glicosidación del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina - *d*₅).

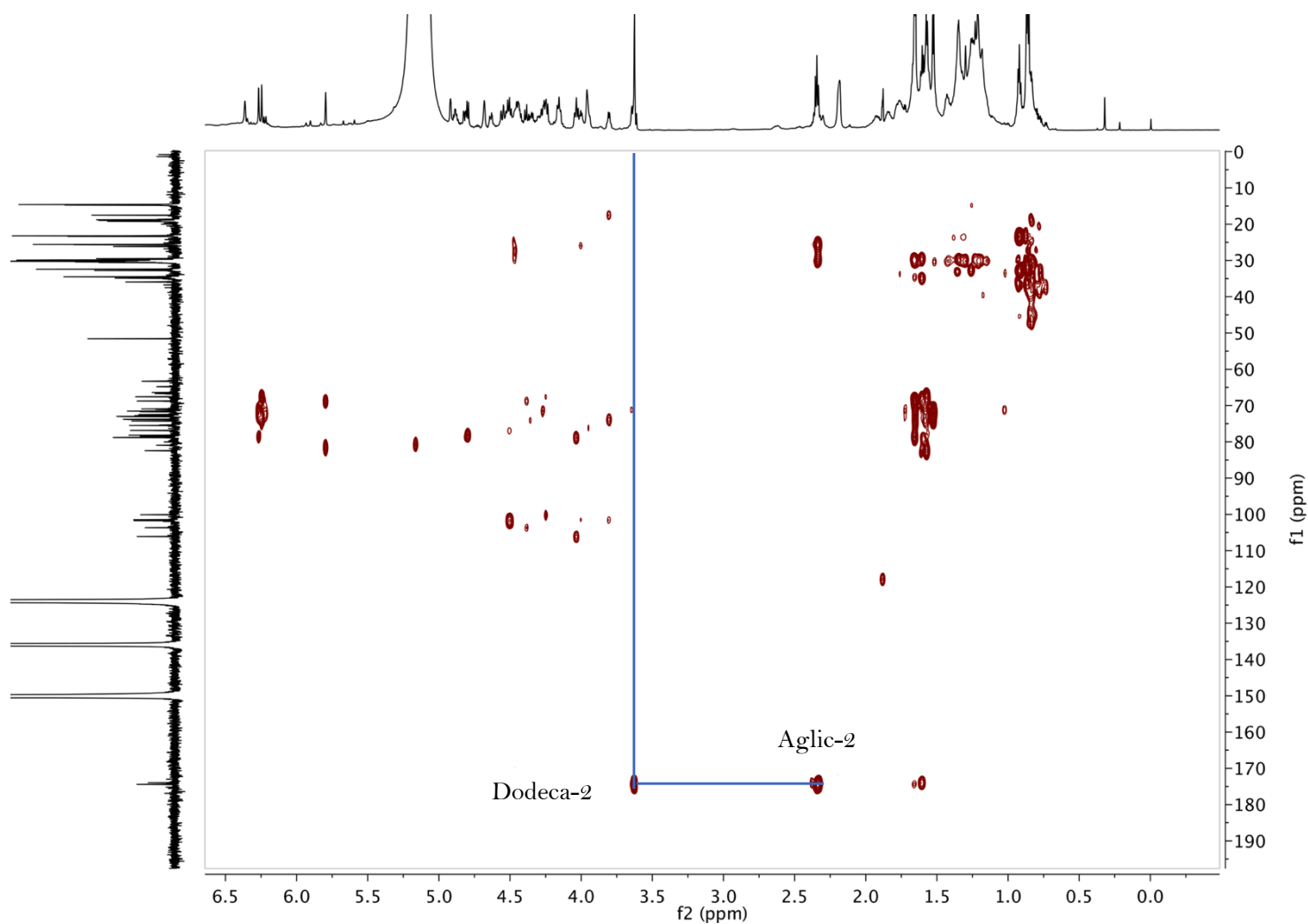


Figura 29. Espectro HMBC indicando la secuencia de glicosidación del compuesto F4P9 (900 MHz, piridina - *d*₅).

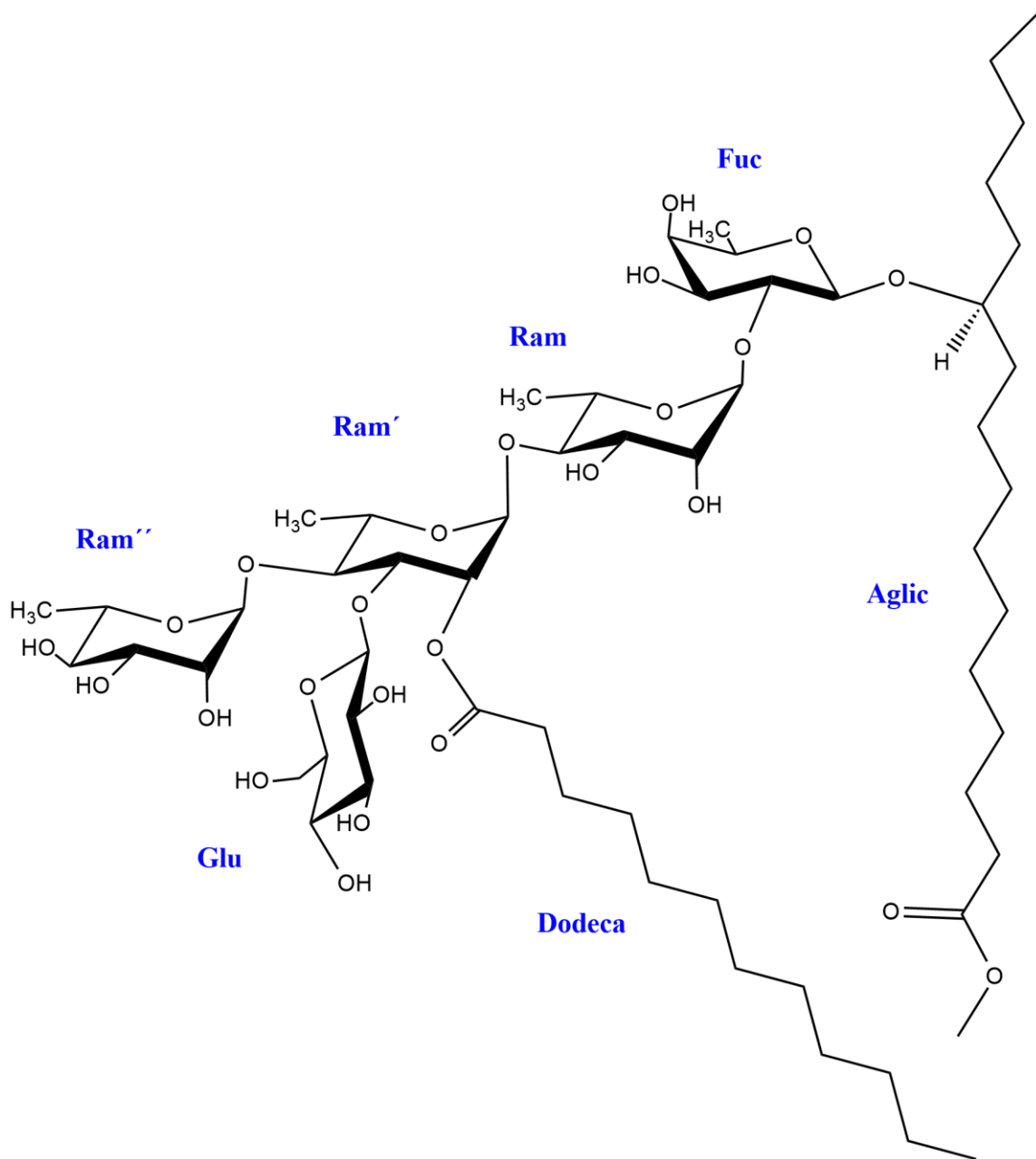


Figura 30. Estructura del compuesto F4P9.

Cuadro 4. Constantes espectroscópicas de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto F4P9.

Posición	δ H	δ C
Fuc-1	4.80 d (7.7)	101.5
2	4.52dd (10.3, 7.7)	75.5
3	4.16 dd (10.3, 4.2)	76.9
4	3.96 d (4.2)	73.8
5	3.80 dq (6.2)	71.7
6	1.52 d (6.2)	17.5
Ram-1	6.25 d (0.8)	101.7
2	4.68 dd (0.8, 3.6)	73.1
3	4.63 dd (3.6, 9.1)	72.8
4	4.43 dd (9.1, 9.1)	74.3
5	4.88 dq (6.2, 9.1)	67.6
6	1.57 d (6.2)	19.1
Ram'-1	5.80 d (0.8)	100.1
2	6.36 dd (3.3, 0.8)	73.8
3	4.82 dd (9.2, 3.3)	81.0
4	4.38 dd (9.2, 9.2)	78.5
5	4.35 dq (9.2, 6.1)	74.2
6	1.65 d (6.1)	19.2
Ram''-1	6.27 d (0.8)	103.6
2	4.92 dd (0.8, 3.3)	72.7
3	4.45 dd (9.4, 3.3)	73.2
4	4.27 dd (9.4, 9.4)	70.9
5	4.42 dq (9.4, 6.5)	68.7
6	1.60 d (6.9)	19.2
Glu-1	5.13 d (7.9)	106.1
2	4.03 dd (9.0, 7.9)	75.5
3	4.17 dd (10.5, 9.0)	76.9
4	4.15 dd (10.5, 10.5)	75.5
5	3.96 m*	80.9
6a	4.25 m*	63.3
6b	4.54 d (12.1)	
AgI-1	-	173.9
2	2.34	34.5
11	4.00 m	78.2
16	0.86 t (7.0)	14.6
Dodeca-1	-	174.4
2	2.34	34.9
12	0.92 t (6.8)	14.7

Datos registrados a 900 MHz para RMN ^1H y RMN ^{13}C en piridina-*ds*. Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm con relación al TMS. Las constantes de acoplamiento se encuentran en paréntesis y están expresadas en Hz. Los desplazamientos químicos marcados con un asterisco (*) indican señales sobrepuestas. Los patrones de acoplamiento están expresados como: s = singulete, d = doblete, dd = doble de doble, dq = doblete cuarteteado, t = señal triple, m = señal múltiple. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H (COSY, TOCSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC). Abreviaciones: Fuc = fucosa, Ram = ramnosa, Glu = glucosa, AgI = 11-hidroxihexadecan

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES

1.- Se desarrolló un procedimiento analítico mediante HPLC en fase reversa a nivel semipreparativo por la técnica de corte, rasurado de núcleo y reciclaje de pico, para la purificación de un éster metílico acilado del ácido operculínico A, de una fracción rica en resinas glicosídicas de las raíces de *O. hamiltonii*, la raíz de jalapa brasileña con flores amarillas.

2.- Los experimentos de RMN en dos dimensiones (COSY, TOCSY y HSQC) permitieron la caracterizar la estructura de cada una de las unidades sacáridas para el ácido glicosídico, en tanto que el experimento HMBC permitió establecer sus conectividades y la secuencia de glicosilación del ácido glicosídico constitutivo del producto F4P9.

3.- Se caracterizó la estructura molecular del constituyentes mayoritario de la fracción F4P9 como: el éster metílico del ácido hexadecanoico, (11S)-[(O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)]-O-[β -D-glucopiranosil-(1 \rightarrow 3)]-O-[2-decanoil]-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 4)-O-6-desoxi- α -L-manopiranosil-(1 \rightarrow 2)-6-desoxi- β -D-galactopiranosil)-oxi]).

4.- Este nuevo pentasacárido corresponde al éster metílico del ácido operculínico A con la esterificación en la posición C-2 de la ramnosa interna (Ram') por el ácido dodecanoico.

5.- El núcleo pentasacárido descrito para este constituyente corresponde a uno de los ácidos glicosídicos que con mayor abundancia se encuentra en la familia de las convolvuláceas. Este producto se describió originalmente como uno de los principales constituyentes presente en las resinas glicosídicas de *Operculina macrocarpa*, la raíz de jalapa brasileña con flores blancas.

CAPÍTULO 8

REFERENCIAS

Alonso-Castro AJ, Domínguez F, Maldonado-Miranda JJ, Castillo-Pérez LJ, Carranza-Álvarez C, Solano E, Isiordia-Espinoza MA, Juárez-Vázquez MC, Zapata-Morales JR, Argueta-Fuertes MA, Ruiz-Padilla AJ, Solorio-Alvarado CR, Rangel-Velázquez JE, Ortiz-Andrade R, González-Sánchez I, Cruz-Jiménez G, Orozco-Castellanos LM (2017) Use of medicinal plants by health professionals in Mexico. *Journal of Ethnopharmacology* 198: 81-86.

Austin, DF, Staples, GW (1983) Additions and changes in the neotropical convolvulaceae – notes on merremia, operculina and turbine, *Journal of the Arnold Arboretum* 64: 487-488.

Austin, DF, Staples, GW (2011) *Convolvulaceae Unlimited*, *Operculina macrocarpa*, (<http://convolvulaceae.myspecies.info/content/operculina-macrocarpa-0>) consultada el 12 de mayo del 2019.

Bezerra, CAC, Lana, TN, Silvério, PJP, Silveira, D (2018) The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. *Journal of Ethnopharmacology* 212: 29-35.

Bitu, VCN, Matias, EFF, Ribeiro-Filho, J, Vega, C, Coronel, C, Rolón, M, Boligon, AA, Araujo, AAS, Quintans-Júnior, LJ, Coutinho, HDM, Menenzes, IRA (2017) Chemical profile, cytotoxic and antiparasitic activity of *Operculina hamiltonii*. *South African Journal of Botany* 112: 447-451.

Bye R, Linares E (2016) Ethnobotany and ethnohistorical sources of Mesoamerica. In: Lira R, Casas A, Blancas J (eds) *Ethnobotany of Mexico: interactions of people and plants in Mesoamerica*. Springer, New York 41-65.

Castañeda-Gómez, J, Pereda-Miranda, R (2011) Resin Glycosides from the herbal drug Jalap (*Ipomoea purga*). Journal of Natural Products 74: 1148-1153.

Castañeda-Gómez, J (2012) Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de *Ipomoea purga*. Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM, México.

Castañeda-Gómez, J, Charry, PA, Pereda-Miranda, R (2013) Empleo de métodos analíticos modernos para el aislamiento y la identificación de resinas glicosídicas de la familia Convolvulaceae, Revista de Investigaciones Universidad del Quindío 24: 19-29.

Eich, E., (2007) Solanaceae and Convolvulacea: Secondary Metabolites., Secondary Metabolites Derived from Fatty Acids and Carbohydrates, Springer 8(3): 525-532.

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.

Galvao, MAM, Ferreira, MRA, Nunes, BM, Santana, ASCO, Randau, KP, Soares, LAL (2014) Validation of a spectrophotometric methodology for the quantification of polysaccharides from roots of *Operculina macrocarpa* (jalapa). ELSEVIER., Revista Brasileira de Farmacognosia 24:683-690.

Gomes, A, da Silva, P, Soares, S, da Silva, CE, Gallão, MI, Germani, R, Ricardo, N (2009) Isolation and physico-chemical and rheological characterisation of the Brazilian jalap starch (*Operculina tuberosa* Meisn.). Carbohydrate Polymers 77: 885-890.

Jalapa (Batata-De-Purga) - Convolvulus Operculata Consultada el 21-05-2019 a las 2:49 hrs.

(<https://www.extra.com.br/bebidas/cha/chasinstantaneos/jalapa--batata-de-purga---convolvulus-operculata--6165526.html>)

Lira-Ricárdez, J, Pereda-Miranda, R, Castañeda-Gómez, J, Fragoso-Serrano, M, Costa Simas, R, Guimarães Leitão, S (2019) Resin Glycosides from the roots of *Operculina macrocarpa* (Brazilian Jalap) with Purgative Activity. *Journal of Natural Products* 82: 1664–1677.

Lobo, KMS, Athayde, ACR, Silva, AMA, Rodrigues, FFG, Lobo, IS, Bezerra, DAC, Costa, JGM (2010) Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano 12(2): 227-233.

Lotina-Hennsen, B, King-Díaz, B, Pereda-Miranda, R (2013) Tricolorin A as a Natural Herbicide. *Molecules* 18:778–788.

Meira, M, Silva, EP, David, JM, David, JP (2012) Review of the genus *Ipomoea*: traditional. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 22: 682-713.

Michelin, D, Gandolfo Finati, SC, Silva Sacramento, LV, Vilegas, W, Nunes Salgado, H (2010) Controle de qualidade de raiz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urb., *Convolvulaceae*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 20:18-22.

Moreno-Velasco, A (2019) Aplicación de técnicas de alta resolución para la purificación (HPLC) y la caracterización estructural (RMN y EM) de las resinas glicosídicas de *Ipomoea alulata*. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, México.

Nagano, T, Pospíšil, J, Chollet, G, Schulthoff, S, Hickmann, V, Moulin, E, Herrmann, J, Müller, R, Fürstner, A (2009) Total synthesis and biological evaluation of the cytotoxic resin glycosides ipomoeassin A–F and analogues. *Chemistry A European Journal* 15 (38): 9697-9706.

Noda, N, Ono, M, Miyahara, K, Kawasaki, T (1987) Resin Glycosides I. Isolation and

Structure Elucidation of Orizabin I, II, III and IV, genuine Resin Glycosides from the root of *Ipomoea Orizabensis*. *Tetrahedron* 43: 3889-3902.

Noda, N, Yoda, S, Kawasaki, T, Miyahara, K (1992) Resin Glycosides. XV. Simonins I-V, Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from the Root of *Ipomoea batatas* (cv. Simon). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40: 3163-3168.

Olayiwola, A (1993) Las plantas medicinales: Un tesoro que no debemos desperdiciar. *Medicina Tradicional*, pág. 390-395.

(https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/47707/WHF_1993_14_4_p390-;jsessionid=35099469780F7FDE36741C1D2D5725D4?sequence=1) Consultada el 8 de Abril del 2019 a las 6:50 p.m.

Ono, M, Kawasaki, T, Miyahara, K, (1989) Resin Glycosides. V. Identification and Characterization of the Component Organic and Glycosidic Acids of the Ether-Soluble Crude Resin Glycosides (“Jalapin”) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 37: 3209-3213.

Ono, M, Nishi, M, Kawasaki, T, Miyahara, K (1990) Resin Glycosides IX. Operculins I, II, V, VII and VIII, New Ether-Soluble Resin Glycosides of *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (the Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 38: 2986-2991.

Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K (1991). Resin Glycosides. XI. Operculins III, IV, IX, X, XVI, XVII and XVIII, New Ether-Soluble Resin Glycosides of *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (Root of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 39: 2534-2539

Ono, M., Fujimoto, K., Kawata, M., Fukunaga, T., Kawasaki, T., Miyahara, K (1992). Resin Glycosides. XIII. Operculins VI, XI, XII, XIII, XIV and XV, the Ether-Soluble Resin Glycosides (Jalapin) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (Roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 40: 1400-1403.

Ono, M (2017) Resin glycosides from Convolvulaceae plants. *Journal of Natural Medicine* 71: 591-604.

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, Bah, M (2003) Biodynamic Constituents in the Mexican Morning Glories: Purgative Remedies. *Current Topics in Medicinal Chemistry* 3: 111-131.

Pereda-Miranda, R, Fragoso-Serrano, M, Escalante-Sánchez, E, Hernández- Carlos, B, Linares, E, Bye, R (2006a) Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *Journal of Natural Products* 69:1460–1466.

Pereda-Miranda, R, Kaatz, GW, Gibbons S (2006b) Polyacylated oligosaccharides from medicinal Mexican morning glory species as antibacterials and inhibitors of multidrug resistance in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Natural Products* 69:406-409.

Pereda-Miranda, R, Rosas-Ramírez, D, Castañeda-Gómez, J (2010) Resin glycosides from the morning glory family, in: Kinghorn A, Falk H, Kobayashi J. (Eds.) *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, Springer Verlag, New York, 92: 77–153.

Pereda-Miranda, R, Villatoro-Vera, R, Bah, M, Lorence, A (2009) Pore-forming activity of morning glory resin glycosides in model membranes. *Revista Latinoamericana de Química*, 37:144-154.

Pierdoná, TM, Lima, NR, Rodrigues, RCM, Teixeira, JP, Goncalves, RP, Fontenele, JB, Vasconcelos, SMM, Viana, GSB, Leal, LKAM (2014) The *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (*jalapa*) tincture modulates human blood platelet aggregation. *Journal of Ethnopharmacology*. 151: 151-157.

Reserva Madre de Luna, *Operculina hamiltonii* (http://www.mae-dalua.org/port/flora_species/operculina_hamiltonii_00.html#mdl_header) Consultado el 7 de mayo de 2019. 4:25 hrs.

Song, WB, Wang, WQ, Zhang, SW, Xuan, LJ (2015) Multidrug resistance-reversal effects of resin glycosides from *Dichondra repens*, 795-798.

Staples, George, Er, E (2011) Convolvulaceae Unlimited, *Operculina hamiltonii* (<http://convolvulaceae.myspecies.info/content/operculina-hamiltonii-0>) consultada el 8 de mayo de 2019.

Shellard EJ (1961b) The chemistry of some convolvulaceous resins. Part 2. Brazilian Jalap. *Planta Med* 9:141–145

Votocěk E, Prelog V (1929) Sur l'acide 3,12-dioxypalmitique, composant de l'acide rhamnoconvolvulique. *Coll Trav Chim Tchécoslovaq* 1:55–64

Watson & Dallwitz (2000) Familia Convolvulaceae, Flota Arvensis de Navarra, Herbario de la Universidad Pública de Navarra, Consultado en 21-05-2019 a las 1:13 hrs. (<https://www.unavarra.es/herbario/htm/Convolvulaceae.htm>)