



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
ESTRUCTURAL DE GLICOLÍPIDOS PRESENTES EN  
FRACCIONES DE LAS RESINAS DE *Ipomoea intrapilosa*  
ROSE (CONVOLVULACEAE)”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ANA RUTH DÍAZ OLGUÍN**

**DIRIGIDA POR**

**M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2009.**

No. Adq. 159380

No. Título \_\_\_\_\_

Clas TS

668.372

D542a

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“AISLAMIENTO, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN  
ESTRUCTURAL DE GLICOLÍPIDOS PRESENTES EN  
FRACCIONES DE LAS RESINAS DE *Ipomoea intrapilosa*  
ROSE (CONVOLVULACEAE)”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**ANA RUTH DÍAZ OLGUÍN**

**DIRIGIDA POR**

**M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ**

**SINODALES**

**M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ**  
DIRECTOR

\_\_\_\_\_

**Dr. MAMADOU MOUSTAPHA BAH**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Dra. DORA MARINA GUTIÉRREZ AVELLA**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

**Q.B. SERGIO PACHECO HERNÁNDEZ**  
SINODAL

\_\_\_\_\_

## DEDICATORIAS

A **DIOS** por estar siempre conmigo, por ayudarme en todos los momentos difíciles, por darme la vida y permitirme concluir estos estudios.

A mis **PADRES** por todo su esfuerzo económico, físico y emocional, por su paciencia, apoyo y amor que siempre me han brindado, por confiar en mí y por hacer de mí la mujer que hoy soy. GRACIAS, LOS AMO y Dios los bendiga siempre.

A mi prometido y amor de mi vida **ALEJANDRO** por ser el hombre que eres, por tu paciencia, bondad y fortaleza, por amarme, alentarme e impulsarme en todo momento. TE AMO.

A mi hermano **GERSON** por su apoyo y amistad.

A mi **FAMILIA**: mis abuelos, mis tíos y primos que estuvieron en esta etapa de mi vida y me brindaron su apoyo.

A mi Pastor **ÁNGEL** por todos los sabios consejos, por la paciencia y apoyo que ha brindado a mi vida.

A mi amigo y profesor favorito **ISIDRO** por ser el profesor más dedicado y entregado que pude tener, por ser un hombre luchador y emprendedor que no teme a los retos ni a la adversidad. TE ADMIRO.

## AGRADECIMIENTOS

Al Programa Integral de Fortalecimiento Institucional (PIFI 3.1) del año 2004 por el soporte económico para la realización de este trabajo de tesis.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, que mediante la Facultad de Química, hicieron de mí una profesionista, inculcándome responsabilidad y valores.

Al Laboratorio de Química de Microescala por el apoyo en los equipos y materiales proporcionados para el trabajo.

Al M. en C. Isidro Reséndiz López director de esta tesis por su tiempo, esfuerzo, conocimiento, paciencia, amistad, confianza, apoyo y guía para culminar esta meta en mi vida.

Al Dr. Mamadou Moustapha Bah director del Laboratorio de Química de Productos Naturales por sus conocimientos, su tiempo, equipo y confianza para realizar este trabajo.

Al Dr. Pereda Miranda de la Facultad de Química de la UNAM, por su colaboración y apoyo en el registro de los espectros de RMN.

A Raquel Castañeda Moreno por su tiempo y paciencia en la capacitación para este proyecto.

A Sonia Ruiz Luna por proporcionar las bases y fracciones obtenidas en su trabajo de investigación que dieron pie a la realización de este trabajo.

A Gabriela Arredondo Acosta por el trabajo a la par y en equipo, por su sincera e incondicional amistad y apoyo.

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	ii
ÍNDICE DE FIGURAS	iii
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 La familia Convolvulaceae	2
II.2 El género <i>Ipomoea</i>	2
II.3 Perfil químico de <i>Ipomoea</i>	5
II.4 Metodología general de aislamiento de glicolípidos	6
II.5 Elucidación estructural de los glicolípidos	8
III. HIPÓTESIS	10
IV. OBJETIVOS	11
IV.1 General	11
IV.2 Específicos	11
V. METODOLOGÍA	12
V.1 Materiales	12
V.2 Métodos	13
V.3 Diseño experimental	13
VI. RESULTADOS	14
VI.1 Análisis mediante cromatografía de líquidos	14
VI.2 Perfil cromatográfico de la banda IPS-20	14
VI.3 Purificación del compuesto IRL-3	16
VI.4 Purificación del compuesto IRL-5	16
VII. DISCUSIÓN	30
VIII. CONCLUSIONES	34
IX. BIBLIOGRAFÍA	35

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Pesos de los picos recolectados de la banda IPS-20 de <i>I. intrapilosa</i> .	15

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Fotografía de dos aspectos de: (A) <i>I. murucoides</i> : planta completa en su hábitat natural, (B) flores de <i>I. murucoides</i> , (C) flor de <i>I. intrapilosa</i> .	3
2	Ilustración de diferentes partes de <i>I. intrapilosa</i> . (A) Cazahuate enano en su habitad natural, (B) tronco, (C) hoja y (D) frutos.	4
3	Lipopolisacáridos aislados de <i>I. intrapilosa</i> .	7
4	Estructuras de las orizabinas, primeros glicolípidos genuínos aislados.	8
5	Cromatograma de la fracción 18-35 de <i>I. intrapilosa</i> .	14
6	Perfil de la banda IPS-20 de <i>I. intrapilosa</i> .	15
7	Cromatograma del compuesto IRL-3 de <i>I. intrapilosa</i> .	16
8	Cromatograma del compuesto IRL-3 de <i>I. intrapilosa</i> .	17
9	Cromatograma del compuesto IRL-5 de <i>I. intrapilosa</i> .	17
10	Reciclaje del compuesto IRL-5 de <i>I. intrapilosa</i> .	18
11	Espectro de masas modalidad FAB negativo del pico IRL-3.	19
12	Espectro de RMN $^1\text{H}$ del pico IRL-3 (Az = azúcar).	20
13	Ampliación de una zona del espectro RMN $^1\text{H}$ del pico IRL-3.	21
14	Ampliación de la zona de campo alto del espectro RMN $^1\text{H}$ del pico IRL-3.	22
15	Espectro RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del pico IRL-3.	23
16	Ampliación de una región del espectro RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ COSY del pico IRL-3.	24
17	Espectro RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY del pico IRL-3.	25
18	Ampliación de la región de campo bajo del espectro de RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY del pico IRL-3.	26
19	Ampliación de una zona del espectro RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY del pico IRL-3.	27

20	Ampliación de una zona del espectro RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY del pico IRL-3.	28
21	Ampliación de la zona de campo alto del espectro RMN bidimensional homonuclear $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$ TOCSY del pico IRL-3.	29
22	Desplazamientos químicos de los protones del cinamoato.	32
23	Estructura genérica del lipopentasacárido IRL-3 aislado de <i>Ipomoea intrapilosa</i> .	33

## RESUMEN

Las especies vegetales de Convolvulaceae como *Ipomoea intrapilosa* constituyen una fuente importante de resinas glicosídicas, a las cuales se les atribuyen diversas actividades biológicas, siendo más conocidos los efectos purgantes; pero también otras especies tienen uso agrícola. *I. intrapilosa* es una especie arbórea cuyas semillas se emplean como insecticidas naturales que ayudan a combatir plagas [*Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Epilachna varivestis*, y *Trialeurodes vaporariorum*], particularmente dañinos al maíz. Por lo tanto, esta especie vegetal arbórea puede ser una fuente importante de insecticidas naturales biodegradables. El presente proyecto se enfocó al aislamiento y a la caracterización estructural de algunos constituyentes individuales mayoritarios de su resina glicosídica de mediana polaridad. Como herramienta básica de aislamiento y purificación, se empleó la cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). Se aislaron dos compuestos, aunque por el rendimiento, sólo se registraron algunos de los espectros de RMN y el de masas en la modalidad FAB negativo de uno de ellos, el cual fue caracterizado como un isómero posicional de la intrapilosina III aislada previamente en esta especie.

## I. INTRODUCCIÓN

La investigación de productos naturales a partir de plantas de uso tradicional en la medicina y en la agricultura ha conducido a menudo al descubrimiento de nuevos compuestos de interés biológico, ya sea para tratar o prevenir enfermedades, para uso en la agricultura como herbicidas biodegradables. *I. intrapilosa* Convolvulaceae es una especie arbórea cuyas semillas se emplean como insecticidas naturales que ayudan a combatir insectos [*Spodoptera frugiperda* (gusano cogollero), *Epilachna varivestis*, y *Trialeurodes vaporariorum*], particularmente dañinos al maíz.

Las especies del género *Ipomoea* se caracterizan por sus resinas glicosídicas, cuyas propiedades farmacológicas más reconocidas son sus efectos purgantes. Sin embargo, se ha reconocido cada vez con mayor evidencia que los oligosacáridos presentes en estas resinas constituyen además un almacén de información y desempeñan un papel clave en diferentes procesos biológicos complejos, dependiendo de su estructura molecular y, por lo tanto, de las interacciones específicas que presentan con otros constituyentes del organismo, principalmente las proteínas. Más recientemente, se ha descrito también su papel como mediadores de numerosas interacciones alelopáticas. Esto pone en evidencia la presencia de compuestos fitotóxicos como los principales constituyentes bioactivos de esta especie.

El amplio espectro de actividades biológicas atribuidas a estas resinas de las convolvuláceas, la complejidad y la diversidad estructural de los glicolípidos individuales que las constituyen, convierten a estos metabolitos en un sujeto de estudio muy atractivo. Bajo esta óptica, la presente propuesta tuvo como objetivo contribuir al aislamiento mediante el empleo de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia y a la caracterización química de los constituyentes individuales de algunas fracciones de las resinas de *I. intrapilosa*. El aislamiento, la purificación y la caracterización estructural de esos glicolípidos constituye un paso de primera importancia para continuar con la investigación de los mecanismos de acción involucrados en las actividades biológicas desarrolladas por estos glicolípidos.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 La familia Convolvulaceae

La familia de las convolvuláceas tiene amplia distribución en el mundo, particularmente en las zonas tropicales de Asia y América que tienen temporadas secas. Está integrada por unos 55 géneros y más de 1650 especies. Los géneros más representativos son *Convolvulus* (250 especies), *Ipomoea* (500 especies) y *Cuscuta* (170 especies). En México, se han registrado hasta la fecha 15 géneros y aproximadamente 217 especies en la familia, siendo *Ipomoea* uno de los géneros mayoritarios, con un grado de endemismo de aproximadamente el 65%, es decir, la relación entre el número de especies presentes en el país y el número aproximado de especies en el género (104/160) (McDonnald, 1991). Varias especies presentan principios alucinógenos y, en general, en esta familia están representados los alcaloides de tipo indólico, isoquinolínico y tropánico. Además, se han descrito resinas glicosídicas purgantes, ácidos fenólicos y saponinas triterpénicas (Trease y Evans, 2002).

### II.2 El género *Ipomoea*

#### II.2.1 Morfología y usos

La mayoría de las plantas del género *Ipomoea* no presentan una variación importante en su morfología. Son plantas enredaderas con tallos enroscados que alcanzan de 1 a 5 metros, además de presentar flores en forma de campana (Argueta, 1994). Existen unas cuantas especies como *I. phillomega* e *I. santillanii* que se presentan como lianas tropicales y alcanzan alturas de hasta 15 metros. Otras especies como *I. imperata* e *I. pescaprae* crecen a iguales longitudes, pero han perdido su capacidad de enroscarse creciendo de manera tendida. Otras especies de las zonas áridas son arbustos perennes leñosos y herbáceos, que crecen hasta un metro. Las especies *I. arborescens* e *I. murucoides* crecen en forma de árboles de madera suave y alcanzan de 3 a 9 metros de altura.

Algunas de las especies que integran el género se consumen en diversas partes del mundo como alimento; por ejemplo, *I. batatas* es una especie de reconocido valor nutritivo, ya que su raíz, conocida como camote, es rica en almidón y azúcar (Pereda-Miranda, 1995), mientras que otras se utilizan en la medicina tradicional y forman parte de numerosas farmacopeas herbolarias como remedios tradicionales.

Entre los principales usos de las plantas del género *Ipomoea* se encuentran sus propiedades purgantes (Díaz, 1976; Pereda-Miranda, 1995; Trease y Evans, 2002) siendo el principal exponente *I. purga*, conocida como “raíz de Jalapa”, que desde la época prehispánica se utiliza como un poderoso laxante, con un amplio comercio en la actualidad. En el centro de México, la raíz de *I. stans*, mejor conocida como “tumba vaqueros”, se usa como catártico, y en el tratamiento de enfermedades del corazón. Probablemente, más de la mitad de especies de este género tienen un potencial hortícola, muchas de las cuales se encuentran cultivadas en jardines y huertos familiares en gran parte de México, por ejemplo los populares quebraplátos.

Muchas de las especies arbóreas de *Ipomoea* se parecen en su morfología. Esas semejanzas pueden apreciarse sobre todo en las flores como se muestra para *I. murucoides* e *I. intrapilosa* en la Figura 1 (Ruiz-Luna, 2006).

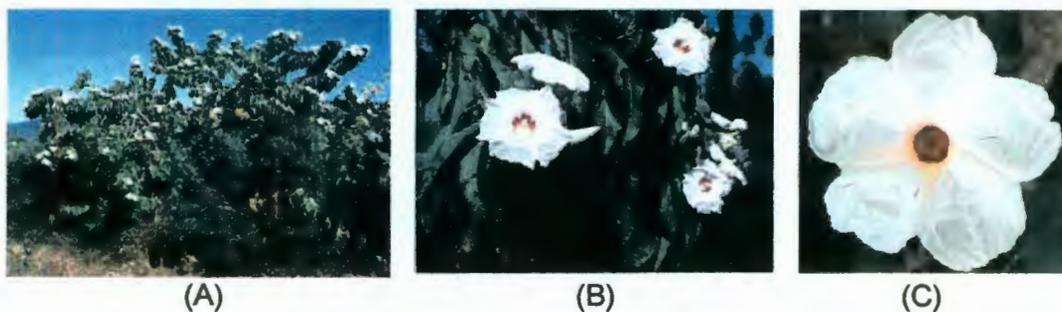


Figura 1. Fotografía de dos aspectos de: (A) *I. murucoides*: planta completa en su hábitat natural, (B) flores de *I. murucoides*, (C) flor de *I. intrapilosa*.

### II.2.2 La especie *I. intrapilosa*

*I. intrapilosa* (Figura 2) es un árbol que alcanza una altura de 3 a 8 metros, racemoso, con ramas péndulas y lisas. Posee hojas pecioladas, glabras, con pecíolo delgado y liso de 3 a 6 cm, de lámina elíptica, redonda o truncada en la base, acuminada glabra de 8 a 12 mm, uni o pluríferos; con pedicelos de 1 a 2 cm y sépalos iguales, anchamente ovales, obtusamente agudos de 8 a 12 mm de largo por 5 a 7 mm de ancho, glabros afuera y finamente blanco pilosos en la parte inferior; su corola es de color blanco de 4 a 5 cm, de largo. El fruto se encuentra en una cápsula ovoidea de 2 cm de largo, con semillas de 5 a 6 mm con pelos blancos en los ángulos dorsales.

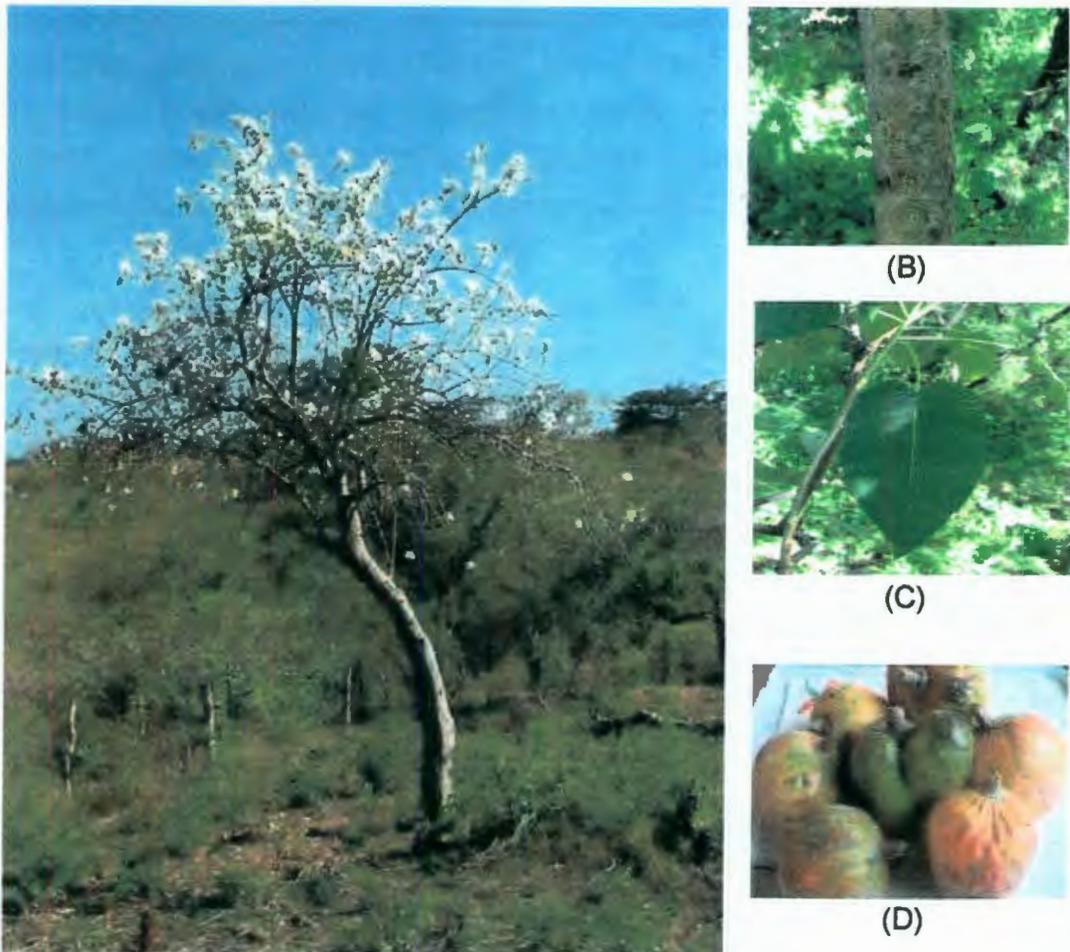


Figura 2. Ilustración de diferentes partes de *I. intrapilosa*. (A) cazahuate enano en su habidad natural, (B) tronco, (C) hoja y (D) frutos.

*I. intrapilosa* se distribuye a todo lo largo del territorio mexicano desde los estados de Sonora, Sinaloa, Jalisco, Guerrero, Morelos y Oaxaca, hasta el territorio de Guatemala (Matuda, 1963, 1964, 1965). Recibe los nombres de Cazahuate enano en Puebla, Cazahuate blanco en Jalisco, "Lime-quipa-ca-tu-ue" en lengua chontal de Oaxaca, Ochote en Zacatecas, Pájaro bobo en Oaxaca, Palo blanco, Palo bobo, Sosote en Jalisco (Martínez, 1987). Además, se ha encontrado que dicha especie posee propiedades analgésicas en sus flores y semillas (Figura 2) (Osuna/Ponce-Monter, 1996).

*I. intrapilosa* es un árbol que renueva anualmente su follaje y en la época de floración, desde finales de septiembre hasta principios de enero del año siguiente, se cubre totalmente de flores blancas muy vistosas, resaltando notablemente esta especie en la vegetación del área (Soria, 1985).

Los usos de esta especie son diversos; así, en Hueyapan, Morelos, se le atribuyen propiedades digestivas y se utiliza para tratar problemas gastrointestinales. En el municipio de Zacatepec, Morelos, el té preparado con las hojas se emplea en la terapia de los padecimientos renales (Banco de Datos, IMSS). En la zona cercana a Cuernavaca, se ha reportado el uso de esta planta entre los jóvenes para inducir estados neurotóxicos.

### II.3 Perfil químico de *Ipomoea*

#### II.3.1 Resinas glicosídicas de *Ipomoea*

La propiedad medicinal de mayor reconocimiento para las plantas del género *Ipomoea* es el efecto purgante de sus resinas. Un amplio espectro de bondades medicinales adicionales se ha descrito en el uso popular para un gran número de estas especies; algunas de esas bondades han sido confirmadas mediante experimentación farmacológica (Contreras y col., 1996).

Sin embargo, la naturaleza química y la complejidad estructural de las resinas glicosídicas ha constituido un obstáculo que ha dificultado durante mucho tiempo el aislamiento de sus constituyentes individuales y, por lo tanto, la

caracterización de su estructura molecular. Entre los métodos comunes de separación que se han empleado para tratar de resolver las mezclas complejas de oligosacáridos que conforman las resinas de las convolvuláceas se cuenta con los procedimientos de partición líquido-líquido y las técnicas cromatográficas en capa fina y columna. De las particiones, en un principio solo se obtuvieron dos categorías de resinas, la fracción poco polar y soluble en éter (o cloroformo) denominada "jalapina" y la insoluble en ese disolvente o "convolvulina" (soluble en MeOH), de acuerdo a la clasificación de Mayer (Ono y col., 1989).

Los glicolípidos característicos del género *Ipomoea* constituyen una serie de oligosacáridos que tienen la particularidad de ser moléculas anfipáticas por la presencia simultánea en su estructura de un núcleo oligosacárido hidrofílico y una porción hidrofóbica constituida por las agliconas. En la Figura 3, se presentan dos ejemplos de lipopolisacáridos aislados de *I. intrapilosa*. Debido a esta característica estructural, se ha postulado que estos glicolípidos desempeñan un papel importante en la química de la familia Convolvulaceae (Bah y Pereda-Miranda, 1996, 1997), ya que un gran número de sus actividades biológicas pueden explicarse como un resultado de su posible acción ionofórica, e.g. la citotoxicidad, misma que provocaría perturbaciones en la membranas celulares (Pereda-Miranda y Hernández-Carlos, 2002).

Por otra parte, los compuestos responsables de la actividad alelopática para las especies de *Ipomoea* utilizadas como cultivo de cobertura en las prácticas agrícolas son las resinas glicosídicas, las cuales en *I. stans* han demostrado tener propiedades anticonvulsivas, citotóxicas y efectos vasoactivos (Hernández, 2000).

#### II.4 Metodología general de aislamiento de glicolípidos

La determinación de mono y disacáridos mediante la cromatografía de líquidos de alta resolución ha sido descrita en trabajos previos (Nikolov y col., 1985; Anonymous, 1998). Sin embargo, a pesar del amplio uso agrícola y medicinal de las especies del género *Ipomoea*, el aislamiento y la caracterización estructural

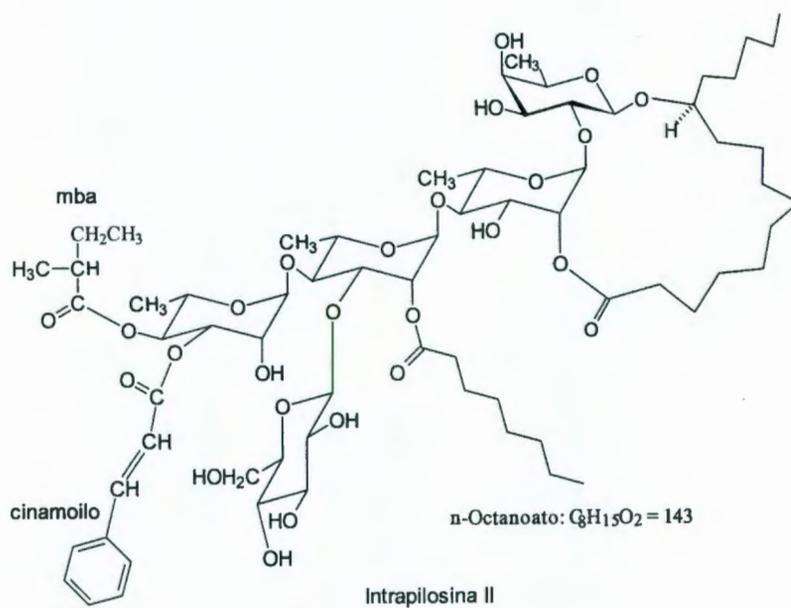
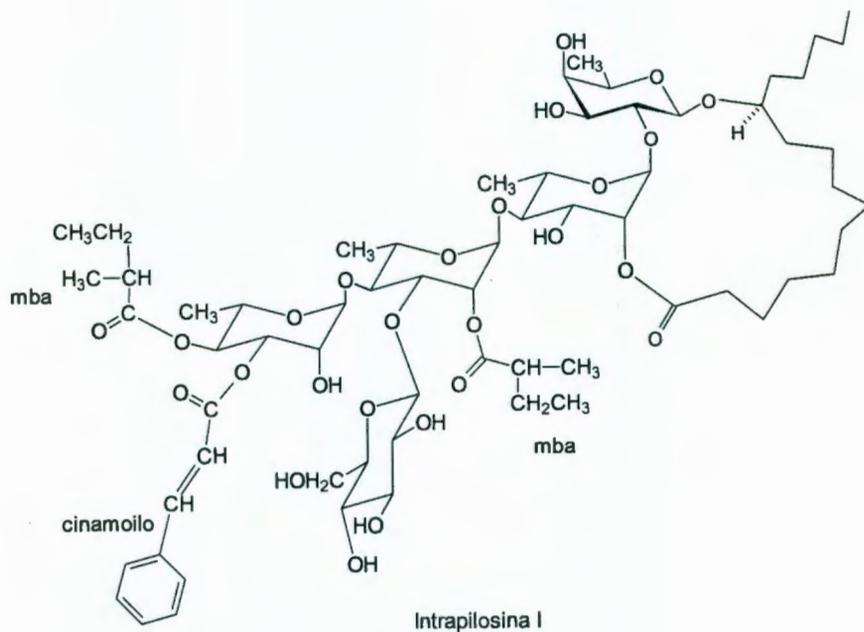


Figura 3. Lipopolisacáridos aislados de *I. intrapilosa*.

de sus constituyentes individuales ha resultado infructuosa durante más de cien años. Los primeros glicolípidos purificados y caracterizados fueron los descritos en un trabajo pionero realizado con la resina (jalapina) de *I. orizabensis* (Noda y col., 1987) (Figura 3).

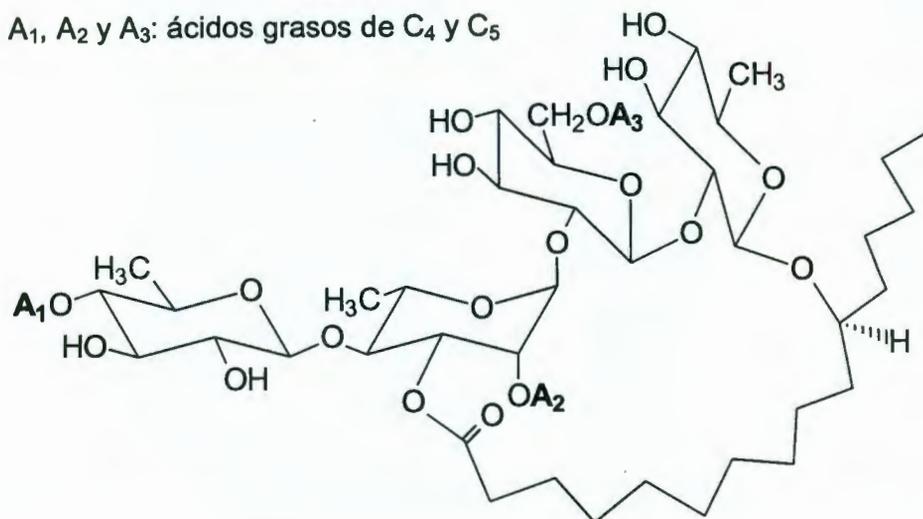


Figura 4. Estructuras de las orizabinas, primeros glicolípidos genuínos aislados.

## II.5 Elucidación estructural de los glicolípidos

### II.5.1. Espectrometría de masas

Tradicionalmente, la técnica del impacto electrónico sólo se ha limitado al análisis del tamaño de la aglicona y de la configuración de su centro quiral C-11, así como de los derivados permetilados o peracetilados de los ácidos glicosídicos obtenidos por saponificación de los compuestos naturales. Esos derivados se preparan para aumentar la volatilidad y la estabilidad de los ácidos. Sin embargo, el desarrollo de las técnicas de ionización suave, en especial la espectrometría de masas (EM) por bombardeo rápido de átomos (FAB: de sus siglas en inglés, Fast Atom Bombardment), hace posible llevar a cabo el análisis de los oligosacáridos naturales que representan compuestos no volátiles y termolábiles. Esa técnica permite establecer la secuencia de glicosilación y las unidades sacáridas portadoras de los grupos acilantes en los compuestos naturales, pero es particularmente útil en la determinación del tamaño de los dímeros. Sin embargo, a pesar de la valiosa información que se obtiene

mediante la EM-FAB, esta metodología no permite distinguir entre monosacáridos isoméricos como por ejemplo la fucosa, la ramnosa y la quinovosa, o la glucosa, la galactosa y la manosa, ya que la composición obtenida sólo se define en términos de hexosa, desoxihexosa o pentosa. Tampoco esta técnica proporciona información sobre la posición exacta de los sustituyentes. Para determinar la naturaleza de los monosacáridos y los sitios de acilación y de glicosilación, es inevitable recurrir a métodos alternos, como las reacciones de degradación y de derivatización, seguida de la identificación de los productos obtenidos, todo eso combinando con la resonancia magnética nuclear, sobre todo si se trata de heteropolisacáridos.

#### II.5.2. Resonancia magnética nuclear (RMN)

Esta metodología proporciona una panorámica más completa para la caracterización de la estructura de los glicolípidos, ya que permite determinar el número de monosacáridos, la configuración del centro anomérico de cada uno de ellos, los enlaces interglicosídicos, la secuencia de glicosilación y la naturaleza y el sitio de unión de los grupos ligados, tales como los ácidos grasos. Para esos objetivos, se emplea la RMN de alta resolución en sus diferentes modalidades.

El uso de plantas medicinales y de interés agrícola ha sido una práctica común en nuestro país, sin embargo pocos estudios han elucidado los componentes químicos de *I. intrapilosa*, por lo que, el presente trabajo se enfocó al aislamiento y a la caracterización estructural de los constituyentes individuales de este género.

## IV. OBJETIVOS

### IV.1 General

Purificar algunos de los constituyentes individuales de la resina de *I. intrapilosa* y establecer su estructura química.

### IV.2 Específicos

- Implementar condiciones en la cromatografía de líquidos a nivel analítico para una máxima resolución de los constituyentes individuales de la resina.
- Llevar a cabo un escalamiento a nivel preparativo para la purificación de algunos de los constituyentes de la resina.
- Establecer la estructura química de los metabolitos aislados, utilizando la espectrometría de masas de baja y alta resolución, así como la espectroscopía de resonancia magnética nuclear de alta resolución.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

#### V.1.1 Material para análisis cromatográficos

Membranas de nylon y polipropileno hidrofílico para filtración de disolventes (47 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de poro).

Jeringas micrométricas de vidrio de 100 y 500  $\mu\text{l}$  para inyección de muestras.

Jeringa de purga de 10 ml.

Loops (líneas de inyección) de diversas capacidades (5, 10, 20, 200 y 500  $\mu\text{l}$ ).

Matraces para filtración de disolventes de 5 l.

#### V.1.2 Disolventes, reactivos y fracciones de la resina de *Ipomoea intrapilosa* para análisis cromatográficos

Acetonitrilo grado HPLC de la marca Baker y/o Mallincrodt.

Metanol grado HPLC de la marca J. T. Bakery/o Mallincrodt.

Fracciones 18-35 de mediana polaridad de la resina de *Ipomoea intrapilosa*

#### V.1.3 Equipos e instrumentos para los análisis cromatográficos

Balanza analítica marca Ohaus (0.00001-250.0 g).

Columnas analíticas YMC PACK ODS-AQ S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm (250 X 20 mm DI) y

SimmetryPrep C18 7  $\mu\text{m}$ , 100 A (19 x 300 mm).

Sistema cromatográfico de la marca Waters equipado con una bomba cuaternaria de entrega de disolventes modelo 600, un detector de uv-visible programable 486, un inyector manual Rheodyne 7725i y un degasificador electrónico (Metachem Technologies Inc.). El control del equipo, la adquisición de datos, el procesamiento y manipulación de la información se realizó mediante el software Empower2 (Waters).

## V.2 Métodos

### V.2.1 Purificación de los compuestos

Una vez determinadas las condiciones óptimas de máxima resolución de los constituyentes, se procedió a llevar a cabo un escalamiento a nivel preparativo para la purificación final de los mismos. Se utilizó la válvula de reciclaje para la obtención en forma homogénea de los picos que lo requirieron.

### V.2.2 Identificación de compuestos aislados

Para ese objetivo se usaron métodos espectroscópicos (Agrawal, 1992; Duus y col., 2000) y espectrométricos (Haig, 2001; Ruiz-Luna, 2006). Se utilizó la espectroscopía RMN en sus diferentes modalidades. Esas incluyeron la RMN unidimensional  $^1\text{H}$ , así como las bidimensionales homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  (COSY, TOCSY).

## V.3 Diseño experimental

Se buscaron las condiciones óptimas de mejor resolución de los constituyentes individuales de las fracciones que se estudiaron en la cromatografía de líquidos. Se probaron varias fases estacionarias y móviles. Una vez obtenidas esas condiciones, se purificaron los compuestos presentes, llevando a cabo numerosas inyecciones. Se utilizó la técnica de reciclaje de picos en el caso que se estimó necesario. Finalmente, se registraron los datos espectroscópicos de los compuestos.

## VI. RESULTADOS

### VI.1 Análisis mediante cromatografía de líquidos

El análisis de la fracción clorofórmica 18-35 de *I. intrapilosa* mediante cromatografía de líquidos de alta presión generó el cromatograma de la Figura 5. De los componentes de este perfil, en el presente trabajo sólo se estudió la banda denominada como IPS-20.

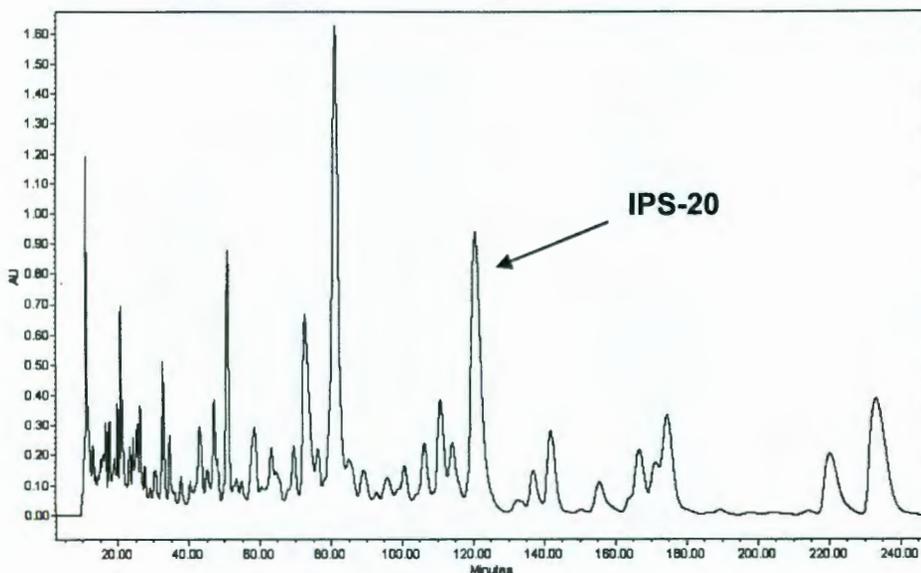


Figura 5. Cromatograma de la fracción 18-35 de *I. intrapilosa*. Condiciones de análisis: Columna YMC-PACK ODS-AQ™ S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm (250 x 20 mm DI); fase móvil isocrática de MeOH-CH<sub>3</sub>CN (4:6); flujo 5.0 mL/min; detección a 254 nm; volumen de inyección de 500  $\mu\text{L}$ ; tiempo de corrida 300 min.

### VI. 2 Perfil cromatográfico de la banda IPS-20

Como puede verse en la Figura 6, esa banda resultó ser a su vez bastante compleja. Los picos marcados con las claves IRL-3 e IRL-5 fueron los considerados en el presente trabajo, debido a que presentaron aspectos resinosos bien claros y tuvieron los mayores rendimientos. Los rendimientos de todos los picos colectados se muestran en el Cuadro 1. Los picos IRL-1, IRL-2 e IRL-4 fueron objeto de otros estudios que no formaron parte de la presente tesis.

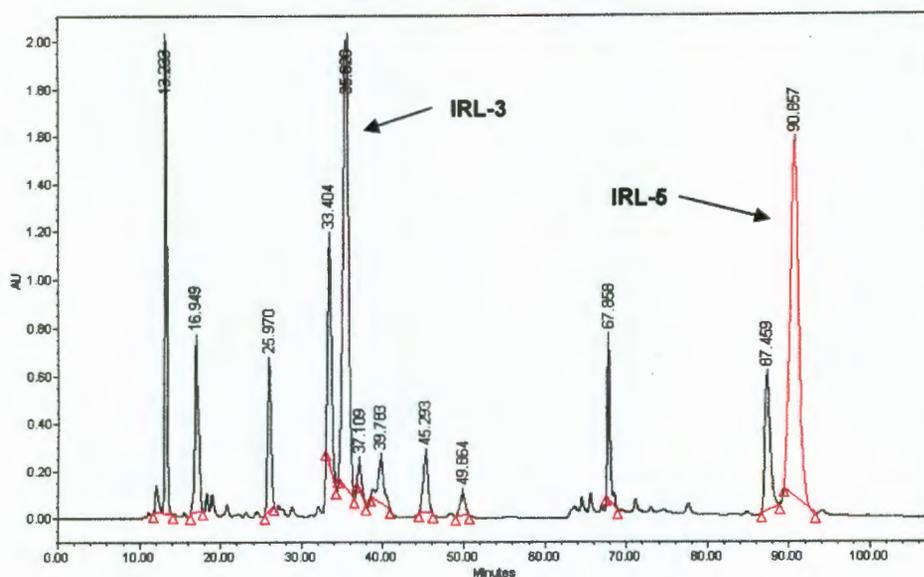


Figura 6. Perfil de la banda IPS-20 de *I. intrapilosa*. Condiciones de análisis: Columna YMC-PACK ODS-AQ™ S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm (250 x 20 mm DI); fase móvil isocrática de MeOH-CH<sub>3</sub>CN (1:9); flujo 5.0 mL/min; detección a 254 nm; volumen de inyección de 500  $\mu\text{L}$ ; tiempo de corrida 120 min.

Cuadro 1. Pesos de los picos recolectados de la banda IPS-20 de *I. intrapilosa* (Tr = tiempo de retención).

Pico	(Tr, en min)	Clave asignada	Peso obtenido (mg)	Peso puro (mg)
0	11.000		0.1	ND
1	13.233		0.3	ND
2	16.949		0.8	ND
3	25.970	IRL-1	1.1	ND
4	33.404	IRL-2	2.2	ND
5	35.620	IRL-3	5.4	2.7
6	37.109		ND	ND
7-8	39.783		ND	ND
9	45.293		ND	ND
10	49.864		0.4	ND
11	67.858		0.9	ND
12	87.459	IRL-4	1.3	ND
13	90.857	IRL-5	5.7	1.3

\*ND = No determinado

### VI. 3 Purificación del compuesto IRL-3

Se realizó un análisis cromatográfico del compuesto IRL-3 para corroborar su grado de pureza (Figura 7), y observando que éste era alto, pero de poca cantidad, no se procedió a un reciclaje, en cambio se realizó otro análisis cromatográfico modificando las proporciones de la fase móvil para obtener una mejor resolución y de aquí se observó un desdoblamiento mayor de otro componente, así que se cortó el pico mayoritario (Tr 15.9 min) para su identificación (Figura 8).

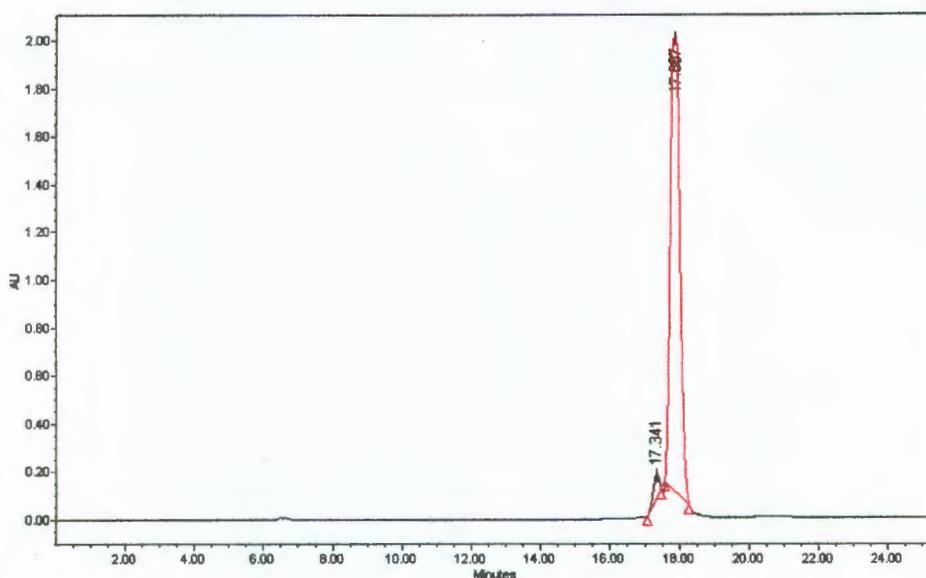


Figura 7. Cromatograma del compuesto IRL-3 de *I. intrapilosa*. Condiciones de análisis: Columna YMC ODS-AQ™ S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm (250 x 4.6 mm DI); fase móvil isocrática de MeOH-CH<sub>3</sub>CN (4:6); flujo 0.5 mL/min; detección a 254 nm; volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ .

### VI. 4 Purificación del compuesto IRL-5

Se realizó un análisis cromatográfico del compuesto IRL-5 (Figura 9) y se identificaron tres picos, el último y mayor pico, con un tiempo de retención de 51.450 min se cortó y recolectó.

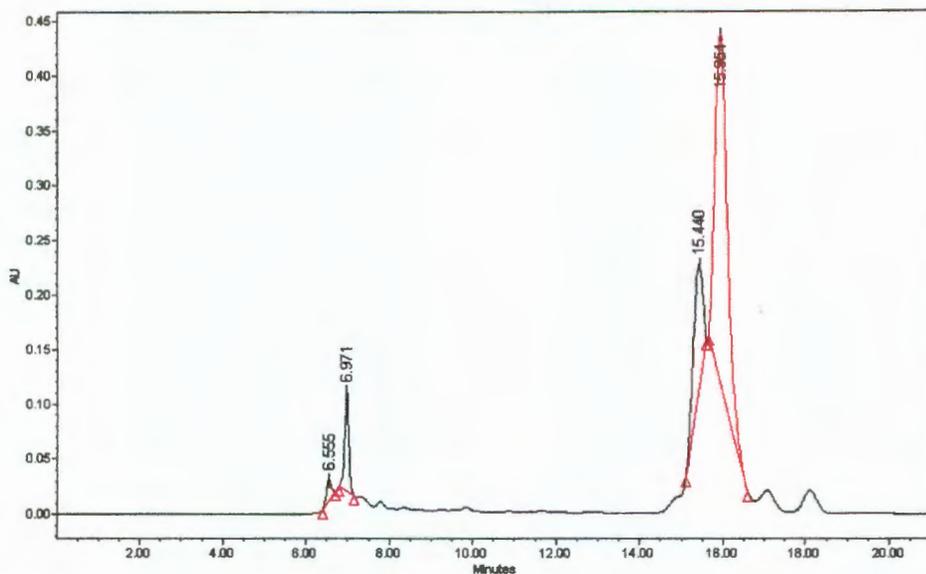


Figura 8. Cromatograma del compuesto IRL-3 de *I. intrapilosa*. Condiciones de purificación: Columna YMC-PACK ODS-AQ™ S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm (250 x 20 mm DI); fase móvil isocrática de MeOH-CH<sub>3</sub>CN (1:9); flujo 2.0 mL/min; detección a 254 nm; volumen de inyección de 200  $\mu\text{L}$ .

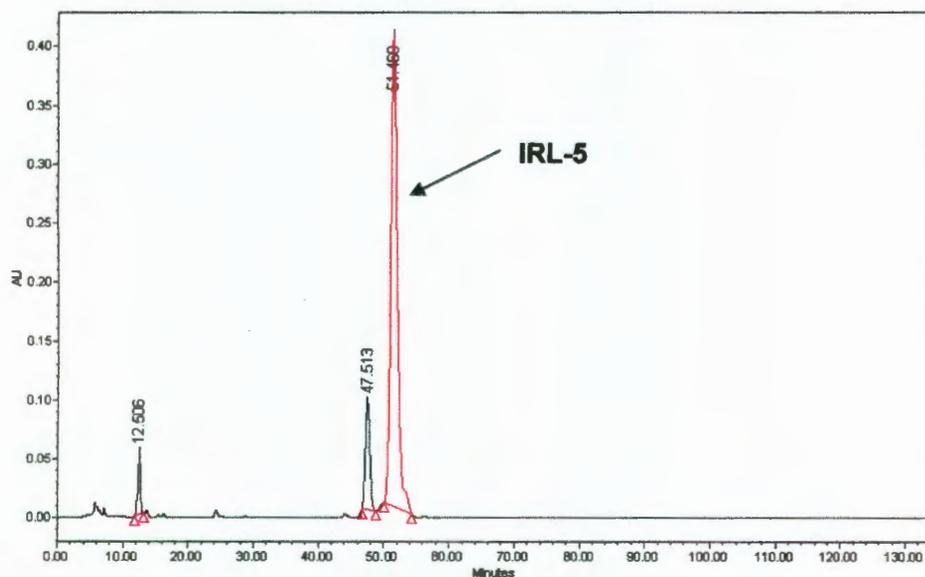


Figura 9. Cromatograma del compuesto IRL-5 de *I. intrapilosa*. Condiciones de análisis: Columna YMC ODS-AQ™ S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm (250 x 4.6 mm DI); fase móvil isocrática de MeOH-CH<sub>3</sub>CN (4:6); flujo 0.5 mL/min; detección a 254 nm; volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ ; tiempo de corrida 200 min.

Para corroborar el grado de pureza del compuesto IRL-5 se sometió al proceso de reciclaje (Figura 10) utilizando para ese propósito, la válvula correspondiente. Finalmente este compuesto se desechó porque la cantidad obtenida era no detectable.

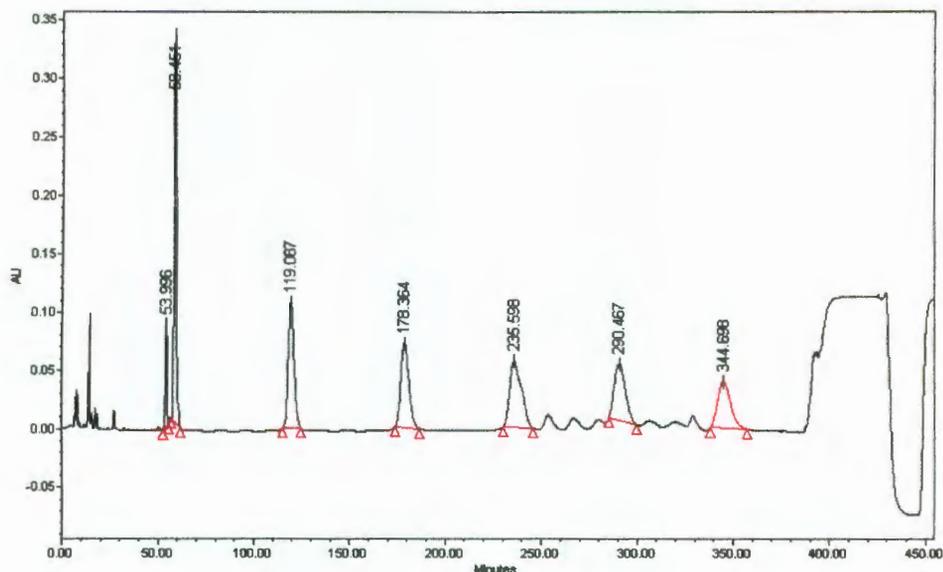


Figura 10. Reciclaje del compuesto IRL-5 de *I. intrapilosa*. Condiciones de análisis: Columna YMC ODS-AQ™ S-5  $\mu\text{m}$ , 12 nm (4.6 x 250 mm DI); fase móvil isocrática de MeOH-CH<sub>3</sub>CN (4:6); flujo 0.5 mL/min; detección a 254 nm; volumen de inyección de 20  $\mu\text{L}$ .

Se registraron los espectros tanto de masas modalidad FAB negativo (Figura 11), como de RMN <sup>1</sup>H (Figuras 12-21) del compuesto IRL-3. El estudio de esos espectros permitió visualizar la naturaleza del compuesto, pero no condujo a la identificación completa de su estructura, debido a la baja resolución de los mismos y al bajo rendimiento que no permitió registrar los espectros de RMN bidimensionales heteronucleares <sup>1</sup>H-<sup>13</sup>C.

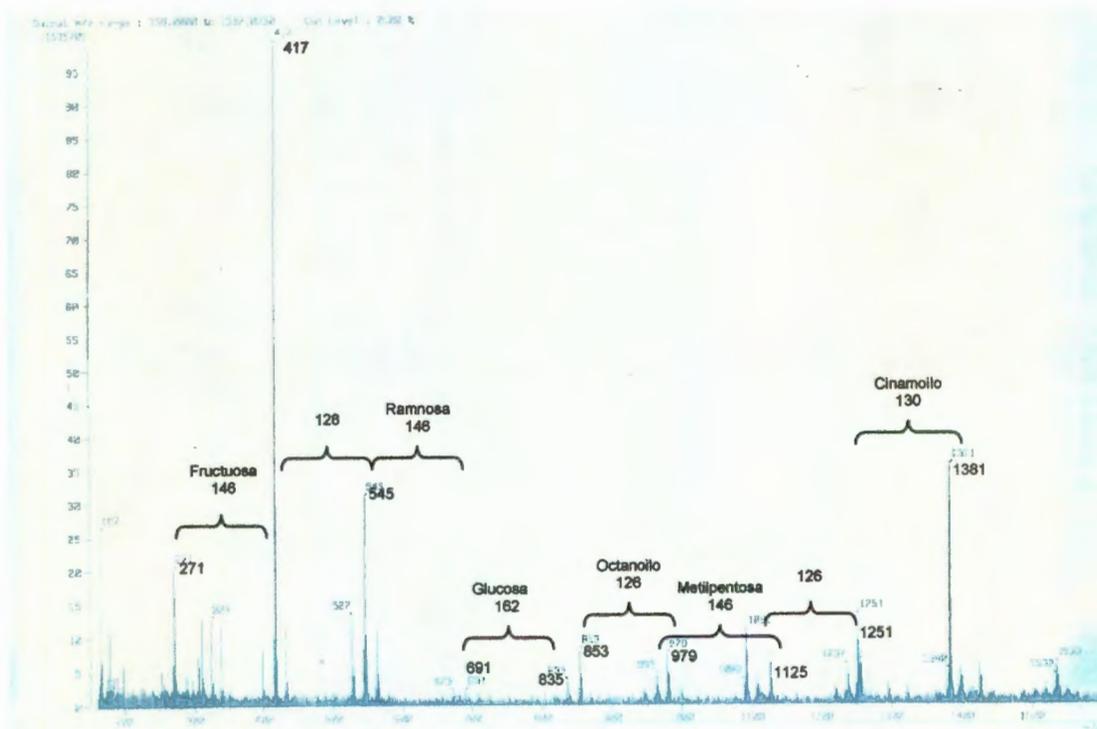
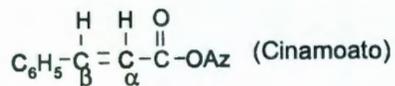


Figura 11. Espectro de masas modalidad FAB negativo del pico IRL-3.



H $\beta$ :  $\delta = 7.80$  (J = 16.0 Hz)

H $\alpha$ :  $\delta = 6.63$  (J = 16.0 Hz)

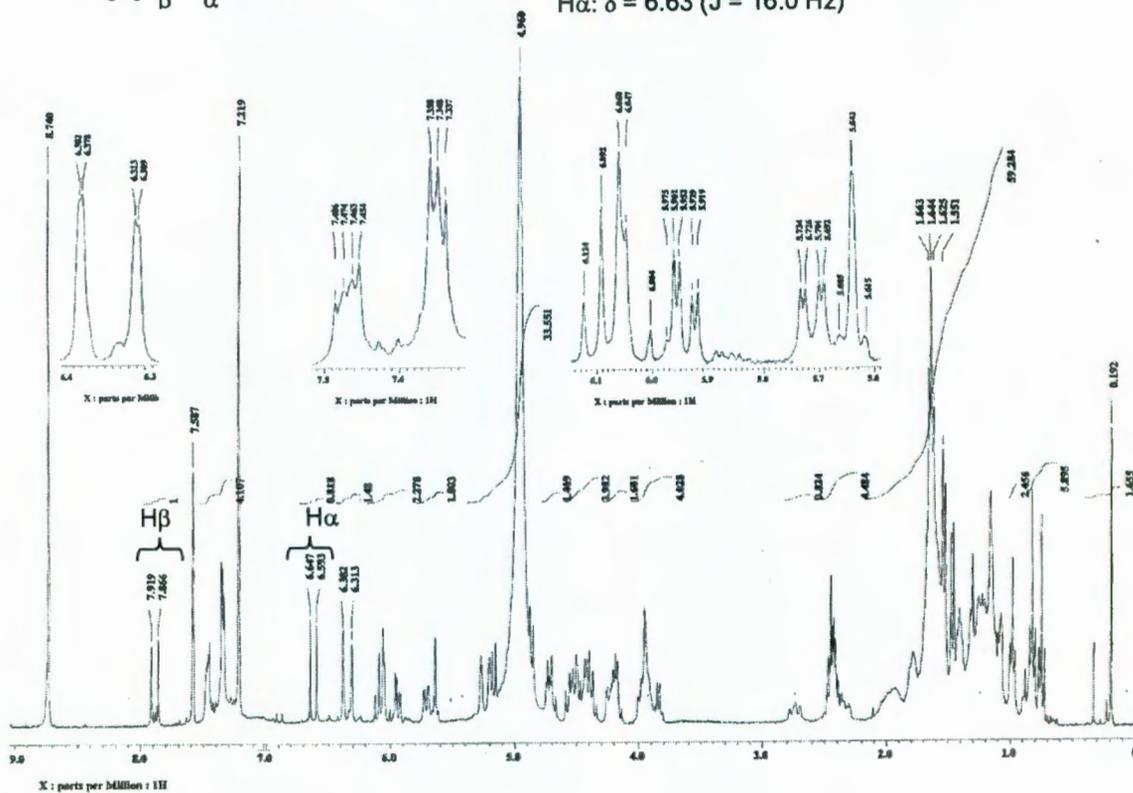


Figura 12: Espectro RMN  $^1\text{H}$  del pico IRL-3 (Az = azúcar).

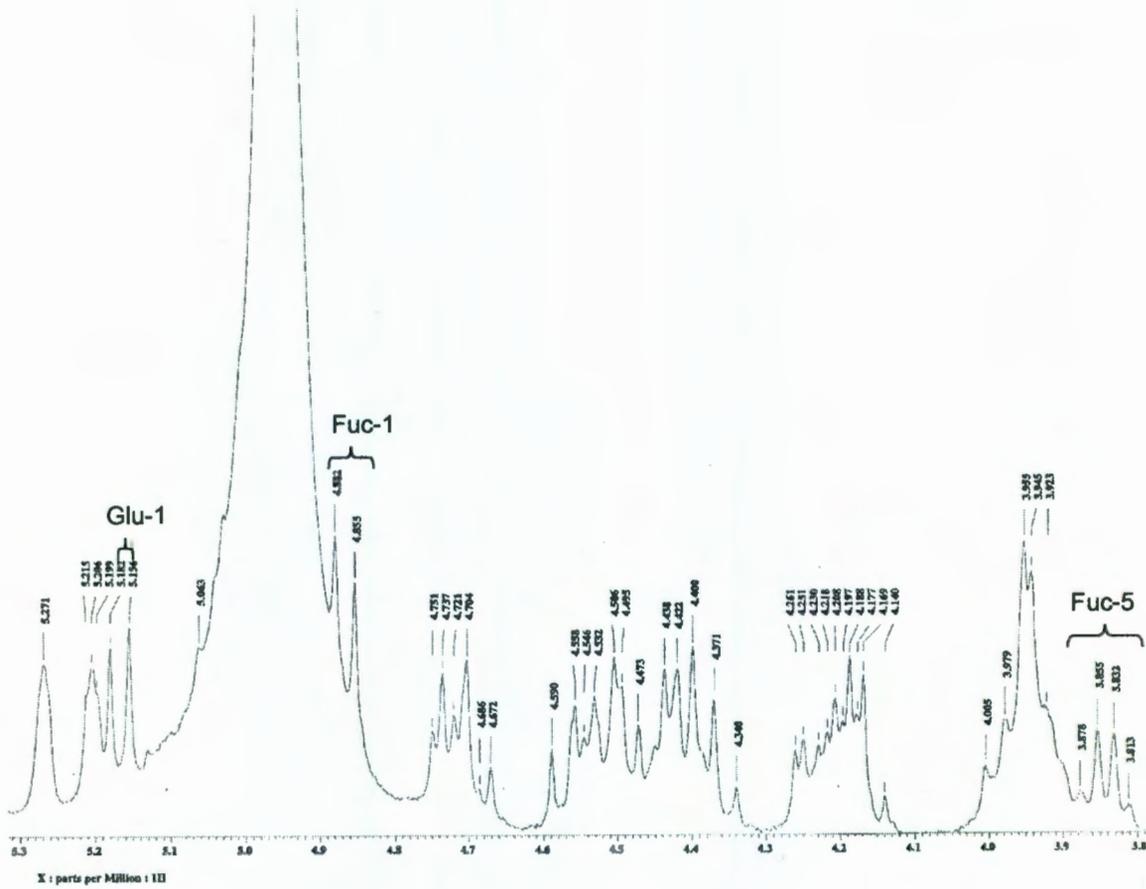


Figura 13: Ampliación de una zona del espectro RMN <sup>1</sup>H del pico IRL-3.

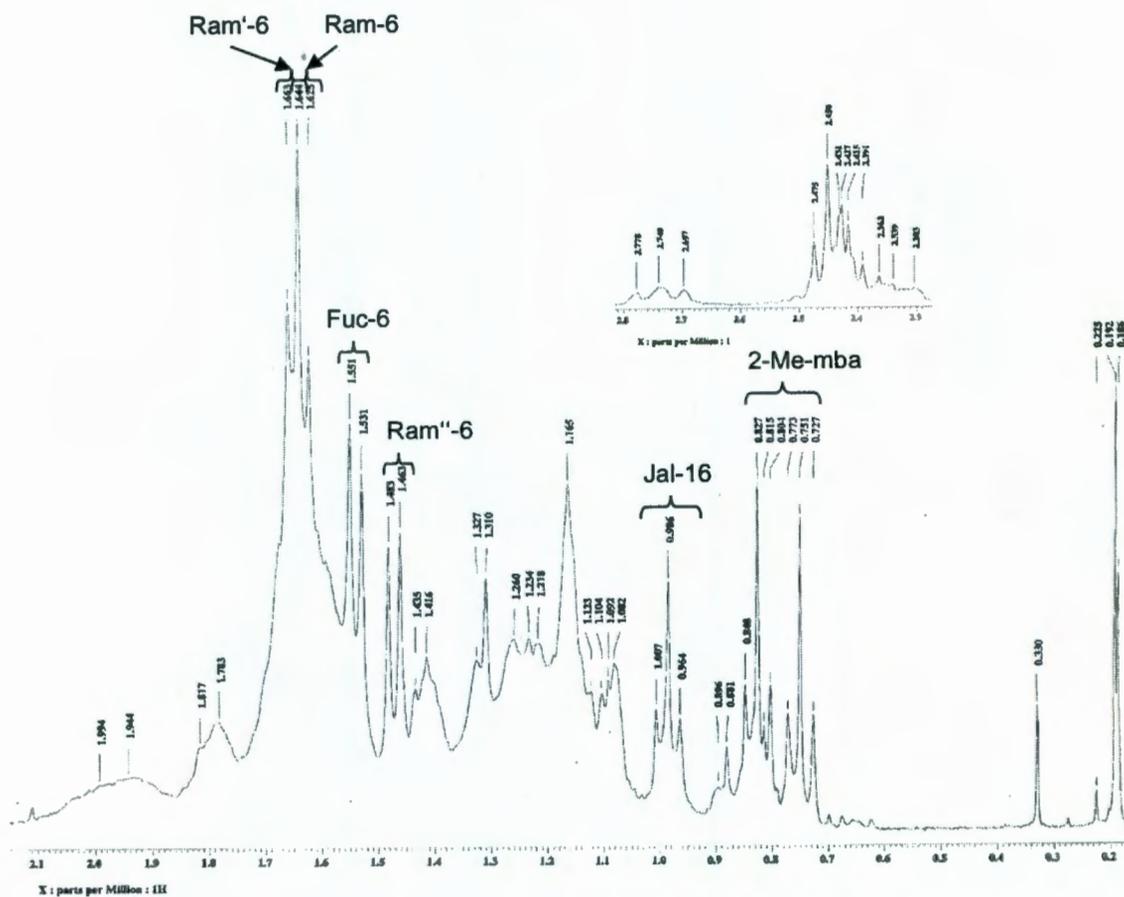


Figura 14: Ampliación de la zona de campo alto del espectro RMN  $^1\text{H}$  del pico IRL-3.

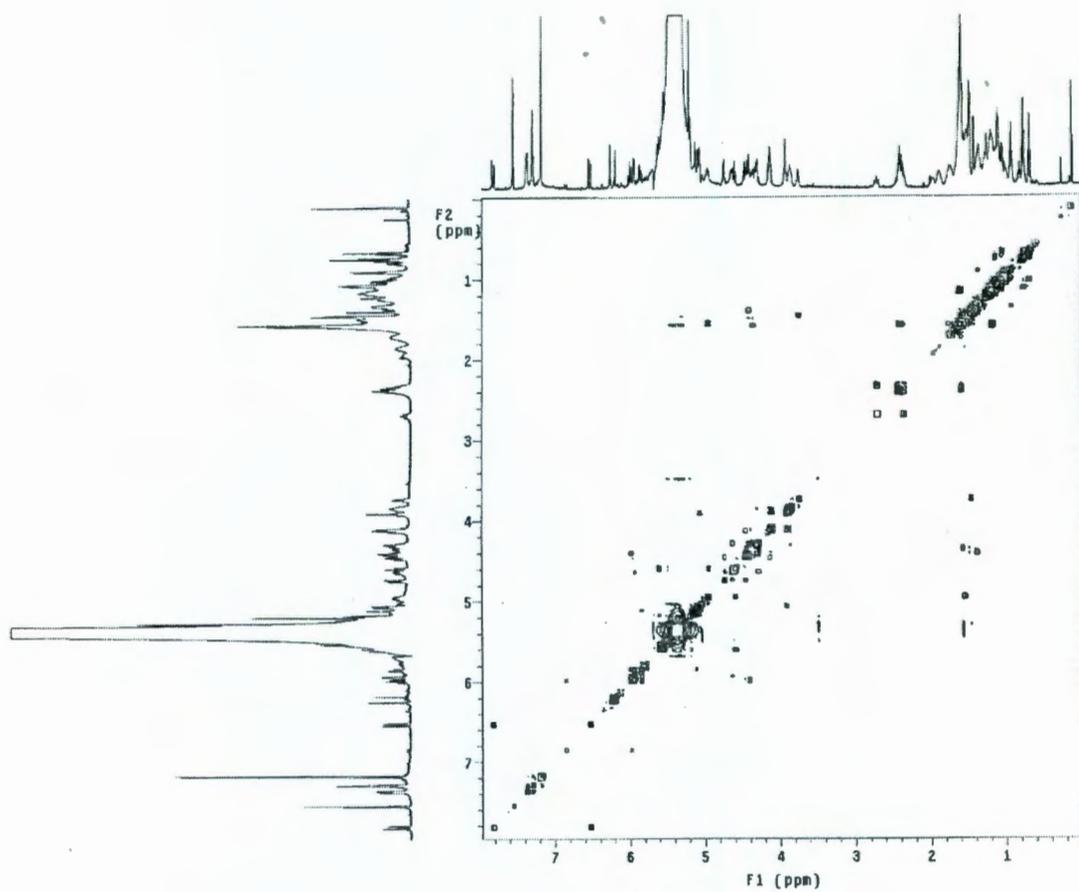


Figura 15: Espectro RMN bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del pico IRL-3.

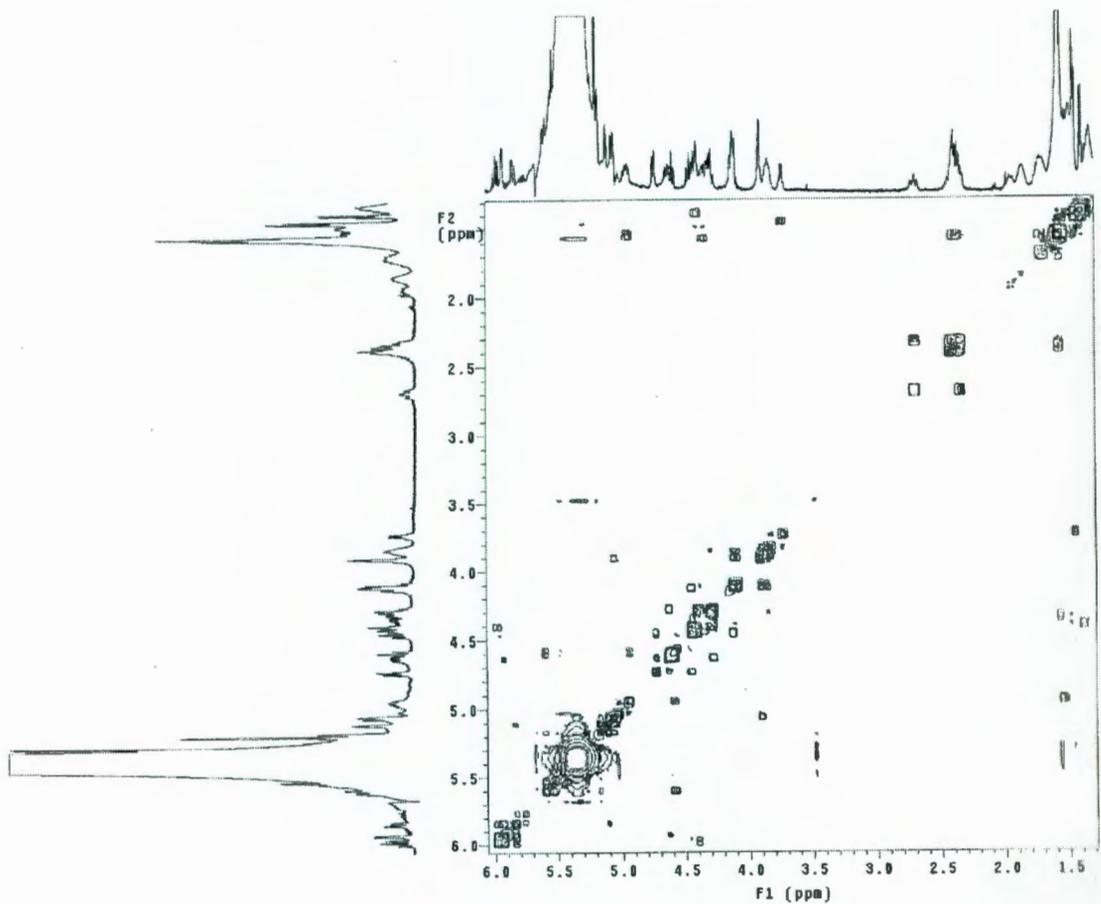


Figura 16: Ampliación de una región del espectro RMN bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY del pico IRL-3.

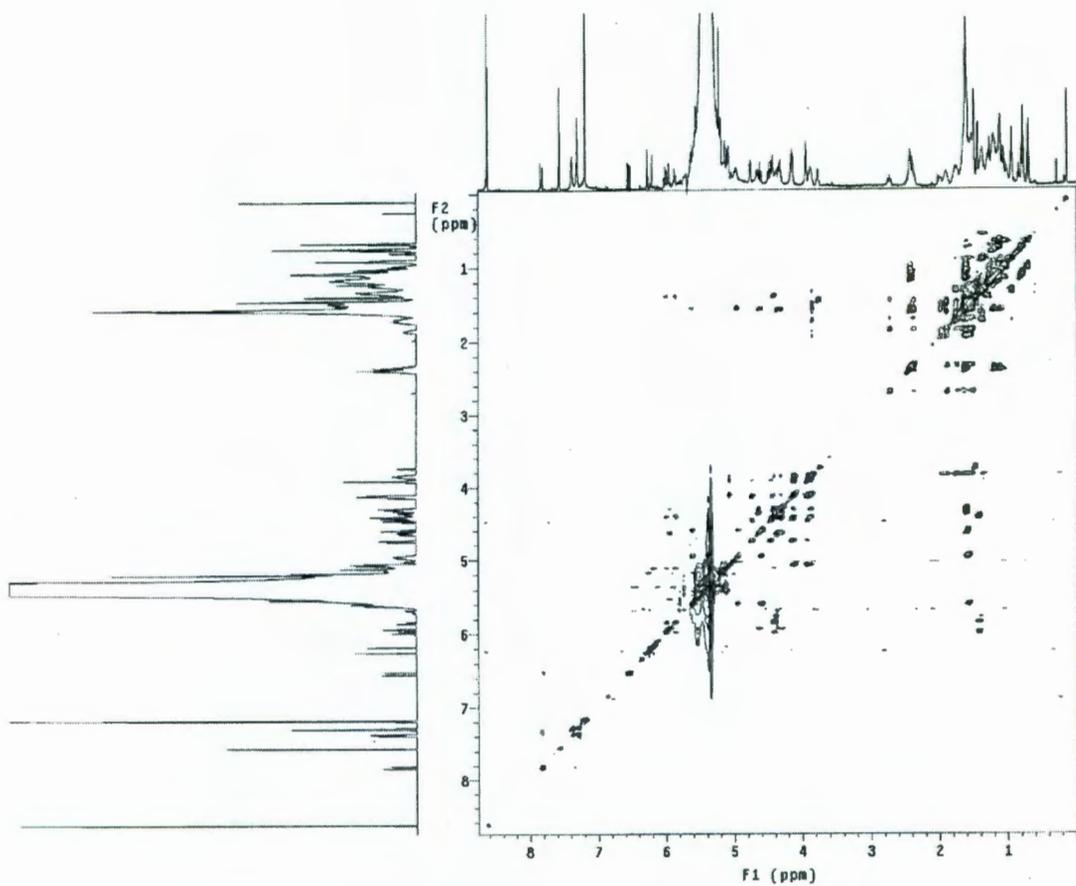


Figura 17: Espectro RMN bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY del pico IRL-3.

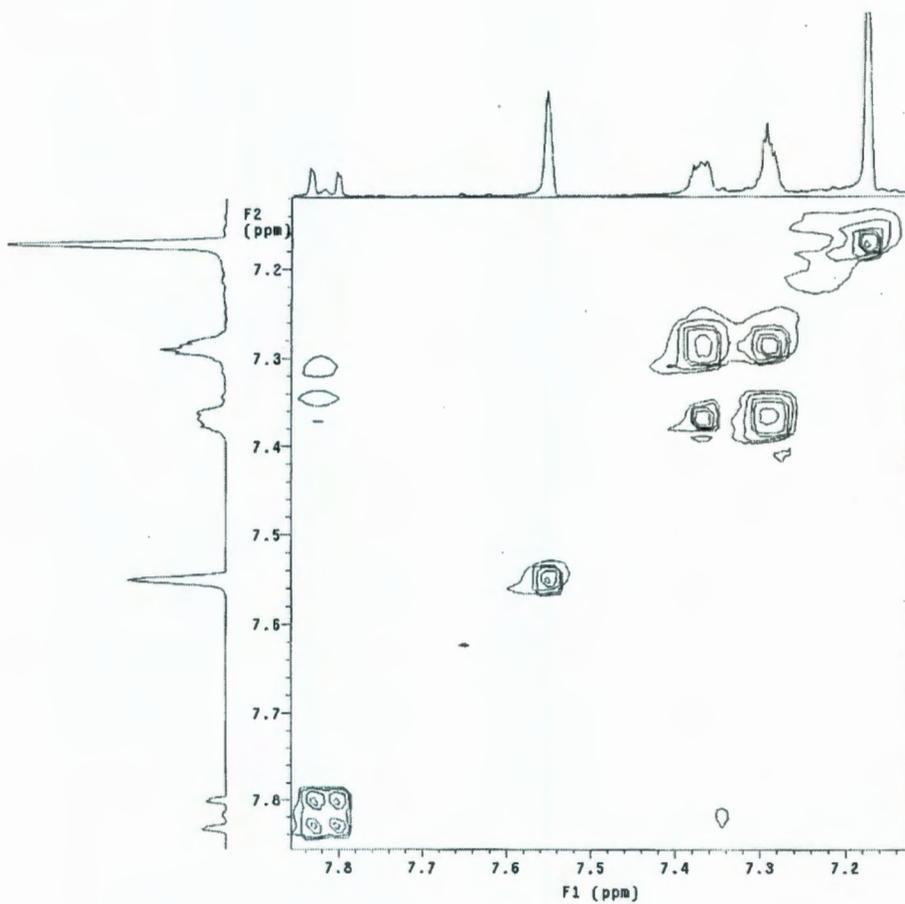


Figura 18: Ampliación de la región de campo bajo del espectro RMN bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY del pico IRL-3.

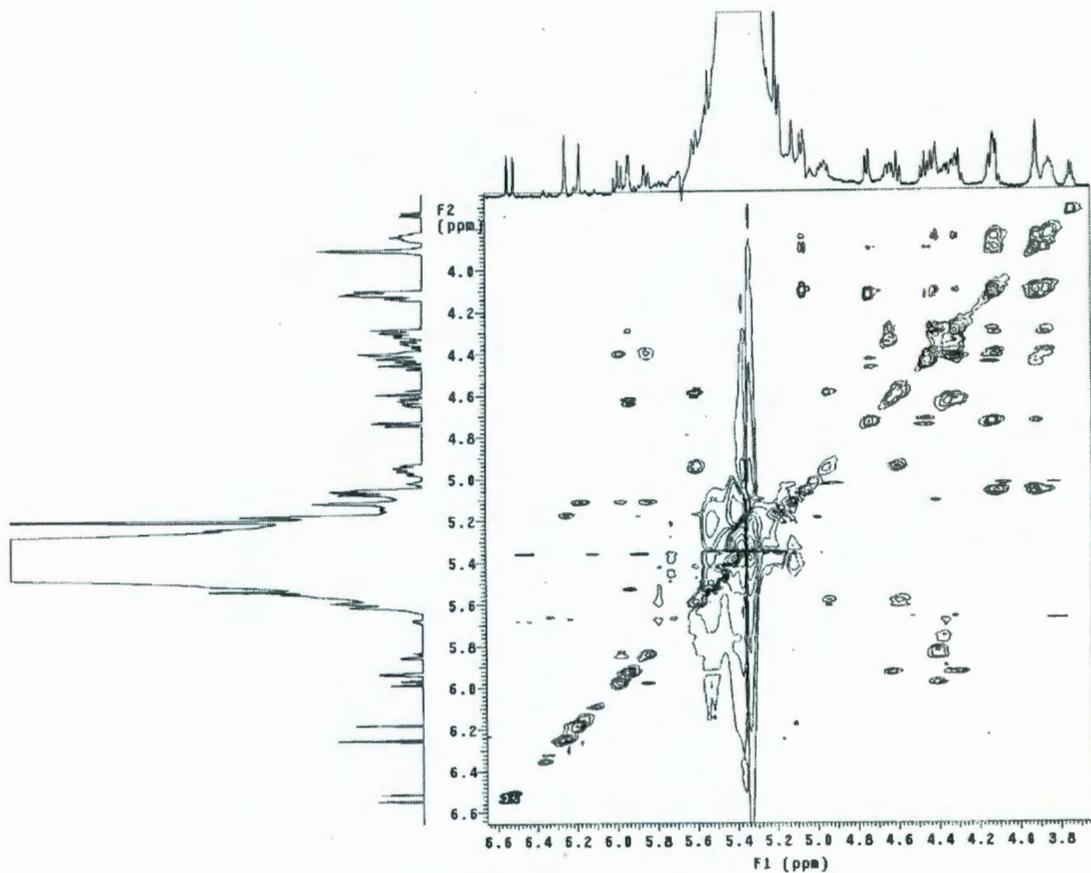


Figura 19: Ampliación de una zona del espectro RMN bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY del pico IRL-3.

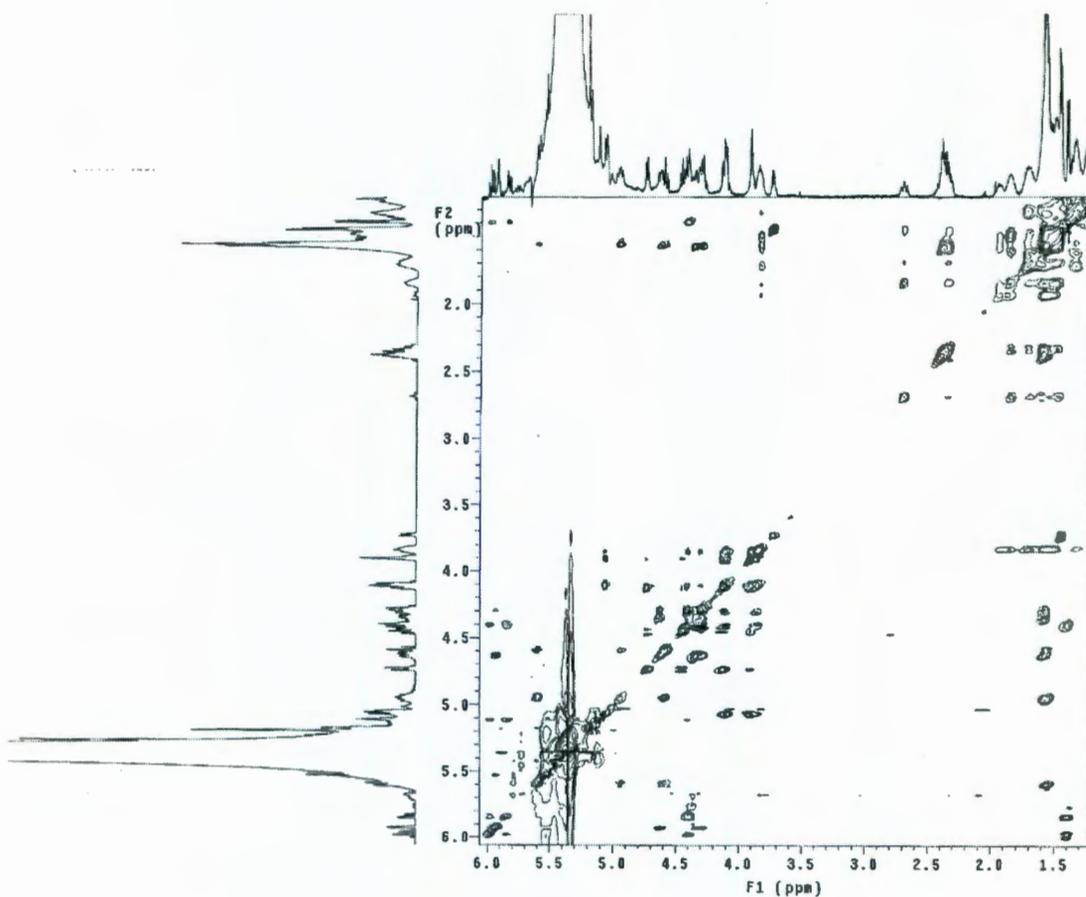


Figura 20: Ampliación de una zona del espectro RMN bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY del pico IRL-3.

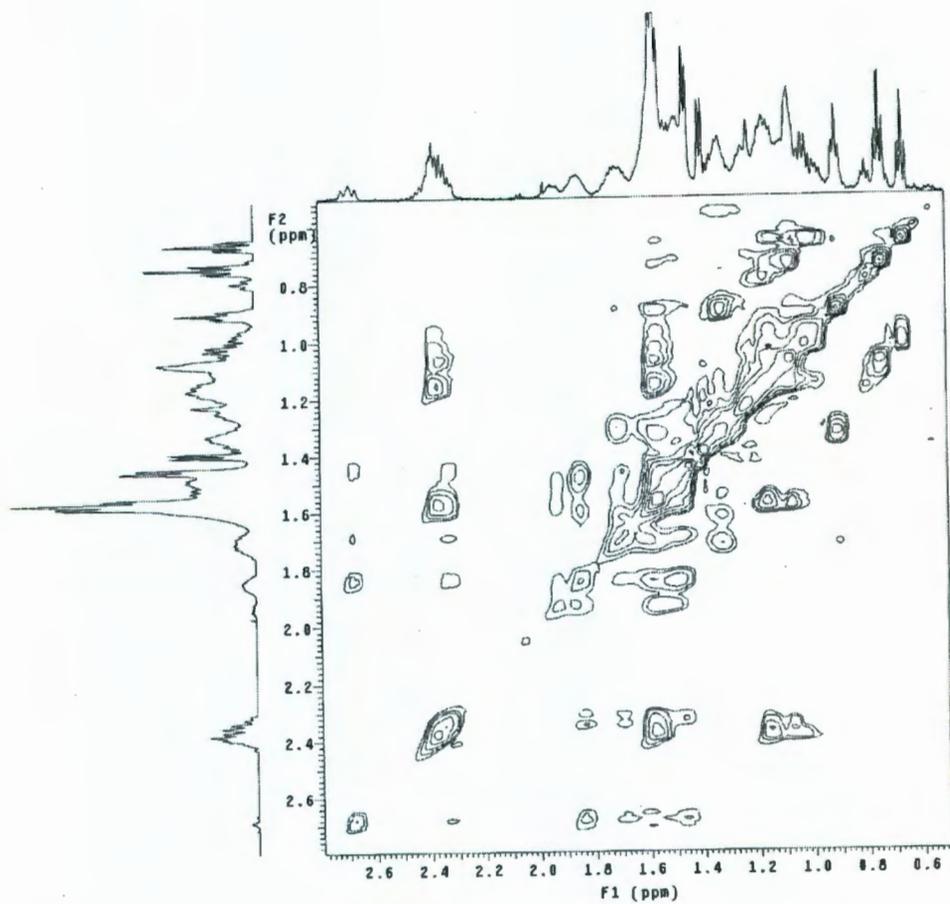


Figura 21: Ampliación de la zona de campo alto del espectro RMN bidimensional homonuclear  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY del pico IRL-3.

## VII. DISCUSIÓN

### VII.1 Discusión general de resultados

La determinación de la estructura química de los lipolisacáridos que se aíslan de especies de *Ipomoea* ha dependido fundamentalmente de la espectroscopía en la resonancia magnética nuclear (RMN) y de la espectrometría de masas (EM) de baja resolución. La primera, a través de la correlación homonuclear total ( $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  TOCSY), permite completar la asignación de los sistemas de spines y, a través de la correlación  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a uno, dos y tres enlaces, la determinación de las inter-conectividades entre monosacáridos, y entre éstos y los grupos acilos. La EM por su parte resulta indispensable para la definición de la naturaleza de los ácidos grasos de cadena lineal que esterifican el oligosacárido.

Sin embargo, el bajo rendimiento obtenido para el compuesto IRL-3 no propició un registro de todas las modalidades de espectros en la RMN. En particular, debido al tiempo de adquisición que sería demasiado largo para la cantidad de muestra disponible y al costo asociado al misma, no fue posible obtener espectros de  $^{13}\text{C}$ , y por lo tanto, tampoco pudieron registrarse las modalidades que involucran esa variante, esto es que no se obtuvieron las correlaciones  $^1\text{H}$ - $^{13}\text{C}$  a un enlace (HSQC) y a varios enlaces (HMBC). No obstante, se logró al menos el registro del espectro RMN  $^1\text{H}$  unidimensional, así como de las modalidades bidimensionales  $^1\text{H}$ - $^1\text{H}$  COSY y TOCSY. Esos datos permitieron visualizar la naturaleza del compuesto, mediante algunas observaciones.

### VII.2 Evidencias espectrométricas

El espectro de masas obtenido en la modalidad FAB negativo para el compuesto IRL-3 (Figura 11) mostró un ión quasi-molecular de 1381 de  $m/z$ , lo cual permitió proponer la fórmula molecular  $\text{C}_{71}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$  (1382). El patrón de fragmentación reveló la presencia de fragmentos propios de algunos residuos de ácido. Éstos fueron 1251 [1381 - 130 ( $\text{C}_9\text{H}_6\text{O}$ , cinamoilo)], 1125 [1251 - octanoilo (126:  $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{O}$ )], 979 [1125 - 146 (metilpentosa,  $\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_4$ )], 853 [979 -

octanoilo], 691 [ 853 – 162 ( glucosa, C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>5</sub>)], 545 [ 691 – 146 ], 417 [ 545 – 128], 271 [ Jal – H]<sup>+</sup>. Estos fragmentos fueron ya identificados en las intrapilosinas, en particular en la intrapilosina III, cuyo peso quasimolecular fue de 1381 (Ruiz-Luna, 2006, Bah y col., 2007). Por lo tanto IRL-3 es un isómero posicional de este glicolípido.

### VII.3 Evidencias espectroscópicas en la RMN

La comparación de los datos espectroscópicos en la RMN de IRL-3 con los publicados durante la primera fase del estudio químico de esta especie vegetal (Ruiz-Luna, 2006, Bah y col., 2007) puso en evidencia que este constituyente consiste en un heteropentasacárido que forma una macrolactona con el ácido jalapινόico (ácido 11*S*-hidroxihexadenoico) y con tres posiciones esterificadas por otros ácidos, los cuales han sido identificados en la EM-FAB (ver punto VII.2). Algunas de las señales características fueron las siguientes:

En el espectro de RMN <sup>1</sup>H del compuesto IRL-3 (Figura 12) destacan cinco señales en la región de los protones anoméricos. Los tres singuletes anchos en  $\delta$  5.64, 6.31 y 6.38, corresponden a tres unidades de ramnosa, que pueden nombrarse como Ram, Ram' y Ram'' respectivamente. Cabe mencionar que las constantes de acoplamiento para los protones anoméricos de la ramnosa se sitúan entre 0 y 2 Hz, debido al acoplamiento ecuatorial-ecuatorial entre H-1 y H-2 de esta unidad. Evidentemente, el desdoblamiento solamente se aprecia si se dispone de un equipo de mayor resolución (500 MHz o superiores).

Por otra parte, los dos dobletes en  $\delta$  5.17 ( $J = 7.8$  Hz) y 4.87 ( $J = 8.1$  Hz) indican la presencia de dos glucosas o de una glucosa y una fucosa. Esas afirmaciones se sustentan en estudios anteriores de otras fracciones del extracto clorofórmico de esta especie vegetal, en donde se pudieron caracterizar las mismas unidades en siete compuestos (Bah y col., 2007). La observación de cuatro dobletes en  $\delta$  1.65 ( $J = 5.7$  Hz), 1.63 ( $J = 5.7$  Hz), 1.54 ( $J = 6.0$  Hz) y 1.47 ( $J = 6.0$  Hz) (Figura 13) confirma la presencia de la cuarta metilpentosa en el compuesto, por lo que el doblete en  $\delta$  4.87 corresponde más bien al protón anomérico de una fucosa (Fuc), cuyo metilo produjo el cuarteto en  $\delta$  3.84.

Comparando con los datos publicados anteriormente, los dobletes antes mencionados ( $\delta$  1.47-1.65) pueden asignarse a Ram'-6, Ram-6, Fuc-6 y Ram"-6, respectivamente.

A campo más alto, se distinguen claramente tres tripletes en  $\delta$  0.75, 0.83 y 0.99 (Figura 14), los cuales han de corresponder a los metilos terminales de residuos de ácidos grasos de cadena lineal larga de 8 átomos de carbonos (octanoilo:  $C_8H_{15}O$ ), como se ha descrito en publicaciones anteriores (Pereda-Miranda y col., 2005, Chérigo y Pereda-Miranda, 2006, Bah y col., 2007). Aunque en aquellos estudios se determinó la presencia del 2-metilbutanoilo en la mayoría de los lipopolisacáridos, destaca la ausencia de esta unidad en ILR-3, al no observarse ningún doblete en  $\delta$  1.00–1.16, el cual corresponde al metilo de la posición 2 de este grupo.

Por otra parte, se observan dos dobletes en  $\delta$  7.90 y 6.62 con valores de 16 Hz (Figura 12). Esos dobletes corresponden respectivamente a los protones  $\beta$  y  $\alpha$  de un cinamoato, cuyos protones aromáticos aparecieron como multipletes no bien definidos en  $\delta$  7.36-7.34 (H-2 y H-4) y  $\delta$  7.49-7.45 (H-3) (Figuras 12 y 22).

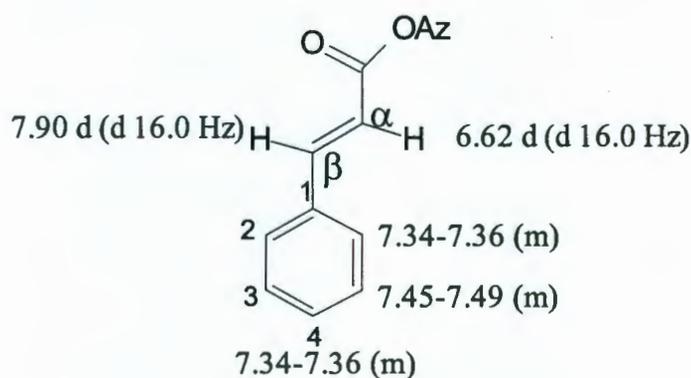


Figura 22. Desplazamientos químicos de los protones del cinamoato (Az = azúcar).

Es importante mencionar que ni los desplazamientos químicos de los protones de este compuesto IRL-3, ni las constantes de acoplamiento calculadas coinciden con los descritos para los identificados anteriormente en esta planta. Esos datos sugieren que el compuesto es un isómero de la intrapilosina III (Bah y col., 2007) y novedoso, al menos en esta especie de *Ipomoea*.

Basándonos en esas evidencias espectroscópicas y en los antecedentes químicos de esta planta, podemos proponer la estructura de la Figura 22 para este lipopentasacárido. La propuesta considera la única secuencia de glicosilación y los sitios de acilación determinados en los siete homólogos identificados con anterioridad (Bah y col., 2007).

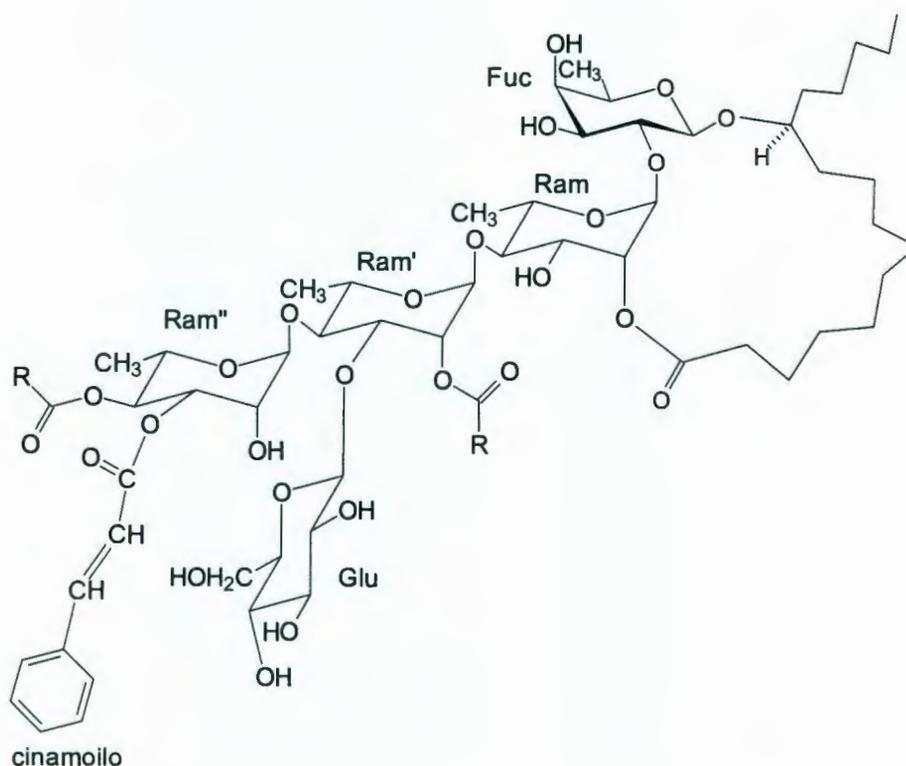


Figura 23. Estructura del lipopentasacárido IRL-3 aislado de *Ipomoea intrapilosa* (R puede ser grupos  $C_8H_{15}$  de octanoilo y  $C_9H_7$  de cinamoilo). Fuc = fucosa, Ram = ramnosa, Glu = glucosa.

## VIII. CONCLUSIONES

De una fracción del extracto soluble en cloroformo de *Ipomoea intrapilosa* se aislaron varios constituyentes minoritarios. En esta ocasión, las cantidades purificadas no permitieron el registro de todas las constantes espectroscópicas en la RMN, datos que son necesarios para avanzar en la elucidación de sus estructuras químicas.

Una comparación de los datos obtenidos en el presente estudio con los descritos en la literatura revela que el metabolito aislado consiste en un lipopentasacárido macrolactónico similar a los ya descritos.

Con estas evidencias espectroscópicas y los antecedentes químicos de esta planta, se propuso la estructura genérica del lipopentasacárido IRL-3 aislado de *I. intrapilosa*.

Pero, debido a que ya no existe materia prima para juntar más de cada uno de compuesto aislados, ni para obtenerlos en forma más pura, se necesitará de mayores recursos económicos para completar el registro de sus espectros y terminar con su elucidación estructural.

## VII. BIBLIOGRAFÍA

**Agrawal, P.K. 1992.** Review Article Number 70. NMR spectroscopy in the structural characterization of oligosaccharides and glycosides. *Phytochemistry*: Vol. 31: 3307-3330.

**Anonymous. 1998.** Oligosaccharides. *Carbohydrate Chemistry*: Vol. 30: 62-89.

**Argueta, A. 1994.** Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Instituto Nacional Indigenista. Biblioteca de la Medicina Tradicional Mexicana. México.

**Bah, M., Chérigo, L., Cardoso-Taketa, L., Fragoso-Serrano, M., Hammond, G.B., Pereda-Miranda, R. 2007.** Intrapilosins I-VII, Pentasaccharides from the Seeds of *Ipomoea intrapilosa*. *Journal of Natural Products*: Vol. 70: 1153-1157.

**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*: Vol. 52, pp. 13063-13080.

**Bah, M., Pereda-Miranda, R. 1997.** Isolation and Structural Characterization of New Glycolipid Ester Type Dimers from the resin of *Ipomoea tricolor* (Convolvulaceae). *Tetrahedron*: Vol. 53: 9007-9022.

**Banco de datos IMSS. 1983-1985.** Encuesta Nacional sobre Medicina Tradicional. Programa IMSS-COPLAMAR. Centro de Investigación Biomédica del Sur. IMSS. Xochitepec, Mor.

**Contreras, C.M., Chacón, L., Enriquez, R.G. 1996.** Anticonvulsant properties of *Ipomoea stans*. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*: Vol. 3: 41-44.

**Díaz, J.L. 1976.** Índice y Sinonimia de las Plantas Medicinales de México. Monografías Científicas 1. Instituto Mexicano para el estudio de las plantas medicinales A.C.IME PLAM. México.

**Duus, J.Ø., Gøfredsen, C.H., Bock, K. 2000.** Carbohydrate structural determination by NMR spectroscopy: Modern methods and limitations. *Chemical Reviews*: Vol. 100: 4589-5614.

- Haig, T. 2001.** Application of hyphenated chromatography-mass spectrometry techniques to plant allelopathy research. *Journal of Chemical Ecology*: Vol. 27: 2363-2396.
- Hernández, B. 2000.** Caracterización de la composición química de las resinas glicosídicas de dos miembros representativos del complejo mexicano de jalapas, especies de convolvuláceas con propiedades purgantes, como una evidencia para distinguir entre la auténtica raíz de jalapa y sus adulterantes. Tesis doctoral, Facultad de Química, UNAM.
- Lozaya, X. 1999.** Un paraíso de plantas medicinales. *Arqueología Mexicana*: Vol. 39: 14-21.
- Martínez, M. 1987.** Catálogo de Nombres Vulgares y Científicos de Plantas Mexicanas. Fondo de Cultura Económica. México.
- Matuda, E. 1963.** El género *Ipomoea* en México. *Anales del Instituto de Biología*. México: Vol. 34: 85- 145.
- Matuda, E. 1964.** El género *Ipomoea* en México. *Anales del Instituto de Biología*. México: Vol. 35: 45- 76.
- Matuda, E. 1965.** El género *Ipomoea* en México. *Anales del Instituto de Biología*. México: Vol. 36: 83- 106.
- McDonnald, A. 1991.** Origin and Diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales del Instituto de Biología*: Vol. 62: 65-82.
- Nikolov, Z.L., Meagher, M.M., Reilly, P.J. 1985.** High performance liquid chromatography of disaccharides on amine-bonded silica columns. *Journal of Chromatography*: Vol. 319: 51-57.
- 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*: Vol. 43: 3889-3902.
- Ono, M., Kawasaki, T., Miyahara, K. 1989.** Glycosides y. 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 & Pharmaceutical Bulletin*: Vol. 37: 3209-3213.

**Osuna, L., Ponce-Monter, H. 1996.** Effect of *Ipomoea intrapilosa* methanol extract on the serotonergic response in rat uterus. *Phytotherapy Research*: Vol. 10: 257-259.

**Pereda-Miranda, R.; Mata, R.; Anaya, A. L.; Wickramaratne, D.B.M.; Pezzuto, J.M.; Kinghorn, A.D. 1993.** Tricolirin A, Major Phyto-growth Inhibitor from the Resins of *Ipomoea tricolor*. *Journal of Natural Products*: Vol. 56, 571-582.

**Pereda-Miranda, R. 1995.** Bioactive Natural Products from traditionally used Mexican Plants. En J.T. Arnason (Ed). *Phytochemistry of Medicinal Plants*. Plenum press, New York, 83-112.

**Pereda-Miranda, R., Hernández- Carlos, B. 2002.** HPLC isolation and structural elucidation of diastereomeric nilyl ester tetrasaccharides from mexican scammony root. *Tetrahedron*: Vol. 58: 3145- 3154.

**Ruiz-Luna, S. 2006.** Estudio Químico de Lipopolisacáridos de *Ipomoea intrapilosa* (CONVOLVULACEAE). Querétaro, Qro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de licenciatura en Químico Farmacéutico-Biólogo. 42-56, 61.

**Soria, R.G. 1985.** Flora de Morelos. Descripción de especies vegetales de la selva baja del Cañon de Lobos. Municipio de Yautepec. Serie de Ciencias Naturales y de la Salud. UAEM, 44- 48.

**Trease, G.E., Evans, W.C. 2002.** *Pharmacognosy*. 15th ed. WB Saunders, USA.