

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS							
	CARTA DE AUTORIZACIÓN							
CÓDIGO	AP-BIB-FO-06	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 1	

Neiva, 15 de Octubre de 2019

Señores

CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN

UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA

Ciudad

El(Los)suscrito(s):

JONATHAN ANDRÉS HUERTAS BELTRÁN, con C.C. No. 1.075.289.123 y KELLY JOHANA MUÑOZ LOSADA, con C.C. No. 1.075.304.250, autor(es) de la tesis y/o trabajo de grado titulado AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GLICOLÍPIDO MAYORITARIO DE LA ESPECIE VEGETAL *IPOMOEA PURPUREA* (L.) ROTH Y SU EVALUACIÓN COMO MODULADOR DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS EN CÉLULAS CANCERÍGENAS presentado y aprobado en el año 2019 como requisito para optar al título de LICENCIADO EN CIENCIAS NATURALES: FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLOGÍA; Autorizo(amos) al CENTRO DE INFORMACIÓN Y DOCUMENTACIÓN de la Universidad Surcolombiana para que con fines académicos, muestre al país y el exterior la producción intelectual de la Universidad Surcolombiana, a través de la visibilidad de su contenido de la siguiente manera:

- Los usuarios puedan consultar el contenido de este trabajo de grado en los sitios web que administra la Universidad, en bases de datos, repositorio digital, catálogos y en otros sitios web, redes y sistemas de información nacionales e internacionales "open access" y en las redes de información con las cuales tenga convenio la Institución.
- Permita la consulta, la reproducción y préstamo a los usuarios interesados en el contenido de este trabajo, para todos los usos que tengan finalidad académica, ya sea en formato Cd-Rom o digital desde internet, intranet, etc., y en general para cualquier formato conocido o por conocer, dentro de los términos establecidos en la Ley 23 de 1982, Ley 44 de 1993, Decisión Andina 351 de 1993, Decreto 460 de 1995 y demás normas generales sobre la materia.
- Continúo conservando los correspondientes derechos sin modificación o restricción alguna; puesto que de acuerdo con la legislación colombiana aplicable, el presente es un acuerdo jurídico que en ningún caso conlleva la enajenación del derecho de autor y sus conexos.

De conformidad con lo establecido en el artículo 30 de la Ley 23 de 1982 y el artículo 11 de la Decisión Andina 351 de 1993, "Los derechos morales sobre el trabajo son propiedad de los autores", los cuales son irrenunciables, imprescriptibles, inembargables e inalienables.

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

JONATHAN ANDRÉS HUERTAS BELTRÁN

EL AUTOR/ESTUDIANTE:

KELLY JOHANA MUÑOZ LOSADA

Firma: Jonathan A. Huertas Beltrán

Firma: 

Vigilada Mineducación

La versión vigente y controlada de este documento, solo podrá ser consultada a través del sitio web Institucional www.usco.edu.co, link Sistema Gestión de Calidad. La copia o impresión diferente a la publicada, será considerada como documento no controlado y su uso indebido no es responsabilidad de la Universidad Surcolombiana.

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						
	DESCRIPCIÓN DEL TESIS Y/OTRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	1 de 4

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DEL GLICOLÍPIDO MAYORITARIO DE LA ESPECIE VEGETAL *IPOMOEA PURPUREA* (L.) ROTH Y SU EVALUACIÓN COMO MODULADOR DE RESISTENCIA A MÚLTIPLES FÁRMACOS EN CÉLULAS CANCERÍGENAS.

AUTOR O AUTORES:

PrimeroySegundoApellido	PrimeroySegundoNombre
HUERTAS BELTRÁN	JONATHAN ANDRÉS
MUÑOZ LOSADA	KELLY JOHANA

DIRECTOR Y CODIRECTOR TESIS:

PrimeroySegundoApellido	PrimeroySegundoNombre
CASTAÑEDA GÓMEZ	JHON FREDY

ASESOR(ES):

PrimeroySegundoApellido	PrimeroySegundoNombre
POLANIA PATIÑO	ALCIDES
CASTRO SALAZAR	HANS THIELIN

PARA OPTAR AL TÍTULO DE: LICENCIADO EN CIENCIAS NATURALES: FÍSICA, QUÍMICA Y BIOLOGÍA

PROGRAMA O POSGRADO: LICENCIATURA CIENCIAS NATURALES Y EDUCACIÓN AMBIENTAL

CIUDAD: NEIVA **AÑO DE PRESENTACIÓN:** 2019 **NÚMERO DE PÁGINAS:** 130

TIPO DE ILUSTRACIONES(Marcar con una X):

Diagramas_X_ Fotografías___ Grabaciones en discos___ Ilustraciones en general___ Grabados___ Láminas___
Litografías___ Mapas___ Música impresa___ Planos___ Retratos___ Sin ilustraciones___ Tablas o Cuadros_X_

SOFTWARE requerido y/o especializado para la lectura del documento: **N.A.**

MATERIAL ANEXO: ANEXOS EN FORMATO PDF

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS						
	DESCRIPCIÓN DEL TESIS Y/O TRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	2 de 4

PREMIO O DISTINCIÓN (*EncasodeserLAUREADA So Meritoria*): **Meritoria**

PALABRAS CLAVES EN ESPAÑOL E INGLÉS:

Español - Inglés

1. Glicolípido - Glycolipid
2. Glicoproteína P- Glycoprotein P
3. *Ipomoea purpurea* – *Ipomoea purpurea*
4. Células cancerígenas – Carcinogenic cells
5. Modulación - Modulation
6. Citotoxicidad - Cytotoxicity
7. Aislamiento - Isolation

RESUMEN DEL CONTENIDO: (Máximo 250 palabras)

El género *Ipomoea* está representado por una variedad de especies reconocidas por sus propiedades medicinales y terapéuticas. Sus metabolitos secundarios presentan alto potencial para contrarrestar el efecto de las bombas de eflujo desarrolladas principalmente por bacterias Gram-positivas, Gram-negativas y células cancerígenas. A pesar de las investigaciones que se hacen actualmente para que las quimioterapias cumplan su objetivo, la resistencia que presentan las células cancerígenas a agentes citotóxicos constituye un gran obstáculo para la curación de los pacientes ya que se han identificado varios genes, proteínas y vías metabólicas implicados en el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos. En este sentido, se aislaron glicolípidos mediante la técnica de cromatografía de alta eficiencia en fase reversa y sus estructuras fueron identificadas mediante técnicas espectroscópicas como resonancia magnética nuclear ^1H , COSY, TOCSY, HSQC y HMBC; así como la espectroscopía de masas. Los glicolípidos aislados de *I. purpurea* se identificaron como tetrasacáridos conformados por un núcleo de azúcares compuesto por una unidad de glucosa y tres de ramnosa reportada como ácido glicosídico E. Adicional a esto, se identificaron los ésteres que se encuentran acilando este núcleo como el ácido octanoico, decanoico, hexadecanoico y octadecanoico. Las evaluaciones biológicas consistieron en el bioensayo de *Artemia salina* para identificar la toxicidad de los extractos calculando el CL_{50} identificando que el extracto hexánico fue el más tóxico a una concentración de 314,9 $\mu\text{g/mL}$, así como su evaluación para determinar su potencial como modulador de resistencia a múltiples fármacos empleados en la quimioterapia contra el cáncer. El compuesto aislado no fue citotóxico para células MCF-7 (carcinoma de mama), HeLa (carcinoma de cérvix) y HCT-116 (carcinoma de colon) a concentraciones 0.004-0.016 $\mu\text{g/mL}$ y utilizando vinblastina y colchicina como controles positivos. En el ensayo de modulación, las células MCF-7 S, MCF-7/Vin⁻ y MCF-7/Vin⁺ fueron expuestas a diferentes concentraciones de Vinblastina desde 0.00064- 10 $\mu\text{g/mL}$, un fármaco citotóxico empleado principalmente para la quimioterapia contra el cáncer de mama, testicular, pulmonar, de cabeza y cuello. Se considera un agente modulador aquellos compuestos que presentan factores de reversión

superiores al control positivo. En este ensayo, el compuesto de prueba resultó ser menos potente que el control positivo, ya que los factores de reversión para las líneas MCF-7 S, MCF-7/Vin- y MCF-7/Vin con reserpina como control positivo fue de 143.3, 44.2 y 16.9 mientras que el compuesto P₆-1 obtuvo valores inferiores a 2.

ABSTRACT: (Máximo 250 palabras)

The genus *Ipomoea* is represented by a variety of species recognized for their medicinal and therapeutic properties. Its secondary metabolites have high potential to counteract the effect of efflux pumps developed mainly by Gram-positive, Gram-negative bacteria and cancer cells. Despite the research currently being done so that chemotherapies meet their objective, the resistance presented by cancer cells to cytotoxic agents constitutes a major obstacle to the healing of patients since several genes, proteins and metabolic pathways have been identified in the phenomenon of resistance to multiple drugs. In this sense, glycolipids were isolated by the reverse phase high efficiency chromatography technique and their structures were identified by spectroscopic techniques such as ¹H nuclear magnetic resonance, COSY, TOCSY, HSQC and HMBC; as well as mass spectroscopy. The glycolipids isolated from *I. purpurea* were identified as tetrasaccharides consisting of a core of sugars consisting of a unit of glucose and three of rhamnose reported as glycosidic acid E. In addition to this, the esters that are acylating this nucleus were identified as the acid octanoic, decanoic, hexadecanoic and octadecanoic. The biological evaluations consisted of the *Artemia salina* bioassay to identify the toxicity of the extracts by calculating the LC₅₀ identifying that the hexane extract was the most toxic at a concentration of 314.9 µg/mL, as well as its evaluation to determine its potential as Multiple drug resistance modulator used in cancer chemotherapy. The isolated compound was not cytotoxic for MCF-7 (breast carcinoma), HeLa (cervical carcinoma) and HCT-116 (colon carcinoma) cells at concentrations 0.004-0.016 µg / mL and using vinblastine and colchicine as positive controls. In the modulation assay, MCF-7 S, MCF-7 / Vin- and MCF-7 / Vin + cells were exposed to different concentrations of Vinblastine from 0.00064-10 µg / mL, a cytotoxic drug used primarily for chemotherapy against breast, testicular, lung, head and neck cancer. A modulating agent is considered to be those compounds that have reversal factors superior to the positive control. In this test, the test compound proved to be less potent than the positive control, since the reversal factors for the MCF-7 S, MCF-7 / Vin- and MCF-7 / Vin lines with reserpine as a positive control were 143.3, 44.2 and 16.9 while compound P₆-1 obtained values below 2.

APROBACIÓN DE LA TESIS

Nombre Presidente Jurado: JHON FREDY CASTAÑEDA GOMEZ

Firma:



Nombre Jurado: HANS THIELIN CASTRO SALAZAR

Firma:



Vigilada mieducación

	UNIVERSIDAD SURCOLOMBIANA GESTIÓN SERVICIOS BIBLIOTECARIOS					   	
	DESCRIPCIÓN DEL TESIS Y/OTRABAJOS DE GRADO						
CÓDIGO	AP-BIB-FO-07	VERSIÓN	1	VIGENCIA	2014	PÁGINA	4 de 4

Nombre Jurado: ALCIDES POLANÍA PATIÑO

Firma:





Facultad de Educación
Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

**Aislamiento y Caracterización del Glicolípido Mayoritario de la
Especie Vegetal *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH y su Evaluación como
Modulador de Resistencia a Múltiples Fármacos en Células
Cancerígenas**

Presentan:

Jonathan Andrés Huertas Beltrán
Kelly Johana Muñoz Losada

Asesor

Lic. Jhon Fredy Castañeda Gómez, *Ph.D*

Neiva, Huila, Colombia

Octubre de 2019



Facultad de Educación
Licenciatura en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

**Aislamiento y Caracterización del Glicolípido Mayoritario de la
Especie Vegetal *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH y su Evaluación como
Modulador de Resistencia a Múltiples Fármacos en Células
Cancerígenas**

Trabajo de Grado para optar al título de:

Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología

Presentan:

Jonathan Andrés Huertas Beltrán
Kelly Johana Muñoz Losada

Neiva, Huila, Colombia

Octubre de 2019

**Aislamiento y Caracterización del Glicolípido Mayoritario de la
Especie Vegetal *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH y su Evaluación como
Modulador de Resistencia a Múltiples Fármacos en Células
Cancerígenas**

Presentado por:

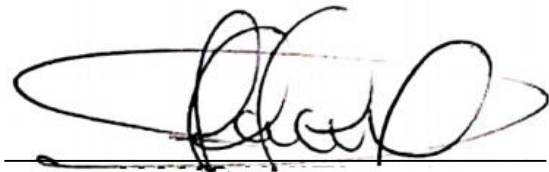
**Jonathan Andrés Huertas Beltrán
Kelly Johana Muñoz Losada**

Aprobado por los Jurados:



Lic. Alcides Polanía Patiño, MSc

Fundación Escuela Tecnológica de Neiva Jesús Oviedo Pérez



Qco. Hans Thielin Castro Salazar, Ph.D

Corporación Universitaria Corhuila-Neiva

Octubre del 2019

Dedicatoria

Dedico este trabajo principalmente a Dios, por haberme dado fortaleza para continuar día a día con mis estudios y permitir haber llegado hasta este momento tan importante en mi vida profesional.

A mi madre, por ser el pilar más importante y que ha sabido formarme con buenos hábitos, valores y sentimientos y por demostrarme siempre su cariño y apoyo incondicional ayudándome a salir adelante.

A mi padre, que con sus consejos me ha guiado para culminar mi carrera profesional y que siempre ha estado presente en los momentos difíciles para darme su total apoyo.

A mi hermana, quien quiero mucho por compartir momentos significativos conmigo, por darme su apoyo incondicional y por siempre estar dispuesta a ayudarme.

A mi familia, quienes me han dado su ayuda, cariño, comprensión y han sido parte fundamental de mi vida.

A mis amigos, por brindarme su aprecio en el transcurso de mi carrera universitaria, por compartir momentos de alegría, tristeza y sobre todo por demostrar que siempre se pueden lograr las cosas que tanto se anhela.

A mis maestros de la Universidad Surcolombiana, gracias por su tiempo, apoyo y por la sabiduría que me transmitieron en mi formación profesional.

A Kelly Johana, muchas gracias por su apoyo, tiempo y sabiduría que hicieron de esta experiencia una de las más especiales.

Jonathan Andrés Huertas Beltrán

Dedicatoria

A Dios, a mis padres: Nelson y Nancy por su ejemplo de lucha y superación, a mis hermanos; Angie y Nelson por el apoyo incondicional y a Jonathan Andrés por su tiempo, dedicación y sabiduría, pero sobre todo por demostrarme que podemos ser grandes amigos y compañero de trabajo a la vez.

Kelly Johana Muñoz Losada

Agradecimientos

Nuestros más sinceros agradecimientos al maestro y tutor el Dr. Jhon Fredy Castañeda Gómez por todo el apoyo durante este largo tiempo de ejecución de este proyecto, por su comprensión y guía permanente durante este proceso de formación. De igual manera, deseo expresar nuestros eternos agradecimientos a las siguientes instituciones y personas:

- ❖ Al Dr. Rogelio Gregorio Pereda Miranda, por la invitación a las instalaciones de la facultad de química (UNAM), por colocar su entera disposición de equipos, materiales y reactivos del laboratorio L-123 a nuestra disposición.
- ❖ A la Dra. Mabel Clara Fragoso Serrano del departamento de Farmacia, Facultad de Química (UNAM), por su enseñanza y constante asistencia técnica en el manejo de los equipos y en las pruebas biológicas de citotoxicidad y modulación.
- ❖ A los miembros del jurado: Mg. Alcides Polanía Patiño de la Fundación Escuela Tecnológica de Neiva y al Dr. Hans Thielin Castro Salazar de la Corporación Universitaria Corhuila, por las correcciones sugeridas en el manuscrito del presente proyecto de investigación.
- ❖ A la Licenciada Yeimis Yoana Montealegre Figueroa, coordinadora del laboratorio de química de la Universidad Surcolombiana, por poner siempre a disposición el uso del laboratorio y por su apoyo brindado al trabajo de investigación.
- ❖ A la Vicerrectoría de Investigación y Proyección Social de la Universidad Surcolombiana por el financiamiento de este proyecto de investigación código No. 2846.
- ❖ A la Universidad Surcolombiana y sus maestros por la formación académica para obtener el título de Licenciado en Ciencias Naturales: Física, Química y Biología.

Tabla de Contenido

1.	Presentación	16
2.	Justificación.....	17
3.	Planteamiento del Problema.....	19
4.	Objetivos	20
4.1.	General.....	20
4.2.	Específicos.....	20
5.	Antecedentes	21
5.1.	Antecedentes Nacionales	21
5.2.	Antecedentes Internacionales	22
6.	Marco Teórico	25
6.1.	Cáncer.....	25
6.2.	Desarrollo y causas.....	26
6.2.1.	Inducción o iniciación	26
6.2.2.	Cáncer “in situ”	26
6.2.3.	Invasión local	26
6.2.4.	Invasión a distancia o metastatización	26
6.3.	Tipos de cáncer.....	27
6.3.1.	Carcinoma	27
6.3.2.	Sarcoma.....	27
6.3.3.	Leucemia.....	27
6.3.4.	Linfoma.....	27
6.3.5.	Mielomas.....	28
6.4.	Medicamentos empleados en la quimioterapia contra el cáncer.....	28
6.4.1.	Vinblastina	28
6.4.2.	Vincristina	29
6.4.3.	Paclitaxel	29
6.4.4.	Doxorrubicina	30
6.4.5.	Podofilotoxina	30
6.4.6.	Colchicina	31
6.4.7.	Camptotecina.....	31

6.5.	Mecanismo de resistencia a múltiples fármacos.....	32
6.5.1.	Células resistentes	32
6.5.2.	Amplificación de genes.....	32
6.5.3.	La molécula objetivo es alterada.....	33
6.5.4.	Barrera sangre-cerebro	33
6.5.5.	Resistencia múltiple a los fármacos	34
6.6.	Multirresistencia inducida por la glicoproteína-p	34
6.7.	Sistema de bomba de eflujo.....	36
6.8.	Sustancias químicas que modulan la resistencia a múltiples fármacos de células de cáncer	36
6.8.1.	Trifluoperazina.....	37
6.8.2.	Ciclosporina A	37
6.8.3.	Cloroquina.....	37
6.8.4.	Quercetina	38
6.8.5.	Panaxadiol.....	38
6.8.6.	Ácido gamma-linoleico.....	39
6.9.	Glicolípidos	39
6.10.	Familia Convolvulaceae	41
6.11.	Género Ipomoea	42
6.12.	Ipomoea purpurea (L.) ROTH.....	42
6.13.	Distribución de Ipomoea purpurea (L.) ROTH	44
6.14.	Cromatografía líquida.....	44
6.15.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.....	45
6.16.	Espectroscopia	46
7.	Metodología	47
7.1.	Fase de campo y obtención de los extractos.....	47
7.2.	Pruebas para identificar resinas glicosídicas	47
7.2.1.	Keller-Killiani	48
7.2.2.	Antrona.....	48
7.2.3.	Molish	48
7.3.	Toxicidad de los extractos: Bioensayo Artemia salina.....	48
7.4.	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna de los extractos vegetales..	49
7.5.	Obtención de los ácidos orgánicos mediante hidrólisis ácida.....	50

7.5.1.	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación de los ácidos orgánicos.....	50
7.6.	Obtención de los ácidos glicosídicos mediante hidrólisis alcalina	50
7.6.1.	Peracetilación del ácido glicosídico	51
7.7.	Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) para la identificación y separación de los ácidos glicosídicos peracetilados.....	51
7.8.	Identificación y purificación de los constituyentes mayoritarios de cada extracto mediante CLAE.....	52
7.8.1.	Condiciones por CLAE para la identificación de los constituyentes mayoritarios a nivel analítico	52
7.8.2.	Purificación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel semipreparativo	52
7.8.3.	Condiciones por CLAE para la purificación de los constituyentes mayoritarios a nivel semipreparativo	53
7.8.4.	Purificación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel analítico	53
7.9.	Caracterización de las estructuras químicas de los compuestos purificados por RMN y EM.	54
7.10.	Líneas celulares y cultivos celulares.....	54
7.10.1.	Soluciones utilizadas.....	54
7.10.2.	Descongelamiento de las líneas celulares	55
7.10.3.	Mantenimiento de las líneas celulares.....	55
7.10.4.	Conteo de células	55
7.11.	Citotoxicidad y modulación de la resistencia a múltiples fármacos	56
7.11.1.	Preparación de disoluciones.....	56
7.11.2.	Bioensayo de citotoxicidad	57
7.11.3.	Ensayo de modulación	58
8.	Resultados y Análisis de Resultados	59
8.1.	Fase de campo y obtención de los extractos.....	59
8.2.	Pruebas de identificación de resinas glicosídicas.	59
8.2.1.	Prueba de Keller-Killiani	60
8.2.2.	Prueba de Antrona.....	60
8.2.3.	Prueba de Molisch.....	61
8.3.	Toxicidad de los extractos: Bioensayo Artemia salina.....	61
8.4.	Fraccionamiento primario por cromatografía en columna de los extractos vegetales..	64

8.4.1.	Fraccionamiento primario del extracto hexánico	64
8.4.2.	Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico.....	65
8.4.3.	Fraccionamiento primario del extracto metanólico.....	67
8.4.4.	Fracciones seleccionadas para análisis.....	69
8.5.	Obtención de los ácidos orgánicos mediante hidrólisis ácida.....	70
8.5.1.	Cromatograma de gases de la subfracción A (H-IX)	70
8.5.2.	Cromatograma de gases de la subfracción B (C-X).....	72
8.5.3.	Cromatograma de gases de la subfracción D (M-XVI).....	74
8.5.4.	Ácido tíglico.....	76
8.5.5.	Ácido butanodioico	78
8.5.6.	Ácido propanoico	80
8.5.7.	Ácido Octanoico.....	82
8.5.8.	Ácido decanoico.....	84
8.5.9.	Ácido hexadecanoico	86
8.5.10.	Ácido octadecanoico	88
8.6.	Obtención de los ácidos glicosídicos peracetilados.....	91
8.7.	Identificación y purificación de los constituyentes mayoritarios de cada extracto mediante CLAE.....	92
8.7.1.	Perfiles cromatográficos para la identificación de los constituyentes mayoritarios a nivel analítico	93
8.7.2.	Purificación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel semipreparativo	95
8.7.3.	Purificación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel analítico	97
8.8.	Caracterización de las estructuras químicas de los compuestos purificados	98
8.8.1.	Empleo de la técnica RMN: COSY.....	100
8.8.2.	Empleo de la técnica RMN: HSQC.....	102
8.8.3.	Empleo de la técnica RMN: HMBC	105
8.8.4.	Identificación de la aglicona metilada del compuesto mayoritario	107
8.8.5.	Determinación de la estructura química del compuesto minoritario.....	108
8.9.	Citotoxicidad y modulación de resistencia a múltiples fármacos.....	111
8.9.1.	Citotoxicidad.....	111
8.9.2.	Modulación	112

9. Conclusiones	115
10. Referencias	117
11. Anexos.....	122

Índice de Tablas

Tabla 1: Antecedentes Nacionales.	21
Tabla 2: Antecedentes internacionales sobre aislamiento y caracterización de compuestos químicos de especies vegetales del género <i>Ipomoea</i>	22
Tabla 3. Clasificación de toxicidad de acuerdo a la concentración letal media.	49
Tabla 4. Diluciones para el control positivo	56
Tabla 5. Diluciones del compuesto	56
Tabla 6. Líneas celulares implementadas en el ensayo de modulación	58
Tabla 7. Resultados obtenidos en la prueba de identificación de resinas glicosídicas mediante la técnica de cromatografía en capa fina de los extractos crudos.....	59
Tabla 8. Resultados de las pruebas cualitativas para la identificación de carbohidratos.	60
Tabla 9. Concentración de letal media (CL ₅₀) para los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de la especie <i>Ipomoea purpurea</i>	63
Tabla 10. Número de fracciones, fracciones combinadas y sus respectivas masas del extracto hexánico.	64
Tabla 11. Número de fracciones, fracciones combinadas y sus respectivas masas del extracto clorofórmico.....	66
Tabla 12. Número de fracciones, fracciones combinadas y sus respectivas masas del extracto metanólico.	68
Tabla 13. Compuestos volátiles presentes en la subfracción A.	70
Tabla 14. Compuestos volátiles presentes en la subfracción B.....	73
Tabla 15. Compuestos volátiles presentes en la subfracción D.	74
Tabla 16. Descripción de los cortes realizados a la muestra A en escala semipreparativa.	95
Tabla 17. Descripción de los cortes realizados a la muestra B en escala semipreparativa.	96
Tabla 18. Datos espectroscópicos de RMN ¹ H y ¹³ C del compuesto P ₄ -4	105
Tabla 19. Actividad citotóxica del compuesto P ₆ -1	112
Tabla 20. Bioensayo de modulación del compuesto P ₆ -1.	113

Índice de Figuras

Figura 1. Proliferación incontrolada de células cancerígenas.	25
Figura 2. Estructura química de la vinblastina.	28
Figura 3. Estructura química de la vincristina.	29
Figura 4. Estructura química del paclitaxel.	29
Figura 5. Estructura química de doxorubicina.	30
Figura 6. Estructura química de la podofilotoxina.	30
Figura 7. Estructura química de la colchicina.	31
Figura 8. Estructura química de la camptotecina.	31
Figura 9. Mecanismo de amplificación de genes.	33
Figura 10. Mecanismo por el cual la molécula de destino es alterada.	33
Figura 11. Mecanismo de acción de la glicoproteína-p.	34
Figura 12. Analogía del mecanismo de acción de la glicoproteína-p	35
Figura 13. Representación de la glicoproteína-p.	36
Figura 14. Estructura química de la trifluoperazina.	37
Figura 15. Estructura química de la ciclosporina A.	37
Figura 16. Estructura química de la cloroquina.	38
Figura 17. Estructura química de la quercetina.	38
Figura 18. Estructura química del panaxadiol.	39
Figura 19. Estructura química del ácido gamma-linoleico.	39
Figura 20. Estructura general de un glicolípido.	40
Figura 21. Especies de Convolvulácea y su forma de crecimiento	41
Figura 22. Flor de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) ROTH	43
Figura 23. Semillas de <i>Ipomoea purpurea</i> (L.) ROTH	43
Figura 24. Separación de un compuesto mediante la técnica de cromatografía líquida.	45
Figura 25. Descripción de cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas.	45
Figura 26. A) Material vegetal pulverizado y homogéneo. B) Extracto hexánico, clorofórmico y metanólico respectivamente.	59
Figura 27. Reacción de Antrona.	60
Figura 28. Reacción de Molisch.	61
Figura 29. A) Eclosión de los huevos de <i>Artemia salina</i> . B) Larva o nauplio de <i>A. salina</i> . C) Evaluación de la toxicidad de los extractos por triplicado. D) Monitoreo de letalidad.	61
Figura 30. Porcentaje de letalidad de <i>A. salina</i> en función de la concentración de los extractos (mg/L) a 24h de exposición.	62
Figura 31. Cromatoplasmas de las fracciones positivas para azúcares del extracto hexánico.	65
Figura 32. Cromatoplasmas de las fracciones positivas para azúcares del extracto clorofórmico.	67
Figura 33. Cromatoplasmas de las fracciones positivas para azúcares del extracto clorofórmico.	69
Figura 34. Perfil cromatográfico de la subfracción A.	70
Figura 35. Perfil cromatográfico de la subfracción B.	72
Figura 36. Perfil cromatográfico de la subfracción D.	74
Figura 37. Representación estructural del ácido tíglico.	76

Figura 38. Espectro de masas experimental para el ácido tíglico.	77
Figura 39. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido tíglico	77
Figura 40. Fragmentación de la molécula del ácido tíglico.	78
Figura 41. Representación estructural del ácido butanodioico o succínico..	78
Figura 42. Espectro de masas experimental para el ácido butanodioico.....	79
Figura 43. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido butanodioico...	79
Figura 44. Fragmentación de la molécula del ácido tíglico.	80
Figura 45. Representación estructural del ácido propanoico o propiónico.	80
Figura 46. Espectro de masas experimental para el ácido propanoico.....	81
Figura 47. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido propanoico.....	81
Figura 48. Representación estructural del ácido octanoico o caprílico.....	82
Figura 49. Espectro de masas experimental para el ácido octanoico.	83
Figura 50. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido octanoico.	83
Figura 51. Fragmentación de la molécula del ácido octanoico.	84
Figura 52. Representación estructural del ácido decanoico o caprílico.	84
Figura 53. Espectro de masas experimental para el ácido decanoico.	85
Figura 54. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido decanoico.	85
Figura 55. Fragmentación de la molécula del ácido octanoico.	86
Figura 56. Representación estructural del ácido hexadecanoico o palmítico.....	86
Figura 57. Espectro de masas experimental para el ácido hexadecanoico.	87
Figura 58. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido hexadecanoico.....	88
Figura 59. Representación estructural del ácido octadecanoico o esteárico.	88
Figura 60. Espectro de masas experimental para el ácido octadecanoico.....	89
Figura 61. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido octadecanoico.	90
Figura 62. Perfil cromatográfico de los ácidos glicosídicos peracetilados.	92
Figura 63. Perfil cromatográfico de la muestra A.....	93
Figura 64. Perfil cromatográfico de la muestra B.	94
Figura 65. Cromatograma a nivel semipreparativo de la muestra A.....	95
Figura 66. Cromatograma a nivel semipreparativo de la muestra B.....	96
Figura 67. Purificación a escala analítica del P ₄ de la muestra A.....	97
Figura 68. Purificación a escala analítica del P ₆ de la muestra A.....	98
Figura 69. Espectro RMN ¹ H (900 MHz, en Piridina) del compuesto P ₄ -4.....	100
Figura 70. Espectro ¹ H – ¹ H COSY del compuesto P ₄ -4.	101
Figura 71. Representación esquemática de señales mostradas en el espectro RMN: COSY.....	102
Figura 72. Espectro HSQC del compuesto P ₄ -4 mayoritario.	103
Figura 73. Espectro HSQC del compuesto P ₄ -4.....	104
Figura 74. Conectividades C – H a tres enlaces (³ J _{C-H}) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación.....	106
Figura 75. Espectro HMBC del compuesto P ₄ -4 donde se observa las correlaciones ³ J _{C-H} para la identificación de la secuencia de glicosidación.....	107
Figura 76. Ácido operculínico E metilado.	108
Figura 77. Espectro HMBC para la identificación de los carbonos carbonilos.....	109

Figura 78. Espectro COSY de protones esterificados del compuesto P ₄ -4 minoritario.	110
Figura 79. Estructura química del compuesto P ₄ -4 minoritario.	111

1. Presentación

El género *Ipomoea* está representado por una variedad de especies reconocidas por sus propiedades terapéuticas. Sus metabolitos secundarios presentan alto potencial para atenuar el cáncer. A pesar de las investigaciones que se hacen actualmente para que las quimioterapias cumplan su objetivo, la resistencia que presentan las células cancerígenas a agentes citotóxicos constituye un gran obstáculo para la curación de los pacientes ya que se han identificado varios genes, proteínas y vías metabólicas implicados en el fenómeno de resistencia a múltiples fármacos.

Hasta el momento, el mecanismo de resistencia más estudiado es hacia la glicoproteína-p que actúa como una bomba de eflujo que impide que los quimioterapéuticos ejerzan su acción al interior de las células. Para lograr reducir el efecto de la glicoproteína-p, se propuso en esta investigación aislar y caracterizar el glicolípido mayoritario de la especie vegetal *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH y evaluar su potencial como modulador de resistencia a múltiples fármacos en células cancerígenas.

Como herramientas básicas de aislamiento y purificación del glicolípido, se empleó la técnica de Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE). Nuestros hallazgos permitieron confirmar aún más el potencial de los glicolípidos para modular la resistencia a múltiples fármacos producidos por las células de cáncer.

2. Justificación

El cáncer tiene grandes repercusiones sociales, económicas y emocionales que afectan no solo a las personas del departamento del Huila, sino a todo el país y el mundo entero. Los crecientes índices de mortalidad sobre el cáncer ameritan intervenciones oportunas y certeras sobre el avance en el conocimiento científico, y en el desarrollo tecnológico para conocer y controlar esta enfermedad. Un estudio realizado por el Instituto Nacional de Cancerología en el año 2016, indicó que el cáncer de estómago es la mayor causa de mortalidad en hombres con 119 casos registrados, seguido de próstata, tráquea, bronquios y pulmón, hígado y colon. Por otro lado, las causas más comunes de mortalidad en mujeres se debieron a cáncer de estómago con 73 casos reportados, seguido de mama, cuello uterino, tráquea, bronquios y pulmón, colon y ovario.

Es conveniente buscar diferentes métodos que ayuden a los tratamientos contra el cáncer, en especial, con los que se encuentran relacionados con los mecanismos de resistencia que desarrollan las células a los quimioterapéuticos. Uno de los mecanismos que desarrollan las células cancerígenas para evitar que los fármacos ingresen al interior de la célula, es la formación de glicoproteínas como la *P-gp* que actúan como bombas de eflujo a nivel transmembranal. En este contexto, se plantea en esta investigación, la búsqueda de un inhibidor tipo glicolípido de la *P-gp* de origen natural y que sea aislado de una especie del Huila, especialmente, de la familia Convolvulaceae, con igual o mejor potencial que los descubiertos hasta el momento para que pudiera convertirse en otra alternativa en la quimioterapia contra el cáncer.

Colombia por ser un país con mayor expresión de la diversidad biológica en todos los niveles, y con un gran número de especies de Convolvuláceas que aún no han sido muy exploradas en nuestra región, pero con varios reportes relacionados con el empleo de azúcares ligados a cadenas de ácidos grasos, las cuales han demostrado actuar como moduladores de fármaco-resistencia en células cancerígenas, sería muy interesante en esta investigación, el aislamiento de glicolípidos de especies autóctonas y el conocimiento de su diversidad estructural y su potencial para modular la *P-gp* con el objetivo de revertir la

resistencia a múltiples fármacos. La especie vegetal *Ipomoea purpurea* hace parte de la gran variedad de plantas que podemos encontrar en el Huila, empleada como antiparasitario, ya que sus hojas molidas se usan como purgante, por lo que surge la necesidad de ampliar los conocimientos científicos de esta especie medicinal.

Debido a que no se han reportado grandes estudios sobre la especie *Ipomoea purpurea*, el propósito de este proyecto investigación es aislar y caracterizar el glicolípido mayoritario de la especie *Ipomoea purpurea* mediante métodos cromatográficos y espectroscópicos y evaluar su actividad como modulador de resistencia a múltiples fármacos en células de cáncer de mama.

3. Planteamiento del Problema

En las últimas décadas, el cáncer ha sido uno de las enfermedades con mayor tasa de mortalidad en diferentes países. En el departamento del Huila, se ha registrado elevados índices de muerte por cáncer de estómago y mama, debido a la resistencia generada por este tipo de células a los agentes quimioterapéuticos. Sin embargo, en los últimos años se han llevado a cabo investigaciones sobre el descubrimiento de moduladores que ayudan a contrarrestar la resistencia a múltiples fármacos de células cancerígenas.

En consecuencia, es preciso determinar la importancia de la necesidad de descubrir moléculas nuevas que modulen la resistencia a fármacos y que permitan reducir la tasa de mortalidad producida por el cáncer. Actualmente, en Colombia no se han encontrado estudios fitoquímicos ni biológicos relevantes acerca de moduladores del cáncer provenientes de la especie *Ipomoea purpurea*.

Así mismo, es necesario llevar a cabo investigaciones que permitan el aislamiento y la identificación de compuestos químicos presentes en las especies vegetales que se encuentran en el Huila y realizar su evaluación como moduladores de resistencia a múltiples fármacos de las células cancerígenas. Por tal motivo, se plantea la siguiente pregunta problema:

¿Cuál es el glicolípido mayoritario de la especie *Ipomoea purpurea* y qué efecto tiene como modulador de resistencia a múltiples fármacos de las células de cáncer de mama?

4. Objetivos

4.1. General

- ✓ Identificar el glicolípido mayoritario de la especie vegetal *Ipomoea purpurea* y evaluar su potencial como modulador de resistencia a múltiples fármacos en células de cáncer de mama resistente a vinblastina.

4.2. Específicos

- ✓ Extraer los glicolípidos de las partes aéreas de la especie *Ipomoea purpurea* con disolventes de diferente polaridad.
- ✓ Determinar la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos obtenidos mediante el bioensayo con *Artemia salina*.
- ✓ Purificar los extractos obtenidos mediante cromatografía de columna abierta.
- ✓ Llevar a cabo la hidrólisis ácida y alcalina de las fracciones mayoritarias para la identificación de los ácidos grasos y el ácido glicosídico.
- ✓ Establecer las condiciones óptimas de purificación del glicolípido mayoritario mediante Cromatografía de líquidos de alta eficiencia (CLAE)
- ✓ Determinar la estructura química del compuesto aislado mediante técnicas espectroscópicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM).
- ✓ Evaluar el glicolípido mayoritario contra líneas celulares de cáncer de mama resistentes a vinblastina.

5. Antecedentes

Una vez revisada la literatura con la que cuenta la biblioteca de la Universidad Surcolombiana tales como las publicaciones en bases de datos y algunos estudios que se relacionan con el tema a estudiar, no se encontraron estudios locales, por consiguiente, se procede a mencionar los estudios encontrados a nivel nacional e internacional.

5.1. Antecedentes Nacionales

Tabla 1: Antecedentes Nacionales.

Título de investigación	Objetivos	Aspectos Metodológicos	Principales Hallazgos
Modulación de la actividad de los fármacos antitumorales de uso convencional por fracciones de <i>C. spinosa</i> y <i>P. alliacea</i> . (Castañeda, 2011)	Evaluar la acción ejercida por las fracciones provenientes de <i>C. spinosa</i> (P ₂ Et) y <i>P. alliacea</i> (FAST-8) en líneas celulares tumorales humanas de Leucemia y mama de humano y ratón, y su posible efecto modulador a fármacos antitumorales como doxorubicina, vincristina, taxol y camptotecina.	Las células fueron mantenidas en un medio RPMI 1640 suplementado. Los métodos de análisis fueron: efecto citotóxico de las diferentes fracciones sobre las células tumorales, ensayos de clonogenicidad de células tumorales, medición del potencial de la membrana mitocondrial evaluada por citometría de flujo usando la sonda catiónica lipofílica (JC-1), ensayo de la actividad caspasa 3 <i>in vitro</i> , el ensayo de Anexina V/IP para la diferenciación de apoptosis y necrosis, choque térmico y tratamientos con las fracciones, obtención de proteínas y análisis por Western Blot.	Se concluye que las fracciones P ₂ Et y FAST-8 tienen citotoxicidad sobre las células tumorales, modulan la HSP ₇₀ e influyen muerte por mecanismos que son dependientes del tipo celular. Además, se pudo observar que las fracciones complejas obtenidas de las plantas pueden ser usadas en combinación con fármacos convencionales, de tal forma, que pueden promover la actividad de la droga o algunas veces, aumentar la resistencia de las células tumorales.

Título de investigación	Objetivos	Aspectos Metodológicos	Principales Hallazgos
Caracterización ecológica y fitoquímica de la batatilla <i>Ipomoea purpurea</i> L. Roth (<i>Solanaceae</i> , <i>Convolvulaceae</i>) en el municipio de Manizales (Arias, López, Bernal, & Castaño, 2011)	Realizar una caracterización ecológica (insectos asociados, flora acompañante), fitoquímica y efecto biocida en batatilla <i>Ipomoea purpurea</i> L. Roth (sustancias presentes en semillas).	Para este estudio se selección, recolectó y caracterizó la <i>Ipomoea purpurea</i> en fincas de las veredas Bajo Tablazo y Agua Bonita. Los métodos de análisis fueron: pruebas fitoquímicas empleando el análisis bromatológico, extracción de alcaloides de semillas de <i>Ipomoea spp.</i> , pruebas del efecto del extracto en <i>Cosmopolites sordidus</i> y, por último, utilizaron los bioensayos como evaluadores de los efectos generales del extracto puro.	El resultado del análisis se destaca por la presencia (por posible bioacumulación o traslocación hacia las semillas) de metales pesados como Hierro (59,83 mg/kg), Cobre (15,95 mg/kg), Manganeso (17,34 mg/ kg) y Zinc (39,03 mg/kg). Además, la extracción de alcaloides a partir de semillas de <i>Ipomoea purpurea</i> obtuvo como resultado un volumen final de 2,5 mL de una sustancia de color verde-oscuro, turbia, sin diferenciación de fases, inodora, no grasosa y de apariencia un poco densa. Finalmente, la capacidad del extracto sobre la plaga (picudo negro), y los cambios de comportamiento, precisaron la utilidad biocida de las sustancias contenidas en las semillas de <i>Ipomoea purpurea</i> .

5.2. Antecedentes Internacionales

Tabla 2: Antecedentes internacionales sobre aislamiento y caracterización de compuestos químicos de especies vegetales del género *Ipomoea*.

Título de la Investigación	Objetivos	Aspectos Metodológicos	Principales Hallazgos
Aislamiento, purificación y caracterización estructural de glicolípidos presentes en fracciones de las resinas de <i>Ipomoea intrapilosa</i> ROSE. (Díaz, 2009)	Purificar algunos de los constituyentes individuales de la resina glicosídica de <i>Ipomoea intrapilosa</i> ROSE y establecer su estructura química.	Se purificaron los compuestos presentes mediante reciclaje de picos por cromatografía de líquidos de alta resolución. Finalmente, se registraron los datos espectroscópicos de los compuestos.	Se aislaron varios constituyentes minoritarios. El metabolito aislado consiste en un lipopentasacárido macrolactónico.
Purgina II, un dímero de tipo éster de la resina glicosídica de	Realizar una reinvestigación del extracto soluble en	Se utilizó la cromatografía HPLC de reciclado a escala	Se purificaron cuatro nuevos glicósidos como pentasacáridos,

<i>Ipomoea purga</i> como inhibidor de bombas de eflujo. (Castañeda-Gómez, Figueroa-González, Jacobo, & Pereda-Miranda, 2012)	cloroformo de las partes aéreas de <i>Ipomoea purga</i> para la identificación de inhibidores de resistencia a múltiples fármacos de mamíferos.	preparativa para purificar los nuevos glicósidos de las resinas. Las estructuras se establecieron mediante espectroscopia RMN y MS. La modulación de la resistencia a múltiples fármacos se evaluó en células de carcinoma de mama humano resistentes a vinblastina.	(purginósidos) y dímeros de tipo éster del ácido operculínico con tres residuos de acilación diferentes en unidades monoméricas. La Purgina II mejoró la actividad de la vinblastina a 25 µg/mL.
Purificación de glicolípidos de interés agrícola y medicinal a partir de la planta <i>Ipomoea tricolor</i> CAV. (Villeda, 2006)	Purificar algunos de los constituyentes individuales de la fracción 38-40 (soluble en metanol) del extracto cloroformo-metanólico de <i>Ipomoea tricolor</i> CAV.	La fracción 38-40 seleccionada se analizó mediante HPLC. Se buscaron las condiciones óptimas de mejor resolución de sus constituyentes. Fueron probadas varias fases estacionarias y móviles. Se purificaron algunos de los compuestos presentes, llevando a cabo numerosas inyecciones. Finalmente, se registraron los datos espectroscópicos de los compuestos purificados. El compuesto mayoritario purificado se identificó mediante RMN.	El compuesto purificado coincidió con la tricolorina I, metabolito anteriormente descrito en la especie vegetal. La fracción metanólica del extracto de <i>Ipomoea tricolor</i> contiene algunos separación en forma natural se ve difícil. La acetilación de la muestra permite caracterizar los núcleos básicos. isómeros cuya
Resinas glicosídicas de semillas <i>Ipomoea alba</i> como potencial quimiosensibilizador en células de carcinoma de mama. (Cruz-Morales, y otros, 2016)	Aislar y elucidar nuevos glicósidos de <i>Ipomoea alba</i> como posibles agentes modificadores de resistencia de células de mama a múltiples fármacos.	Los compuestos fueron purificados del extracto soluble en cloroformo. Se utilizó una combinación de espectroscopia de RMN y espectroscopia de masas para la elucidación estructural. La potenciación de las células de carcinoma de mama se evaluó mediante ensayos de modulación.	Se obtuvieron seis nuevos glicósidos de <i>Ipomoea alba</i>. Los albinosidos aislados ejercieron potenciación más fuerte de la susceptibilidad a la vinblastina a una concentración de 25 µg/mL.

Caracterización de un extracto de <i>Ipomoea batatas</i> para ser utilizado en calidad de base nutritiva en medios de cultivo. (Lobaina, Rodriguez, & Zhurbenko, 2007)	Caracterizar un extracto nutritivo de <i>Ipomoea batatas</i> obtenido por un método hidrolítico, con el fin de emplear el extracto como base nutritiva para el cultivo de diferentes especies microbianas.	A 3 lotes industriales de 10 kg de extracto de <i>Ipomoea batatas</i> se hizo el proceso hidrolítico recomendado. Se establecieron las condiciones de temperatura y pH óptimas para garantizar la actividad enzimática. Se realizó la caracterización organoléptica y fisicoquímica. Posteriormente, se usaron cepas de bacterias y levadura para evaluar la capacidad de promoción del crecimiento microbiano.	El estudio demostró la presencia de aminoácidos esenciales para los microorganismos, como lo son triptófano, cistina y caseína. Se demostró la capacidad del extracto vegetal como única fuente de nutrientes a diferentes concentraciones para promover el crecimiento de bacterias y levaduras. El extracto no contiene compuestos antibacterianos ya que se obtuvo valores similares a los obtenidos en un medio de referencia de agar triptona soya.
Marubajalapinas, I-VII, nuevas resinas glicosídicas solubles en éter de <i>Pharbitis purpurea</i>. (Ono, Ueguchi, Murata, Kawasaki, & Miyahara, 1992)	Aislamiento y elucidación estructural de nuevas resinas glicosídicas (marubajalapinas) de <i>Pharbitis purpurea</i> solubles en éter.	Los glucósidos se aislaron mediante la cromatografía en columna y cromatografía líquida de alta eficiencia y se identificaron por RMN y espectroscopia de masas.	Se aislaron las marubajalapinas I-VII, como tetrasacáridos del ácido operculínico E.

6. Marco Teórico

Según la Organización Mundial de la Salud, en el año 2015, aproximadamente 8.8 millones de personas fallecieron a causa del cáncer, siendo una de las principales causas de muerte en el mundo. En Colombia se registra que los principales tipos de cáncer son de pulmón, hígado, estómago, colon y mama presentándose cerca de 71.000 casos de cáncer anualmente, de los cuales 104 personas mueren cada día por esta enfermedad. En el 2016, el departamento del Huila registró 119 víctimas de cáncer de estómago en hombres, en contraste con esta enfermedad en mujeres, dentro de las cuales alrededor de 69 víctimas fueron reportadas con cáncer de mama (Instituto Nacional de Cancerología, 2016).

6.1. Cáncer

Según la (Organización Mundial de la Salud, 2017) el cáncer representa un proceso de crecimiento y diseminación incontrolada de células. Por otro lado, la (Fundación para la Excelencia y la Calidad de la Oncología, 2017) define el cáncer como un crecimiento descontrolado de células en alguna parte del cuerpo; en efecto autores como (Huerta, 2014) (Varela, 2002), (Mehta & Zahid, 2009) definen el cáncer en términos singulares partiendo desde el mismo origen. De este modo, (Cairns, 1981) en su libro titulado “cáncer: ciencia y sociedad” define concretamente que “*cada cáncer procede de una sola célula que traspasa sus límites territoriales y es capaz de formar una línea celular que se produce sin límites.*”

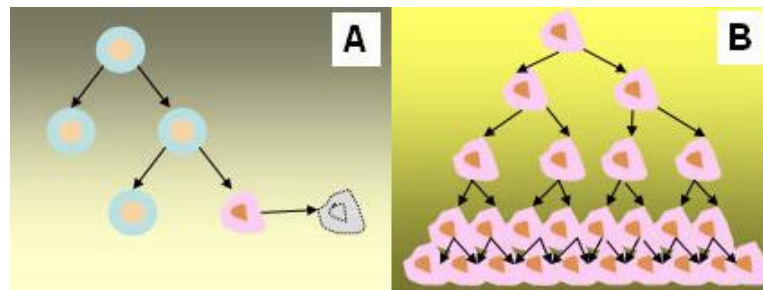


Figura 1. Proliferación incontrolada de células cancerígenas. **A.** Las células normales se dividen en forma controlada, cuando una célula desarrolla una mutación u otra alteración activa el proceso de apoptosis. **B.** Las células cancerígenas desarrollan mutaciones que no son reparadas y pierden la capacidad para morir.

Tomado de: (Sociedad Española de Oncología Médica, 2017)

6.2. Desarrollo y causas

El cuerpo humano está conformado por billones de células diferentes en forma, tamaño, distribución y función, considerada como la estructura funcional de cada ser vivo. Según (Cairns, 1981) el cuerpo humano contiene aproximadamente diez billones de células. Actualmente, la Fundación para la Excelencia y la Calidad de la Oncología 2017, expresa que durante la división celular la transformación de las células normales en células cancerígenas surge por el daño del ADN, dando paso a la creación de células incapaces de controlar su crecimiento y división. Esta división celular incontrolable forma masas o tumores en los órganos donde se origina la proliferación, denominadas tumores primarios. Existen tumores no cancerosos que no migran a otras partes del cuerpo, por ende, no generan metástasis. Por otro lado, las células malignas cancerígenas son capaces de invadir órganos vecinos a su lugar de origen y extenderse por la sangre a otros lugares lejanos creciendo en ellos, produciendo tumores secundarios conocidos como metástasis.

La carcinogénesis se le conoce entonces como el proceso de mutación producida del ADN en células sanas y diferentes estudios ha llegado a reconocer sus cuatro fases, así:

6.2.1. Inducción o iniciación

Aparece la mutación del ADN que convierte a las células sanas en células cancerígenas: división incontrolada, invasión local y de diseminación incontrolada.

6.2.2. Cáncer “*in situ*”

Incremento de células cancerígenas en el órgano o tejido de origen, produciendo el tumor primario.

6.2.3. Invasión local

Expansión del tumor primario a zonas vecinas del punto de origen, expresando los primeros síntomas.

6.2.4. Invasión a distancia o metastatización

Las células cancerígenas se trasladan a otros órganos o tejidos lejanos por medio del torrente sanguíneo o el sistema linfático originando tumores secundarios denominados metástasis.

Actualmente, existen gran variedad de agentes que causan el cáncer en los seres humanos, algunas de ellas son los agentes ambientales, radiación solar, así como la inactividad física, factores de dieta, obesidad, tabaquismo, alcoholismo, herencia, también, agentes infecciosos como parásitos, virus, bacterias (Partanen, Monge, & Wesseling, 2009).

6.3. Tipos de cáncer

Según (Instituto Nacional del Cáncer, 2017) el cáncer, se clasifica dependiendo de la ubicación o las funciones de las células en donde surgen los diferentes tipos de tumores dependiendo del tejido, así:

6.3.1. Carcinoma

Grupo de células epiteliales anormales que permanecen en el mismo lugar en el que se forman. Estas células, se pueden volver cancerosas y diseminarse hasta los tejidos vecinos sanos. Los carcinomas son los tipos más comunes de cáncer.

6.3.2. Sarcoma

Los sarcomas son cánceres que se forman en el tejido óseo y tejidos blandos, incluyendo músculos, tejido adiposo (graso), vasos linfáticos, sanguíneos, tendones y ligamentos (tejido fibroso).

6.3.3. Leucemia

Cáncer derivado de los tejidos que forman la sangre en la médula ósea o sus precursores. Este tipo de cáncer no forman tumores sólidos, en lugar de esto, los glóbulos blancos anormales (células leucémicas) se acumulan en la sangre desplazando los glóbulos normales de la sangre.

6.3.4. Linfoma

Cáncer que empieza en los linfocitos (células B o células T), que son los encargados de combatir las enfermedades, por lo cual forma parte del sistema inmunitario. Estos se acumulan en los ganglios y vasos linfáticos principalmente, pero también se pueden presentarse en otros tipos de órganos en el cuerpo.

6.3.5. Mielomas

Cáncer que inicia en las células plasmáticas, otro tipo de células inmunitarias. Las células de mieloma, comúnmente se acumulan en la médula ósea formando tumores en los huesos.

6.4. Medicamentos empleados en la quimioterapia contra el cáncer

Según el tipo de cáncer, puede ser administrado un medicamento de terapia en combinación con algunos tratamientos de quimioterapia. Existen dos tipos de medicamentos de quimioterapia: Las antraciclinas son químicamente similares a los antibióticos. Las antraciclinas dañan el ADN de las células cancerígenas, por lo que las células mueren. Los taxanos interfieren en los microtúbulos alterando la división de las células cancerígenas. A continuación, se nombran algunos de los agentes quimioterapéuticos más empleados:

6.4.1. Vinblastina

La vinblastina es un fármaco citotóxico que se usa principalmente en la quimioterapia para cáncer testicular, de mama, pulmonar, de cabeza y cuello. Según (Hurley, 2012) el fármaco es un tipo de alcaloide vegetal extraído de la planta *Catharanthus roseus*. El fármaco actúa en el estadio de la metafase del ciclo celular uniéndose a la tubulina inhibiendo el ensamble de los microtúbulos que son necesarios para la separación de los cromosomas durante la anafase, la inhibición de estas estructuras provoca la muerte celular.

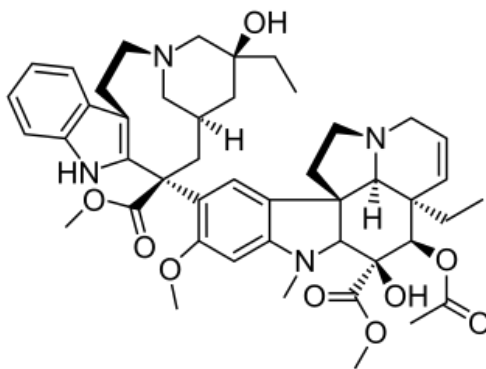


Figura 2. Estructura química de la vinblastina.

6.4.2. Vincristina

La vincristina, es un fármaco citotóxico usado para la quimioterapia contra el cáncer de tiroides, tumores cerebrales, leucemias agudas y crónicas, linfomas, sarcomas y mielomas. También es un tipo de alcaloide vegetal que actúa al igual que la vinblastina.

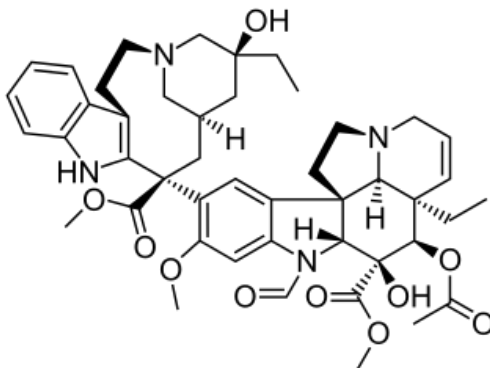


Figura 3. Estructura química de la vincristina.

6.4.3. Paclitaxol

Es un fármaco de quimioterapia citotóxico clasificado como un alcaloide vegetal y un agente antimicrotubular. Se vende con el nombre comercial de Taxol. Se utiliza principalmente para el tratamiento de cáncer de mama, ovario, pulmón, vejiga, próstata, melanoma, esófago y algunos tumores cancerosos. El mecanismo de acción de este fármaco radica en los microtúbulos, ya que inhibe la estructura microtubular dentro de la célula. La inhibición de estas estructuras finalmente provoca la muerte celular.

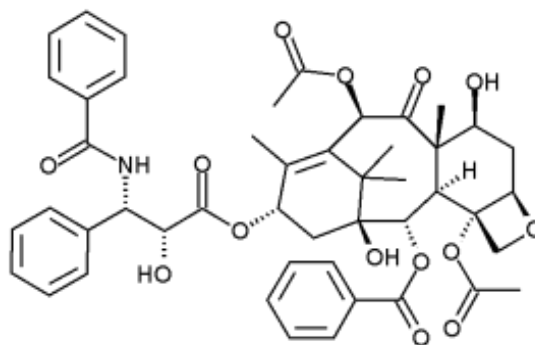


Figura 4. Estructura química del Paclitaxel.

6.4.4. Doxorubicina

Es un fármaco de quimioterapia citotóxico, que se clasifica como un antibiótico de tipo antraciclina. Se vende con el nombre comercial de adriamicina. Se usa para tratar el cáncer de vesícula, mama, cabeza y cuello, algunos tipos de leucemia, cáncer de hígado, cáncer de testículo, tiroides, y útero. El mecanismo de acción se basa en su intercalamiento con la molécula de ADN, inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos, ya que dificulta el avance de la enzima topoisomerasa II, que es la encargada del desenrollamiento del ADN en el proceso de transcripción (Kaye, SB, 1998).

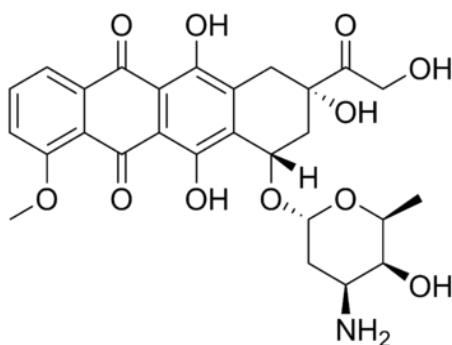


Figura 5. Estructura química de Doxorrubicina.

6.4.5. Podofilotoxina

También conocido como PPT, es un fármaco que se extrae de las raíces del género *Podophyllum*. Se usa como tratamiento tópico para los condilomas acuminados o verrugas genitales producidos por algunos tipos de virus del papiloma humano (VPH) y otras verrugas externas inhibiendo la división celular en la metafase.

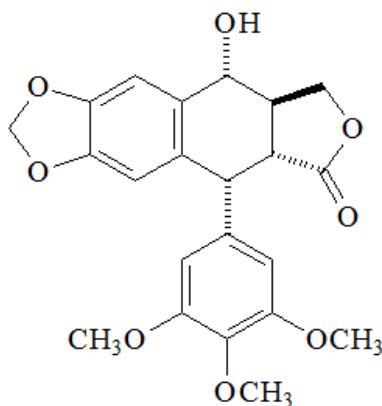


Figura 6. Estructura química de la Podofilotoxina.

6.4.6. Colchicina

Es un fármaco que detiene o inhibe la división celular en el estado de metafase o anafase. El mecanismo de acción es la inhibición de la polimerización de los microtúbulos lo cual es esencial para la mitosis, por lo que la colchicina es eficaz para la inhibición de las células. Principalmente, se usa para tratar la gota y para prevenir el cáncer de hígado.

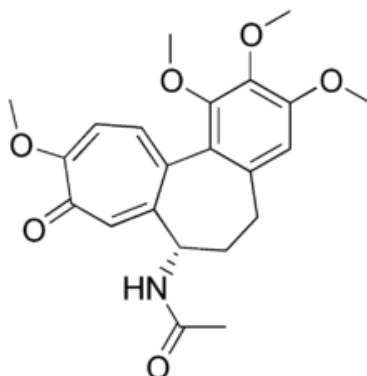


Figura 7. Estructura química de la colchicina.

6.4.7. Camptotecina

Es un fármaco citotóxico usado para la quimioterapia contra el cáncer, perteneciente al grupo de los alcaloides vegetales y es un inhibidor de las topoisomerasas. Se usa principalmente para el cáncer rectal o de colon metastásico, pulmón y mama. El mecanismo de acción es inhibir las topoisomerasas I y II que son las encargadas de controlar la manipulación de la estructura del ADN para la replicación. Se ha comprobado la eficacia en varios tipos de tumores malignos, debido a la poca afinidad para atravesar las membranas celulares su uso queda limitado, por lo que se han sintetizado nuevos derivados con mejoras en sus propiedades.

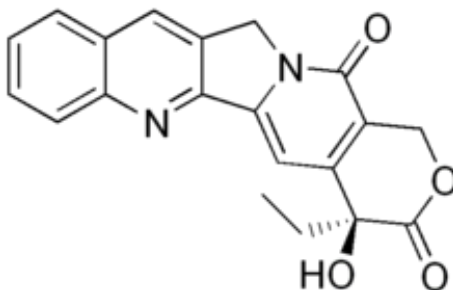


Figura 8. Estructura química de la Camptotecina.

6.5. Mecanismo de resistencia a múltiples fármacos

Una de las razones principales por la que los tratamientos contra el cáncer no son efectivos, es el desarrollo de resistencia a los medicamentos por las células cancerígenas, por esta razón, algunas veces es necesario suministrar una combinación de fármacos (Paredes, Blanco, & Echenique, 2005). Si una célula cancerígena desarrolla la capacidad de resistir a un fármaco, lo más probable es que el cáncer sea resistente a otros fármacos (Bredel & Zentner, 2002) creando problemas que pueda comprometer aún más la salud de las personas, ya que puede ser precursor de una enfermedad o incluso causar la muerte.

Según lo planteado por (Vega, 2008) la resistencia a fármacos se puede clasificar en dos categorías, la inmunidad natural o innata, que hace referencia a las células malignas resistentes a las terapias desde el inicio, y la específica, adquirida o adaptativa, cuando las células crean la inmunidad a la droga durante el tratamiento o después de éste. Existen varios mecanismos conocidos mediante el cual la célula adquiere inmunidad a los efectos de los fármacos, a continuación, se explican algunas de ellas:

6.5.1. Células resistentes

Las células cancerígenas se distinguen porque son inestables genéticamente estando en constante mutación. Esto hace que no todas las células adquieran los cambios genéticos, lo que significa que, aunque las células son del mismo tipo de cáncer no son todas idénticas. El fármaco cumple su función si actúa terapéuticamente en todas las células que son sensibles a éste, pero existen algunas células que son resistentes por lo que no sufren ningún daño, logrando reproducirse. El resultado son nuevas células que no se destruyen con el fármaco ya que mutan y se convierten en resistentes a éste, creando un mecanismo que inactiva el fármaco.

6.5.2. Amplificación de genes

En una célula la efectividad del fármaco disminuye cuando no se suministra la cantidad necesaria de dosis terapéutica. Algunas veces la célula puede desarrollar un mecanismo para producir cientos de copias de un gen en particular, implicando la replicación selectiva de una región de un cromosoma (Gottesman, 2002). Este proceso

desencadena una producción de proteínas codificadas por esos genes que hacen que el fármaco sea ineficaz.

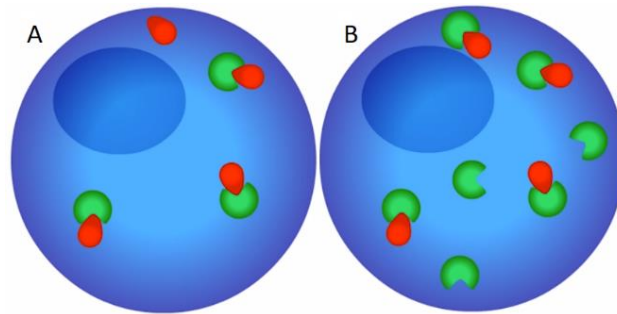


Figura 9. Mecanismo de amplificación de genes. **A.** Célula de cáncer que se le aplica la cantidad necesaria del fármaco. **B.** Célula que no se le aplica la cantidad necesaria de fármaco, provocando la amplificación de genes logrando que el fármaco ya no sea efectivo. Tomado de: (Chemocare, 2012).

6.5.3. La molécula objetivo es alterada

Como se ha mencionado anteriormente las células cancerígenas están mutando su información genética. El mecanismo de acción del fármaco puede contrarrestar la acción de células que tienen una versión no mutada de una célula en particular, sin alterar las células que adquieren la mutación del gen modificado. El fármaco no podrá inhibir la célula que ha sido alterada genéticamente.

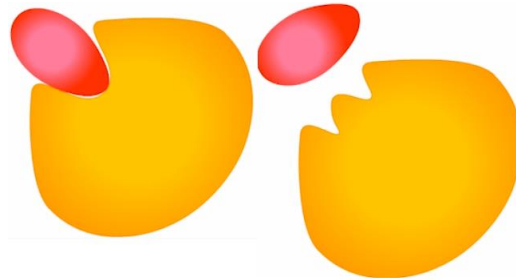


Figura 10. Mecanismo por el cual la molécula de destino es alterada. Tomado de: (Chemocare, 2012).

6.5.4. Barrera sangre-cerebro

El objetivo del fármaco es inhibir la reproducción de las células cancerígenas, pero éste puede verse altamente afectado debido al tamaño y el lugar en donde se encuentre el tumor. Cuando los tumores son grandes, los vasos sanguíneos que se encuentran en este son muy pocos, por lo cual va a ser muy difícil que el fármaco actúe, a excepción de los

tumores que se encuentran en la cavidad craneal. De acuerdo a (Gottesman, 2002) si los vasos sanguíneos llegarán a cambiar, el paso de diferentes moléculas sería aún más difícil ya que no podrán ser introducidas en la zona que rodea el cerebro, este movimiento de las moléculas por los vasos sanguíneos es llamada barrera sanguínea cerebral.

6.5.5. Resistencia múltiple a los fármacos

Existen diferentes motivos por la que los fármacos no pueden cumplir con su función terapéutica en las células cancerígenas; uno de los más comunes es el gen llamado MDR1 (Resistencia a Múltiples Fármacos) que es el mecanismo de amplificación de un gen, descrito anteriormente. Tal como lo plantea (Bredel & Zentner, 2002) otro nombre que recibe la proteína que codifica este gen es la glicoproteína-P o P-gp, que es una proteína transmembranal con la habilidad de detener el paso a la célula de algunos fármacos, expulsándolos una vez estos ingresen al interior de la célula. Es tanto la importancia de esta proteína que muchos grupos de investigación se encuentran desarrollando alternativas para lograr la inactividad de ésta.

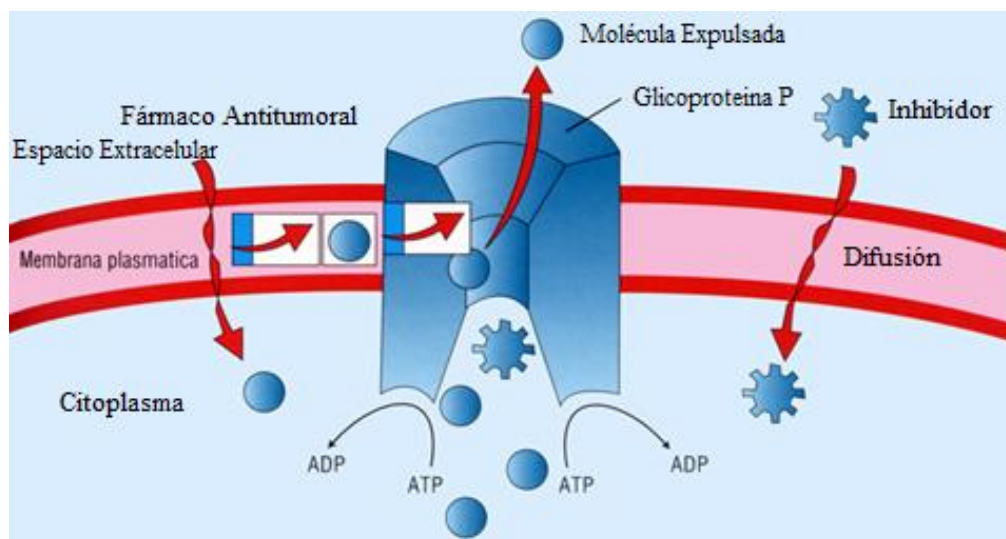


Figura 11. Mecanismo de acción de la glicoproteína-p.

6.6. Multirresistencia inducida por la glicoproteína-p

La expulsión del fármaco fuera de la célula es el mecanismo de resistencia más estudiado y está ligado con las proteínas transportadoras. Según (Sánchez & Benitez,

2006) hasta ahora se conocen tres proteínas que actúan como mecanismo de resistencia: glicoproteína-p (Pg-p), proteínas asociadas a la resistencia a múltiples fármacos (MRP) y la proteína de resistencia al cáncer de mama (BRCP).

La resistencia a los agentes anticancerígenos es uno de los retos que representa el tratamiento contra el cáncer ya que existen diversas causas que hace que la terapia no sea exitosa. La glicoproteína-p se encuentra en la membrana de las células tumorales y conduce a la resistencia de múltiples fármacos, lo cual se describe como una célula multirresistente (multidroga resistente o MDR) (Arvelo, Merentes, & Cotte, 2000). El gen que codifica la glicoproteína-p se localiza en el cromosoma 7. El mecanismo de acción se puede observar en la figura 12, donde se muestra que la célula constantemente está expulsando el fármaco que contrarresta la reproducción de células (bomba de regulación).

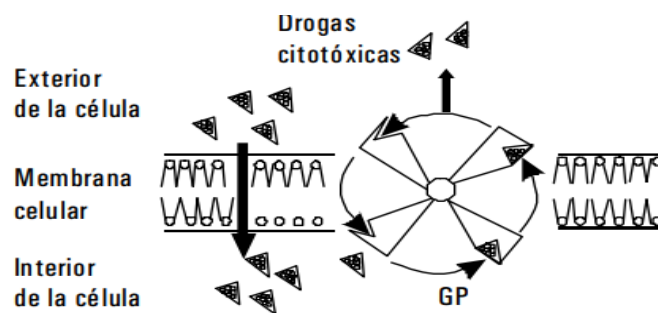


Figura 12. Analogía del mecanismo de acción de la glicoproteína-p. Tomado de: (Águila, Crombet, Villares, & Pons, 1998)

Según (Águila, Crombet, Villares, & Pons, 1998) “la P-gp está compuesto por una cadena de aproximadamente 1280 aminoácidos con dos mitades homólogas y 12 dominios transmembrana. Presenta dos zonas de unión al ATP ubicadas en la parte citoplasmática, un sitio de glicosilación entre el primer y segundo dominio transmembrana y varios sitios de fosforilación” (figura 13).

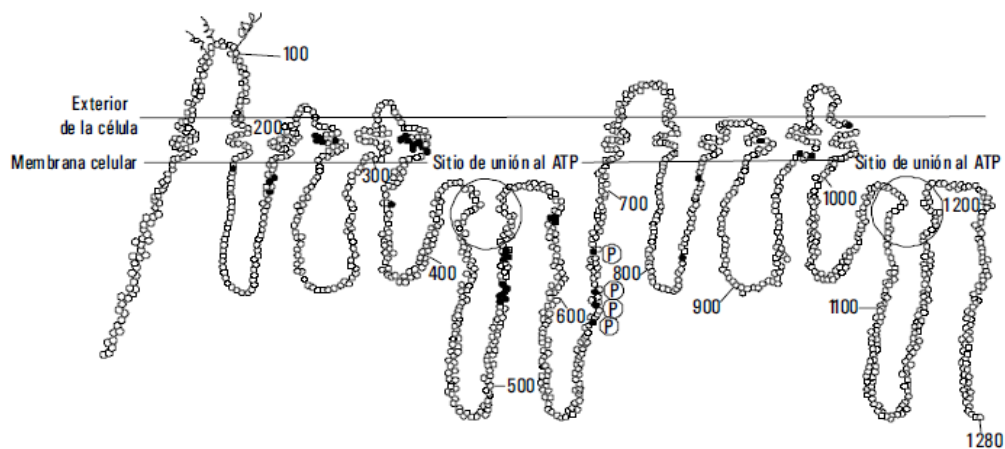


Figura 13. Representación de la glicoproteína-p. Tomado de: (Águila, Crombet, Villares, & Pons, 1998)

6.7. Sistema de bomba de eflujo

En un estudio realizado por (Marchetti, Errecalde, & Mestorino, 2011), las bombas de eflujo son transportadores de membrana constituidas por proteínas que se encuentran involucrados en la obstrucción de sustancias tóxicas desde el interior de la célula hasta el medio externo, principalmente como mecanismo de resistencia. Los sistemas de eflujo se categorizan por familias de bombas entre las cuales encontramos: familias de casete de unión al ATP (ABC), superfamilia de facilitador mayor (MFS), familia de extrusión de multifarmacos y tóxicos (MATE), familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR), familias de resistencia a división por nodulación (RND). Las ABC se caracterizan por transportadores activos primarios y su mecanismo depende de la captación e hidrólisis del ATP, mientras que las MFS, MATE, SMR y RND corresponden a transportadores secundarios ya que su actividad se logra por gradiente de protones.

6.8. Sustancias químicas que modulan la resistencia a múltiples fármacos de células de cáncer

Actualmente, existen una gran variedad de sustancias químicas que modulan la resistencia a múltiples fármacos de células de cáncer, que se combinan con los medicamentos empleados para las quimioterapias y así lograr que el fármaco elimine a las células de cáncer. Algunas de estas sustancias son:

6.8.1. Trifluoperazina

Es un fármaco antipsicótico y tranquilizante que junto con erlotinib (fármaco específico contra el cáncer) adquieren las propiedades que hacen que los genes supresores de tumor se activen atacando las células tumorales (Adolfoneda, 2012).

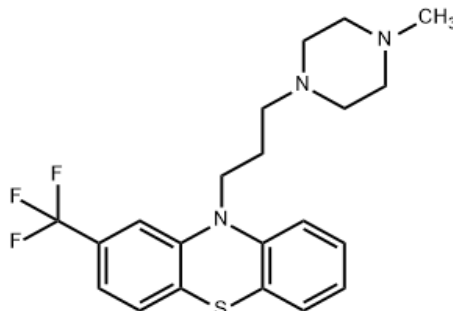


Figura 14. Estructura química de la Trifluoperazina.

6.8.2. Ciclosporina A

La ciclosporina A es un decapeptido aislado de un hongo llamado *Tolypocladium inflatum* (Gago, 2014). La (Universidad Autónoma de Madrid, 2012), afirma que la ciclosporina A es un fármaco inmunosupresor que actúa inhibiendo a la calcineurina, sustancia que se fija a las proteínas intracelulares tipo inmunofilinas.

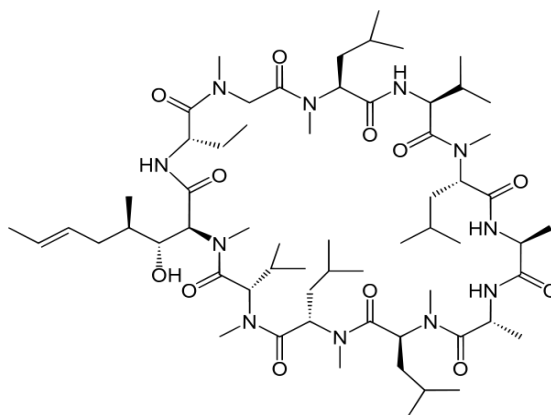


Figura 15. Estructura química de la Ciclosporina A.

6.8.3. Cloroquina

Según (Ingraham & Ingraham, 1998) “la cloroquina es un compuesto sintético derivado de la quinina, de origen natural extraída de la corteza del árbol de la quinina”. Actualmente, se desconoce el mecanismo de acción de la Cloroquina.

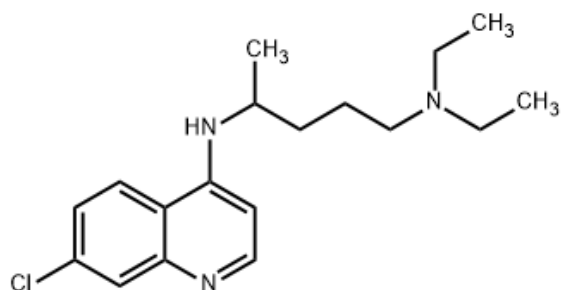


Figura 16. Estructura química de la Cloroquina.

6.8.4. Quercetina

La quercetina es un compuesto polifenólico que hace parte de los flavonoides y se encuentra ampliamente en vegetales, frutos, bebidas no alcohólicas y plantas medicinales. Además, se puede encontrar como glucósido en manzanas, té, cebollas y vino tinto. Uno de los mecanismos de acción de la quercetina es gracias a su capacidad antimutagénica y de su poder antioxidante, esta sustancia ha sido capaz de contrarrestar el cáncer de mama, ovario, pulmón y estómago (Dominguez & Ruiz, 2007).

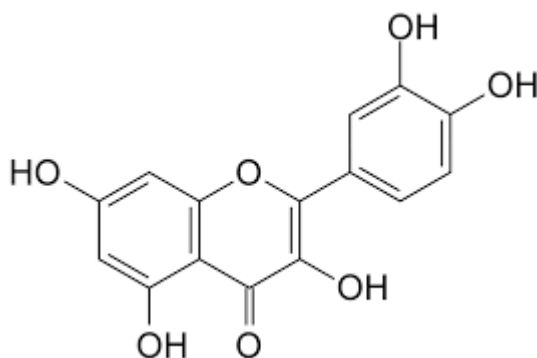


Figura 17. Estructura química de la Quercetina.

6.8.5. Panaxadiol

Agente anticancerígeno que induce la apoptosis de las células cancerígenas y muestra efectos radioprotectores "*in vivo*". Es un compuesto de tipo protopanaxadiol de ginsenósido que, junto con algunos medicamentos como ciclofosfamida, fluorouracilo y epicatequina muestran propiedades antitumorales en células cancerígenas humanas (Rahman, 2013).

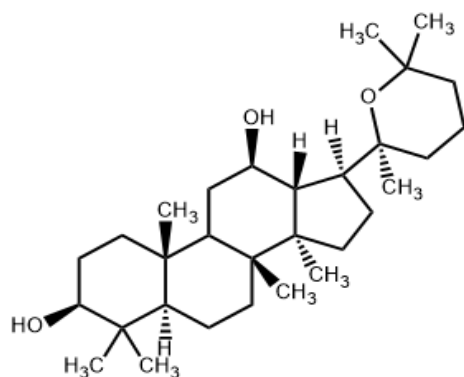


Figura 18. Estructura química del Panaxadiol.

6.8.6. Ácido gamma-linoleico.

El ácido gamma-linoleico es un ácido graso Omega-6 y es considerado como un ácido esencial para el cuerpo humano, ya que este no tiene la capacidad de sintetizar dicho ácido. Así, el ácido gamma-linoleico se obtiene de los alimentos en forma de aceite vegetal. Tal como lo plantea (Campra, 2003), actualmente se ha encontrado que este ácido es un modulador para los fármacos utilizados en los tratamientos de quimioterapia, entre los cuales se encuentran: doxorubicina, cisplatino, carboplatino, idarubicina, mitoxantrona, tamoxifeno, vincristina y vinblastina. De tal modo, el ácido aumenta la efectividad de los fármacos.

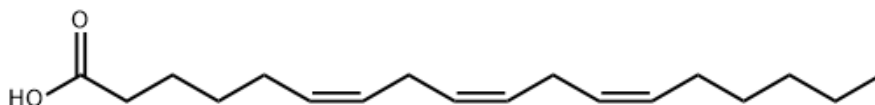


Figura 19. Estructura química del Ácido gamma-linoleico.

6.9. Glicolípidos

Los carbohidratos también llamados glúcidos o hidratos de carbono, son las moléculas que están compuestas por átomos de carbono, hidrógeno y oxígeno y es la principal fuente de energía en casi todas las células. Tal como lo plantea (Nelson & Cox, 2009), en la naturaleza estas moléculas cumplen un papel muy esencial, ya que forman gran parte de las biomoléculas, siendo los compuestos orgánicos más abundantes en la naturaleza. Los glucósidos se pueden caracterizar según su tamaño en monosacáridos, oligosacáridos y polisacáridos.

Los oligosacáridos son moléculas unidas entre sí mediante enlaces glucosídicos. (Eyzaguirre, 1974) plantea que se considera oportuno hablar de oligosacáridos cuando en la molécula se presenta de 2 a 9 unidades de monosacáridos. Según el número de monosacáridos que la conformen, se formarán disacáridos, trisacáridos, tetrasacáridos, etc. Los más abundantes son los disacáridos, que son oligosacáridos formados por dos unidades de monosacáridos iguales o diferentes.

Los oligosacáridos se pueden encontrar unidos a proteínas (glicoproteínas) y lípidos (glicolípidos) mediante un enlace covalente. Como se observa en la figura 20, los glicolípidos que han demostrado revertir la resistencia a fármacos de las células cancerígenas, constan de una porción hidrofílica correspondiente al glúcido y una porción hidrofóbica constituida por ésteres de ácidos grasos de cadena corta y cadena larga (Castañeda-Gómez, Charry y Pereda-Miranda, 2013). Se han logrado identificar una gran variedad de glicolípidos de origen natural en extractos vegetales correspondientes a la familia Convolvulácea del género *Ipomoea* que han logrado modular la resistencia a múltiples fármacos que presentan las células de cáncer.

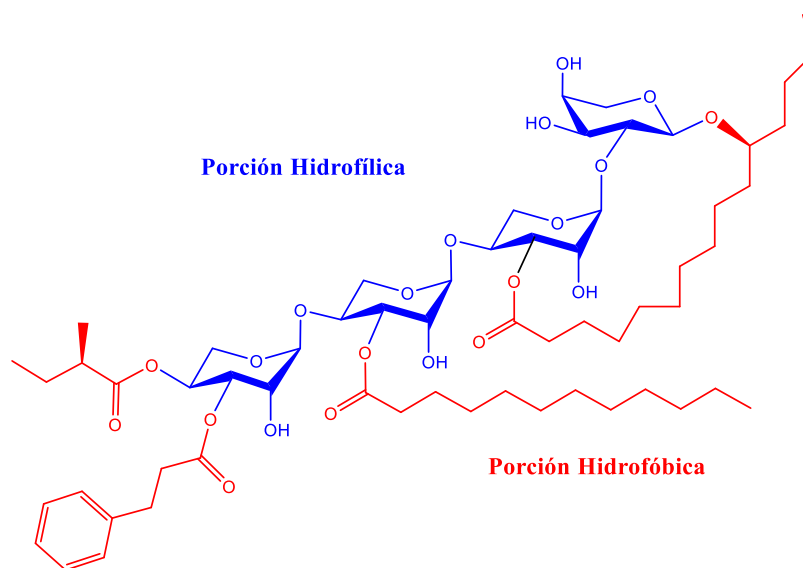


Figura 20. Estructura general de un glicolípido. Tomado de: (Castañeda-Gómez, Charry, & Pereda-Miranda, *Empleo de Métodos Analíticos Modernos para el Aislamiento y la Identificación de Resinas Glicosídicas de la Familia Convolvulaceae*, 2013)

6.10. Familia Convolvulaceae

El nombre de esta familia viene del latín “*Convolvo*” que significa “entrelazarse” y se refiere a la forma como crecen la mayoría de sus especies en forma de enredaderas (Figura 21). Pertenece al grupo de las angiospermas que posee alrededor de 55 géneros y 1650 especies en el mundo (Castañeda-Gómez, Charry y Pereda-Miranda, 2013). Crecen naturalmente desde las regiones cálidas hasta las subtropicales de todo el planeta, pudiéndose encontrar con mayor certeza en los bosques con una alta humedad ambiental y en terrenos modificados (Universidad Nacional del Nordeste, 1998), también se cultivan para uso ornamental debido al tamaño de sus flores y los colores llamativos que presentan. (Linares, 2001), plantea que en Colombia se encuentran alrededor de 13 géneros y 81 especies de las cuales 39 especies corresponden al género *Ipomoea*.



Figura 21. Especies de Convolvulácea y su forma de crecimiento. *Ipomoea alba* (enredadera), *Ipomoea pes-caprae* (rastrera) e *Ipomoea murucoides* (arbusto), respectivamente.

Las especies vegetales de la familia Convolvulácea se caracterizan por ser plantas herbáceas y leñosas, a menudo trepadoras, erectas o rastreras, con hojas alternas y simples que producen látex y raramente se encuentran con estípulas, con flores de tipo actinomorfas o ligeramente zigomorfas, perianto con cáliz de 5 sépalos persistentes, libres o soldados, corola de 5 pétalos soldados, a menudo campanulada, gineceo ovario súpero, 2 carpelos, 2 óvulos por lóculo, axilares y estilo terminal simple o bifurcado a veces ginobásico, estigma simple, lobado o capitado, fruto en cápsula de dehiscencia septifraga, circuncisa y generalmente con poco endosperma y embrión curvo (Universidad Nacional

del Nordeste, 1998). Según (Orfila & D'Alfonso, 1995), algunas especies tienen raíces o rizomas tuberificados o también llamados raíces tuberosas, ricas en carbohidratos.

Las flores de la familia Convolvulácea se encuentran de diferentes colores, entre los cuales tenemos: azules, lilas, amarillo crema, blancas, verdes, rosada, y combinaciones tales como lila combinada con blanco en el exterior y amarillo en su interior, otras con amarillo en el exterior y púrpura en el centro; entre otros colores representativos de la familia Convolvulácea.

6.11. Género *Ipomoea*

El género *Ipomoea* está representada por una gran variedad de especies, algunas son muy conocidas por poseer propiedades que son benéficas o perjudiciales para el ser humano, debido a la presencia de metabolitos secundarios. Se ha documentado la existencia de algunas especies que han sido objeto de estudio los últimos años, entre estas encontramos: *Ipomea alba*, *Ipomoea purga*, *Ipomoea tricolor*, *Ipomoea wolcottiana*, *Ipomoea batatas*, entre, otras. En estas especies se han descrito nuevos glucósidos que se han registrado como moduladores de la glicoproteína-p, lo cual es nuestro objeto de estudio.

El género *Ipomoea* es el más representativo de la familia ya que contiene propiedades medicinales purgativas y alucinógenas. (Manzanero , Flores, Sandoval, & Bye, 2009), plantea que algunas de las especies del género *Ipomoea*, tal como la especie *Ipomea batatas*, hace parte del mercado de raíces medicinales ya que contiene una raíz modificada comestible que es empleada como alimento. También la especie *Ipomea stans* se utiliza comúnmente para enfermedades del sistema nervioso, órganos de los sentidos, enfermedades renales y biliares, empleándose la raíz mediante infusión (Vázquez, y otros, 2014).

6.12. *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH

En el departamento del Huila, la especie se conoce comúnmente como batatilla. Esta especie tiene hojas simples, alternas, sus hojas son ovadas que van desde 1-11 cm de longitud y de 1-12 cm de ancho. Los tallos son ramificados o simples, vagamente pubescentes a tomentosos con tricomas, los pecíolos varían entre 1-14 cm de largo, las

inflorescencias con 1-5 flores, el cáliz es de 5 lóbulos, densamente hirsuto en la base, y más glabrosa hacia las puntas. Los sépalos son subiguales, los sépalos exteriores son estrechos ovados a elípticas que van desde 0,8-1,5 cm de largo y 2,5-4,5 mm de ancho, los sépalos interiores son ovales, de 0,8 a 1,5 cm de largo y 2,5 a 3 mm de ancho. Las coronas en forma de embudo de color blanco, azul o púrpura, sin embargo, el blanco siempre se encuentra dentro de la corola. Las flores varían de 2.5- 5cm de largo y 2.4-5 cm de ancho. Los cinco estambres epipétalos varían de 8 a 10 mm de largo con anteras de 1,5-2 mm de largo. El ovario glabroso con 3 loculares en la parte superior, el estilo glabroso varía de 14-22 mm de largo con 3 estigmas, el fruto es una cápsula ovoide de aproximadamente 1 cm de diámetro y hasta 2.5 cm de largo, de 3-6 semillas granulares, las semillas son de 4 a 5,7 mm de largo con forma de herradura cicatriz (Erwyn, Sondag, & Burnham, 2013).

En la figura 22 y 23 se muestran algunas características de la especie *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH.



Figura 22. Flor de *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH. Tomado de (Erwyn, Sondag, & Burnham, 2013)



Figura 23. Semillas de *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH. (Erwyn, Sondag, & Burnham, 2013)

“Las flores, semillas, raíces, tallos de *I. purpurea* se han utilizado como un laxante, alucinógeno, purgante, y para el tratamiento de la sífilis” (Erwyn, Sondag, & Burnham, 2013).

6.13. Distribución de *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH

La especie vegetal *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH es originaria en América y se distribuye en Norteamérica, Oceanía, partes más calurosas como Europa, Asia y África (Vibrans, 2009).

El Herbario de la Universidad Nacional de Colombia, informa que la especie *Ipomoea purpurea* se encuentra distribuida en el Cauca, Boyacá, Antioquia, Valle del Cauca, Cundinamarca, Nariño, Huila, Magdalena, Putumayo, Caldas, la Guajira, Santander y Bogotá. En el Huila, según el Herbario de la Universidad Surcolombiana 2017, la especie *Ipomoea purpurea* se encuentra en las zonas aledañas al municipio de Rivera.

6.14. Cromatografía líquida

La cromatografía líquida es una técnica utilizada para separar componentes de una mezcla, empleándose una fase móvil y una fase estacionaria; la fase móvil es un líquido que permite la elución de la muestra, mientras que la fase estacionaria es un sólido empacado en una columna (no polar) de sílice, generalmente. La separación de los componentes se da cuando la muestra en solución es inyectada en la fase móvil, los componentes que se separan emigran de acuerdo a sus interacciones no covalentes con la columna de sílice. Estas interacciones químicas permiten la separación de los componentes en la muestra. Por otro lado, esta técnica se puede implementar en muestras de suelo, agua, y alimento (Miranda & Martín, 2013). A continuación, en la figura 24 se muestra una representación gráfica del funcionamiento de la cromatografía líquida.

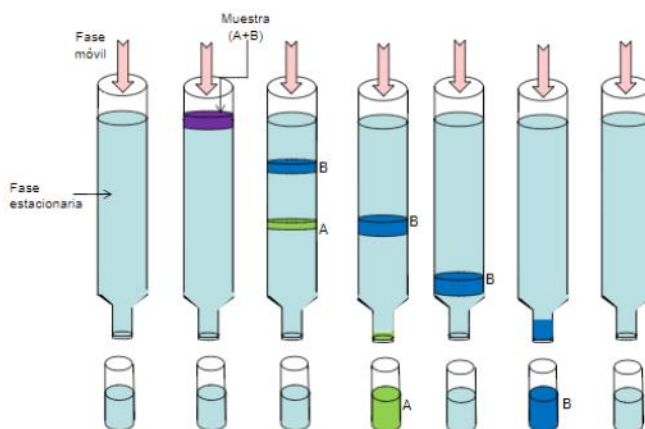


Figura 24. Separación de un compuesto mediante la técnica de cromatografía líquida. Tomado de: (Barquero, 1954).

6.15. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas

La cromatografía de gases es una técnica para separar sustancias químicas volátiles, que se basa en la partición del analito con una fase móvil y una fase estacionaria. La muestra es transportada por una corriente de gas a través de una columna empacada con un sólido recubierta con una película de algún líquido. Debido a su simplicidad, sensibilidad y efectividad para separar los componentes de las mezclas, la cromatografía de gas es una de las herramientas más importantes en química. Es ampliamente usada para análisis cuantitativos y cualitativos de mezclas, para la purificación de compuestos y para la determinación de constantes termoquímicas (Hoffman, 2014).

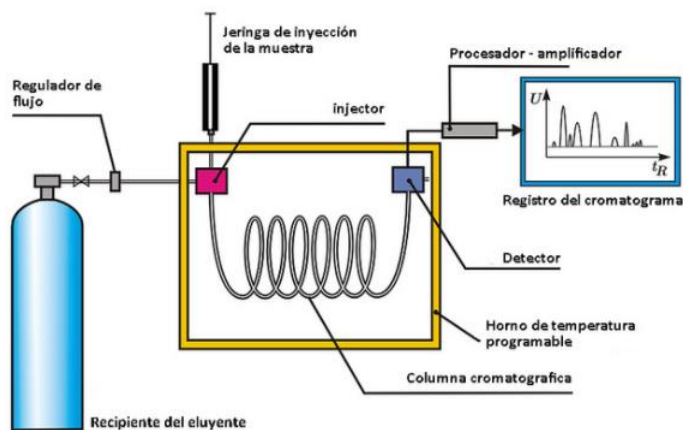


Figura 25. Descripción de cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas. Tomado de: (Castaño, 2013).

6.16. Espectroscopia

La espectroscopia es un método de análisis que permite conocer la composición cuantitativa y cualitativa de una muestra. Según (Barneto , 2017), la espectroscopia radica en la captación de radiación por parte de las moléculas. Dichas moléculas absorben la radiación electromagnética en paquetes discretos de energías o también denominados cuantos. El mecanismo de absorción se produce solamente cuando la radiación que incide en la sustancia proporciona el cuanto de energía suficiente. La energía absorbida por la muestra incita un movimiento mecánico o electrónico en las moléculas, proceso que se denomina excitación. La energía radiante exhibe características ondulatorias. Las radiaciones electromagnéticas aparentemente tan distintas, tienen en común que viajan a la velocidad de la luz y solamente difieren unas de otras en su frecuencia o longitud de onda. Actualmente, existen muchos tipos de espectroscopia, los más utilizados son espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN), espectroscopia de infrarrojo y espectroscopia Ultravioleta/Visible.

7. Metodología

7.1. Colecta del material vegetal y obtención de los extractos

La colecta del material vegetal se realizó en el municipio de Teruel, Huila, vereda Corrales, finca Villa Laura (2°48'57.1"N 75°36'19.2"W) a una altura de 1810 m.s.n.m. Se colectaron partes aéreas de la especie vegetal *Ipomoea purpurea* (L.) ROTH (tallo, hojas, flores, semillas). El lugar de la colecta se realizó en esta región cafetera debido a que la planta se caracteriza por ser “*invasora del café*” y crece de forma silvestre, es decir no presenta alteraciones antrópicas, que podrían alterar los metabolitos sintetizados por la planta.

Posteriormente, se realizó el proceso de secado a la sombra durante 15 días. La pulverización se realizó con un molino tipo Wiley de dos cuchillas hasta obtener un polvo homogéneo. Las extracciones del material pulverizado se llevaron a cabo mediante el método de maceración exhaustiva aplicando diferentes disolventes en orden creciente de polaridad como hexano, cloroformo y metanol. Para lo anterior, el material vegetal se dejó en un recipiente con el disolvente durante 3 días. Posteriormente, el líquido oscuro se procedió a filtrar. El extracto se concentró evaporando el disolvente mediante rotaevaporación a 40°C bajo presión reducida. Este proceso se repitió utilizando cloroformo y metanol. Los extractos se dejaron secar hasta obtener una pasta de consistencia dura.

7.2. Pruebas para identificar Glicolípidos

Los Glicolípidos presentes en los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico se identificaron utilizando la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) empleando acetona como fase móvil y sulfato cérico disuelto en ácido sulfúrico como agente revelador de carbohidratos. Las cromatoplasmas se calentaron en una plancha de calentamiento hasta la formación de un color amarillo-marrón como indicativo de la presencia de azúcares en la muestra.

Posteriormente, se procedió a realizar algunas pruebas cualitativas para identificar la presencia o ausencia de azúcares en los extractos. Los carbohidratos se reconocieron mediante las siguientes pruebas colorimétricas:

7.2.1. Keller-Killiani

En un tubo de ensayo se adicionó 1 mg de extracto y se agregó 0,5 mL de ácido acético glacial y una pequeña cantidad de cloruro férrico al 5%, luego se agitó por unos minutos. Posteriormente, se adicionó 0,5 mL de ácido sulfúrico concentrado y finalmente se agitó. La presencia de una coloración marrón o café es característico para carbohidratos.

7.2.2. Antrona

En un tubo de ensayo se agregó 1 mg de extracto y se adicionaron 1 mL de reactivo antrona (solución de 50 mL de ácido sulfúrico concentrado con 0.01 g de antrona). La prueba es positiva para carbohidratos si se presenta una coloración en tonalidades azul-verde.

7.2.3. Molish

En un tubo de ensayo se agregó 1 mg de extracto y se añadió 1 mL del reactivo de molish (solución de 0.5 g de α -naftol en 10 mL de etanol al 95%), posteriormente se agregaron 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. La prueba es positiva si se da una coloración púrpura.

7.3. Toxicidad de los extractos: Bioensayo *Artemia salina*

A los extractos obtenidos, se les evaluó el potencial biocida para el crustáceo de *Artemia salina*. Aproximadamente 1 g de huevos de *Artemia salina* se incubaron en solución de sal marina 3% a temperatura ambiente por 48 h. El bioensayo se realizó con soluciones de los extractos crudos (solubilizados con Tween 80 al 1%) a concentraciones de 200, 500 y 1000 ppm. En todos los casos, los ensayos se realizaron por triplicado. Luego, se agregaron 10 nauplios en placas de 6 pozos. El conteo de los nauplios vivos y muertos se realizó cada 2 horas hasta completar 12 horas, y un monitoreo final a las 24 horas. Se realizó un control con nauplios de *A. salina* en solución de sal marina 3%. Las larvas se consideraron muertas si no exhibían movimiento durante varios segundos de observación al estereoscopio. El principio de este bioensayo se basa en la determinación

de la concentración que causa la muerte del 50% de los nauplios de *Artemia salina*, en 24 horas bajo las condiciones descritas por este procedimiento. El cálculo de la concentración letal media (CL₅₀) se efectuó por medio del método probit usando el software STATGRAPHICS Centurion. Para clasificar los resultados de toxicidad se tuvo en cuenta tabla 3.

Tabla 3. Clasificación de toxicidad de acuerdo a la concentración letal media.

Tipo	Descripción	CL₅₀ (ppm)
I	Extremadamente Toxico	1-10
II	Altamente Toxico	10-100
III	Moderadamente Toxico	100-500
IV	Ligeramente Toxico	500-1000
V	Prácticamente No Toxico	1000-1500
VI	Relativamente Inocuo	>1500

7.4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna de los extractos vegetales

El fraccionamiento primario de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico se realizó mediante cromatografía en columna (CC), utilizando sílica gel como fase estacionaria en relación 1:20 extracto-fase estacionaria. La columna se empacó utilizando hexano como disolvente. El extracto se depositó en la parte superior de la fase estacionaria, y los disolventes utilizados como fases móviles fueron adicionados para permitir el arrastre de los componentes de la muestra.

Las fases móviles empleadas se fueron cambiando de menor a mayor polaridad de la siguiente manera: hexano, hexano-cloroformo (1:1), cloroformo, cloroformo-acetona (1:1), acetona, acetona-metanol (9:1), acetona-metanol (7:3), acetona-metanol (1:1) y finalmente metanol.

Los eluatos se recogieron en viales de 50 mL y posteriormente fueron concentrados eliminando el disolvente mediante rotaevaporación a 40°C. Las fracciones obtenidas se analizaron por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como fase estacionaria gel de sílice depositada en una placa de aluminio y como revelador sulfato cérico en ácido sulfúrico. La formación de un color amarillo-marrón determinó la presencia de azúcares en la muestra. Una vez reveladas las cromatoplas, las fracciones que presentaron el

mismo patrón fueron agrupadas (Subfracción) y almacenadas en viales de 15 mL, previamente pesados. Las fracciones que dieron prueba positiva con sulfato cérico en ácido sulfúrico fueron analizadas.

7.5. Obtención de los ácidos orgánicos mediante hidrólisis ácida

A 20 mg de cada subfracción rica en glicolípidos (A, B y D) se adicionaron 14 mL de HCl al 4M. Posteriormente, la mezcla se sometió a un proceso de calentamiento a reflujo a 95°C por 4 horas. La mezcla se lavó con 10,0 mL de agua, se extrajo la fase orgánica con éter etílico (3 x 10 mL) y se secó con Na₂SO₄. La fase orgánica representa la mezcla de ácidos orgánicos la cual fue analizada por cromatografía de gases acoplado a espectroscopia de masas.

7.5.1. Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación de los ácidos orgánicos

Para el análisis de los ácidos grasos se empleó un equipo CG-EM (SHIDMAZU - QP2010 ultra - FID). Para la cromatografía se utilizó: Columna: 5% difenil-polisiloxano, helio como gas portador con un flujo de 2 mL/min, las temperaturas del inyector y la línea de transferencia se ajustaron a 250°C y 280°C, respectivamente. Sistema de ionización de impacto electrónico a 70 eV.

La temperatura de la columna se ajustó inicialmente a 50°C manteniéndose allí por 4 minutos y luego gradualmente se incrementó hasta 200°C, a una velocidad de 20°C por minuto; se mantuvo por 2 minutos. Finalmente se incrementó la temperatura hasta 300°C a una velocidad de 10°C por minuto; manteniéndose allí por 10 minutos. Se inyectó 1µL en modo Split.

Los componentes se identificaron por comparación relativa de los tiempos de retención y espectros de masas de la biblioteca del equipo (NIST).

7.6. Obtención de los ácidos glicosídicos mediante hidrólisis alcalina

A 50 mg de cada subfracción rica en glicolípidos (A y B), se adicionaron 2,0 mL de KOH al 5%, luego, la mezcla se sometió a un calentamiento a reflujo a 95°C por 4 horas. Posteriormente, la mezcla se aciduló con HCl 4M hasta un pH de 5.0 y se extrajo con

acetato de etilo (2 x 10 mL). Después, la fase acuosa se extrajo con *n*-butanol (3 x 10 mL), se secó con Na₂SO₄ y se evaporó a vacío para proporcionar un residuo sólido.

7.6.1. Peracetilación del ácido glicosídico

El producto de la hidrólisis alcalina, se sometió a una reacción de acetilación. De esta forma, se adicionó 1,0 mL de anhídrido acético y 0,5 mL de piridina. La mezcla permaneció en agitación constante durante 43 horas. Una vez finalizado el tiempo, se adicionaron 10 mL de agua fría. Luego se realizó una extracción con acetato de etilo (3 x 10 mL) seguido de un tratamiento alcalino con una solución de bicarbonato de sodio (NaHCO₃, 1 x 20 mL). Finalmente, la fase orgánica se lavó con agua (2 x 20 mL), se secó con Na₂SO₄ anhidro y se concentró bajo presión reducida para obtener el ácido glicosídico peracetilado.

7.7. Cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) para la identificación y separación de los ácidos glicosídicos peracetilados

La identificación y la separación de los ácidos glicosídicos peracetilados mayoritarios presentes en las subfracciones (A y B), se realizó mediante el uso de la cromatografía de líquidos de alta eficiencia (Waters 2410, índice de refracción), donde se establecieron las condiciones a nivel analítico que permitiera la mejor separación de los componentes de la mezcla mediante la técnica de corte de núcleo. Las condiciones empleadas fueron las siguientes:

Fase estacionaria: Columna Symmetry Silicaoctadecilo (C₁₈) (4.6 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, 5 µm tamaño de partícula, Waters).

Fase móvil: Acetonitrilo – Agua (9:1)

Flujo: 0,4 mL/min

Detector: Índice de refracción

Volumen de inyección: 20 µL

Concentración de la muestra: 1 mg/20 µL

Sensibilidad: 1024 RIU

Elución de la muestra: Isocrática

7.8. Identificación y purificación de los constituyentes mayoritarios de cada extracto mediante CLAE

Las fracciones A, B, C y D positivas para Glicolípidos se analizaron mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) a nivel analítico para establecer los perfiles cromatográficos de cada muestra, por lo tanto, se buscaron las condiciones óptimas que lograra una mejor resolución de los constituyentes.

Para la identificación de los componentes en las fracciones, fue usada una columna Symmetry Silicaoctadecilo (C₁₈) 4,6 mm x 250 mm, 5µm, Waters, con un sistema de detección de índice de refracción y a un flujo de 0.4 mL/min. La fase móvil fue desgasificada mediante sonicado y por desplazamiento del aire con helio a una velocidad de 10 mL/min. Las muestras se disolvieron en metanol-tetrahidrofurano (9:1) y se filtraron a través de acrodiscos GHP.

7.8.1. Condiciones por CLAE para la identificación de los constituyentes mayoritarios a nivel analítico

Equipo: Waters 2410

Fase estacionaria: Columna Symmetry Silicaoctadecilo (C₁₈) (4.6 mm de diámetro interno x 250 mm de longitud, 5 µm tamaño de partícula, marca Waters).

Fase móvil: Metanol - Agua (9:1)

Flujo: 0.4 mL/min

Detector: Índice de refracción

Volumen de inyección: 20 µL

Concentración de la muestra: 0,6 mg/20 µL

Sensibilidad: 1024 RIU

Elución de la muestra: Isocrática

7.8.2. Separación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel semipreparativo

La separación de cada uno de los constituyentes de cada muestra se realizó a nivel semipreparativo mediante la técnica de corte de núcleo. Para establecer el caudal que

permitiera reproducir el cromatograma de nivel analítico a nivel semipreparativo se empleó la siguiente formula:

$$Fp = Fa \times \frac{Lp}{La} \times \frac{dp^2}{da^2}$$

Donde:

Fp = Flujo a nivel preparativo

Fa = Flujo a nivel analítico

Lp = Longitud de la columna preparativa

La = Longitud de la columna analítica

dp = Diámetro interno de la preparativa

da = Diámetro interno de la analítica.

7.8.3. Condiciones por CLAE para la purificación de los constituyentes mayoritarios a nivel semipreparativo

Equipo: Waters 2410

Fase estacionaria: Columna Symmetry Silicaoctadecilo (C₁₈) (19 mm de diámetro interno x 150 mm de longitud, 7 µm tamaño de partícula, marca Waters).

Fase móvil: Metanol - Agua (9:1)

Flujo: 4 mL/min

Detector: Índice de refracción

Volumen de inyección: 500 µL

Concentración de la muestra: 50 mg/500 µL

Sensibilidad: 1024 RIU

Elución de la muestra: Isocrática

7.8.4. Purificación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel analítico

Para la purificación de cada uno de las constituyentes que se obtuvieron por la técnica de corte de núcleo a nivel semipreparativo, se empleó la cromatografía de líquidos a nivel analítico, siguiendo las mismas condiciones mostradas en el apartado 7.8.1. Los

compuestos purificados fueron enviados para ser registrados por las técnicas de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM).

7.9. Caracterización de las estructuras químicas de los compuestos purificados por Resonancia Magnética Nuclear y Espectrometría de Masas.

Los espectros de RMN fueron registrados en piridina usando microtubos (3 mm de diámetro, volumen de muestra 115µL), en un instrumento Bruker Avance 3HD a 900 MHz y a 600 MHz. Se hizo uso de las técnicas unidimensionales de RMN ^1H y ^{13}C ; bidimensionales como COSY, TOCSY, HSQC y HMBC para la elucidación de las estructuras químicas utilizando TMS como referencia. Adicionalmente, las muestras se registraron mediante la técnica de espectrometría de masas Electrospray ESIMS.

7.10. Líneas celulares y cultivos celulares

Se implementaron diferentes líneas celulares tumorales de origen humano para la observación de actividad biológica ante la exposición del glicolípido mayoritario. Las líneas celulares implementadas fueron: HELA (carcinoma epidermal de cérvix), HCT116 (carcinoma de colon) y MCF7 (carcinoma de glándula mamaria)

Las líneas celulares de carcinoma sensibles a fármacos se obtuvieron de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México. La resistencia a fármacos fue efectuada a través de la exposición continua de Vinblastina a las células cancerígenas por un periodo de tres años. Todas las líneas celulares se colocaron en un medio RPMI 1640 suplementado con suero bovino fetal al 10%, enriquecido con glutamina (200Mm), bicarbonato de sodio al 4,4% gasificado y una suspensión de penicilina-estreptomicina (10,000 U/mL y 10 mg/mL respectivamente). Las líneas se cultivaron a 37° C, incubadas en condiciones estándar (5% CO₂ en el aire).

7.10.1. Soluciones utilizadas

Solución de PBS (phosphate-buffered saline)

Solución de SRB (sulforodamina B 0,4%)

Tris-base (pH 10) 10 mM

Solución de ácido tricloroacético al 20%

Solución de ácido acético al 1%

7.10.2. Descongelamiento de las líneas celulares

Se adicionaron 5 mL del medio de cultivo RPMI 1640 a 37°C en cajas de cultivo de 25 mL, posteriormente, se descongelaron los criotubos que contienen las líneas celulares y se calentó a 37° hasta que la suspensión fue homogénea. Luego se esterilizó el vial con alcohol a 70% y se transfirió 1 mL de la suspensión a la caja con medio. Las cajas se dejaron en incubación a 37°C con 5% de CO₂ y 100% de humedad por un periodo de 24 horas, tiempo durante el cual el medio fue cambiado. Se dejaron en incubación hasta observar confluencia.

7.10.3. Mantenimiento de las líneas celulares

Se transfirió el medio de cultivo a un frasco estéril por decantación. Seguidamente, se lavó la capa de células con PBS (2 mL x repeticiones) para remover los residuos del suero persistentes en la solución que pudieran inhibir la acción de la tripsina. Se añadió 0,3 mL de tripsina y se incubó a 37°C por 5 minutos, luego las células se desprendieron dando pequeños golpes al frasco. Finalmente, se agregó 2 mL de medio RPMI y se resuspendió aproximadamente 10 veces para deshacer los grumos de las células y realizar el conteo celular.

7.10.4. Conteo de células

Con la ayuda de la cámara de Neubauer esterilizada con alcohol 70% se adiciono una alícuota de aproximadamente 40 µL de suspensión celular. Se cuantificó los cuadros laterales con la ayuda del microscopio y un contador de células manual. Se promediaron el número de células contadas y se calculó el volumen de suspensión celular necesario para transferir 0.5×10^6 cel/mL en cajas para la resiembra y 5×10^4 cel/mL para las placas de 96 pozos.

7.11. Citotoxicidad y modulación de la resistencia a múltiples fármacos

7.11.1. Preparación de disoluciones

A partir de una solución de 4 mg/mL del control positivo (vinblastina y colchicina) y el compuesto de prueba, se prepararon las disoluciones propuestas en las tablas 4 y 5, respectivamente. La muestra de origen vegetal fue disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO) al 10%. Debido a que el DMSO ejerce una acción tóxica sobre las líneas celulares, por tal motivo se recomienda usar concentraciones no mayores al 10% por pozo.

Tabla 4. Diluciones para el control positivo

Concentración (µg/mL)	Proporción
10	10 µL de 4 mg/mL + 190 µL de agua estéril
2	40 µL de 10 µg/mL + 160 µL DMSO al 10%
0.4	40 µL de 2 µg/mL + 160 µL DMSO al 10%
0.08	40 µL de 0.4 µg/mL + 160 µL DMSO al 10%
0.016	40 µL de 0.8 µg/mL + 160 µL DMSO al 10%
0.0032	40 µL de 0.016 µg/mL + 160 µL DMSO al 10%
0.00064	40 µL de 0.0032 µg/mL + 160 µL DMSO al 10%

Tabla 5. Diluciones del compuesto

Concentración (µg/mL)	Proporción
25	25 µL de 4 mg/mL + 175 µL de agua estéril
5	40 µL de 25 mg/mL + 160 µL de agua estéril

7.11.2. Bioensayo de citotoxicidad

La citotoxicidad se determinó empleando el ensayo de sulforodamina B (SRB) desarrollado por Skehan et al. (1990) y reside en la unión del colorante sulforodamina a los aminoácidos de las proteínas celulares de una capa celular fijada en una microplaca. La cuantificación de la densidad óptica del colorante a 564 nm ayuda a estimar el total de masa proteica, la cual relaciona el número de células viables después de adicionar un compuesto citotóxico de prueba, comparada con un grupo control positivo (células en presencias de compuestos químicos como vinblastina y colchicina causales de la muerte celular) y negativo (células a las cuales no se les adicionó compuestos citotóxicos). Cuando se tuvieron las cajas con las líneas celulares con un crecimiento de 60 -70%, se realizó el conteo celular y se preparó la suspensión celular para colocar 190 µL en cada pozo de las cajas, donde previamente contenía 10 µL de las muestras a las diferentes concentraciones a evaluar por triplicado. Las cajas son incubadas a 37°C por 72 horas.

Posteriormente, se fijaron las células con 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) al 20% y se incubaron a 5°C por 30 min, luego se lavaron con agua corriente y se tiñeron con sulforodamina B (0,4%) en ácido acético (1%) durante 30 min. El exceso de tinción se eliminó lavando con ácido acético al 1% y se secó en campana de extracción. Finalmente, el colorante unido a las proteínas se solubilizo agitando con 200 µL de Tris base 10 mM a pH 10 por 5 min. La densidad óptica se leyó a una absorbancia de 564 nm en un lector de placas.

El porcentaje de crecimiento celular se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ crecimiento} = \frac{\text{Absorbancia de las células + muestra} - \text{Absorbancia de las células tiempo inicial}}{\text{Absorbancia + DMSO 10\%} - \text{Absorbancia de las células tiempo inicial}} \times 100$$

Se determinó la Cl_{50} empleando una gráfica semilogarítmica que relaciona la concentración del compuesto (µg/mL) contra el porcentaje de inhibición del crecimiento celular utilizando el programa Table Curve 2D v5.01 de Jandel Scientific.

7.11.3. Ensayo de modulación

El ensayo de modulación fue desarrollado con la misma metodología indicada en las secciones 7.11.1, empleando las líneas celulares descritas en la tabla 6.

Tabla 6. Líneas celulares implementadas en el ensayo de modulación

Línea celular	Características
MCF-7	Línea parental (sensible a vinblastina)
MCF-7/Vin+	Línea resistente que crece en presencia de 0,192 µg/mL de vinblastina
MCF-7/Vin-	Línea resistente que crece en medio libre de vinblastina

Las líneas celulares MCF-7, MCF-7/Vin+, MCF-7/Vin- fueron sembradas en placas de 96 pozos alternadas con diferentes concentraciones de Vinblastina en presencia del compuesto de prueba a 25 y 5 µg/mL por 72 horas. Para este ensayo se implementó Reserpina (5 µg/mL) como control positivo. La placa se dividió en 7 filas y 12 columnas de A-H. Las soluciones se situaron de la siguiente manera. Fila A: 10 µL DMSO al 10% + 190 µL de suspensión celular. Fila B-H: 10 µL de las diferentes concentraciones de vinblastina (10 a 0.00064 µg/mL) + 10 µL del compuesto a evaluar a 25 µg/mL (columna 1, 2, 3 filas B-H) y 5 µg/mL (columnas 4, 5, 6 filas B-H) y 5 µg/mL Reserpina (columnas 7,8,9 filas B-H). Todos los pozos contienen 180 µL de suspensión celular. Columnas 10, 11, 12 filas B-H: 190 uL de suspensión de células y 10 µL de las diferentes concentraciones de vinblastina.

Se calculó la Cl_{50} de la vinblastina y en presencia del compuesto de origen natural a dos concentraciones. Con estos datos, se determinó el factor de reversión (FR; parámetro de potencia) dividiendo la Cl_{50} de la vinblastina entre Cl_{50} de la vinblastina en presencia del compuesto de prueba. También fue calculado el FR de la reserpina.

8. Resultados y Análisis de Resultados

8.1. Fase de campo y obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos crudos se emplearon 1752.41 g de material vegetal seco y pulverizado (ver figura 26A). De la extracción con hexano se obtuvieron 11.6487 g de extracto (EH) con un rendimiento del 0.67%, la extracción con cloroformo permitió obtener 16.5462 g de pasta (EC) con un rendimiento de 0.94% y finalmente la extracción con metanol logró la obtención de 12.0941 g de pasta (EM) con un rendimiento de 0.69% (Figura 26B).



Figura 26. A) Material vegetal pulverizado y homogéneo. B) Extracto hexánico, clorofórmico y metanólico, respectivamente.

8.2. Pruebas de identificación de resinas glicosídicas.

La cromatografía en capa fina de los extractos crudos, permitió identificar manchas de color amarillo-marrón que indican la presencia de glicolípidos. En la tabla 7 se plantean los resultados de la cromatopla de los extractos crudos.

Tabla 7. Resultados obtenidos en la prueba de identificación de Glicolípidos mediante la técnica de cromatografía en capa fina de los extractos crudos.

Prueba	Extracto	Observaciones
	Hexánico	Coloración amarilla (+)
$\text{Ce}(\text{SO}_4)_2 / \text{H}_2\text{SO}_4$	Clorofórmico	Coloración amarilla (+)
	Metanólico	Coloración amarilla (+)

Las pruebas cualitativas de identificación de carbohidratos fueron positivas para los diferentes extractos crudos. De acuerdo con lo anterior, en la tabla 8 se describen los resultados y las observaciones de las reacciones de identificación de carbohidratos.

Tabla 8. Resultados de las pruebas cualitativas para la identificación de carbohidratos.

Prueba	EH	EC	EM	Observaciones
Keller-Killiani	+	+	+	Capa superior de color azul-verdosa y capa inferior color marrón.
Antrona	+	+	+	Coloración en la interface de color azul-verdoso.
Molisch	+	+	+	Coloración totalmente púrpura

8.2.1. Prueba de Keller-Killiani

La prueba de Keller-Killiani nos permitió identificar glucósidos con desoxiazúcares en los extractos. La reacción se basa en primer lugar, cuando el ácido acético glacial reacciona con el extracto vegetal utilizando un indicador de cloruro férrico en presencia de ácido sulfúrico concentrado, formando una capa superior azul-verdosa y una capa inferior color marrón (Verde , García y Rivas, 2016)

8.2.2. Prueba de Antrona

La reacción de Antrona es una prueba en general para los carbohidratos. Lo primero que ocurre es la hidrólisis de los enlaces glicosídicos por acción del ácido sulfúrico concentrado produciendo así monosacáridos que pueden ser deshidratados hasta la obtención de furfural, además de algunos otros derivados que pueden reaccionar con la Antrona produciendo un complejo de color azul-verdoso (Plummer, 1994).

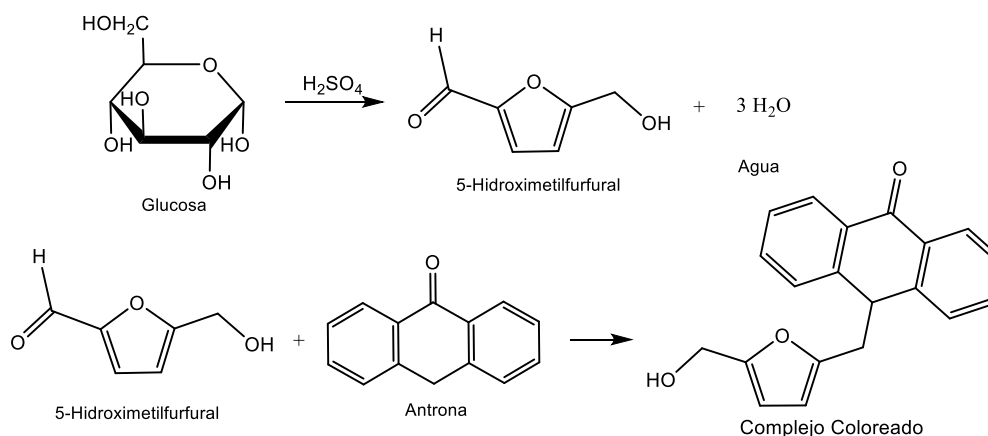


Figura 27. Reacción de Antrona.

8.2.3. Prueba de Molisch

La prueba de Molisch se fundamenta igual que la prueba de Antrona, a excepción de que el furfural reacciona con α -naftol produciendo un complejo de color púrpura.

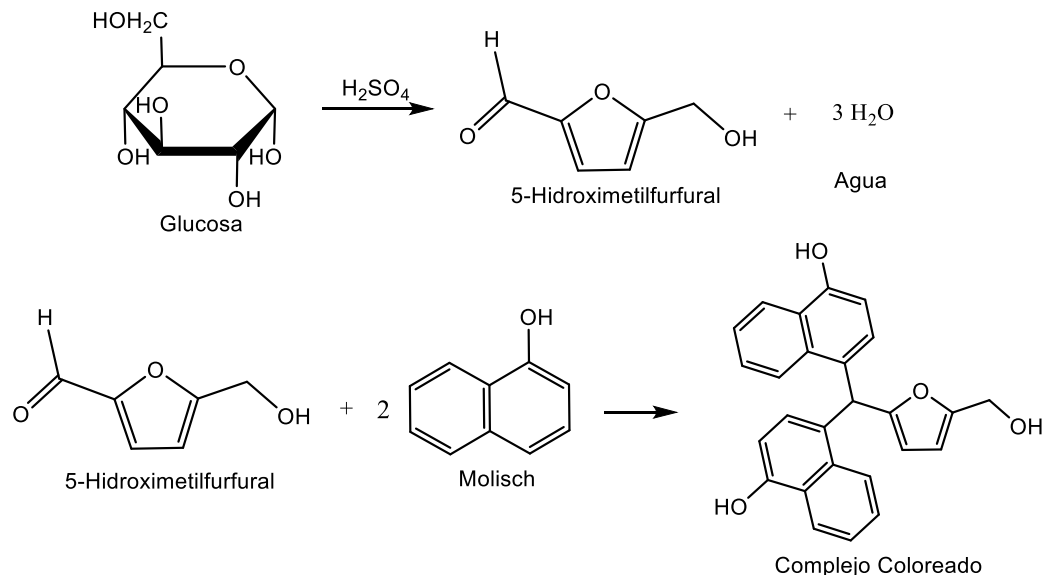


Figura 28. Reacción de Molisch

8.3. Toxicidad de los extractos: Bioensayo con *Artemia salina*

La eclosión de los huevos comenzó a ocurrir pasadas 36 horas bajo las condiciones antes descritas (Figura 29A). La viabilidad del control fue del 100%, tampoco se observaron alteraciones en el comportamiento de los nauplios (Figura 29B).

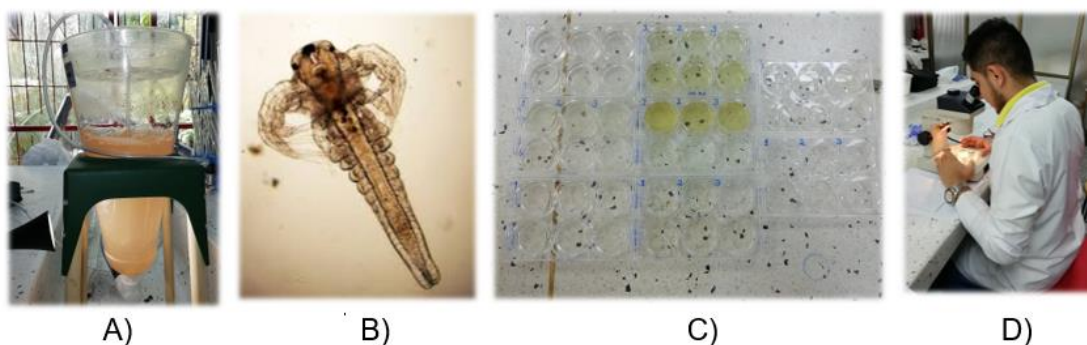


Figura 29. A) Eclosión de los huevos de *Artemia salina*. B) Nauplio de *A. salina*. C) Evaluación de la toxicidad de los extractos por triplicado. D) Monitoreo de letalidad.

El bioensayo con *Artemia salina*, se realizó a concentraciones de 200, 500 y 1000 ppm de los extractos (Figura 29C). Se observaron dificultades para la supervivencia del crustáceo, principalmente con el extracto hexánico a las 24 horas de inicio del experimento. La figura 30, muestra los resultados obtenidos del bioensayo de toxicidad.

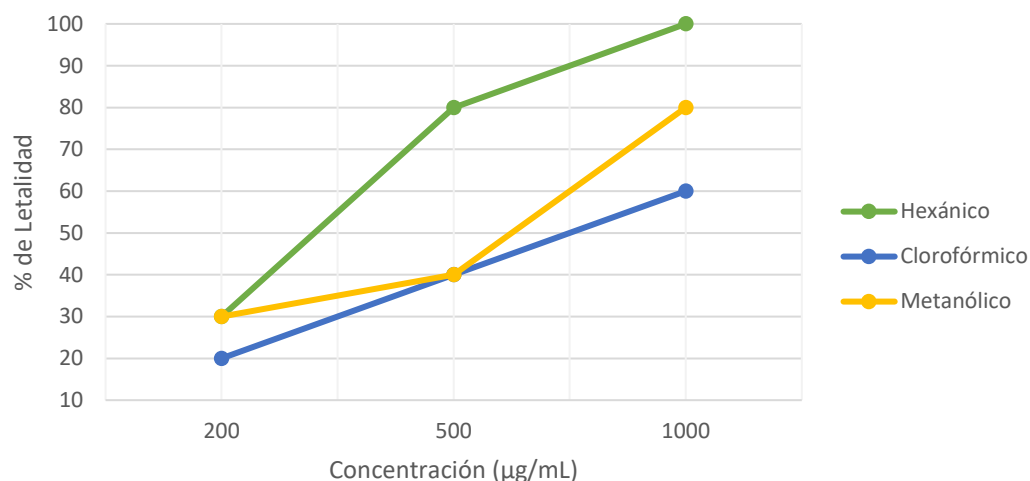


Figura 30. Porcentaje de letalidad de *A. salina* en función de la concentración de los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico (µg/mL) durante 24h de exposición.

En la gráfica anterior, se observa que los extractos hexánico y metanólico a 200 µg/mL fueron letales para el 30% de la población de nauplios expuestos; por el contrario, el extracto clorofórmico fue letal para el 20% de la población. De igual forma, los extractos clorofórmico (500 µg/mL) y metanólico (500 µg/mL) provocaron la muerte del 40% de la población, a diferencia del extracto hexánico que logró disminuir el 80% de la población. Finalmente, a 1000 µg/mL se evidencia que el extracto hexánico causó la muerte del 100% de la población, seguido del extracto metanólico con el 80% y clorofórmico con el 60% de letalidad sobre *Artemia salina*. Así pues, el extracto hexánico presentó mayor porcentaje de letalidad respecto al extracto clorofórmico y metanólico.

Una vez obtenido los porcentajes de letalidad de los extractos, se procedió a consignar los resultados en el software *STATGRAPHICS* Centurion el cual sirve para estimar los valores de la concentración letal media mediante el método probit, el cual es utilizado en diversos trabajos de investigación y tesis de grado. La bioestadística realizada por el software presentó los siguientes datos de la concentración letal media (CL₅₀):

Tabla 9. Concentración de letal media (CL₅₀) para los extractos hexánico, clorofórmico y metanólico de la especie *Ipomoea purpurea* sobre *Artemia salina*.

Especie	Extracto	CL ₅₀ (µg/mL)	Categoría de Toxicidad
<i>Ipomoea purpurea</i>	Hexánico	314.9	Moderadamente toxico (III)
	Clorofórmico	872.3	Ligeramente toxico (IV)
	Metanólico	597.15	Ligeramente toxico (IV)

Se considera que el extracto hexánico tiene un efecto moderadamente tóxico de tipo III ya que se encuentra entre el rango de 100 - 500 µg/mL, y los extractos clorofórmico y metanólico son ligeramente tóxicos de tipo IV ya que se encuentran entre los rangos de 500 - 1000 µg/mL. De esta forma, los diferentes extractos obtenidos de la planta mostraron una toxicidad moderada frente al bioensayo realizado, por lo que probablemente los metabolitos secundarios presentes en cada uno de los extractos tienen un efecto medianamente significativo sobre la supervivencia de *A. salina*.

Debido a que el valor-p de la tabla de análisis de desviaciones es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95.0%. Además, el valor-p para los residuos es mayor o igual que 0.05, indicando que el modelo no es significativamente peor que el mejor modelo posible para estos datos con un nivel de confianza del 95.0% o mayor. Los intervalos de confianza muestran la precisión que se pueden estimar para los coeficientes dada la cantidad de datos disponibles y del ruido que está presente. También, el porcentaje de desviación de porcentaje de letalidad explicado por el modelo es igual a 96.97%.

El ensayo de letalidad de *Artemia salina* se considera una herramienta útil para la determinación preliminar de toxicidad de extractos de plantas basándose en la posibilidad de ocasionar la muerte de larvas (Fernández, y otros, 2009).

Este método, en el cual se determina el valor de la concentración letal media (CL₅₀) de compuestos y extractos en medio salino, ha sido utilizado para la detección de toxinas

de hongos, y cianobacterias, toxicidad de extractos de plantas, metales pesados y para predecir citotoxicidad de compuestos puros (Lagarto, Silva, Guerra, & Iglesias, 2001).

Obtenidos los datos de toxicidad de los extractos de *I. purpurea* sobre *A. salina* se considera continuar con la realización de métodos y técnicas químicas para la separación e identificación de los metabolitos secundarios, para ampliar sus estudios biológicos, y así, evaluar sus efectos farmacológicos de estos tipos de extractos para esta especie que crece en nuestro país.

8.4. Fraccionamiento primario por cromatografía en columna de los extractos vegetales.

8.4.1. Fraccionamiento primario del extracto hexánico

Se realizó el fraccionamiento de 11.60 g de extracto hexánico implementando la técnica de cromatografía en columna abierta. La columna fue empacada con 233 g de sílica gel utilizando hexano como disolvente. La muestra se eluyó inicialmente con hexano y se fue incrementando las polaridades implementando las mezclas de disolventes, anteriormente descritas en la metodología. Se colectaron 92 fracciones de 50 mL. La tabla 10 muestra el número de fracciones, las fracciones que se combinaron y la cantidad obtenida.

Tabla 10. Número de fracciones, fracciones combinadas y sus respectivas masas del extracto hexánico.

Fracción	Subfracción	Cantidad (mg)
1 – 7	-	-
8 – 10	I	644.1
11 – 13	II	176.3
14 – 17	III	628.4
18 – 24	IV	1443.7
25 – 32	V	2693.3
33 – 36	VI	2783.3
37 – 38	VII	2524.3
39 – 40	VIII	582.9
41 – 47	IX	673.1

48 – 50	X	267.2
51 – 55	XI	240.3
56 – 60	XII	317.9
61 – 65	XIII	228.9
66 – 69	XIV	265.8
70 – 80	XV	255.5
81 – 92	XVI	219.6

Las fracciones fueron concentradas mediante rotaevaporación a 40°C y analizadas mediante la técnica de cromatografía en capa fina, reveladas con sulfato cérico con el fin de establecer el patrón que permitiera la unión de las fracciones con igual coeficiente de retención. Se obtuvieron 16 (XVI) fracciones combinadas, de las cuales la subfracciones VIII, IX, X y XII revelaron de manera positiva para glicolípidos (Figura 31).

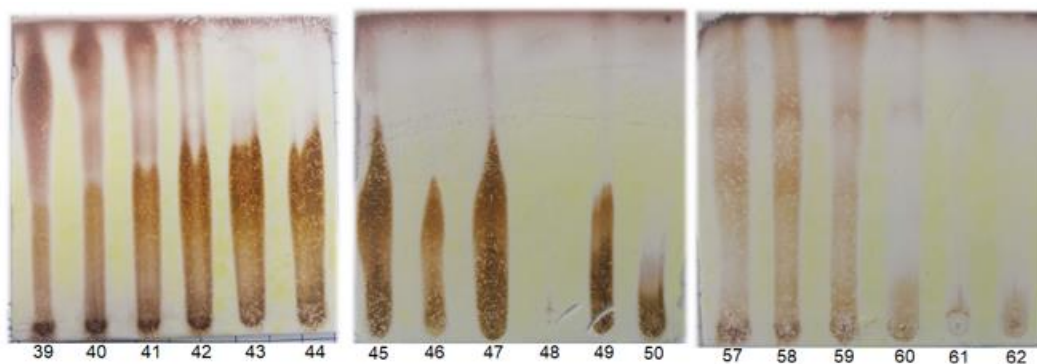


Figura 31. Cromatoplasmas de las fracciones positivas para azúcares del extracto hexánico.

8.4.2. Fraccionamiento primario del extracto clorofórmico

Se realizó el fraccionamiento de 16.53 g de extracto clorofórmico implementando la técnica de cromatografía en columna abierta. La columna fue empacada con 331 g de sílica gel utilizando hexano como disolvente. La muestra se eluyó inicialmente con hexano y se fue incrementando las polaridades implementando las mezclas de disolventes, descritas previamente en la metodología. Se colectaron 134 fracciones de 50 mL. La tabla 11 muestra el número de fracciones, las fracciones que se combinaron y la cantidad obtenida.

Tabla 11. Número de fracciones, fracciones combinadas y sus respectivas masas del extracto clorofórmico.

Fracción	Subfracción	Cantidad (mg)
1 – 25	-	-
26 – 33	I	635.3
34 – 35	II	133.1
36 – 37	III	261.1
38 – 43	IV	321.7
44 – 48	V	947.9
49 – 55	VI	1321.9
56 – 59	VII	4987.3
60 - 65	VIII	636.3
66 – 69	IX	713.9
70	X	258.1
71	XI	229.6
72	XII	170.7
73 – 74	XIII	159.5
75 – 80	XIV	243.5
81 – 86	XV	160.3
87 – 89	XVI	296.1
90 – 94	XVII	290.9
95 – 96	XVIII	68.7
97 – 100	XIX	249.6
101	XX	143.3
102 – 105	XXI	221.9
106 – 111	XXII	66.9
112 - 113	XXIII	18.1
114 – 116	XXIV	32
117 – 129	XXV	945.1
130 – 134	XXVI	53.9

Las fracciones fueron concentradas mediante rotaevaporación a 40°C y analizadas por cromatografía en capa fina y reveladas con sulfato cérico con el fin de establecer los patrones de comportamiento y de esta forma agruparlas en un menor número de

fracciones. Se obtuvieron 26 (XXVI) fracciones combinadas, de las cuales la subfracciones X, XII, XIV, XVI, XVII y XX revelaron de manera positiva indicando la posible presencia de glicolípidos (Figura 32).

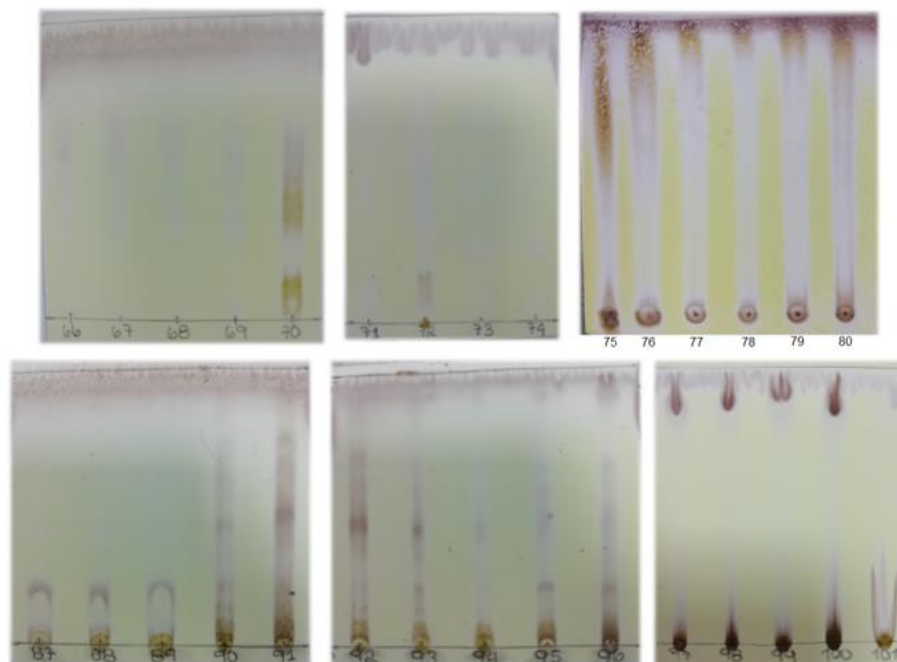


Figura 32. Cromatoplasmas de las fracciones positivas para azúcares del extracto clorofórmico.

8.4.3. Fraccionamiento primario del extracto metanólico

Se realizó el fraccionamiento de 12.01 g de extracto metanólico implementando la técnica de cromatografía en columna abierta. La columna fue empacada con 240 g de sílica gel utilizando hexano como disolvente. La muestra se eluyó inicialmente con hexano y luego con mezclas de disolventes para garantizar el aumento en la polaridad de la fase móvil y por consiguiente la elución de los componentes de la muestra. Se colectaron 125 fracciones de 50 mL. La tabla 12 muestra el número de fracciones, las fracciones que se combinaron y la cantidad obtenida.

Tabla 12. Número de fracciones, fracciones combinadas y sus respectivas masas del extracto metanólico.

Fracción	Subfracción	Cantidad (mg)
1 – 13	-	-
13 – 24	I	128.5
25 – 34	II	214.5
35 – 36	III	39.1
37 – 38	IV	58.4
39 - 41	V	47.2
42	VI	18.9
43 – 47	VII	1514.4
48 – 52	VIII	409.3
53 – 58	IX	419.9
59 – 62	X	128.1
63 – 65	XI	62.1
66 – 70	XII	97.7
71 – 74	XIII	66.1
75 – 76	XIV	24.4
77 – 78	XV	9.1
79 - 86	XVI	1428.3
87 – 88	XVII	97.7
89 – 94	XVIII	68.7
95 – 104	XIX	301.4
106 – 110	XX	112.9
111 – 112	XXI	224.5
113 – 115	XXII	89.3
116	XXIII	156.8
117	XXIV	136.4
118 - 120	XXV	75.8
121 - 125	XXVI	219

Las fracciones fueron concentradas mediante rotaevaporación a 40°C y analizadas mediante cromatografía en capa fina, reveladas con sulfato cérico con el fin de agruparlas en un menor número de fracciones. Se obtuvieron 26 (XXVI) fracciones combinadas, de

las cuales la subfracciones VIII, IX y XVI revelaron de manera positiva indicando la posible presencia de glicolípidos (Figura 33).

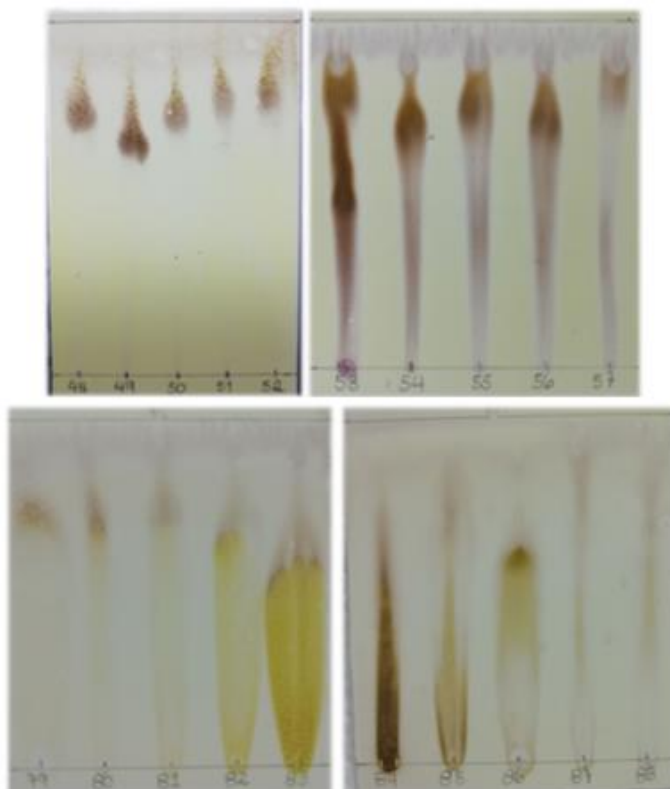


Figura 33. Cromatoplasmas de las fracciones positivas para azúcares del extracto clorofórmico.

8.4.4. Fracciones seleccionadas para análisis

Una vez finalizada la cromatografía en columna de los extractos vegetales de la especie vegetal *Ipomoea purpurea*, se seleccionaron las subfracciones mayoritarias de cada extracto para los posteriores análisis de la siguiente manera:

Del extracto hexánico subfracción IX con 673.1 mg denominado subfracción A.

Del extracto clorofórmico subfracción X con 258.1 mg denominado subfracción B.

Del extracto metanólico subfracción IX y XVI con 419.1 y 1428.3 mg denominadas subfracción C y D, respectivamente.

8.5. Obtención de los ácidos orgánicos mediante hidrólisis ácida

La fase orgánica derivada del proceso de hidrólisis contiene gran cantidad de hidrocarburos pertenecientes a los metabolitos secundarios sintetizados por la planta. Los ácidos orgánicos obtenidos de la hidrólisis ácida corresponden a los ésteres que se encuentran acilando los núcleos de los Glicolipidos presentes en esta especie. El análisis para la identificación de los ácidos grasos mediante la técnica de CG-MS se realizó con base en los tipos de compuestos registrados en los cromatogramas. También, se efectuó una comparación de los ácidos grasos reportados en otras especies de *Ipomoea* por otros autores de la literatura científica. Los cromatogramas que se presentan a continuación representan los compuestos obtenidos en función de su abundancia registrada por el detector de masas y los valores de tiempos de retención (t_R).

8.5.1. Cromatograma de gases de la subfracción A (H-IX)

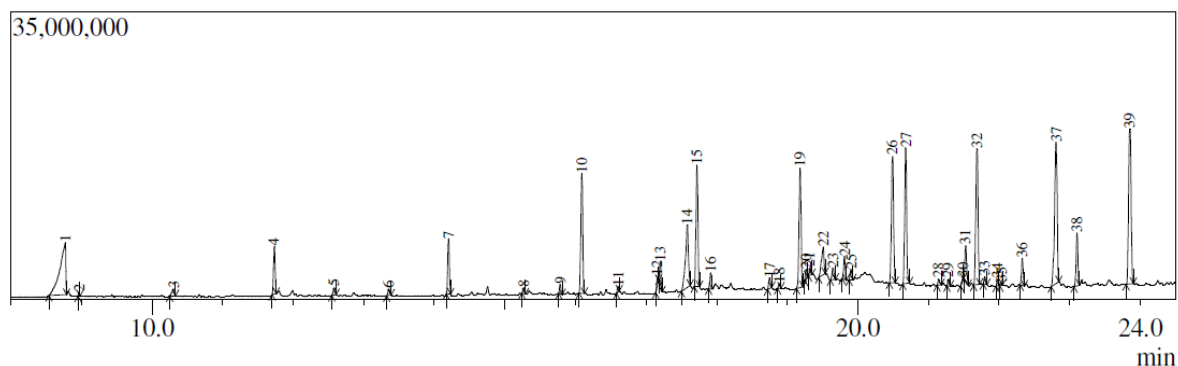


Figura 34. Perfil cromatográfico de la subfracción A. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El análisis por cromatografía gases de la fase orgánica de la subfracción A, reveló la presencia de 39 compuestos, que corresponden a algunos alcanos, cetonas, aldehídos, alcoholes, ésteres y ácidos grasos. Estas sustancias se muestran en la tabla No. 13 y se enlistan según su orden de elución en la columna.

Tabla 13. Compuestos volátiles presentes en la subfracción A.

Pico	t_R (min)	Nombre	% Área
1	8.769	Octanoic acid	8.6
2	8.965	Benzaldehyde, 2,5-dimethyl-	0.12

3	10.304	n-Decanoic acid	0.43
4	11.733	2,3-di-tert-Butyl-1,4-benzoquinone	2.22
5	12.581	1,5-Dimethyl-1-vinyl-4-hexenyl butyrate	0.41
6	13.354	Hexadecane	0.33
7	14.201	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	2.64
8	15.265	Heptadecane	0.25
9	15.781	Hexadecane	0.38
10	16.089	Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-	6.50
11	16.602	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis (2-methylpropyl) ester	0.22
12	17.162	Heneicosane	0.31
13	17.198	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8-dione	0.74
14	17.583	n-Hexadecanoic acid	5.19
15	17.720	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	6.63
16	17.914	Eicosane	0.69
17	18.748	1-Hexadecanol	0.52
18	18.886	Heptacosane	0.20
19	19.181	Cyclooctasiloxane, hexadecamethyl-	6.89
20	19.264	Heneicosane	0.38
21	19.322	Oxirane, [(dodecyloxy)methyl]-	0.33
22	19.508	Octadecanoic acid	1.99
23	19.646	Heneicosane	0.62
24	19.809	Docosane	0.99
25	19.901	Acetic acid n-octadecyl ester	0.49
26	20.490	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	7.61
27	20.677	1-Docosene	7.43
28	21.146	Triacontane	0.27
29	21.284	Kresoxim-methyl	0.29
30	21.486	Heneicosane	0.12
31	21.527	Tetracosane	1.71
32	21.687	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	8.65
33	21.798	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl-	0.33
34	21.980	Decanoic acid, 2-propenyl ester	0.25
35	22.030	Hexacosane	0.12
36	22.328	Hexadecane	1.24
37	22.805	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	10.14

38	23.104	Heneicosane	2.60
39	23.853	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	11.18

A partir de lo anterior, se logró identificar los ácidos grasos presentes en la fase orgánica de la fracción A, como: ácido octanoico o caprílico ($t_R = 8.769$), ácido decanoico o cáprico ($t_R = 10.304$), ácido *n*-hexadecanoico o palmítico ($t_R = 17.583$) y ácido octadecanoico o esteárico ($t_R = 19.508$).

8.5.2. Cromatograma de gases de la subfracción B (C-X)

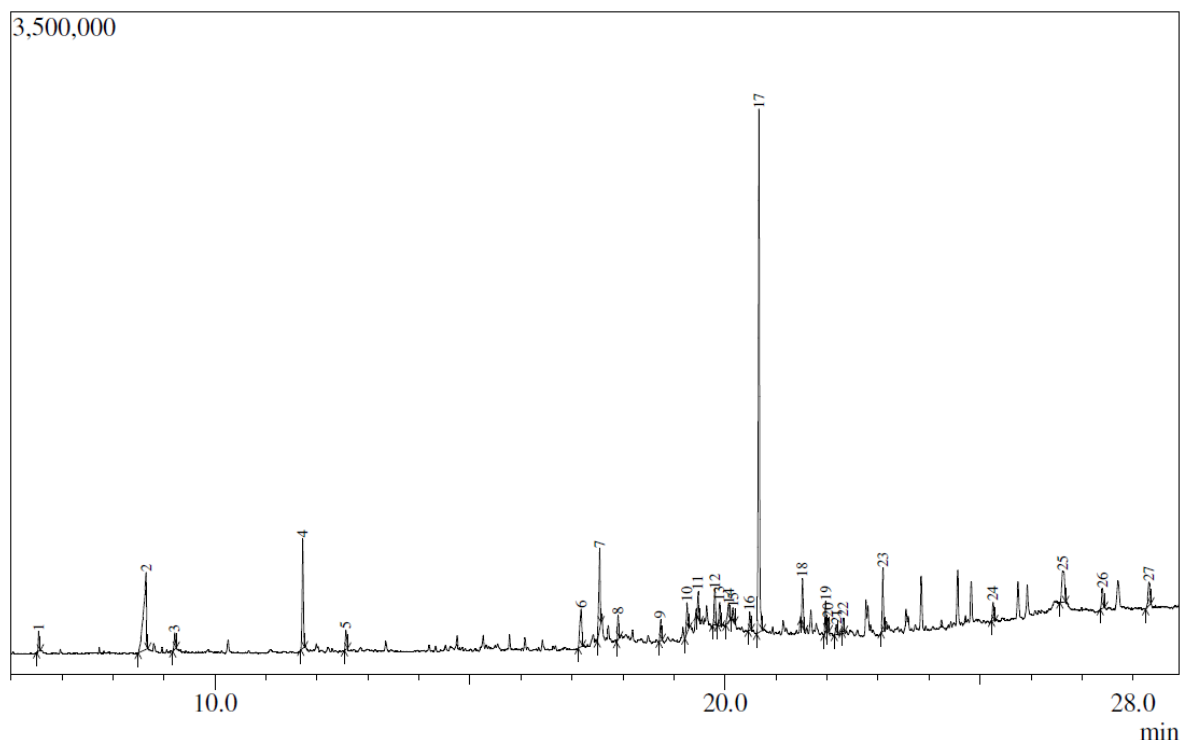


Figura 35. Perfil cromatográfico de la subfracción B. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El análisis por cromatografía gases de la fase orgánica de la subfracción B, reveló la presencia de 27 compuestos, que corresponden a algunos alcanos, cetonas, aldehídos, alcoholes, ésteres y ácidos grasos. Estas sustancias se muestran en la tabla No. 14 y se enlistan según su orden de elución en la columna.

Tabla 14. Compuestos volátiles presentes en la subfracción B.

Pico	t_R (min)	Nombre	% Área
1	6.544	3-Hexanol, 5-methyl-	1.05
2	8.648	Octanoic acid	11.65
3	9.214	Propanedioic acid, phenyl-	1.14
4	11.722	2,5-di-tert-Butyl-1,4-benzoquinone	7.13
5	12.569	1,3,7-Octatriene, 3,7-dimethyl-	1.42
6	17.179	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8dione	3.58
7	17.544	n-Hexadecanoic acid	5.82
8	17.906	Heptacosane	1.32
9	18.739	1-Hexadecanol	1.32
10	19.255	Tetratetracontane	2.31
11	19.474	Octadecanoic acid	1.46
12	19.802	Heptacosane	2.32
13	19.894	Acetic acid n-octadecyl ester	1.55
14	20.072	Silane, trimethyl (pentyloxy)-	1.81
15	20.156	Silane, triethyl (1-methylethoxy)-	1.06
16	20.486	Cyclononasilozane, octadecamethyl-	1.14
17	20.667	n-Tridecan-1-ol	33.37
18	21.522	Heptacosane	2.97
19	21.972	Heneicosanoic acid, methyl ester	1.67
20	22.023	Oxirane, [(dodecyloxy)methyl]-	0.65
21	22.180	1,3-Dipalmitin trimethylsilyl ether	0.73
22	22.322	Heneicosane	0.85
23	23.098	Tetracosane	4.11
24	25.256	Octacosane	1.19
25	26.619	Hexacosane	4.36
26	27.400	Tetratetracontane	1.69
27	28.312	Hexacosane	2.31

A partir de lo anterior, se logró identificar los ácidos grasos presentes en la fase orgánica de la fracción B, como: ácido octanoico o caprílico ($t_R = 8.648$), ácido n-hexadecanoico o palmítico ($t_R = 17.544$) y ácido octadecanoico o esteárico ($t_R = 19.474$).

8.5.3. Cromatograma de gases de la subfracción D (M-XVI)

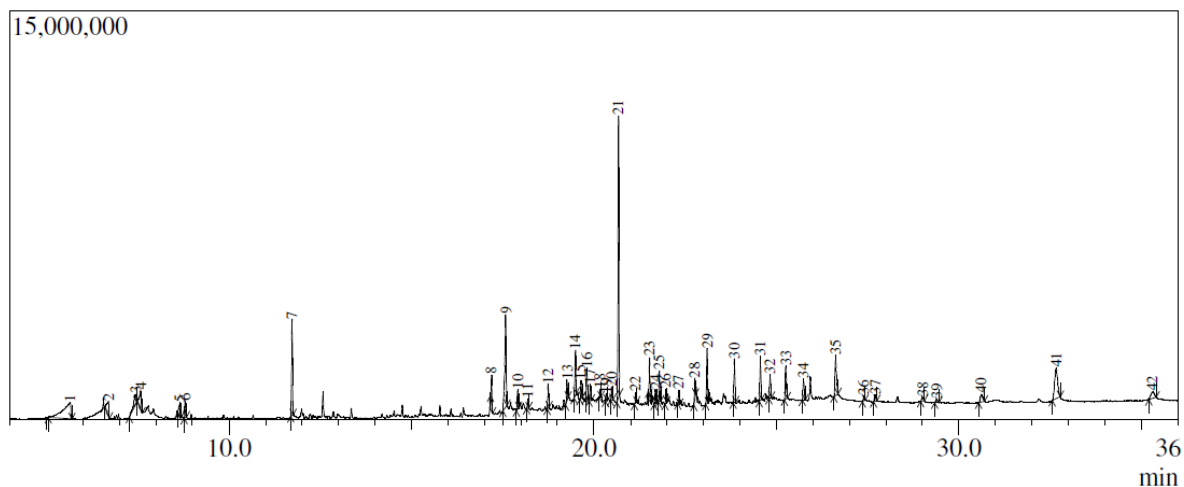


Figura 36. Perfil cromatográfico de la subfracción D. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El análisis por cromatografía gases de la fase orgánica de la subfracción D, reveló la presencia de 42 compuestos, que corresponden a algunos alcanos, cetonas, aldehídos, alcoholes, ésteres y ácidos grasos. Estas sustancias se muestran en la tabla No. 15 y se enlistan según su orden de elución en la columna.

Tabla 15. Compuestos volátiles presentes en la subfracción D.

Pico	t_R (min)	Nombre	%Área
1	5.641	Butanoic acid, 2-methyl	8.34
2	6.698	Tiglic acid	1.83
3	7.442	Butanedioic acid	1.71
4	7.588	Propanoic acid	2.27
5	8.647	Octanoic acid	1.00
6	8.797	Phenol, 3-chloro-	0.89
7	11.728	2,5-Cyclohexadiene-1,4-dione, 2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-	5.95
8	17.192	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8dione	1.20
9	17.582	n-Hexadecanoic acid	8.63
10	17.910	Eicosane	1.07
11	18.192	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-diene-2,8dione	0.56
12	18.743	1-Hexadecanol	1.44
13	19.260	Hexacosane	1.45

14	19.494	Octadecanoic acid	2.92
15	19.642	Heneicosane	1.10
16	19.805	Heptacosane	1.74
17	19.896	1-Acetoxynonadecane	0.97
18	20.171	Hexadecanoic acid, 2-hydroxyethyl ester	0.37
19	20.335	Octanamide, N,N-dimethyl	0.37
20	40.448	Cyclononasilozane, octadecamethyl-	0.85
21	20.673	n-Tridecan-1-ol	16.61
22	21.142	Heneicosane	0.66
23	21.522	Tetracosane	2.43
24	21.683	Cyclononasilozane, octadecamethyl-	1.05
25	21.791	Phenol, 2,2'-methylenebis[6-(1,1-dimethylethyl)-4-methyl]	1.89
26	21.974	Oxyrane, [(dodecyloxy)methyl]-	0.75
27	22.323	Tetracosane	0.79
28	22.763	Di-n-octyl phthalate	1.11
29	23.098	Tetracosane	3.35
30	23.846	Hentriacontane	2.91
31	24.562	Octacosane	2.80
32	24.827	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	1.64
33	25.255	Tetracosane	2.34
34	25.742	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	1.61
35	26.618	Tetratetracontane	4.20
36	27.399	Pentacosane	0.45
37	27.706	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	0.66
38	28.999	Cyclononasiloxane, octadecamethyl-	0.44
39	29.388	Hexadecane	0.41
40	30.616	Cyclononasilozane, octadecamethyl-	1.35
41	32.666	Pentacyclomethyl	6.33
42	35.296	Cyclononasilozane, octadecamethyl-	1.57

A partir de lo anterior, se logró identificar los ácidos grasos presentes en la fase orgánica de la fracción D, como: ácido tíglico ($t_R = 6.698$), ácido butanodioico o succínico ($t_R = 7.442$), ácido propanoico o propiónico ($t_R = 7.588$), ácido octanoico o caprílico ($t_R =$

8.647), ácido *n*-hexadecanoico o palmítico ($t_R = 17.582$) y ácido octadecanoico o esteárico ($t_R = 19.494$).

A continuación, se mencionan los ácidos orgánicos constitutivos de las resinas glicosídicas de la especie *Ipomoea purpurea* comparando los espectros de masas experimentales con los teóricos, así como un breve análisis de los ácidos orgánicos reportados en la literatura científica.

8.5.4. Ácido tíglico

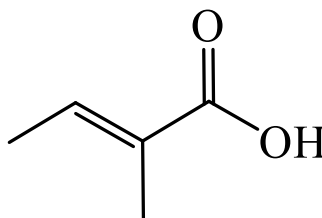


Figura 37. Representación estructural del ácido tíglico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

El cromatograma de la subfracción D (Figura 36), muestra el pico 2 con un porcentaje de área de 1.83% y un tiempo de retención 6.698 minutos. La identificación preliminar de este compuesto se realizó por medio de comparaciones con la base de datos NIST11 permitiendo observar los picos fragmento correspondiente a las ionizaciones y fragmentaciones de la molécula. A continuación, se muestra el espectro de masas experimental del ácido tíglico.

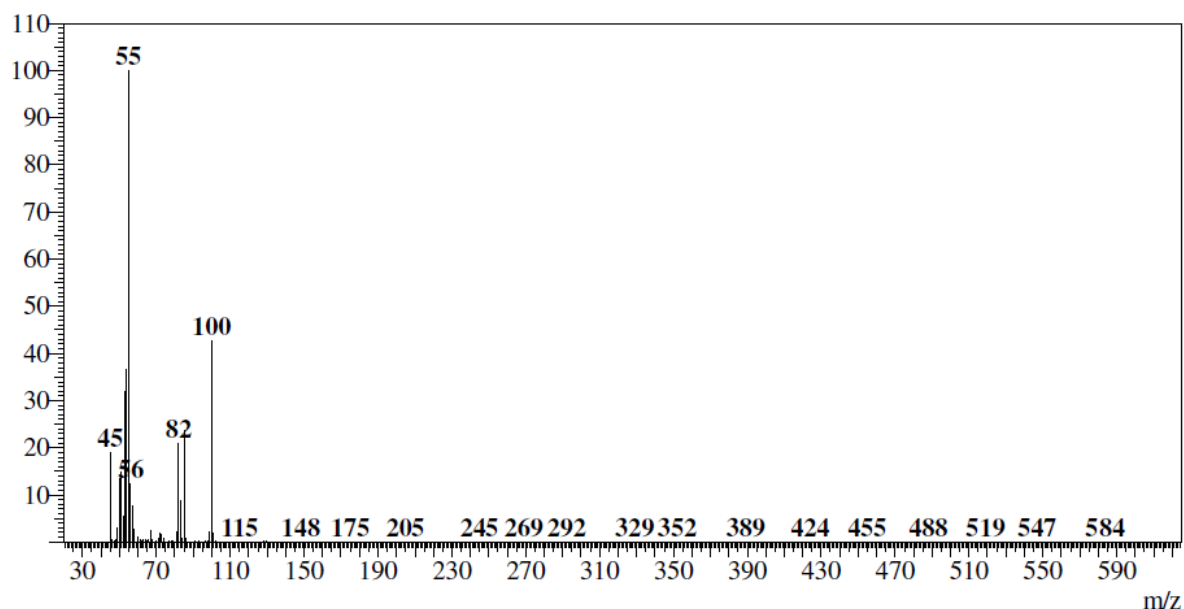


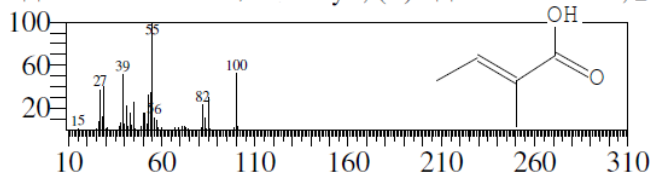
Figura 38. Espectro de masas experimental para el ácido tíglico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas experimental del ácido tíglico se observa el pico del ion molecular con un valor m/z de 100 uma, así como otras señales de 82, 56, 55 (pico de base), y 45 uma. Por consiguiente, se procede a comparar con el espectro de masas experimental de la base de datos NIST11.

Hit#:1 Entry:1771 Library:NIST11s.lib

SI:97 Formula:C₅H₈O₂ CAS:80-59-1 MolWeight:100 RetIndex:860

CompName:Tiglic acid \$\$ 2-Butenoic acid, 2-methyl-, (E)- \$\$ Crotonic acid, 2-methyl-, (E)- \$\$ (E)-2-



Hit#:2 Entry:1768 Library:NIST11s.lib

SI:92 Formula:C₅H₈O₂ CAS:80-59-1 MolWeight:100 RetIndex:860

CompName:Tiglic acid \$\$ 2-Butenoic acid, 2-methyl-, (E)- \$\$ Crotonic acid, 2-methyl-, (E)- \$\$ (E)-2-

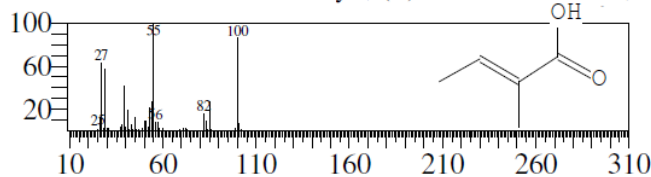


Figura 39. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido tíglico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas teórico del ácido tíglico se puede observar el pico del ion molecular con un valor m/z de 100 uma, correspondiente a la fórmula molecular $C_5H_8O_2$. De igual forma, se observa un pico fragmento de 55 uma ($C_4H_7^+$) como el pico de base en el espectro, indicando la formación del ion (*Z*)-2-butenilo por el proceso de fragmentación de la molécula. También, se logra observar la coincidencia de algunos picos correspondiente a la fragmentación de la molécula con valores de m/z 100, 82, 56 y 55 uma, como se describe a continuación.

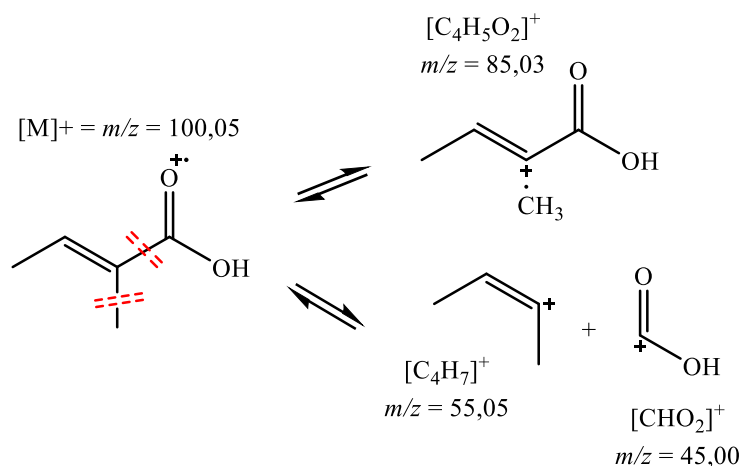


Figura 40. Fragmentación de la molécula del ácido tíglico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

8.5.5. Ácido butanodioico

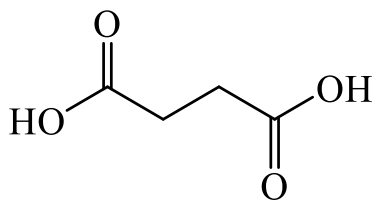


Figura 41. Representación estructural del ácido butanodioico o succínico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

El cromatograma de gases de la subfracción D (Figura 36), muestra el pico 3 con un porcentaje de área de 1.71% y tiempo de retención 7.442 minutos. La identificación preliminar de este compuesto se realizó por medio de comparaciones con la base de datos NIST11 permitiendo observar los picos fragmentos correspondientes a la ionización y

rupturas de la molécula. A continuación, se muestra el espectro de masas experimental del ácido butanodioico o succínico.

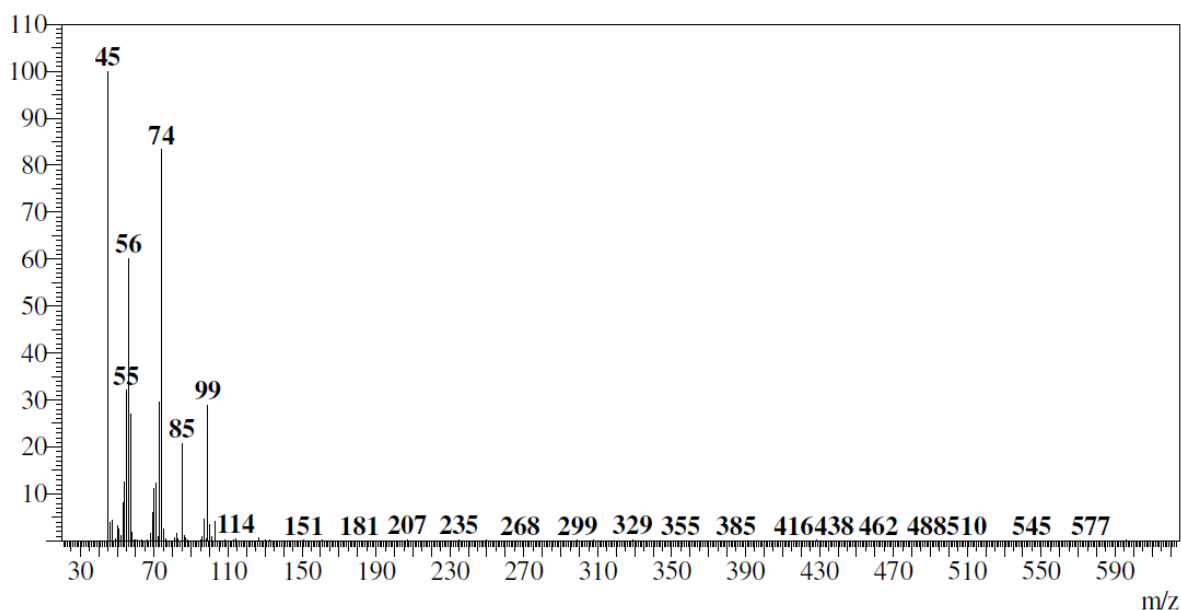
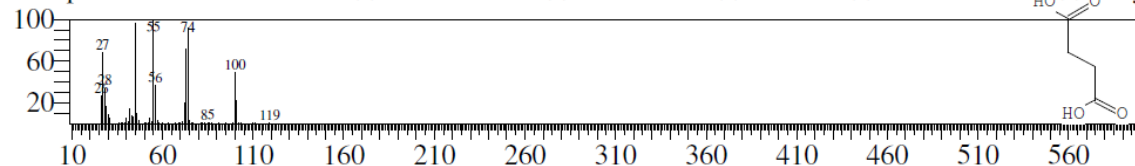


Figura 42. Espectro de masas experimental para el ácido butanodioico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas experimental del ácido butanodioico se logra observar el pico del ion molecular con un valor m/z de 99 uma, así como otras señales de 85, 74, 56, 55 y 45 (pico de base) uma. De esta forma, se procede a comparar con el espectro de masas experimental de la base de datos NIST11.

Hit#:1 Entry:3799 Library:NIST11s.lib
 SI:80 Formula:C₄H₆O₄ CAS:110-15-6 MolWeight:118 RetIndex:1132
 CompName:Butanedioic acid \$\$ Succinic acid \$\$ Amber acid \$\$ Asuccin \$\$ Bernsteinsaurer \$\$ Dihy



Hit#:4 Entry:3801 Library:NIST11s.lib
 SI:78 Formula:C₄H₆O₄ CAS:110-15-6 MolWeight:118 RetIndex:1132
 CompName:Butanedioic acid \$\$ Succinic acid \$\$ Amber acid \$\$ Asuccin \$\$ Bernsteinsaurer \$\$ Dihy

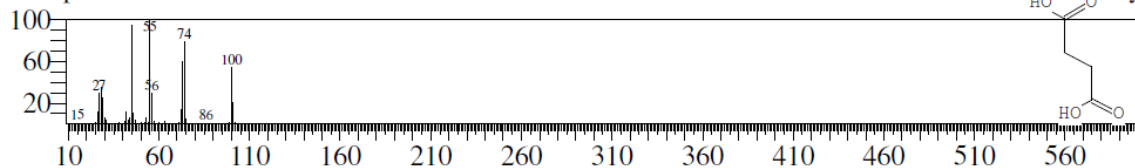


Figura 43. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido butanodioico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas teórico del ácido butanodioico o succínico se logra observar el pico del ion molecular con un valor de m/z de 99 uma, que probablemente corresponde a un fragmento más estable de fórmula molecular $C_4H_5O_3^+$. También, se observa un pico fragmento de 45 uma (CHO_2^+) correspondiente al pico de base del espectro, indicando la formación del ion hidroxio(oxo) metilo por el proceso de descarboxilación de la molécula.

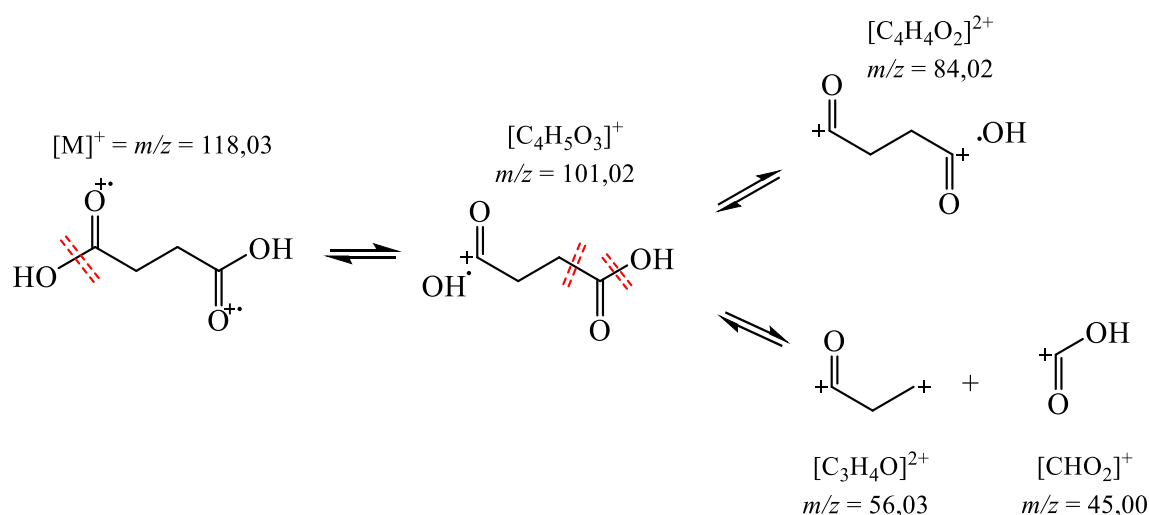


Figura 44. Fragmentación de la molécula del ácido butanodioico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

8.5.6. Ácido propanoico

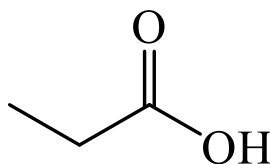


Figura 45. Representación estructural del ácido propanoico o propiónico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

En el cromatograma de la subfracción D se muestra el pico 4 con un porcentaje de área de 2.27% y tiempo de retención 7.588 minutos. La identificación preliminar de este compuesto se realizó por medio de comparaciones con la base de datos NIST11 permitiendo observar el pico del ión molecular y los picos fragmento. A continuación, se muestra el espectro de masas experimental del ácido propanoico o propiónico.

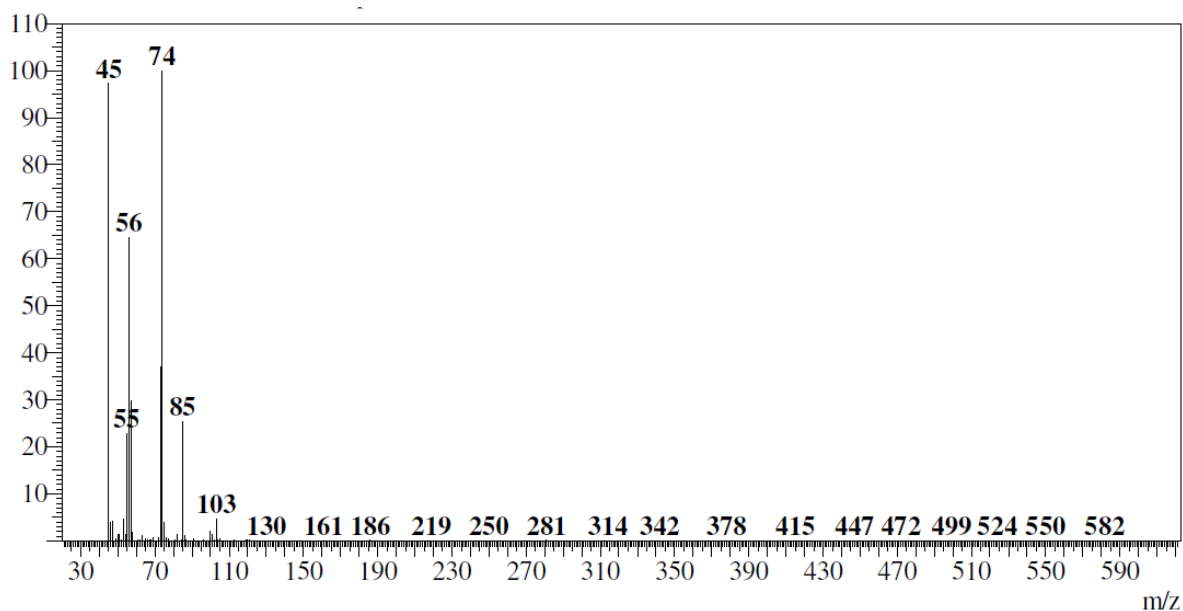


Figura 46. Espectro de masas experimental para el ácido propanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas experimental del ácido propanoico se logra observar el pico del ion molecular con un valor m/z de 74 uma, así como otras señales de 56, 55 y 45 uma. De esta forma, se procede a comparar con el espectro de masas experimental de la base de datos NIST11.

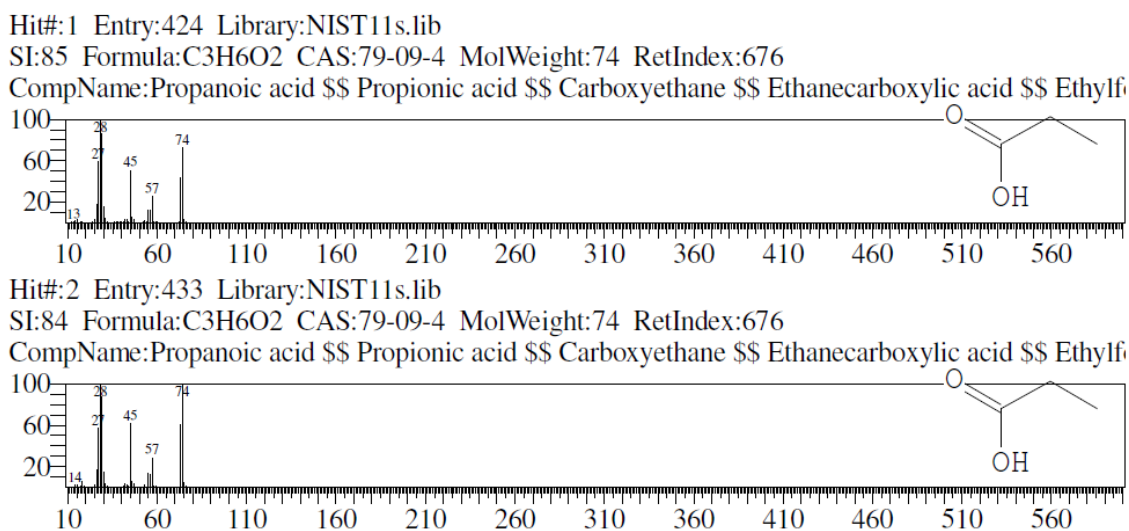


Figura 47. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido propanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas teórico del ácido propanoico o propiónico se logra observar el pico del ion molecular con un valor de m/z de 74 uma que corresponde a la masa total del compuesto cuya fórmula molecular es $C_3H_6O_2$. También, se observa un pico fragmento de 28 uma ($C_2H_5^+$) correspondiente al pico de base del espectro, indicando la formación del ion etilo por el proceso de descarboxilación de la molécula producto del bombardeo electrónico del espectrómetro de masas.

8.5.7. Ácido Octanoico

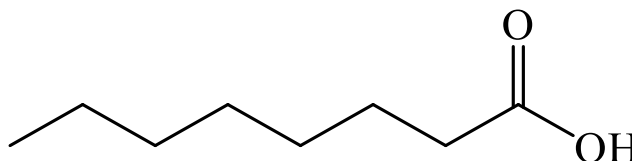


Figura 48. Representación estructural del ácido octanoico o caprílico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

En los cromatogramas de las muestras A, B y D, se observa los picos 1, 2 y 5 con porcentajes de área de 8.6%, 11.65% y 1% y con tiempos de retención 8.769, 8.648 y 8,647 minutos, respectivamente. La identificación preliminar de este compuesto se realizó por medio de comparaciones con la base de datos NIST11 permitiendo observar el pico del ión molecular y los picos correspondientes a las fragmentaciones en cadena de la molécula. A continuación, se muestra el espectro de masas experimental del ácido octanoico.

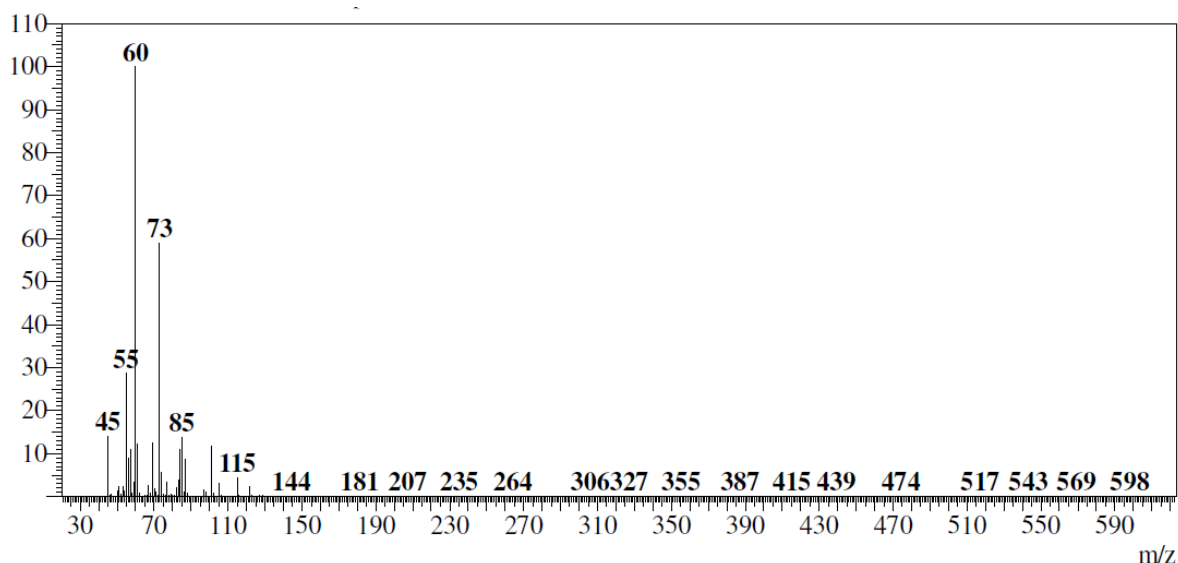


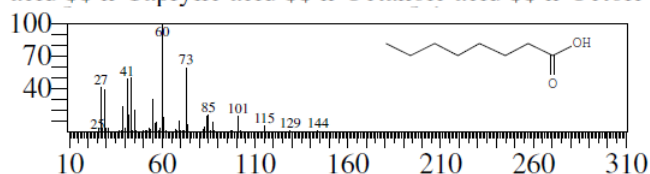
Figura 49. Espectro de masas experimental para el ácido octanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El espectro de masas experimental proporcionó información suficiente correspondiente al pico del ion molecular con un valor m/z 144 uma y señales de m/z correspondientes a 115, 85, 73, 60 (pico de base), 55 y 45 uma. Por consiguiente, se procedió a comparar con el espectro de masas de la base de datos NIST11.

Hit#:1 Entry:7929 Library:NIST11s.lib

SI:96 Formula:C₈H₁₆O₂ CAS:124-07-2 MolWeight:144 RetIndex:1173

CompName:Octanoic acid \$\$ n-Caprylic acid \$\$ n-Octanoic acid \$\$ n-Octoic acid \$\$ n-Octylic acid



Hit#:2 Entry:7930 Library:NIST11s.lib

SI:92 Formula:C₈H₁₆O₂ CAS:124-07-2 MolWeight:144 RetIndex:1173

CompName:Octanoic acid \$\$ n-Caprylic acid \$\$ n-Octanoic acid \$\$ n-Octoic acid \$\$ n-Octylic acid

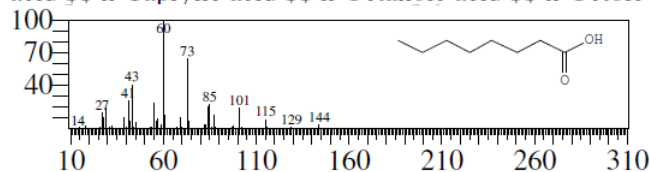


Figura 50. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido octanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El espectro de masas teórico para el ácido octanoico indicó el pico del ion molecular [M^+] con un valor m/z de 144 uma, correspondiente a la formula molecular C₈H₁₆O₂. De igual forma, se observó un pico fragmento de 60 uma (C₂H₃O₂⁺) como el pico de base en el espectro, indicando la formación del ion carboximetilo por el proceso de fragmentación de la molécula. También, se observaron otros picos de m/z 144, 129, 115, 101, 85, 73, 60, 43, 41, 27, 25 y 14.

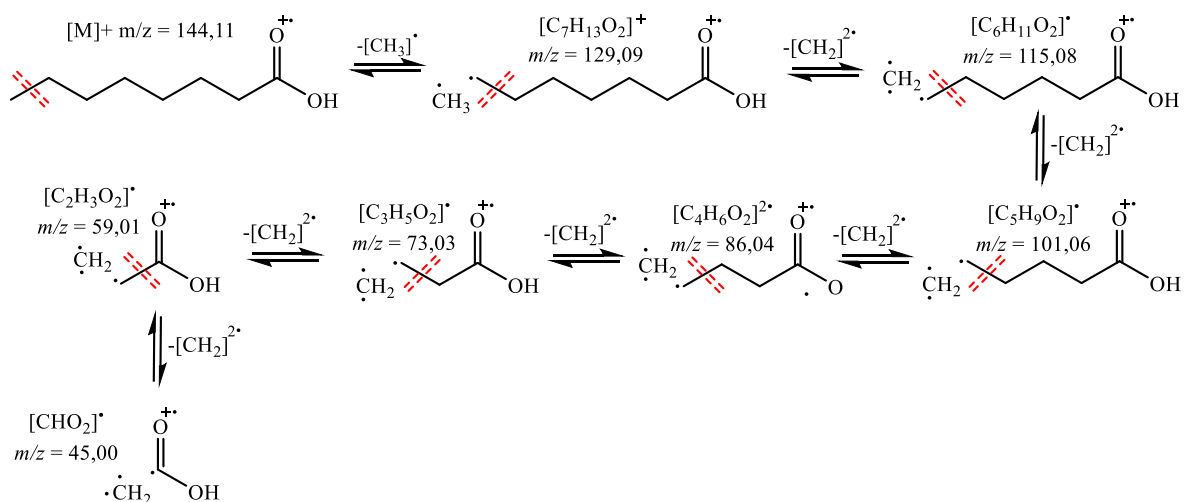


Figura 51. Fragmentación de la molécula del ácido octanoico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

Las fragmentaciones que se muestran en figura 51 de la molécula de ácido octanoico, explican los diferentes picos que aparecen en el espectro de masas de la molécula, como una herramienta de confirmación estructural. En este caso se tienen diferentes señales en los espectros de masas que indican rupturas moleculares en función de su estabilidad- abundancia y masa molecular.

8.5.8. Ácido decanoico

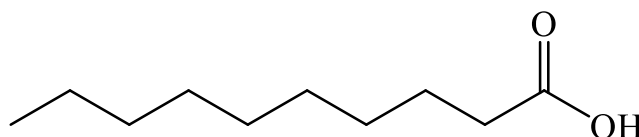


Figura 52. Representación estructural del ácido decanoico o capríco. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

En el perfil cromatográfico de la subfracción A, se observa el pico 3 con porcentajes de área de 0.43% con un tiempo de retención 10.304 minutos. La identificación preliminar de este compuesto se realizó por medio de comparaciones con la base de datos NIST11 permitiendo observar el pico del ión molecular y los picos fragmento. A continuación, se muestra el espectro de masas experimental del ácido decanoico.

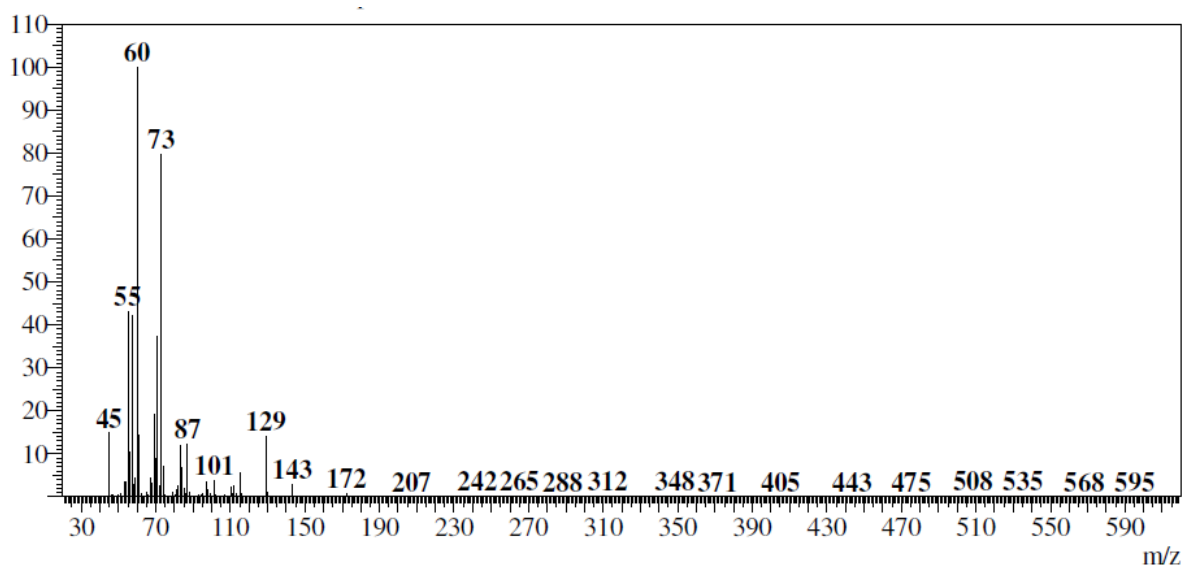
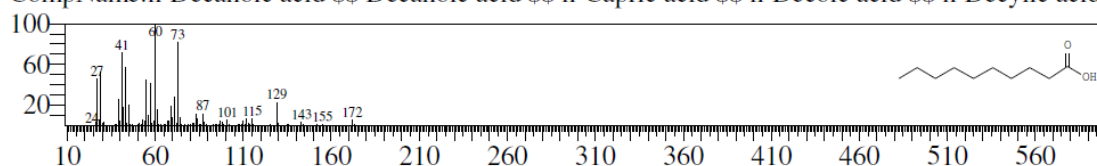


Figura 53. Espectro de masas experimental para el ácido decanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas experimental del ácido decanoico se logró observar el pico del ion molecular con un valor m/z de 172 uma, así como otras señales de 143, 129, 101, 87, 73, 60 (pico de base) 55 y 45 uma. De esta forma, se procede a comparar con el espectro de masas experimental de la base de datos NIST11.

Hit#:1 Entry:13089 Library:NIST11s.lib
 SI:96 Formula:C₁₀H₂₀O₂ CAS:334-48-5 MolWeight:172 RetIndex:1372
 CompName:n-Decanoic acid \$\$ Decanoic acid \$\$ n-Capric acid \$\$ n-Decoic acid \$\$ n-Decylic acid



Hit#:2 Entry:13088 Library:NIST11s.lib
 SI:95 Formula:C₁₀H₂₀O₂ CAS:334-48-5 MolWeight:172 RetIndex:1372
 CompName:n-Decanoic acid \$\$ Decanoic acid \$\$ n-Capric acid \$\$ n-Decoic acid \$\$ n-Decylic acid

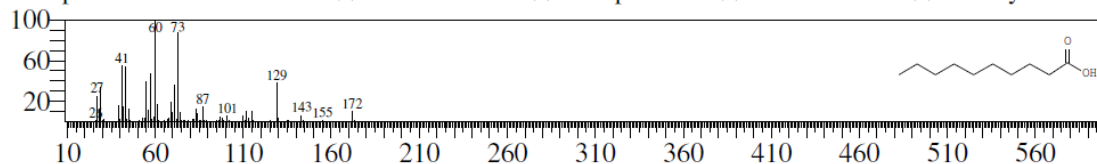


Figura 54. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido decanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El espectro de masas teórico para el ácido decanoico confirmó el pico del ion molecular $[M^+]$ con un valor m/z de 172 uma, correspondiente a la formula molecular

$C_{10}H_{20}O_2^+$. De igual forma, se observó un ion fragmento de 60 uma ($C_2H_3O_2^+$) como el pico base en el espectro, indicando la formación del ion carboximetilo por el proceso de fragmentación de la molécula.

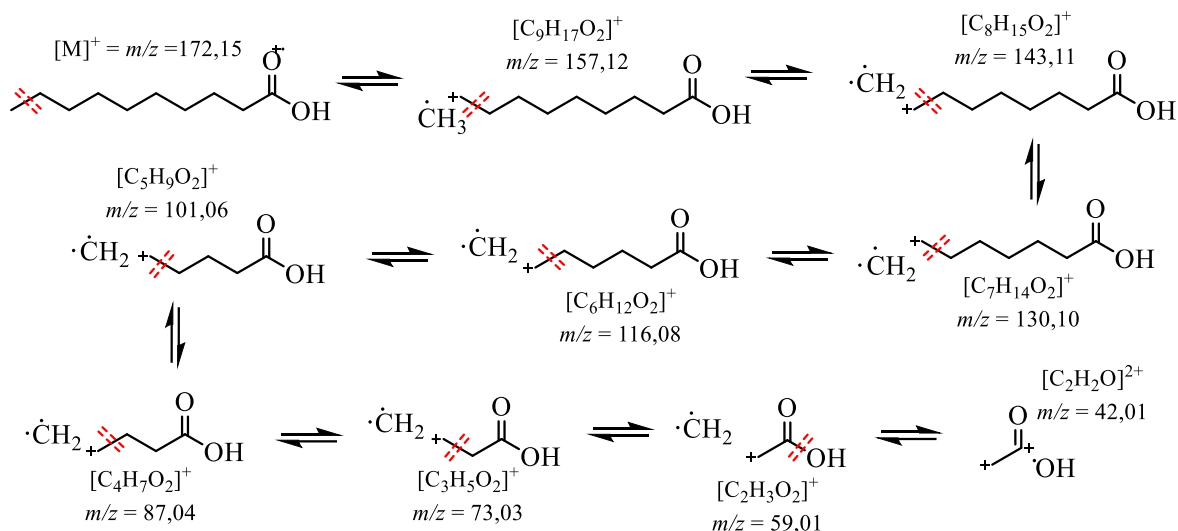


Figura 55. Fragmentación de la molécula del ácido octanoico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

Las fragmentaciones que se muestran en figura 55 de la molécula de ácido octanoico, explican los diferentes picos que aparecen en el espectro de masas de la molécula, como una herramienta de confirmación estructural. En este caso se tienen diferentes señales en los espectros de masas que indican rupturas moleculares en función de su estabilidad- abundancia y masa molecular.

8.5.9. Ácido hexadecanoico

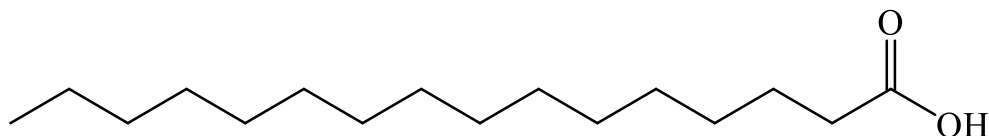


Figura 56. Representación estructural del ácido hexadecanoico o palmítico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

En los perfiles cromatográficos de las muestras A, B y D, se observan los picos 14, 7 y 9 con porcentajes de área de 5.19%, 5.82% y 8.63% con tiempos de retención 17.583, 17.544 y 17.582 minutos, respectivamente. La identificación preliminar de este compuesto se realizó por medio de comparaciones con la base de datos NIST11

permitiendo observar el pico del ion molecular y los picos fragmento. A continuación, se muestra el espectro de masas experimental del ácido octanoico.

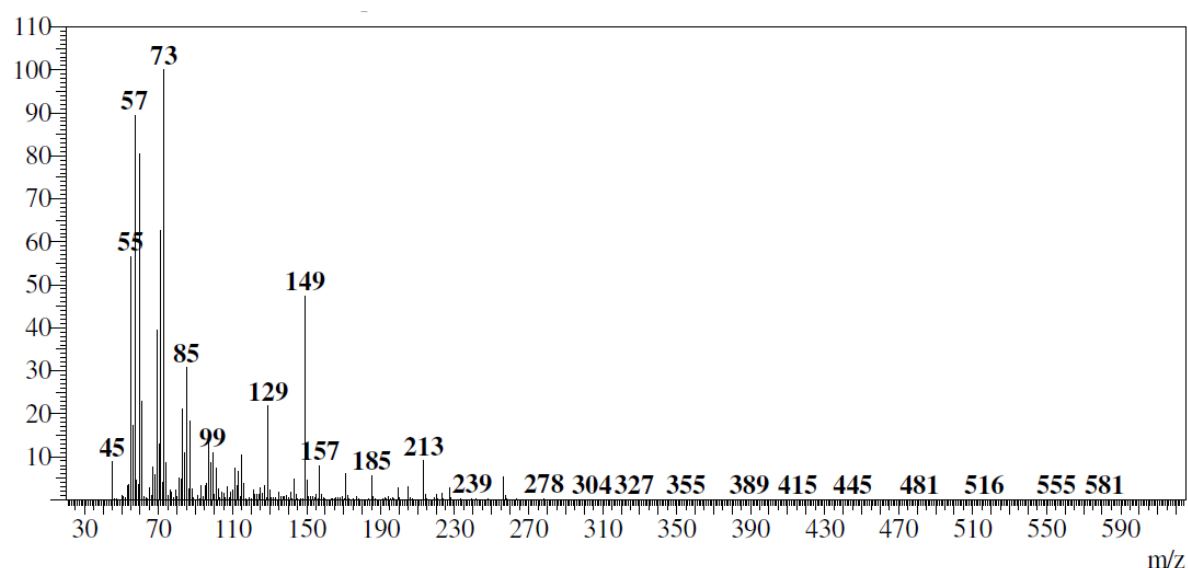


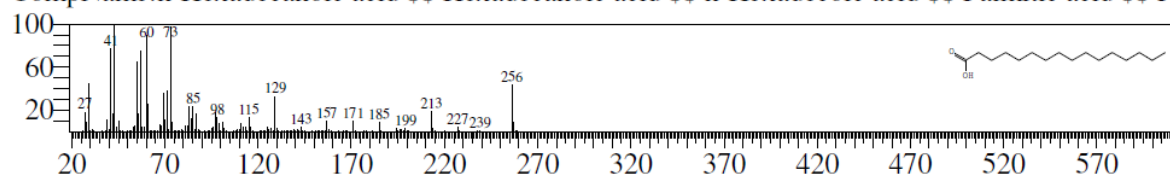
Figura 57. Espectro de masas experimental para el ácido hexadecanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas experimental del ácido decanoico se logró observar el pico del ion molecular con un valor m/z de 256 uma, así como otras señales de 239, 213, 185, 157, 149, 129, 115, 99, 85, 73 (pico de base), 57, 55 y 45 uma. De esta forma, se procede a comparar con el espectro de masas experimental de la base de datos NIST11.

Hit#:1 Entry:23305 Library:NIST11s.lib

SI:90 Formula:C₁₆H₃₂O₂ CAS:57-10-3 MolWeight:256 RetIndex:1968

CompName:n-Hexadecanoic acid \$\$ Hexadecanoic acid \$\$ n-Hexadecoic acid \$\$ Palmitic acid \$\$ P



Hit#:2 Entry:23313 Library:NIST11s.lib

SI:89 Formula:C₁₆H₃₂O₂ CAS:57-10-3 MolWeight:256 RetIndex:1968

CompName:n-Hexadecanoic acid \$\$ Hexadecanoic acid \$\$ n-Hexadecoic acid \$\$ Palmitic acid \$\$ P

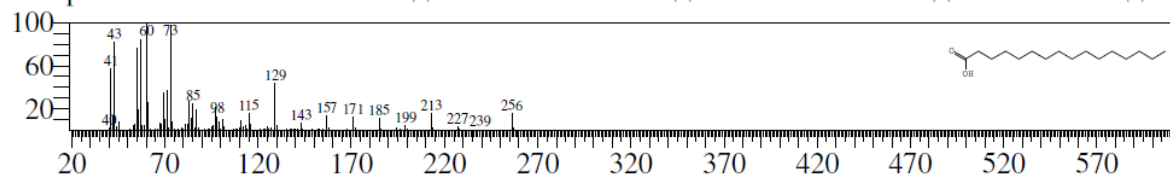


Figura 58. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido hexadecanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El espectro de masas teórico para el ácido hexadecanoico confirmó el pico del ion molecular [M^+] con un valor m/z de 256 uma, correspondiente a la formula molecular C₁₆H₃₂O₂. De igual forma, se observó un pico fragmento de 73 uma (C₃H₅O₂⁺) como el pico base en el espectro, indicando la formación del ion 2-carboxietano-1-ilio por el proceso de fragmentación de la molécula. También, se observa la coincidencia de algunos picos correspondiente a la fragmentación de la molécula con valores de m/z 256, 239, 213, 185, 157, 129, 115, 99, 85, y 73 uma, lo que permite la identificación de este compuesto.

8.5.10. Ácido octadecanoico

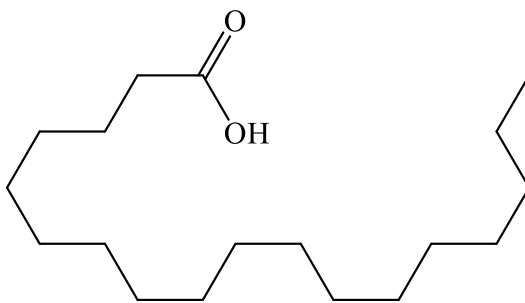


Figura 59. Representación estructural del ácido octadecanoico o esteárico. Edición realizada en: ChemDraw Professional 16.0 (Perkin Elmer Software).

En los perfiles cromatográficos de las muestras A, B y D, se observaron los picos 22, 11 y 14 con porcentajes de área de 1.99%, 1.46% y 2.92% y con tiempos de retención de 19.508, 19.474 y 17.494 minutos, respectivamente. La identificación preliminar de este compuesto se realizó por medio de comparaciones con la base de datos NIST11 permitiendo observar el pico del ión molecular y los picos fragmento. A continuación, se muestra el espectro de masas experimental del ácido octadecanoico.

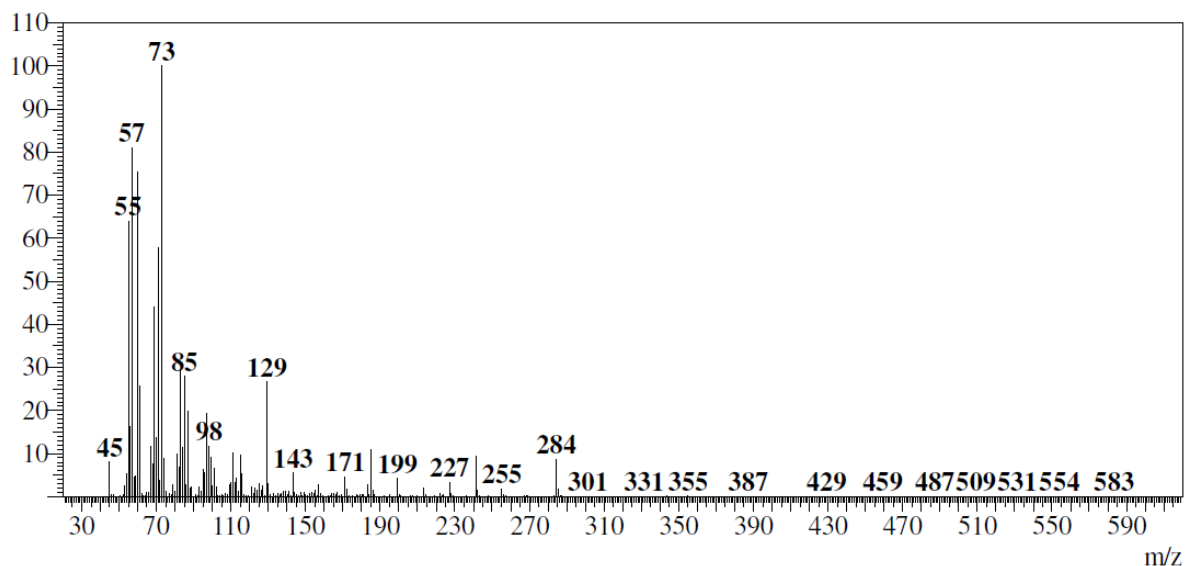


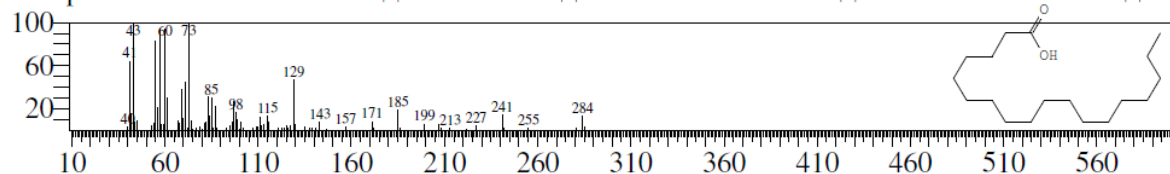
Figura 60. Espectro de masas experimental para el ácido octadecanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

En el espectro de masas experimental del ácido octadecanoico se logró observar el pico del ion molecular con un valor m/z de 284 uma, así como otras señales de 255, 241, 227, 213, 199, 185, 171, 143, 129, 115, 98, 85, 73 (pico de base), 57, 55 y 45 uma. De esta forma, se procedió a comparar con el espectro de masas experimental de la base de datos NIST11.

Hit#:1 Entry:25165 Library:NIST11s.lib

SI:93 Formula:C₁₈H₃₆O₂ CAS:57-11-4 MolWeight:284 RetIndex:2167

CompName:Octadecanoic acid \$\$ Stearic acid \$\$ n-Octadecanoic acid \$\$ Humko Industrer R \$\$ H



Hit#:2 Entry:25163 Library:NIST11s.lib

SI:93 Formula:C₁₈H₃₆O₂ CAS:57-11-4 MolWeight:284 RetIndex:2167

CompName:Octadecanoic acid \$\$ Stearic acid \$\$ n-Octadecanoic acid \$\$ Humko Industrer R \$\$ H

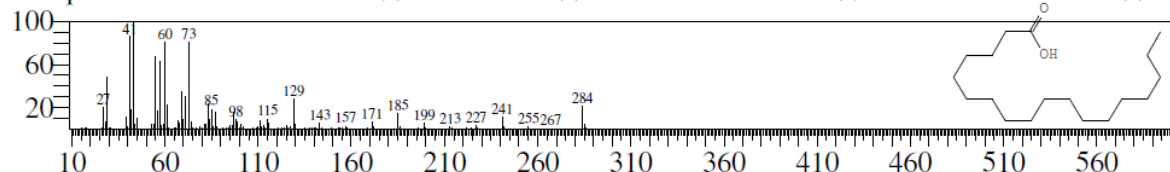


Figura 61. Espectro de masas teórico de la base de datos NIST11 para el ácido octadecanoico. Fuente: Laboratorio de análisis instrumental, programa de Química, Universidad del Quindío 2019.

El espectro de masas teórico para el ácido octadecanoico confirmó el pico del ion molecular [M^+] con un valor m/z de 284 uma, correspondiente a la fórmula molecular C₁₈H₃₆O₂. De igual forma, se observó un pico fragmento de 73 uma (C₃H₅O₂⁺) como el pico base en el espectro, indicando la formación del ion 2-carboxietano-1-ilio por el proceso de fragmentación de la molécula. También, se observó la coincidencia de algunos picos correspondiente a la fragmentación de la molécula con valores de m/z 284, 255, 241, 227, 199, 185, 171, 143, 129, 115, 98, 85, 73, 57 y 55 uma, lo que permitió la identificación de este compuesto.

Cabe mencionar, que la presencia de los ácidos orgánicos descritos anteriormente para la especie vegetal *Ipomoea purpurea* son presuntivos, lo que nos ayudará como una fuente de verificación estructural. A continuación, se mencionan algunos ácidos orgánicos que se han identificado en algunas plantas de este género.

Los autores Osorio, Charry, Rios-Vásquez, y Castañeda-Gómez (2018) identificaron los ácidos orgánicos constitutivos de las resinas glicosídicas de tres especies de *Ipomoea*. El ácido decanoico y hexadecanoico fue identificado en las especies *I. trifida*, *I. hederifolia* e *I. purpurea* con tiempos de retención de $t_R = 10.18$ y $t_R = 13.68$ minutos respectivamente. También, fue identificado el ácido octanoico en las especies *I. trifida* e *I. purpurea* ($t_R = 8.68$ min.). De igual forma, reportaron la presencia del ácido tíglico en

la especie *I. purpurea* ($t_R = 6.19$ min.). Finalmente, registraron la presencia del ácido fenilacético ($t_R = 10.04$ min.), ácido tetradecanoico ($t_R = 13.04$ min) y el ácido octadecanoico ($t_R = 15.11$ min.) para la especie *I. hederifolia*.

Las resinas glicosídicas de la especie vegetal *Ipomoea purga* fueron aisladas y caracterizadas por los autores (Castañeda-Gómez y Pereda-Miranda, 2011) e identificaron los siguientes ácidos del extracto clorofórmico para esta especie: ácido 2-metil butanoico ($t_R = 10.18$ min.), ácido *n*-hexanoico ($t_R = 6.5$ min.), ácido *n*-decanoico ($t_R = 7.4$), ácido cinámico ($t_R = 7.7$ min.) y ácido dodecanoico $t_R = (8.01$ min.).

De igual forma, los glicolípidos presentes en las semillas de *Ipomoea alba* fueron analizadas por (Cruz-Morales, y otros, 2012) identificando la presencia de los ácidos orgánicos del extracto clorofórmico. Los autores registraron los siguientes ácidos: ácido acético ($t_R = 2.81$ min.), ácido 3-hidroxi-2-metil butírico ($t_R = 7.95$ min.) y el ácido tíglico ($t_R = 6.95$ min.).

8.6. Obtención de los ácidos glicosídicos peracetilados

La mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados fueron analizados por Cromatografía de líquidos de alta resolución en fase reversa. Las condiciones empleadas permitieron la resolución de dos picos mayoritarios con tiempos de retención de 12.19 y 19.28 min. Estos resultados indican que hay dos tipos de núcleos que constituyen a los glicolípidos de la especie *Ipomoea purpurea*. De acuerdo con lo reportado en la literatura científica, el pico con t_R de 12.19 min correspondería al ácido operculinico A y el de 19.28 min al ácido operculinico E (Figura 62).

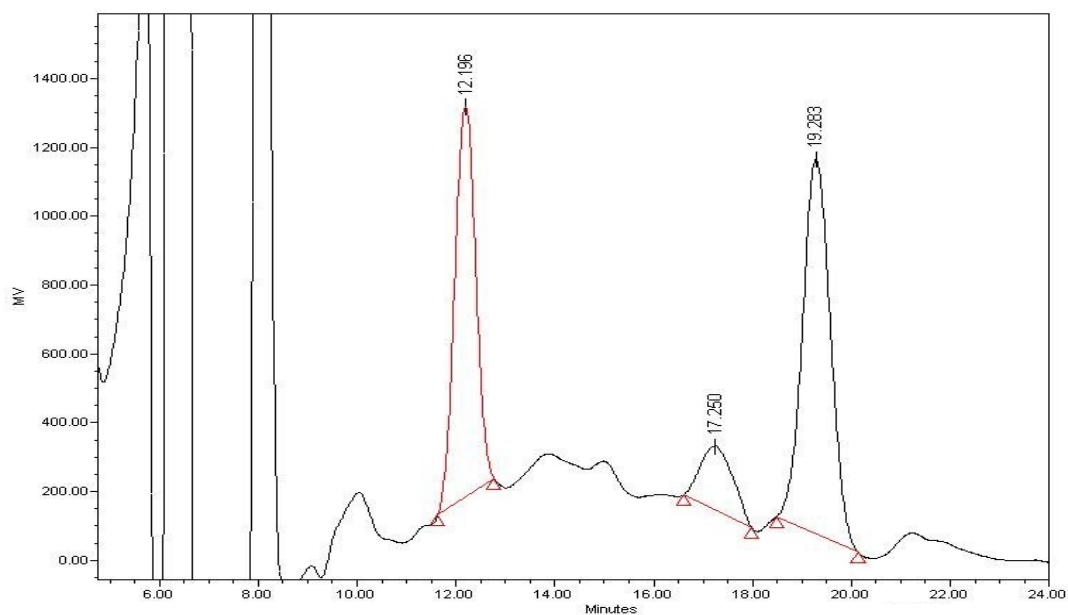


Figura 62. Perfil cromatográfico de los ácidos glicosídicos peracetilados.

8.7. Identificación y purificación de los constituyentes mayoritarios de cada extracto mediante CLAE

Los glicolípidos presentan estructuras tan complejas debido a su naturaleza anfipática que para su aislamiento y purificación se requiere de técnicas de cromatografía de líquidos en fase reversa a nivel preparativo. Las especies pertenecientes a la familia Convolvulaceae producen glicolípidos muy parecidos estructuralmente, con núcleos oligosacáridos semejantes, lo que dificulta su purificación por métodos convencionales de cromatografía de columna o Cromatografía en capa fina preparativa. Actualmente, existen varios métodos sobre el aislamiento de los glicolípidos; estudios han demostrado una mayor eficacia mediante la técnica de Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (CLAE) para la purificación exitosa de estos constituyentes ya que ofrece resultados a corto plazo con una resolución máxima a través de disponibilidad de pequeños tamaños de partículas, tamaños de poros y fases estacionarias (Pereda-Miranda, Rosas-Ramírez y Castañeda-Gómez, 2010). Teniendo en cuenta lo anterior, el análisis de las muestras A, B, C y D obtenidas del fraccionamiento primario, se realizó mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de índice de refracción (CLAE-IR).

8.7.1. Perfiles cromatográficos para la identificación de los constituyentes mayoritarios a nivel analítico

A las muestras A, B, C y D, se les realizó un análisis por CLAE para obtener los perfiles cromatográficos teniendo en cuenta las condiciones del apartado 7.8.1. Los resultados fueron los siguientes:

8.7.1.1. Perfil Cromatográfico de la muestra A

La muestra A perteneciente a la fracción mayoritaria del extracto hexánico, mostró gran cantidad de constituyentes pertenecientes a glicolípidos que hacen parte de la muestra. En la figura 63, se observa alrededor de 13 constituyentes con diferentes tiempos de retención, de las cuales 8 son compuestos mayoritarios que presentan una intensidad igual o mayor de 1000.0 mV, así como 5 compuestos minoritarios menor de 1000.0 mV.

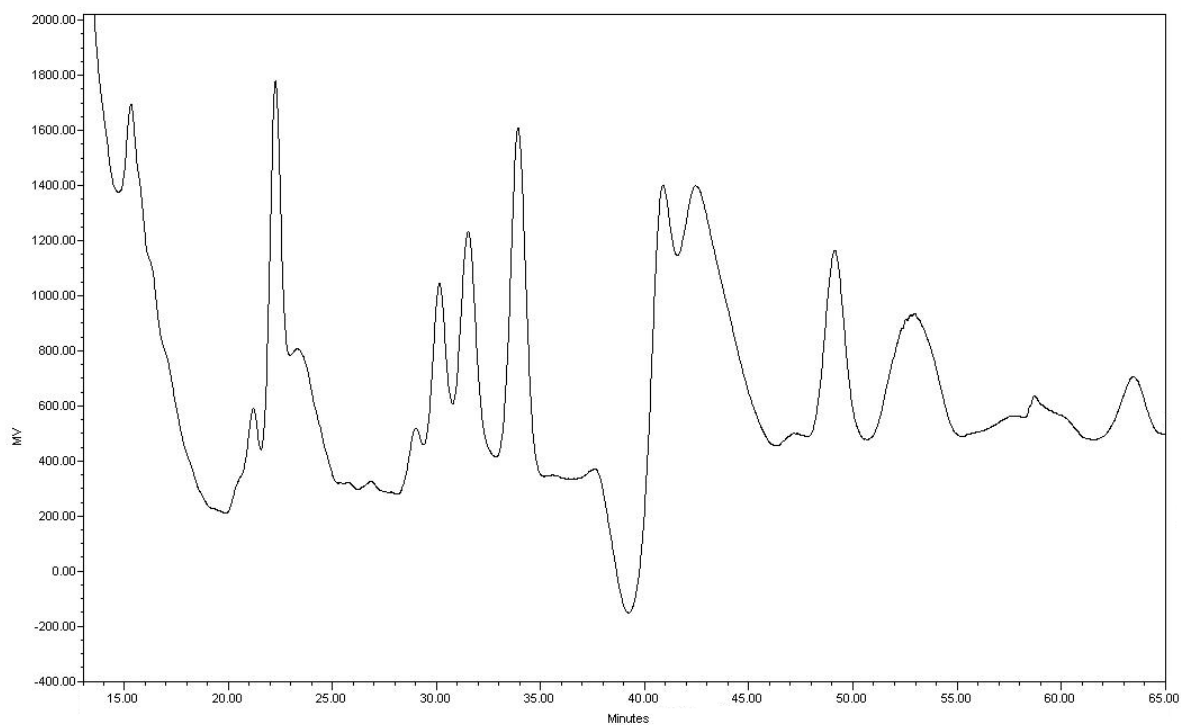


Figura 63. Perfil cromatográfico de la muestra A.

8.7.1.2. Perfil Cromatográfico de la muestra B

La muestra B perteneciente a la fracción mayoritaria del extracto clorofórmico, (Figura 64), mostró 4 constituyentes mayoritarios que presentaron una intensidad igual o mayor de 150.0 mV, así como 6 compuestos minoritarios menor de 150.0 mV.

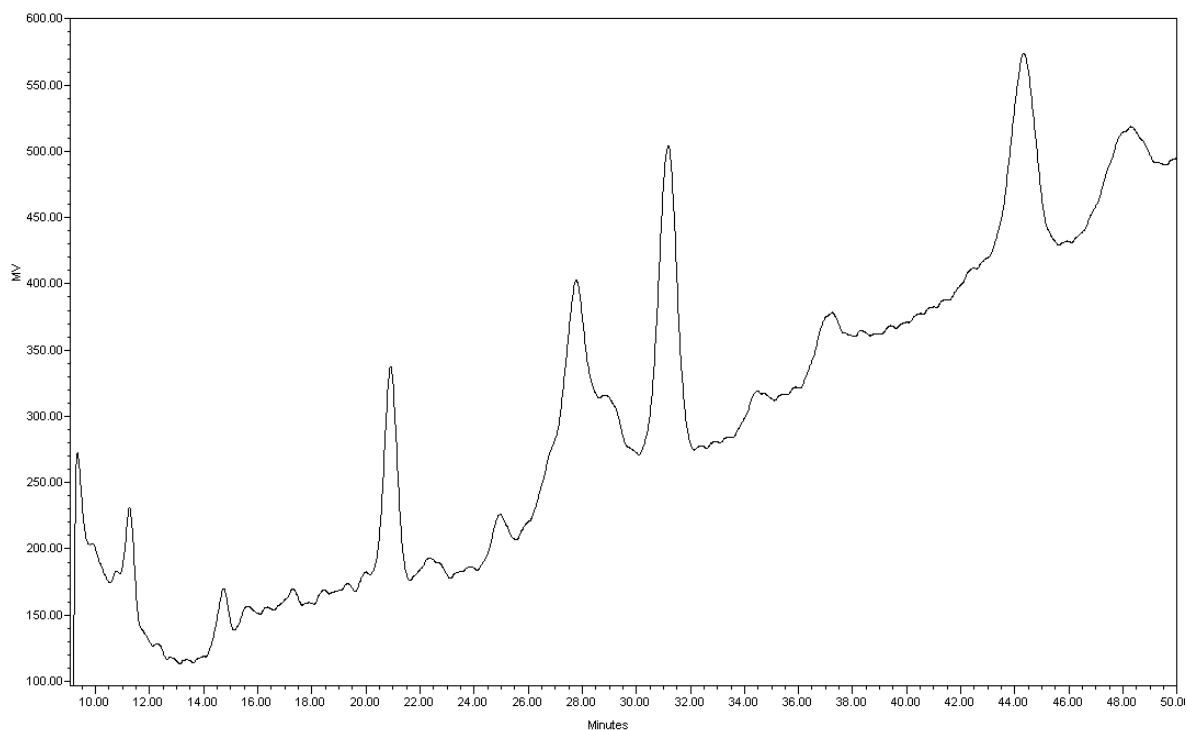


Figura 64. Perfil cromatográfico de la muestra B.

Los perfiles cromatográficos de las muestras C y D no se lograron obtener con buena resolución de los constituyentes a las condiciones que se emplearon para las muestras A y B. Es importante resaltar, que las muestras C y D corresponden al extracto metanólico cuyos glicolípidos estarían constituidos de pocas cadenas éster, dificultando la retención en la fase estacionaria. Por tal razón se llevó a cabo el empleo de una fase móvil más polar como Metanol-Agua a una proporción de 7:3. Sin embargo, estas condiciones reflejaron la gran interacción de los glicolípidos con la fase estacionaria, dificultando su separación.

8.7.2. Purificación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel semipreparativo

Una vez establecido los perfiles cromatográficos de las fracciones A y B, se realizó la purificación de cada uno de los constituyentes mediante el método de corte de núcleo a nivel semipreparativo.

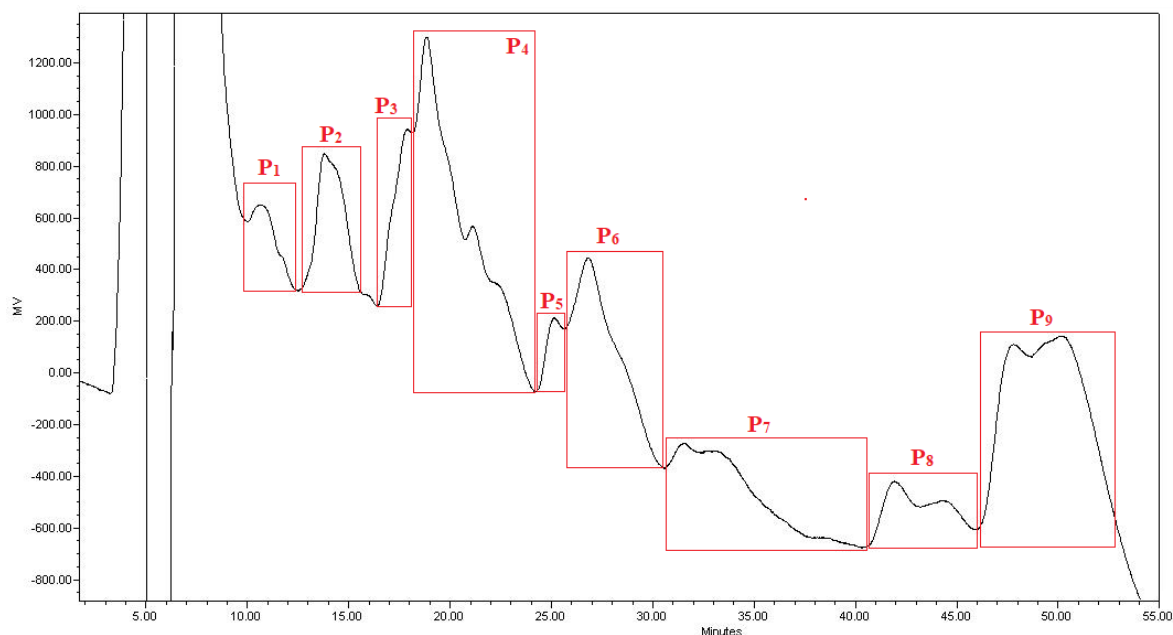


Figura 65. Cromatograma a nivel semipreparativo de la muestra A indicando el corte de núcleo.

La figura 65 muestra el cromatograma a escala semipreparativa de la muestra A, indicando los cortes de núcleo que se trazaron, con el fin de purificar los constituyentes individuales de la muestra. Como resultado, se obtuvo un total de 9 cortes con diferentes tiempos de retención, que se describen a continuación en la tabla 16.

Tabla 16. Descripción de los cortes realizados a la muestra A a escala semipreparativa.

Corte	t_R (min)	Cantidad (mg)
P ₁	10	7.6
P ₂	12.4	11.2
P ₃	16.3	7.2
P ₄	18	14.9
P ₅	24	4.1
P ₆	25.6	16.6

P ₇	30.5	2.0
P ₈	38.3	10.8
P ₉	46	9.9

Por otro lado, el análisis de la muestra B mediante CLAE a escala semipreparativa generó el perfil cromatográfico de la figura 66. Como resultado se obtuvo la purificación mediante el uso de la técnica de corte de núcleo obteniendo cuatro cortes representativos, descrito en la tabla 17.

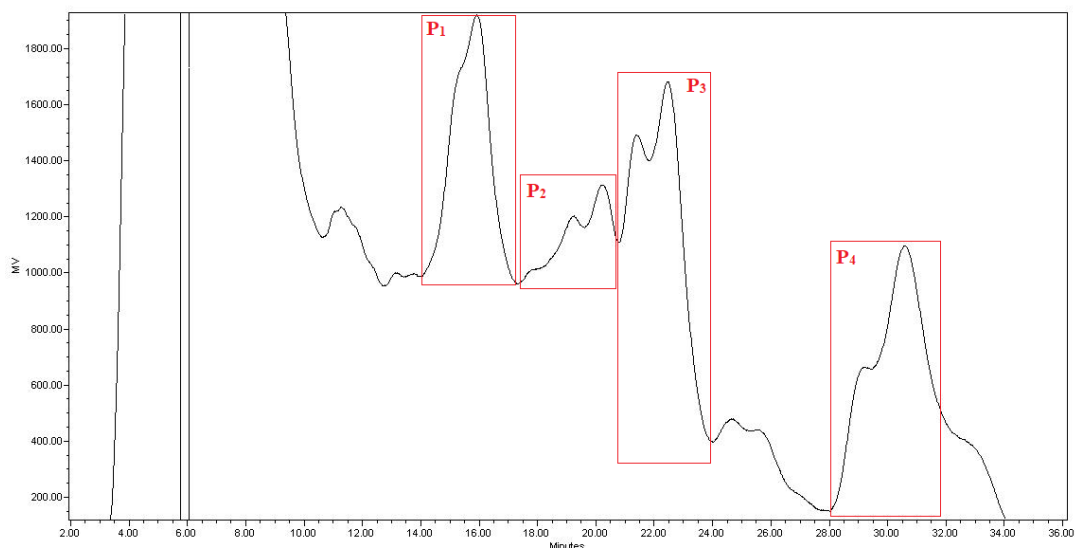


Figura 66. Cromatograma a nivel semipreparativo de la muestra B indicando el corte de núcleo.

Tabla 17. Descripción de los cortes realizados a la muestra B a escala semipreparativa.

Corte	<i>t_R</i> (min)	Cantidad (mg)
P ₁	14.7	2.9
P ₂	17.6	3
P ₃	21	2.3
P ₄	28.6	3.4

Como se puede ver en las tablas 16 y 17 relacionada a los cortes de núcleo realizados a la muestra A y B, se decide continuar con el análisis a las fracciones P₄ y P₆ de la muestra A, ya que corresponden a las muestras mayoritarias, por esto, se purificaron a nivel analítico.

8.7.3. Purificación de los constituyentes obtenidos por la técnica de corte de núcleo mediante CLAE a nivel analítico

Los compuestos correspondientes a las fracciones P₄ y P₆ de la muestra A, se sometió a una segunda purificación mediante CLAE bajo las condiciones analíticas descritas en el apartado 7.8.1. De la fracción P₄, se obtuvo la purificación de tres picos mayoritarios P₄-1 (7.0 mg), P₄-2 (3.0 mg) y P₄-4 (4.0 mg) como se observa en la figura 67. De igual forma, del P₆, se purificaron dos picos mayoritarios, P₆-1 (5.0 mg) y P₆-2 (4.0 mg) tal como se observa en la figura 68.

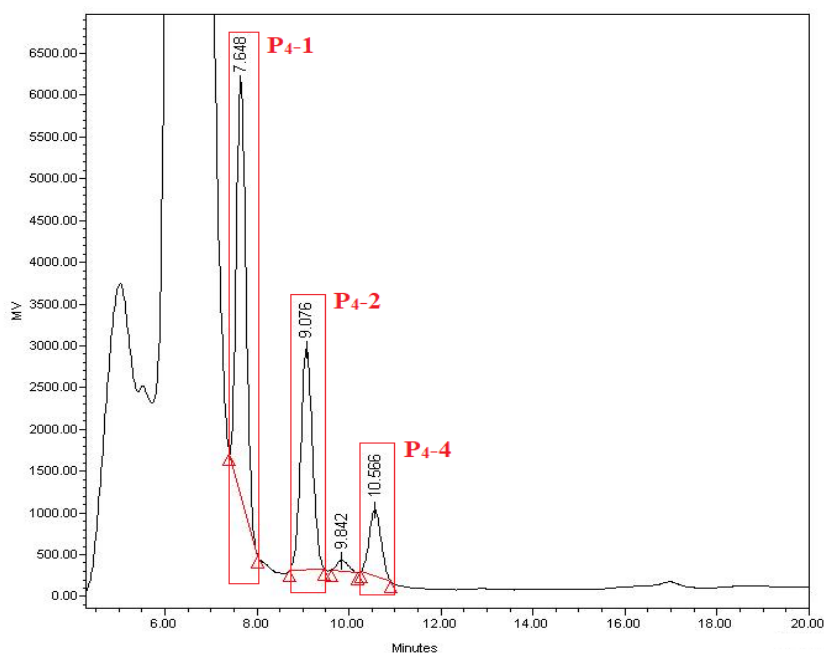


Figura 67. Purificación a escala analítica del P₄ de la muestra A.

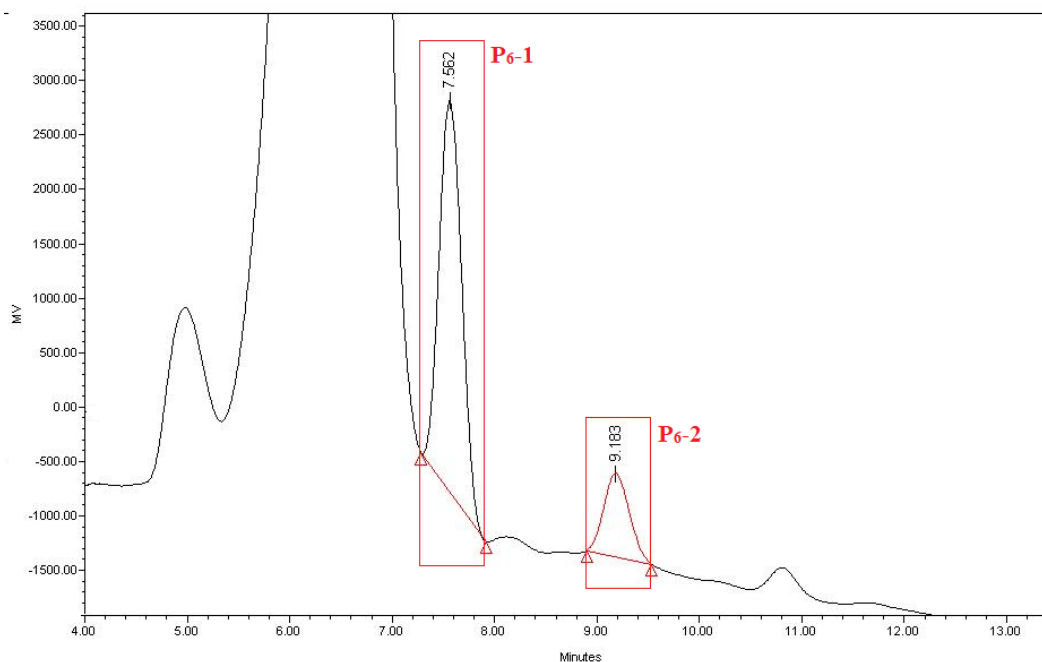


Figura 68. Purificación a escala analítica del P₆ de la muestra A.

Los productos purificados fueron enviados a Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectroscopía de Masas (EM) para su caracterización y elucidación de las moléculas.

8.8. Caracterización de las estructuras químicas de los compuestos purificados

Cada una de las muestras purificadas P₄-1, P₄-2, P₄-4, P₆-1 y P₆-2 fueron analizadas para caracterizar sus estructuras químicas mediante el empleo de diferentes técnicas de espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM). Los espectros unidimensionales de protón RMN ¹H proporcionan información general acerca de las estructuras químicas. De esta forma, el espectro de protón ¹H permitió identificar el número de señales anoméricas en la región comprendida entre 5 – 6 ppm, que indicaron el número de monosacáridos que se encuentran constituyendo el núcleo oligosacárido en estas moléculas.

Las resonancias de protón correspondientes a las señales anoméricas en el espectro RMN ¹H fueron identificadas por el método HSQC (Heteronuclear Single-Quantum Correlation) que permitió la correlación de C – H a un enlace de distancia (¹J_{CH}). Una vez

que se identificaron las señales de los protones anoméricos, se analizaron sus multiplicidades para identificar el tipo de azúcar mediante los patrones de acoplamiento. De esta forma, las señales que presentaron como singuletes anchos fueron atribuidas a las unidades monosacáridas de L-ramnosa y las señales anoméricas correspondientes a las unidades de D-glucosa se asignaron debido a su multiplicidad como dobletes con constantes de acoplamiento de 7.3 Hz ($^3J_{H-H}$). Todas las señales vecinales a los protones anoméricos de estas unidades presentaron concordancia con las características determinadas por los patrones de acoplamiento como dobles de dobles con constantes de acoplamiento aproximadamente de 9.5 Hz ($^3J_{H-H}$) y que resultan de la orientación ecuatorial de los sustituyentes en el anillo glucopiranósido.

De esta forma, los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN 1H) para los compuestos P₄-1, P₄-2, P₄-4, P₆-1 y P₆-2, mostraron una señal generada para una glucosa y tres señales generadas para los protones anoméricos de las unidades de ramnosa. Adicionalmente, se observaron tres dobletes localizados entre δ_H 0.5 – 3.0 ppm correspondientes a los metilos de las unidades de metilpentosa en las estructuras. Al considerar, que los núcleos oligosacáridos están compuestos por cuatro unidades de azúcar, una hexosa (glucosa) y tres metilpentosas (tres ramnosas), se recurrió al uso de la técnica bidimensional 1H - 1H COSY (Correlated Spectroscopy) en la RMN, para la asignación de las señales restantes de cada uno de los protones metinos en cada monosacárido.

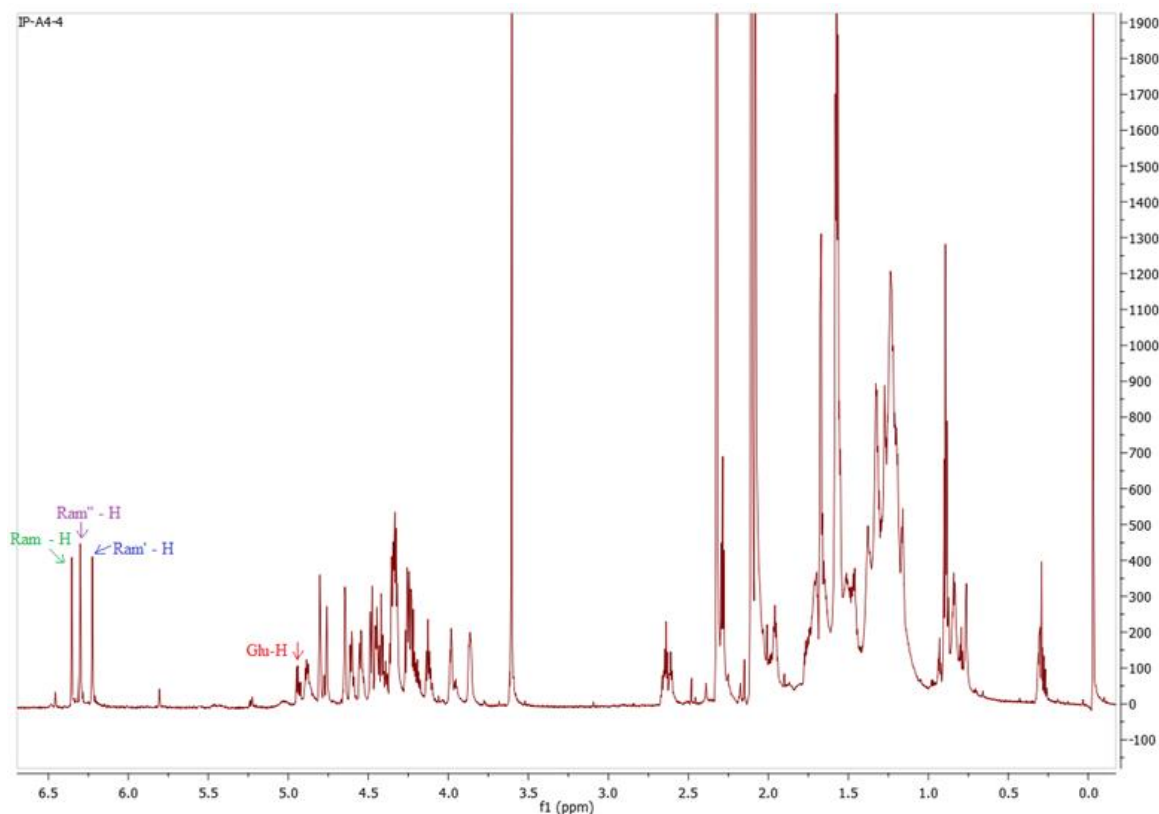


Figura 69. Espectro RMN ^1H (900 MHz, en Piridina) del compuesto P₄-4.

8.8.1. Empleo de la técnica RMN: COSY

El procedimiento de asignación de señales mediante estas técnicas se inicia con la localización de los protones anoméricos y el establecimiento de los cuadros de conectividad de cada uno de los protones con su metino vecinal correspondiente a lo largo de toda la unidad sacárida. Es importante resaltar, que para la identificación de las unidades sacáridas se tiene en cuenta la localización de las señales mejores resueltas. En el caso del espectro RMN: COSY de la muestra P₄-4 (figura 70), se observaron las señales de los protones anoméricos (H_1) de cada uno de los azúcares, así como también H_2 de cada unidad de ramnosa (Ram), H_3 de la glucosa (Glu) y las tres ramnosas, lo cual facilitan el diagnostico para la asignación correcta, en específico en los casos donde los protones vecinos se encuentran localizados en regiones con sobreposición de señales. Así, en el espectro mostrado en la Figura 70, perteneciente al compuesto P₄-4, se observa que el protón anomérico H_1 de la primera unidad de ramnosa (Ram) establece su cuadro de

conectividad con el H₂, cuyo desplazamiento se encuentra en 4.64 ppm, así como su conectividad entre el H₃ y H₄ cuyo desplazamiento se encuentra en 4.60 y 4.35 ppm, respectivamente. Siguiendo este mismo razonamiento, se localizaron los demás sitios restantes de los protones de las unidades de azúcares.

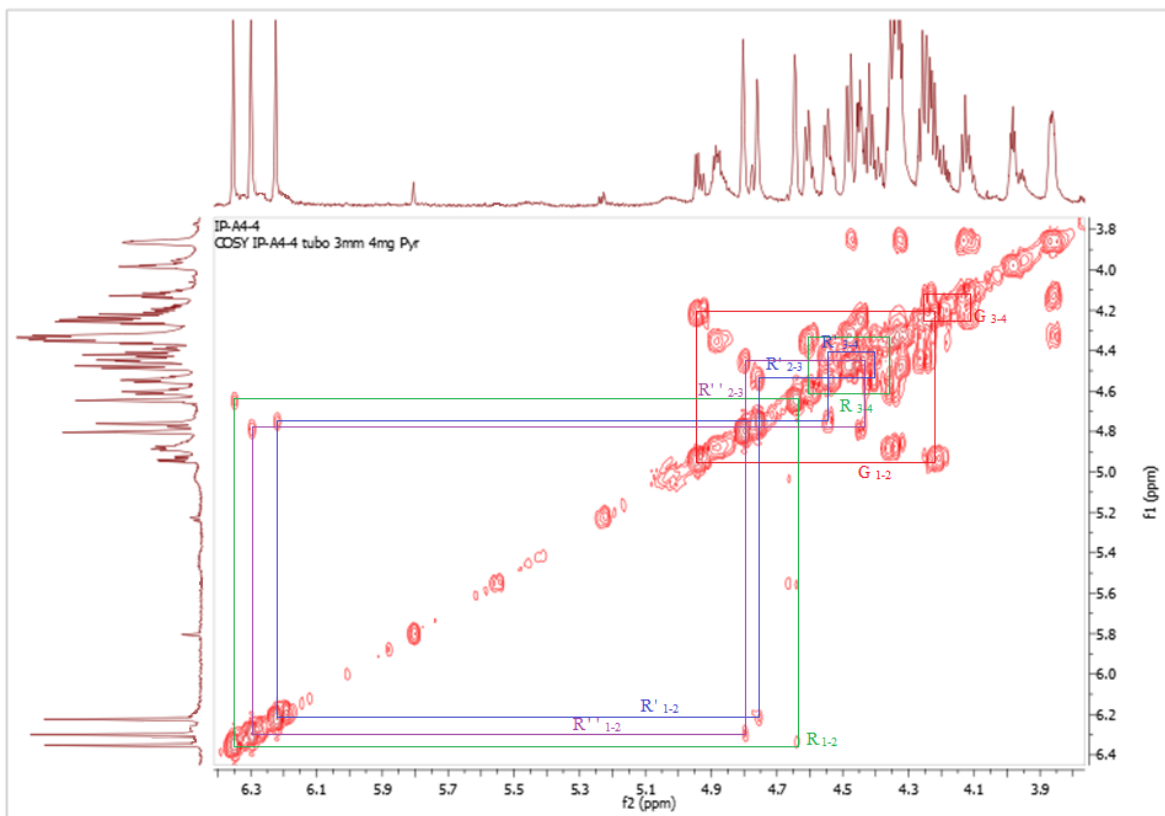


Figura 70. Espectro ¹H – ¹H COSY del compuesto P₄-4. Sección de la porción oligosacárida.
Correlaciones (³J_{H-H})

En la figura 71, se representan las correlaciones H-H a tres enlaces de distancia observadas en el espectro RMN: COSY, en donde se observa la relación que hay entre el H₁ – H₂, H₃ – H₄ de la glucosa, así como la relación del H₁ – H₂ de cada una de las ramnosas.

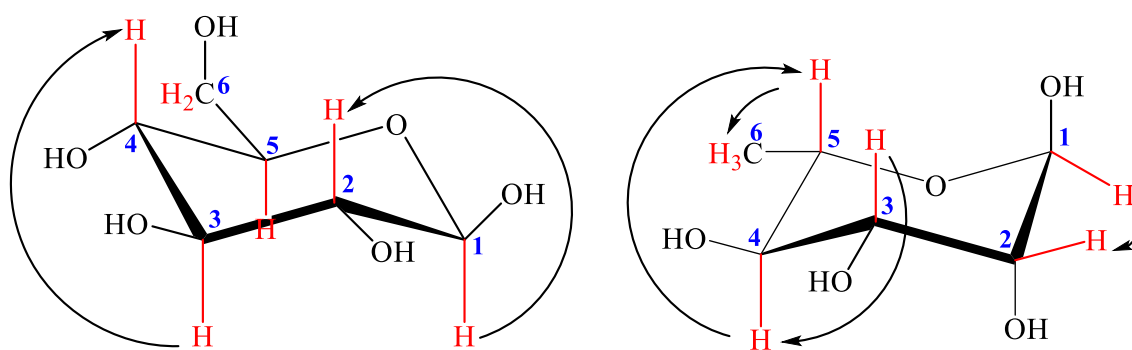


Figura 71. Correlaciones H-H mostradas en el espectro RMN: COSY.

8.8.2. Empleo de la técnica RMN: HSQC

Después de llevar a cabo la identificación de los protones correspondientes a las unidades de los azúcares a través de la técnica RMN ^1H bidimensional COSY, se procedió con la asignación de los desplazamientos químicos de los carbonos correspondientes a los protones oligosacáridos mediante la técnica RMN bidimensional Heteronuclear $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ a un enlace de distancia ($^1J_{\text{C-H}}$) HSQC.

Este procedimiento se inició con la localización de los carbonos anoméricos en la región comprendida entre 95 a 110 ppm en el espectro de carbono obtenidos a través de una técnica de RMN ^{13}C . Después, se estableció la conectividad entre cada carbono anomérico con su protón correspondiente. La Figura 72, muestra el espectro HSQC de la región anomérica del compuesto P4-4, donde se observan cuatro señales anoméricas, las cuales confirman el número de unidades de azúcar en cada núcleo oligosacárido.

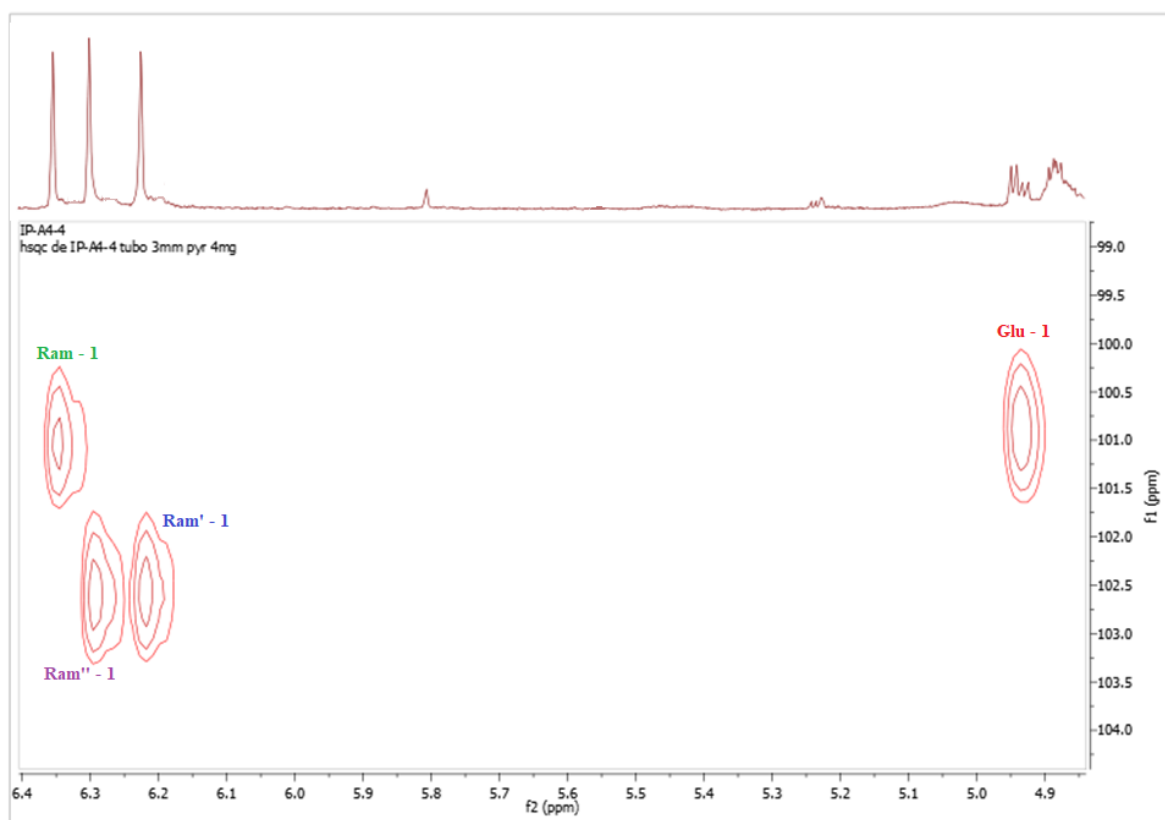


Figura 72. Espectro HSQC del compuesto P₄-4 mayoritario. Región anomérica para la identificación de los hidrógenos y carbonos de los azúcares. Correlaciones ($^1J_{C-H}$). Abreviaciones: Glu = glucosa, Ram = ramnosa superior, Ram' = ramnosa intermedia y Ram'' = ramnosa inferior.

Esta técnica también permitió identificar los protones que se localizan en las regiones con mayor sobreposición correspondiente entre 3.5 – 5 ppm. En la figura 73, se muestra el espectro HSQC del compuesto P₄-4, donde se observa que los protones H₂ – H₆ de la unidad de glucosa, los protones H₂ – H₅ de cada unidad de ramnosa, así como el protón de la aglicona.

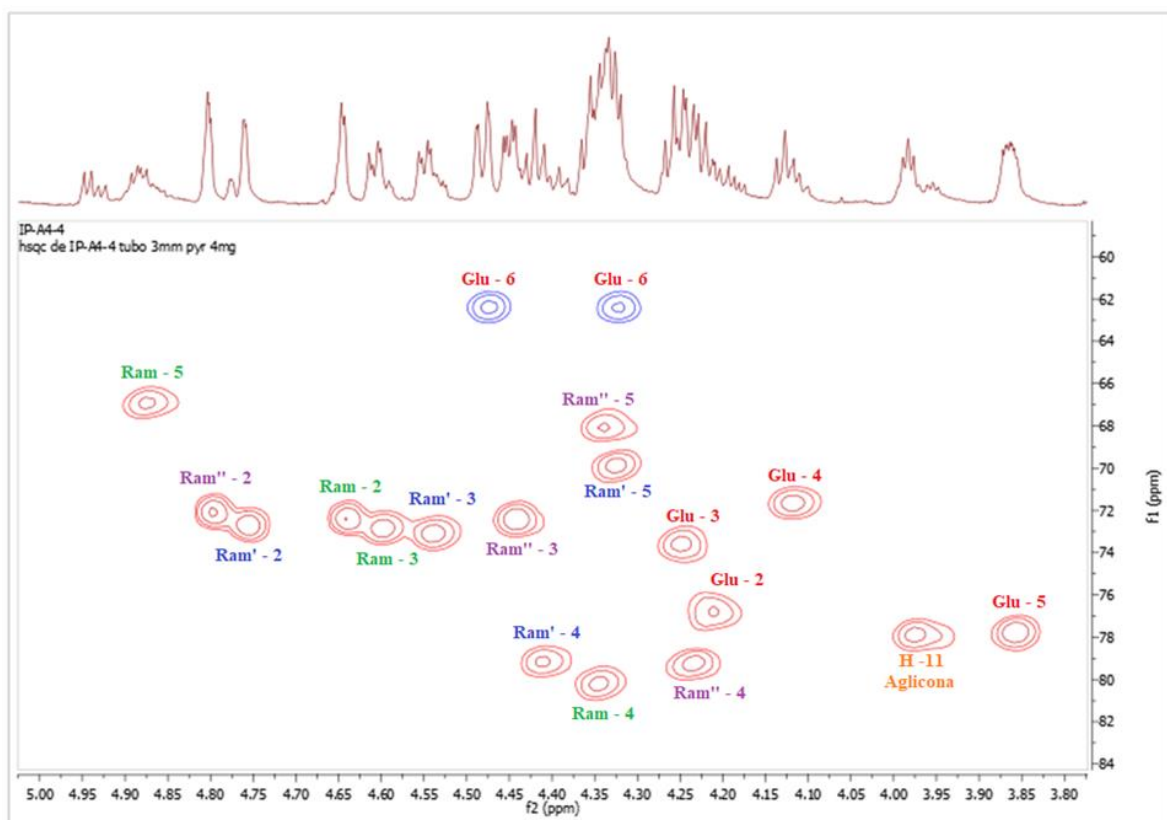


Figura 73. Espectro HSQC del compuesto P₄-4. Región oligosacárida para la identificación de los carbonos correspondientes a los protones oligosacárido. Correlaciones ($^1J_{C-H}$).

Siguiendo este mismo análisis, se localizaron y asignaron los desplazamientos químicos de los carbonos restantes en el espectro de RMN ^{13}C . Una vez identificado los desplazamientos químicos de todos los protones pertenecientes a cada monosacárido en el espectro de RMN ^1H , se procedió a llevar a cabo el establecimiento de las conectividades $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ en el espectro HSQC para determinar inequívocamente la asignación de cada señal de carbono (Tabla 18).

Tabla 18. Datos espectroscópicos de RMN ^1H y ^{13}C del compuesto P₄-4

	Posición		^1H	^{13}C		^1H	^{13}C
Glu	1	4.93	d (7.3)	100.88	4.93	d (7.3)	100.88
	2	4.21	*	76.79	4.21	*	76.79
	3	4.25	*	73.59	4.25	*	73.59
	4	4.12	dd (8.6, 8.6)	71.67	4.12	dd (8.6, 8.6)	71.67
	5	3.86	ddd (2.5, 4.7, 7.6)	77.78	3.86	ddd (2.5, 4.7, 7.6)	77.78
	6	4.32	dd (3.6, 10.0)	62.41	4.32	dd (3.6, 10.0)	62.41
		4.47	dd (2.1, 11.5)	62.40	4.47	dd (2.1, 11.5)	62.40
Ram	1	6.35	s	101.04	6.35	s	101.04
	2	4.64	dd (1.0, 3.3)	72.39	4.64	dd (1.0, 3.3)	72.39
	3	4.60	dd (3.4, 9.3)	72.86	5.55	dd (2.7, 9.9)	78.77
	4	4.35	dd (9.3, 9.6)	80.23	4.35	dd (9.3, 9.6)	80.23
	5	4.87	dq (9.0, 6.0)	66.93	4.87	dq (9.0, 6.0)	66.93
	6	1.66	d (6.2)	18.73	1.66	d (6.2)	18.73
Ram'	1	6.22	s	102.58	6.46	s	100.68
	2	4.76	dd (1.6, 3.1)	72.71	5.21	*	69.39
	3	4.54	dd (3.1, 9.1)	73.12	4.54	dd (3.1, 9.1)	73.12
	4	4.41	dd (9.2, 9.2)	79.15	4.41	dd (9.2, 9.2)	79.15
	5	4.33	dq (6.0, 8.7)	69.89	4.33	dq (6.0, 8.7)	69.89
	6	1.56	d (6.21)	18.17	1.56	d (6.21)	18.17
Ram''	1	6.29	s	102.61	6.29	s	102.61
	2	4.80	dd (1.4, 3.2)	72.08	4.80	dd (1.4, 3.2)	72.08
	3	4.44	dd (3.3, 9.2)	72.42	5.22	*	69.39
	4	4.23	*	79.20	5.54	dd (2.8, 10.0)	78.77
	5	4.34	dq (6.0, 8.7)	68.08	4.34	dq (6.0, 8.7)	68.08
	6	1.56	d (6.1)	18.17	1.56	d (6.1)	18.17
Jal	11	3.98		77.89	3.98		77.89

Los desplazamientos químicos se encuentran en ppm con relación al tetrametilsilano. 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 = señal singulete, d = señal doble, dd = señal doble de doble, ddd = señal doble de doble de doble, dq = señal doblete cuarteteado. Todas las asignaciones se basaron en experimentos de correlación homonuclear ^1H - ^1H (COSY) y heteronuclear ^1H - ^{13}C (HMQC, HMBC).

Este procedimiento, fue necesario para llevar a cabo el establecimiento de la secuencia de glicosidación a través de las correlaciones ^{13}C - ^1H a larga distancia observadas en los espectros bidimensionales HMBC.

8.8.3. Empleo de la técnica RMN: HMBC

Se procedió a la determinación de las correlaciones ^{13}C – ^1H a tres enlaces de distancia ($^3J_{\text{C-H}}$) a través de la técnica HMBC para el establecimiento de los enlaces glicosídicos. De esta manera, se identificó los núcleos oligosacáridos constitutivos de las estructuras P₄-1, P₄-2, P₄-4, P₆-1 y P₆-2. La técnica HMBC permitió confirmar las secuencias de glicosidación de los compuestos mencionados, mismas que corresponden a las descritas para el ácido glicosídico E. Este procedimiento se logró identificando las

conectividades C – H entre los átomos de protones anoméricos y los carbonos enlazados directamente a la posición donde se establece el enlace glicosídico entre las unidades monosacáridas. El análisis de los espectros HMBC de los compuestos mencionados permitió determinar las mismas secuencias de glicosidación en los compuestos a través de las conectividades $^3J_{H-C}$ observadas, $H_2\text{Glu} - C_1\text{Ram}$, $H_4\text{Ram} - C_1\text{Ram}'$, $H_4\text{Ram}' - C_1\text{Ram}''$ Figura 74.

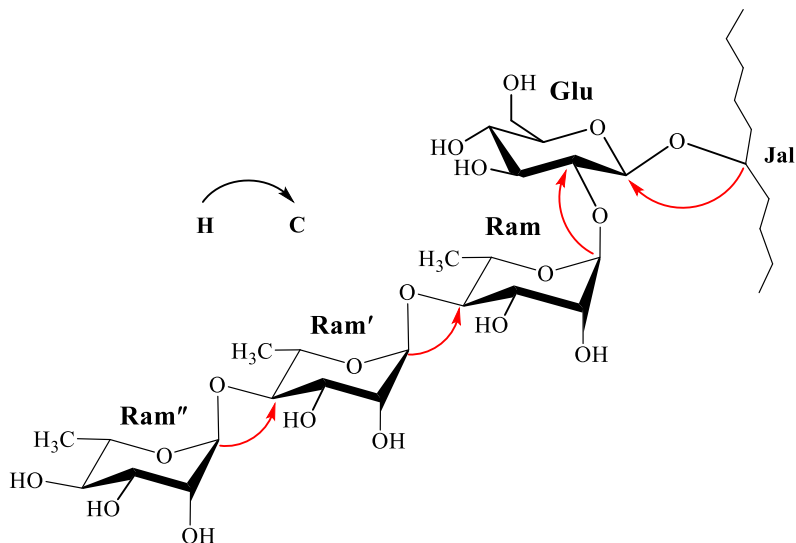


Figura 74. Conectividades C – H a tres enlaces ($^3J_{C-H}$) para el establecimiento de las secuencias de glicosidación.

Por lo tanto, la secuencia de azúcares del núcleo oligosacárido de los compuestos P4-1, P4-2, P4-4, P6-1 y P6-2 se estableció de la siguiente manera: la primera unidad sacárida del núcleo glicosídico corresponde a la glucosa ya que se encuentra enlazada en la posición C_{11} de la aglicona, por las correlaciones observadas entre GluH_1 (δH 4.93 ppm) – JalC_{11} (δC 77.89 ppm); la segunda unidad corresponde a una ramnosa (Ram) que se encuentra enlazada al C_2 de la glucosa, RamH_1 (δH 6.35 ppm) – GluC_2 (δC 76.79 ppm); la tercera unidad sacárida corresponde a una ramnosa (Ram') enlazada en la posición C_4 de la segunda unidad monosacárida (Ram), $\text{Ram}'\text{H}_1$ (δH 6.22 ppm) – RamC_4 (δC 80.23 ppm) y una unidad de ramnosa (Ram'') terminal enlazada a la posición C_4 de la tercera unidad de ramnosa (Ram') $\text{Ram}''\text{H}_1$ (δH 6.29 ppm) – $\text{Ram}'\text{C}_4$ (δC 79.15 ppm). La figura

75 muestra el espectro HMBC del compuesto P₄-4 que ejemplifica la aplicación de esta metodología en la determinación de la secuencia oligosacárida.

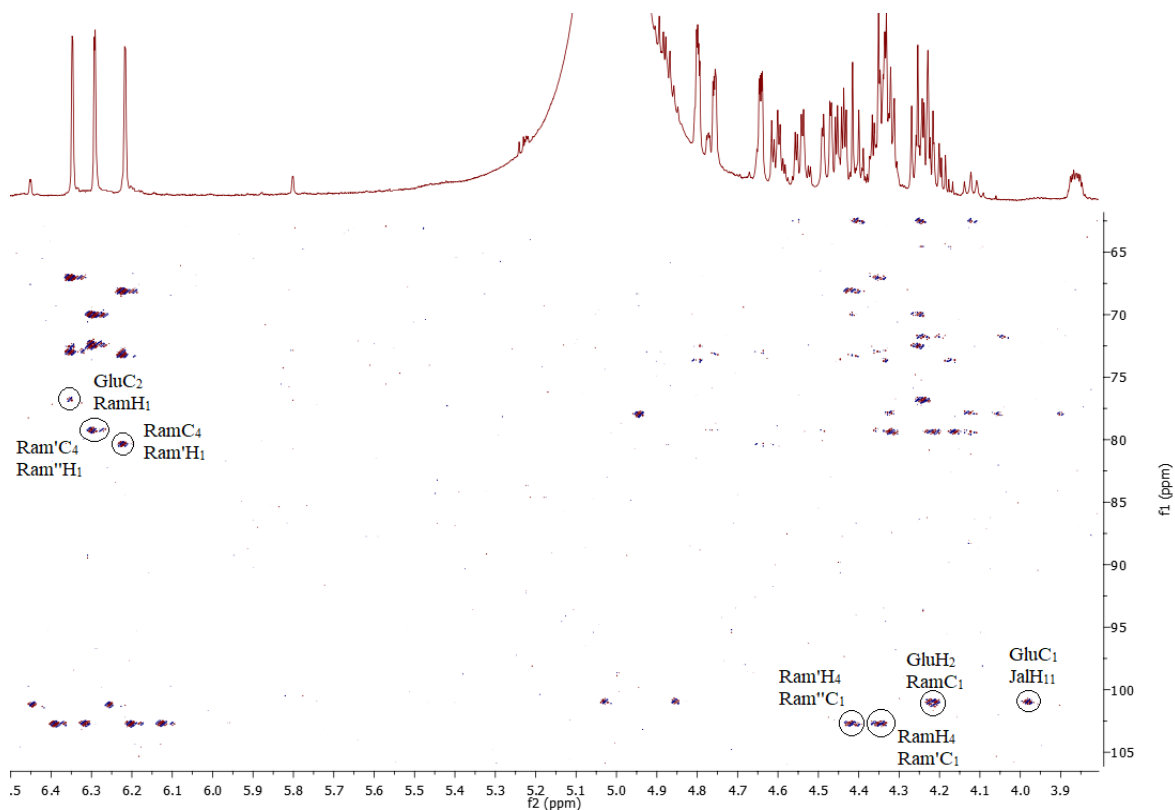


Figura 75. Espectro HMBC del compuesto P₄-4 donde se observa las correlaciones $^3J_{C-H}$ para la identificación de la secuencia de glicosidación.

8.8.4. Identificación de la aglicona metilada del compuesto mayoritario

Mediante el espectro RMN: HMBC del compuesto mayoritario de la muestra P₄-4, se identificó el ácido de cadena abierta correspondiente a la aglicona metilada. Las señales diagnosticas demuestran un carbono carbonilo metilado a δ_C 173.82 ppm correlacionando con los tres hidrógenos a δ_H 2.29, 3.6 y 1.57 ppm como se evidencia en la figura 76. Debido a que las señales diagnosticas del compuesto mayoritario no evidencia señales de esterificación en el núcleo oligosacárido, el compuesto que se propone es el ácido operculinico E metilado.

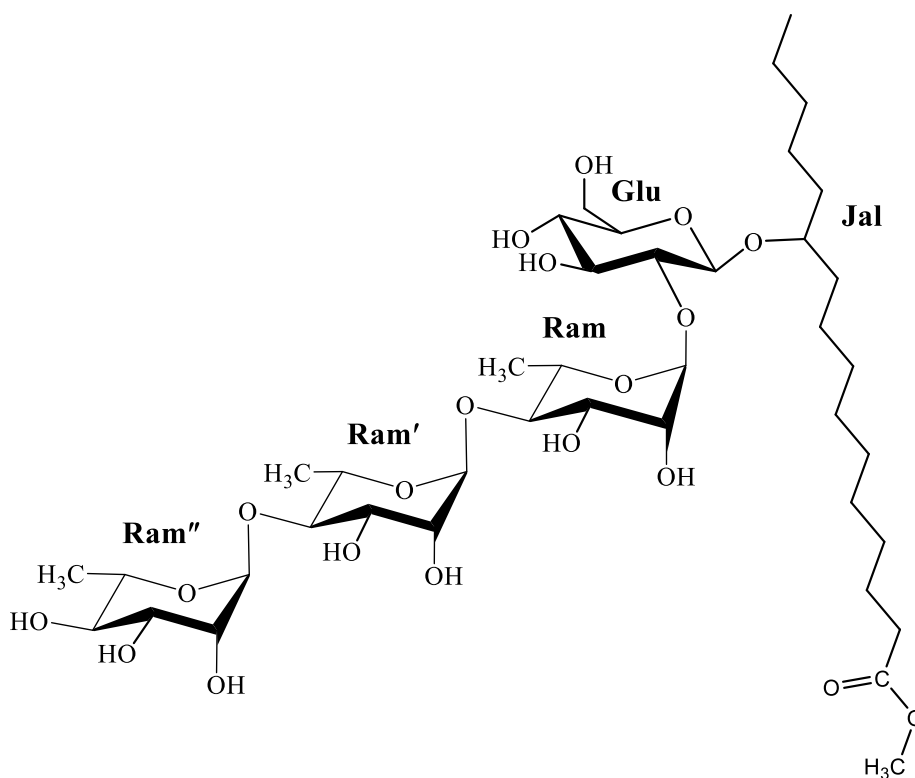


Figura 76. Ácido operculínico E metilado.

8.8.5. Determinación de la estructura química del compuesto minoritario

Mediante el espectro RMN: ^1H , COSY, TOCSY, HSQC y HMBC del compuesto minoritario de la muestra P₄-4, se logró observar la similitud de las señales en los espectros permitiendo identificar que el compuesto minoritario posee el mismo núcleo oligosacárido del compuesto mayoritario. Con la diferencia, que en el compuesto minoritario se encuentran enlazados residuos de ácidos grasos en diferentes posiciones de los azúcares.

Para la identificación de las posiciones de esterificación presentes en la molécula, el primer paso es buscar las señales de los carbonos carbonílicos que comprende la zona entre δ_{C} 170 – 190 ppm. La figura 77, muestra cuatro señales de carbonos carbonílicos para cuatro sitios de esterificación. Una de las señales corresponde a la aglicona y las tres restantes a sustituyentes. Una vez que se ha identificado cada uno de los grupos carbonilos, se lleva a cabo su localización en el núcleo oligosacárido.

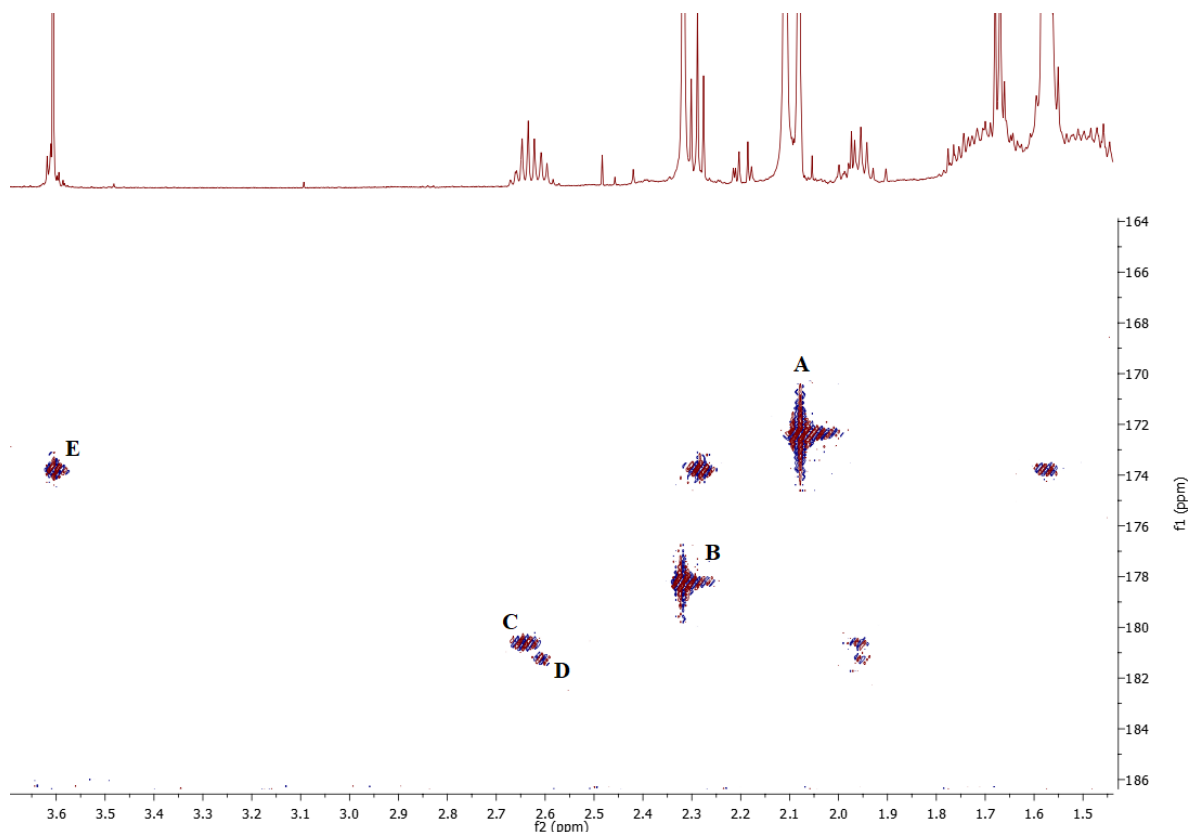


Figura 77. Espectro HMBC para la identificación de los carbonos carbonilos para los sustituyentes éster y para la aglicona.

Para verificar las posiciones de esterificación, se realiza la asignación correcta de los núcleos de carbonos correspondientes a cada uno de los grupos carbonilo. Por lo tanto, se realizó un análisis de las interacciones $^{13}\text{C} - ^1\text{H}$ a tres enlaces de distancia entre el núcleo de carbono de los grupos carbonilos y los protones H_2 de cada sustituyente y de la aglicona mediante el espectro HMBC (Figura 77).

Debido a que los hidrógenos geminales a grupos éster experimentan un efecto de desprotección desplazándose a campo bajo del espectro, las correlaciones observadas entre estos protones y los protones vecinales permitieron determinar la posición de los ésteres en los núcleos. Por lo tanto, el protón H_2 de la primera unidad de ramnosa (Ram) a δ_{H} 4.64 ppm correlaciona con su H_3 a δ_{H} 5.55 ppm; el protón anomérico de la segunda ramnosa (Ram') a δ_{H} 6.46 ppm correlaciona con el protón H_2 a δ_{H} 5.21 ppm y finalmente el protón H_3 de la tercera unidad de ramnosa (Ram'') a δ_{H} 5.22 correlaciona con el protón H_4 a δ_{H} 5.54 ppm (Figura 78).

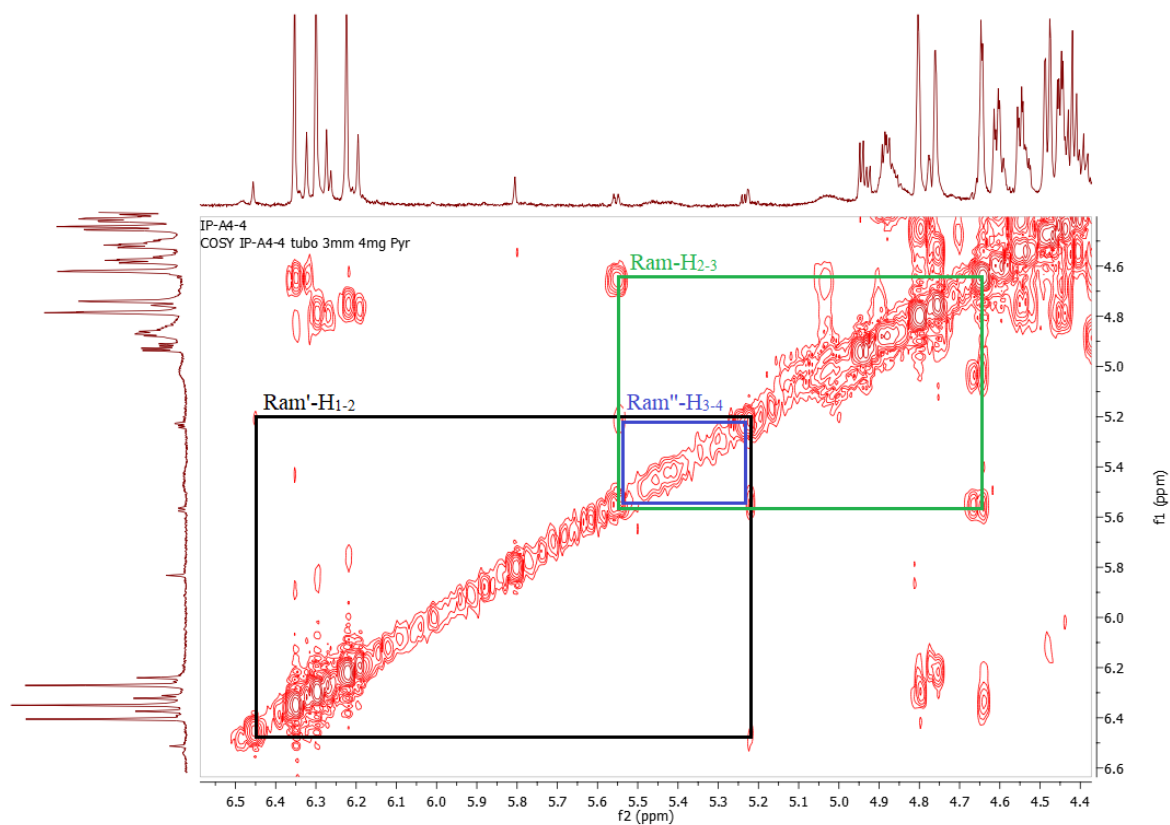


Figura 78. Espectro COSY de protones esterificados del compuesto P₄-4 minoritario.

Teniendo en cuenta las señales diagnosticas del espectro COSY de los protones esterificados del compuesto P₄-4 minoritario, se propone la estructura química del siguiente compuesto:

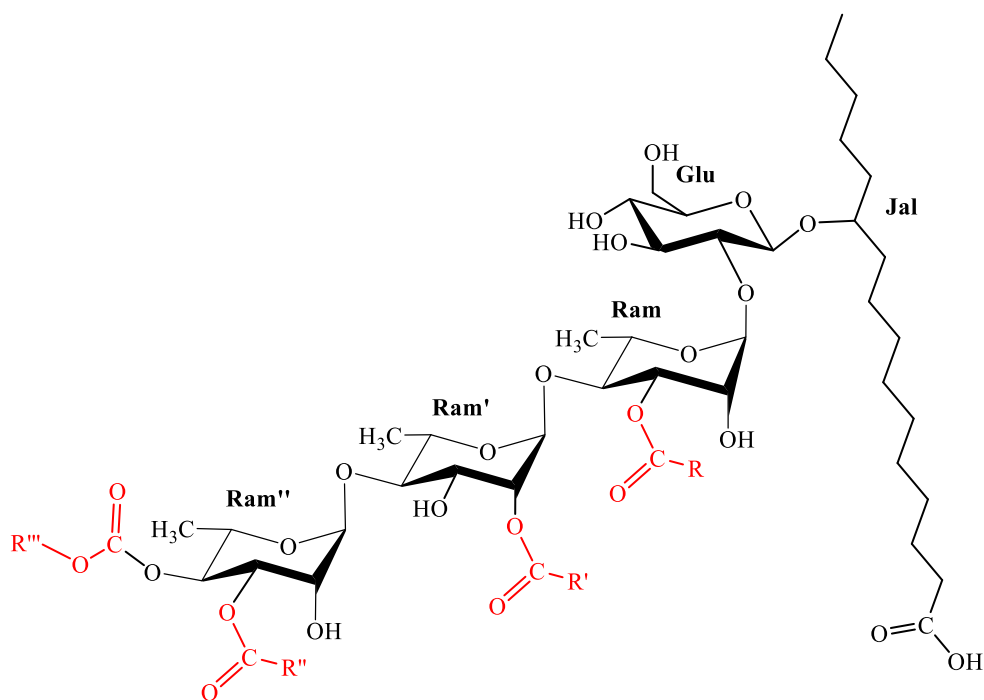


Figura 79. Estructura química del compuesto P₄-4 minoritario.

8.9. Citotoxicidad y modulación de resistencia a múltiples fármacos

8.9.1. Citotoxicidad

Para establecer el grado de citotoxicidad del compuesto P₆-1, se emplearon tres líneas celulares utilizando los agentes anticancerígenos Vinblastina y Colchicina como controles positivos. Todas las líneas celulares demostraron ser sensibles a los compuestos antitumorales con valores de Cl₅₀ dentro del intervalo de 0.004-0.016 µg/mL, lo que indica la adecuada sensibilidad de las líneas celulares a los agentes anticancerígenos. La línea más sensible con vinblastina fue MFC-7 con una Cl₅₀ de 0.004 µg/mL y para colchicina fue HeLa con un valor de Cl₅₀ de 0.005 µg/mL. Se empleó DMSO en proporciones no mayores a 0.010% para preparar las soluciones del compuesto evaluado, para descartar interferencias en la actividad citotóxica del compuesto de ensayo.

De acuerdo a los protocolos establecidos para la evaluación de la actividad citotóxica de extractos vegetales y fracciones, se considera agentes citotóxicos aquellos

con actividad significativa con valores de concentración media (Cl_{50}) $< 25\mu\text{g/mL}$ y para compuestos puros $Cl_{50} < 4 \mu\text{g/mL}$. De este modo, en la tabla 19 se evidencia que el compuesto P₆-1 no exhibe actividad citotóxica en ninguna de las líneas celulares ya que presenta valores de Cl_{50} mayores a $> 25\mu\text{g/mL}$.

Tabla 19. Actividad citotóxica del compuesto P₆-1

Compuesto	Cl_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
	MCF-7	HeLa	HCT116
P ₆ -1	> 25	> 25	> 25
Vinblastina	0.004	0.009	0.006
Colchicina	0.008	0.005	0.016

MCF-7 = carcinoma de mama; HeLa = carcinoma de cervix, HCT-116 = carcinoma de colon.

8.9.2. Modulación

La razón más común del fracaso de la quimioterapia en el tratamiento contra el cáncer se debe principalmente a la resistencia desarrollada por las células cancerosas a los fármacos utilizados, resistencia adquirida que puede deberse a una adaptación de las células tumorales o a una mutación, con la aparición de células que se ven menos afectadas o que no se afectan por el fármaco adquiriendo una ventaja selectiva sobre las células sensibles (Figuerola, 2013). La quimioresistencia en células cancerígenas puede ser una consecuencia de múltiples cambios como disminución en la captación del fármaco, el aumento de las bombas de eflujo, la alteración en los lípidos de membrana, el bloqueo de la muerte celular programada, la activación de mecanismos de reparación del ADN, así como alteraciones en el ciclo celular. Una de las razones por las cuales las células adquieren resistencia a un amplio rango de fármacos anticancerígenos se debe a la sobre expresión de unas o más transportadores dependientes de energía, tal es el caso de la glicoproteína P, que tiene la tarea de detectar y expulsar el fármaco o cualquier agente xenobiótico al exterior de la célula (Gottesman, 2002). Por tal motivo las pruebas biológicas son un indicador de la acción de una sustancia en un organismo vivo, desde ensayos preliminares en líneas celulares y microorganismos hasta ensayos en fase clínica en humano. En el caso de la química de productos naturales, los extractos crudos de plantas o sustancias aisladas se evalúan mediante una serie de pruebas biológicas

preliminares. Esto permite discernir la acción o las acciones potenciales para posteriormente buscar modelos biológicos más precisos (Trejo-Ginez, 2016)

La ausencia de citotoxicidad es un requisito importante e indispensable para realizar los ensayos de modulación y distinguir claramente cualquier efecto de potenciación (inhibición de la glicoproteína P) de un posible sinergismo entre un compuesto activo y la vinblastina. No obstante, se evaluó la actividad moduladora del compuesto puro P6-1 empleando diferentes líneas celulares de mama (ver tabla 6, sección 7.11.3)

Las células MCF-7 S, MCF-7/Vin⁻ y MCF-7/Vin⁺ fueron expuestas a diferentes concentraciones de Vinblastina desde 0.00064- 10 µg/mL, un fármaco citotóxico empleado principalmente para la quimioterapia contra el cáncer de mama, testicular, pulmonar, de cabeza y cuello. A continuación, en tabla 20 se resume el comportamiento de la modulación del compuesto P6-1.

Se considera un agente modulador aquellos compuestos que presentan factores de reversión superiores al control positivo. En este ensayo, el compuesto de prueba resulto ser menos potente que el control positivo, ya que los factores de reversión para las líneas MCF-7 S, MCF-7/Vin⁻ y MCF-7/Vin con reserpina como control positivo fue de 143.3, 44.2 y 16.9 mientras que el compuesto P6-1 obtuvo valores inferiores a 2 a 25 y 5 µg/mL.

Tabla 20. Bioensayo de modulación del compuesto P6-1.

Compuesto ^a	CI ₅₀ (µg/mL)			Factor de reversión ^c		
	MCF-7/Vin ⁻	MCF-7/Vin ⁺	MCF-7 sens	RF _{MCF-7/Vin⁻}	RF _{MCF-7/Vin⁺}	RF _{MCF-7 sens}
Vinblastina	1.37 ± 0.17	1.69 ± 0.26	0.043 ± 0.006			
P6-1 25	1.16 ± 0.17	1.26 ± 0.26	0.026 ± 0.002	1.2	1.3	0.6
P6-1 5	1.20 ± 0.30	1.40 ± 0.07	0.034 ± 0.005	1.1	1.2	0.8
reserpina^b	0.031 ± 0.020	0.10 ± 0.009	0.0003 ± 0.001	44.2	16.9	143.3

^aDiluciones seriadas desde 0.000128 a 2 µg/mL de vinblastina en presencia o ausencia de glicolípido (25 µg/mL, 5 µg/mL), ^b Reserpina = 5 µg/mL como control positivo, ^c FR = CI₅₀ Vinblastina/ CI₅₀ Vinblastina en presencia de glicolípido. Cada valor representa la media ± D.E. de tres experimentos.

Aunque el compuesto P6-1 de la especie vegetal *Ipomoea purpurea* no exhibe factores de reversión superiores al control positivo, se evidencia un efecto citotóxico

moderadamente modulador en las células de cáncer resistentes a vinblastina lo que conlleva a continuar con la búsqueda de nuevos glicolípidos de esta especie pues se ha demostrado el efecto de los oligosacáridos de especímenes como *Ipomoea batatas*, *I. murucoides*, *I. orizabensis*, *I. pes-caprae*, *I. purga*, *I. tricolor* pertenecientes a la familia *Convolvulaceae* sobre la modulación de la glicoproteína-P en células resistentes a fármacos antitumorales además, se han encontrado compuestos derivados de la *Salvia amarissima* que en combinación con agentes anticancerígenos ejercen un efecto inhibitor de las bombas de extrusión. Por lo tanto, estas investigaciones aumentan el interés por la búsqueda de nuevos productos de origen natural como posible alternativa para el tratamiento contra el cáncer.

9. Conclusiones

El método de maceración exhaustiva permitió extraer de manera exitosa los glicolípidos de las partes aéreas de la especie vegetal *Ipomoea purpurea*, identificados mediante pruebas cualitativas de Keller-Killiani, Molish y Antrona y a través de la técnica de cromatografía en capa fina, empleando sulfato cérico como revelador.

A través del bioensayo con *Artemia salina* se logró determinar la concentración letal media (CL₅₀) a 24 horas de exposición, identificando el grado de toxicidad de los extractos. Así, el extracto hexánico fue moderadamente toxico a una CL₅₀ de 314.9 ppm, mientras que los extractos clorofórmico y metanólico fueron ligeramente tóxicos a CL₅₀ 872.3 y 597.3 ppm, respectivamente, lo que demuestra el efecto toxico de los extractos frente al crustáceo.

El empleo de metodologías destructivas y degradativas como la hidrólisis ácida y alcalina, permitió la identificación de los ácidos tíglico, butanodioico, propanoico, octanoico, decanoico, hexadecanoico y octadecanoico como los posibles residuos acilantes de los ácidos glicosídicos de esta especie.

La cromatografía líquida de alta eficiencia (CLAE) sirvió como una técnica indispensable para lograr la separación y purificación de los glicolípidos presentes en el extracto hexánico y clorofórmico de esta especie. De igual modo, utilizando la cromatografía de líquidos en fase reversa (Columna C₁₈, MeOH-H₂O como fase móvil) y la técnica de corte de núcleo, se obtuvieron cinco compuestos de la cuales se realizó la elucidación del compuesto P₄-4, caracterizado como el ácido operculínico E metilado aislado de forma intacta en esta especie. Finalmente, la cromatografía de líquidos permitió purificar otros compuestos para sus futuros registros espectroscópicos y espectrométricos.

La espectroscopia de resonancia magnética nuclear (RMN) y la espectroscopía de masas (EM) fueron las técnicas analíticas más pertinentes para la identificación y caracterización de los compuestos purificados a nivel molecular. También, las diferentes técnicas en la resonancia magnética nuclear mono (^1H) y bidimensionales (COSY, TOCSY, HSQC Y HMBC) así como la espectroscopía de masas, fue de gran apoyo para la elucidación estructural del glicolípido mayoritario, el ácido glicosídico E metilado.

Se realizó la evaluación de citotoxicidad y modulación del compuesto P₆-1 presente en la especie *Ipomoea purpurea*. Este ensayo determinó la baja actividad citotóxica frente a las líneas celulares tumorales evaluadas como el requisito indispensable para el ensayo de modulación de citotoxicidad. El compuesto P₆-1 modulo moderadamente la citotoxicidad de las células de Cáncer resistentes a Vinblastina. Se recomienda continuar con la búsqueda de glicolípidos presentes en esta especie que reviertan con mayor potencial los efectos de la glicoproteína-P .

El presente trabajo de investigación describe el primer estudio químico de las resinas glicosídicas intactas de la especie *Ipomea purpurea* en el departamento del Huila, así como el empleo de estos compuestos como posibles alternativas para el tratamiento contra el cáncer.

10. Referencias

- Adolfoneda. (14 de Agosto de 2012). *Web Médica y Farmacia*. Recuperado el 8 de Octubre de 2017, de <http://adolfoneda.com/trifluoperazina/>
- Águila, J., Crombet, O., Villares, I., & Pons, R. (1998). Resistencia a Drogas Medida por la Glicoproteína P. *Hospital Provincial Clínicoquirúrgico Docente*, 3-5.
- Arias, H., López, A., Bernal, M., & Castaño, E. (2011). Caracterización Ecológica y Fitoquímica de la Batatilla *Ipomoea purpurea* L. ROTH (Solanales, Convolvulaceae) en el Municipio de Manizales. *Boletín Científico Centro de Museos Museo de Historia Natural*, 4-6.
- Arvelo, F., Merentes, E., & Cotte, C. (2000). Multidrug or Pleiotropic Resistance. *Universidad Central de Venezuela*, 5-7.
- Barneto, A. (2017). *Espectroscopia*. Valencia, España: Universitat de Valencia.
- Barquero, M. (1954). *Mecanismos y Aplicaciones de la Cromatografía Líquida de Alto Desempeño*. Costa Rica: Universidad de Costa Rica.
- Bredel, M., & Zentner, J. (2002). Brain-tumour drug resistance: the bare essentials. *Lancet Oncol*, 397-406.
- Cairns, J. (1981). *Cáncer: Ciencias y Sociedad*. Barcelona, España: Reverté.
- Campra, P. (2003). *Ácido gamma-linoléico, Distribución y Purificación a Partir de Nuevas Fuentes Vegetales*. Universidad de Almería, Departamento de Ingeniería Química. España: Universidad de Almería.
- Cancerología, I. N. (18 de Agosto de 2011). Obtenido de <http://infocancer.co>
- CancerQuest. (18 de Agosto de 2002). *CancerQuest*. Obtenido de https://www.cancerquest.org/es/biologia-del-cancer/desarrollo-del-cancer#footnote147_ontehbz
- Castañeda, A. (2011). *Modulación de la actividad de los fármacos antitumorales de uso convencional por fracciones de C. spinosa y P. alliacea*. Bogotá: Universidad Javeriana.
- Castañeda-Gómez, J., & Pereda-Miranda, R. (2011). Resin Glycosides from the Herbal Drug Jalap (*Ipomoea purga*). *Journal Natural Products*, 1148-1153.
- Castañeda-Gómez, J., Charry, P. A., & Pereda-Miranda, R. (2013). Empleo de Métodos Analíticos Modernos para el Aislamiento y la Identificación de Resinas Glicosídicas de la Familia Convolvulaceae. *Revista de Publicaciones de la Universidad del Quindío*, 2-3.
- Castañeda-Gómez, J., Figueroa-González, G., Jacobo, N., & Pereda-Miranda, R. (2012). Purgin II, a Resin Glycoside Ester-Type Dimer and Inhibitor of Multidrug Efflux Pumps from *Ipomoea purga*. *Journal of Natural Products*, 4-6.

- Castaño, E. (30 de Abril de 2013). *Lidia con Química*. Recuperado el 10 de Octubre de 2017, de Enseñanza y Divulgación de la Ciencia: <https://lidiakonlaquimica.wordpress.com/tag/detectores/>
- Chemocare. (15 de Febrero de 2012). *Chemocare*. Recuperado el 8 de Septiembre de 2017, de <http://chemocare.com/es/chemotherapy/what-is-chemotherapy/resistencia-a-la-quimioterapia.aspx>
- Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Figueroa-González, G., Mendoza-García, A., Lorence, A., & Pereda-Miranda, R. (2012). Mammalian Multidrug Resistance Lipopentasaccharide Inhibitors from Ipomoea alba Seeds. *Journal of Natural Products*, 1603-1611.
- Cruz-Morales, S., Castañeda-Gómez, J., Rosas-Ramírez, D., Fragoso-Serrano, M., Figueroa-González, G., Lorence, A., & Pereda-Miranda, R. (2016). Resin Glycosides from Ipomoea alba Seeds as Potential Chemosensitizers in Breast Carcinoma Cells. *Journal Natural Products*, 2-7.
- Díaz, A. R. (2009). *Aislamiento, purificación y caracterización estructural de glicolípidos presentes en fracciones de las resinas de Ipomoea intrapilosa ROSE*. Química. Santiago de Querétaro: Universidad de Querétaro.
- Dominguez, L., & Ruiz, J. (12 de Diciembre de 2007). *Nutrición, Cáncer y Envejecimiento*. Recuperado el 10 de Octubre de 2017, de <http://dietcan.net/docs/QUERCETINALabMerck.pdf>
- Erwyn, A., Sondag, R., & Burnham, R. (Octubre de 2013). *Climbers, Censusing Lianas in Mesic Biomes of Eastern Regions*. Obtenido de <http://climbers.lsa.umich.edu/wp-content/uploads/2013/07/IpompurpCONVFINAL>
- Eyzaguirre, J. (1974). *Química de los Hidratos de Carbono*. Santiago de Chile: Andrés Bello.
- Fernández, A., Mendiola, J., Monzole, L., García, M., Sariego, I., Acuña, D., . . . Gutiérrez, Y. (2009). Evaluación de la toxicidad de extractos de plantas cubanas con posible acción antiparacitaria utilizando larvas de Artemia salina. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 254-258.
- Figueroa, G. (2013). *Efecto de los oligosacáridos de las convolvuláceas sobre la modulación de la glicoproteína P en la células de mamíferos resistentes a fármacos antitumorales*. México: UNAM.
- Fundación para la Excelencia y la Calidad de la Oncología. (18 de Agosto de 2017).
- Gago, F. (28 de Noviembre de 2014). *Universidad de Alcalá*. Recuperado el 10 de Octubre de 2017, de Inmunomoduladores e inmunosupresores: http://www3.uah.es/farmamol/Public/PDF_files/Farma_4FG_T37-2013-14.pdf
- Gottesman, M. (2002). Mechanisms of Cancer Drug Resistance. *Annual Review Medicine*, 6-8.

- Hoffman, A. (2014). Cromatografía de Gases Acoplado a un Detector de Masas. *Revista de Química de la Universidad de México*, 5-6.
- Huerta, E. (2014). *Confrontando el Cáncer*. New York: CELEBRA.
- Hurley. (2012). DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 188-200.
- Ingraham, J. L., & Ingraham, C. A. (1998). *Introducción a la Microbiología*. España: Reverté S.A.
- Instituto Nacional de Cancerología. (Mayo de 2016). *Instituto Nacional de Cancerología*. Obtenido de <https://www.cancer.gov.co/files/libros/archivos/Anuario%20INC%202016-comprimido.pdf>
- Instituto Nacional del Cáncer. (01 de Agosto de 2017). *National Cancer Institute*. Obtenido de At the National Institutes of Health: <https://www.cancer.gov>
- Kaye, SB. (1998). New antimetabolites in cancer chemotherapy and their clinical impact. *British Journal of Cancer*, 1-7.
- Lagarto, A., Silva, R., Guerra, I., & Iglesias, L. (2001). Comparative study of the assay of Artemia salina L. and the estimate of medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 395-400.
- Linares, E. (2001). *Aproximación al Conocimiento de Bejucos de Colombia*. Bogotá, Colombia: Unibiblos.
- Lobaina, T., Rodriguez, C., & Zhurbenko, R. (2007). Caracterización de un extracto de Ipomoea batatas para ser utilizado en calidad de base nutritiva en medios de cultivo. *Revista Cubana de Medicina Tropical*, 4-7.
- Manzanero, G., Flores, A., Sandoval, E., & Bye, R. (2009). Etnobotánica de Siete Raíces Medicinales en el Mercado. *Polibotánica*, 6-8.
- Marchetti, M. L., Errecalde, J., & Mestorino, N. (2011). *Resistencia Bacteriana a los Antimicrobianos Ocasionado por Bombas de Eflujo. Impacto a la Multirresistencia*. Argentina: Universidad Nacional de La Plata.
- Medicinapertutti. (13 de Marzo de 2014). *El sitio del estudiante de Medicina y Cirugía*. Recuperado el 10 de Octubre de 2017, de <http://medicinapertutti.altervista.org/argomento/glicoproteina-p-o-atpasi-trasportatrice-di-farmaci/>
- Mehta, K., & Zahid, S. (2009). *Drug Resistance in Cancer Cells*. Texas: Springer.
- Miranda, A., & Martín, O. (2013). *Cromatografía Líquida*. Venezuela: Universidad Santa María.
- Nelson, D. L., & Cox, M. M. (2009). *Lehninger: Principios de Bioquímica* (Quinta ed.). Barcelona, España: Omega S.A.

- Ono, M., Ueguchi, T., Murata, H., Kawasaki, T., & Miyahara, K. (Diciembre de 1992). Resin Glycosides. XVI Marubajalapins I-VII, New Ether-Soluble Resin Glycosides from *Pharbitis purpurea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 3169-3173.
- Orfila, E. N., & D'Alfonso, C. O. (1995). Flora del Valle de Lerma. *Aportes Botánicos de Salta*, 4-7.
- Organización Mundial de la Salud. (18 de Agosto de 2017). Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/Prevenciondel-cancer.aspx>
- Osorio, N., Charry, P., Rios-Vásquez, E., & Castañeda-Gómez, J. (2018). Ácidos orgánicos constitutivos de las resinas glicosídicas de tres especies de *Ipomoea* (Convolvulaceae). *ION*, 55-58.
- Paredes, A., Blanco, C., & Echenique, M. (2005). Expresión de proteínas relacionadas con resistencia a múltiples drogas (MDR-proteínas) en el cáncer de pulmón. *Oncología*, 378-393.
- Partanen, T., Monge, P., & Wesseling, C. (2009). Causas y prevención del cáncer ocupacional. *Acta Médica Costarricense*, 195-205.
- Pereda Miranda, R., Rosas Ramírez, D., & Castañeda Gómez, J. (2010). In Progress in the Chemistry of Organic Natural Products. *Springer Verlag: New York*, 77-152.
- Plummer, D. (1994). *Introducción a la Bioquímica Práctica*. Barcelona: Universidad de Barcelona.
- Rahman, A. (2013). *Studies in Natural Products Chemistry*. Pakistan: ELSEVIER.
- Sánchez, P., & Benitez, L. (2006). Procesos Biomoleculares De la Resistencia a Drogas . *Cancerología 1*, 2-4.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., . . . Boyd, M. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82:1107-1112.
- Sociedad Española de Oncología Médica. (18 de Agosto de 2017). *SEOM*.
- Trejo-Ginez, N. (2016). *Evaluación de la citotoxicidad, modulación y posible mecanismo de acción de compuestos de origen vegetal*. CD. México: Universidad Nacional de México.
- Universidad Autónoma de Madrid. (1 de Febreo de 2012). *Fármacos Inmunoreguladores*. Recuperado el 8 de Octubre de 2017, de https://www.uam.es/departamentos/medicina/farmacologia/especifica/F_General/FG_T76.pdf
- Universidad Nacional del Nordeste. (1998). *Hipertextos del Área de Biología*. Recuperado el 28 de Agosto de 2017, de <http://www.biologia.edu.ar/>

- Varela, S. (2002). *El Cáncer: Epidemiología, Etiología, Diagnostico y Prevención*. Madrid, España: Harcourt S.A.
- Vázquez, M., Bye, R., Lauro, L., Pulido, M., McClung, E., & Koch, S. (2014). Entobotánica de la Cultura Teotihuacan. *Botanical Sciences*, 3-5.
- Vega, G. B. (2008). Inminología para el Médico General, La respuesta Inmune. *Medigraphic Artemisa*, 1-3.
- Verde , M., García, S., & Rivas, C. (2016). *Metodología Científica para el Estudio de Plantas Medicinales*. Nuevo León, México: Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de León.
- Vibrans, H. (11 de Octubre de 2009). *Conabio Mex*. Obtenido de <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/convolvulaceae/ipomoea-purpurea/fichas/ficha.htm>
- Villeda, W. (2006). *Purificación de glicolípidos de interés agrícola y medicinal a partir de la planta Ipomoea tricolor CAV*. Química. Santiago de Querétaro: Universidad Autónoma de Querétaro.

11. Apéndice

11.1 Estancia de Investigación a la Universidad Nacional Autónoma de México (México) del 19 de junio al 09 de julio del 2019.

11.2 Artículos generados por el presente proyecto de investigación:

Huertas-Beltrán J, Castañeda-Gómez J y Muñoz-Losada J. (2018). *Evaluación de la toxicidad de los extractos de Ipomoea purpurea (Convolvulaceae) sobre Artemia salina*. Educación y Ciencia. Universidad Tecnológica y Pedagógica de Colombia. ISSN 0120-7105. Número 21-2018.

11.3 Trabajos presentados en Congresos modalidad oral y poster:

XIV Encuentro Departamental de Semilleros de Investigación. Lugar: Corporación Unificada Nacional de Educación Superior – CUN, Neiva, Huila. Modalidad: Ponencia Oral. 24 al 25 de mayo de 2018.

VI Congreso Nacional de Investigación en Educación en Ciencias y Tecnología y III Encuentro de Licenciaturas en Ciencias Naturales. Lugar: Universidad Tecnológica y Pedagógica de Colombia, Tunja, Boyacá. Modalidad: Ponencia Oral. 22 al 24 de agosto de 2018.

XXI Encuentro Nacional y XV Internacional de Semilleros de Investigación. Lugar: Universidad Cooperativa de Colombia, San Juan de Pasto, Nariño. Modalidad: Poster. 11 al 14 de octubre de 2018.

I Encuentro Regional Sobre Saberes Disciplinarios, Pedagógicos y Didácticos de las Ciencias Naturales y la Educación Ambiental. Lugar: Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila. Modalidad: Ponencia Oral. 17 al 19 de octubre de 2018.

II Jornada de Investigación CIECE – Facultad de Educación. Lugar: Universidad Surcolombiana, Neiva, Huila. Modalidad: Ponencia Oral. 07 de Febrero de 2019.

VII Seminario Internacional de Química Aplicada para la Amazonia y II Escuela Andina Amazónica de Química. Universidad de la Amazonia-Florencia (Caquetá) del 07 al 11 de octubre de 2019.

1. Anexos

1.1. Cromatogramas

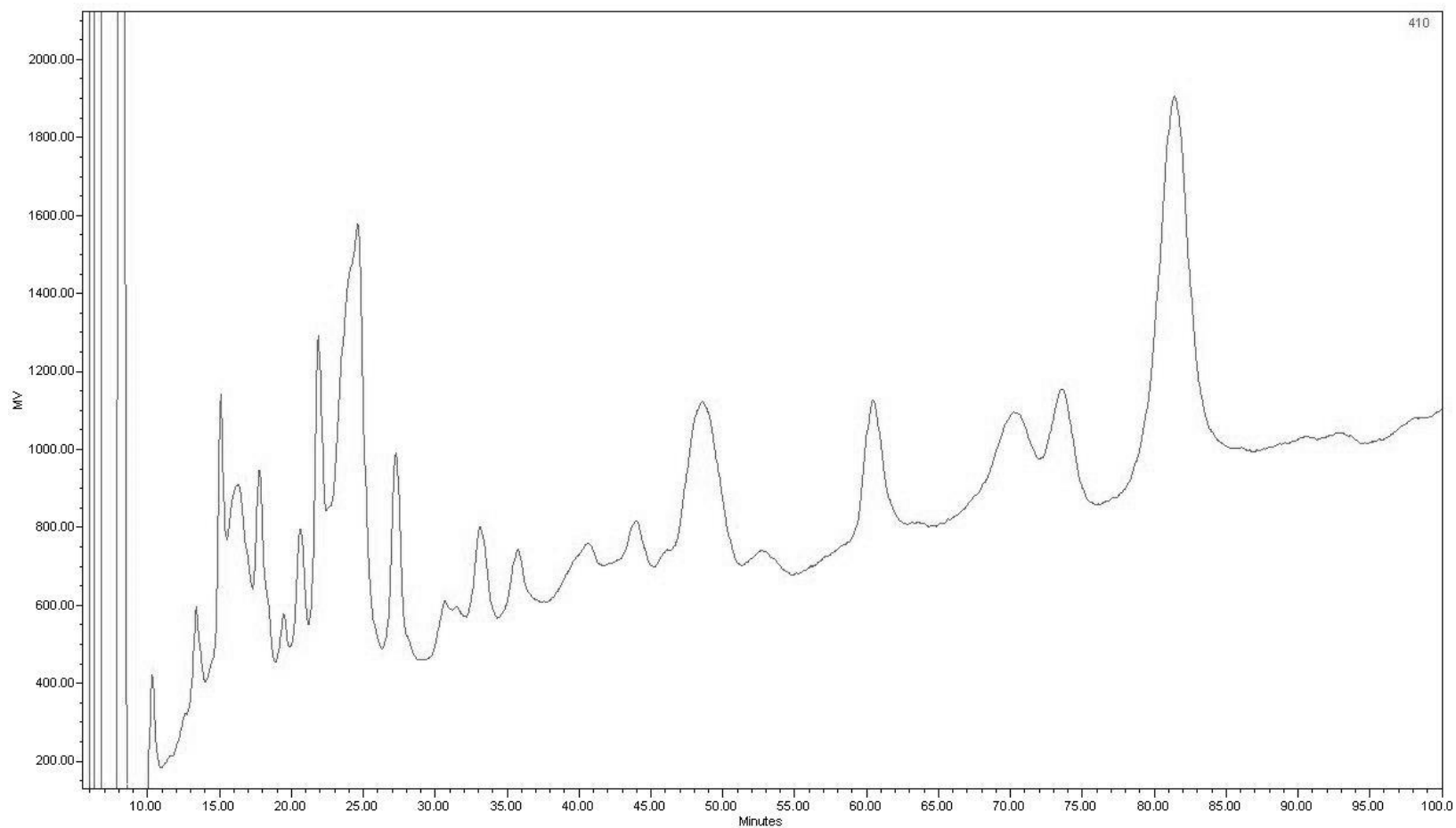


Figura 1. Perfil cromatográfico a escala analítica de la Fracción A (hexánico). Fase móvil: AcN-H₂O (9:1). Flujo: 0,4 mL/min. Columna C₁₈ (4,6 x 250 mm). Volumen de inyección: 20 µL. Concentración: 1 mg / 20 µL.

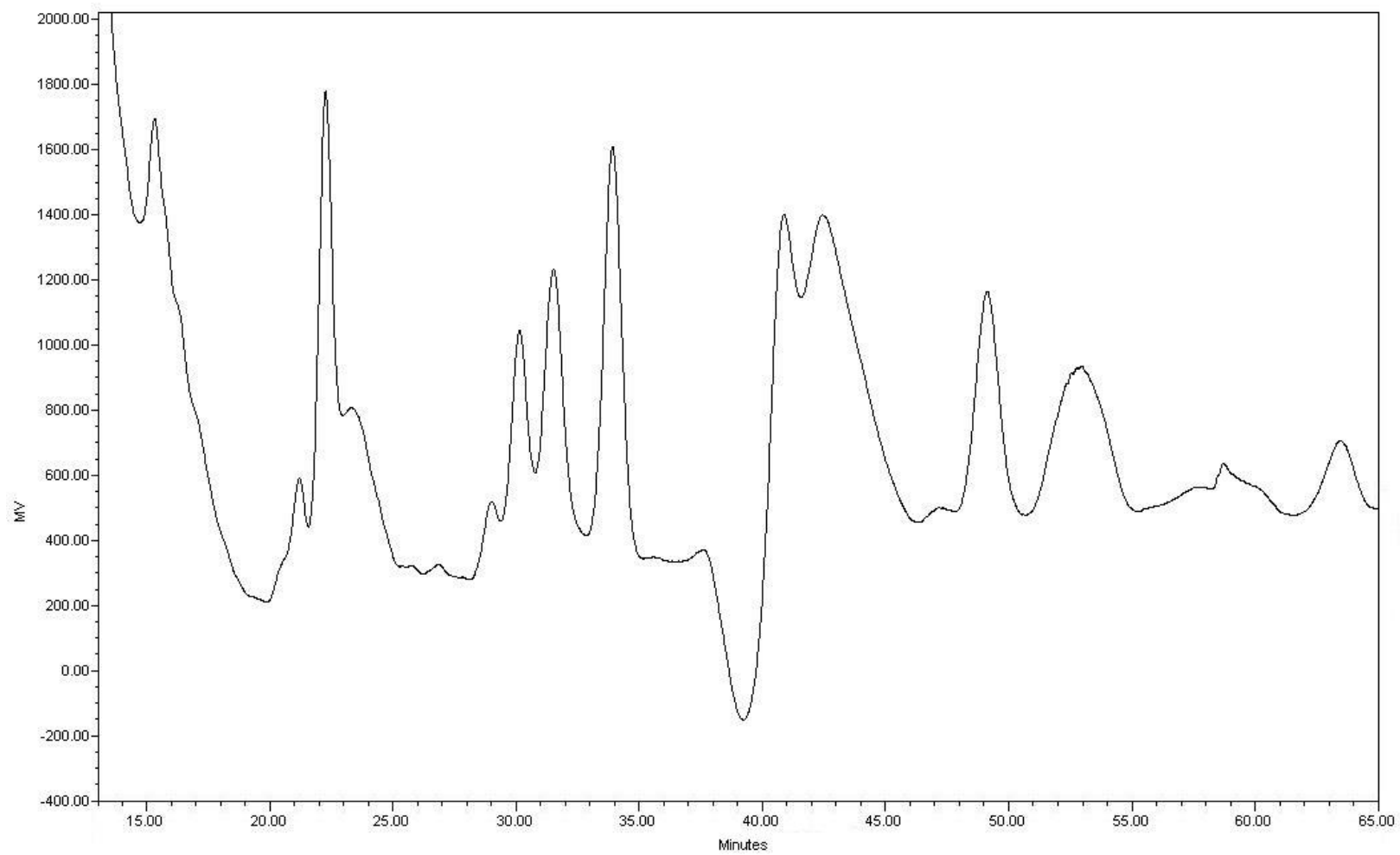


Figura 2. Perfil cromatográfico a escala analítica de la Fracción A (hexánico). Fase móvil: MeOH-H₂O (9:1). Flujo:0,4 mL/min. Columna C₁₈ (4,6 x 250 mm). Volumen de inyección: 20 µL. Concentración: 1 mg / 20 µL.

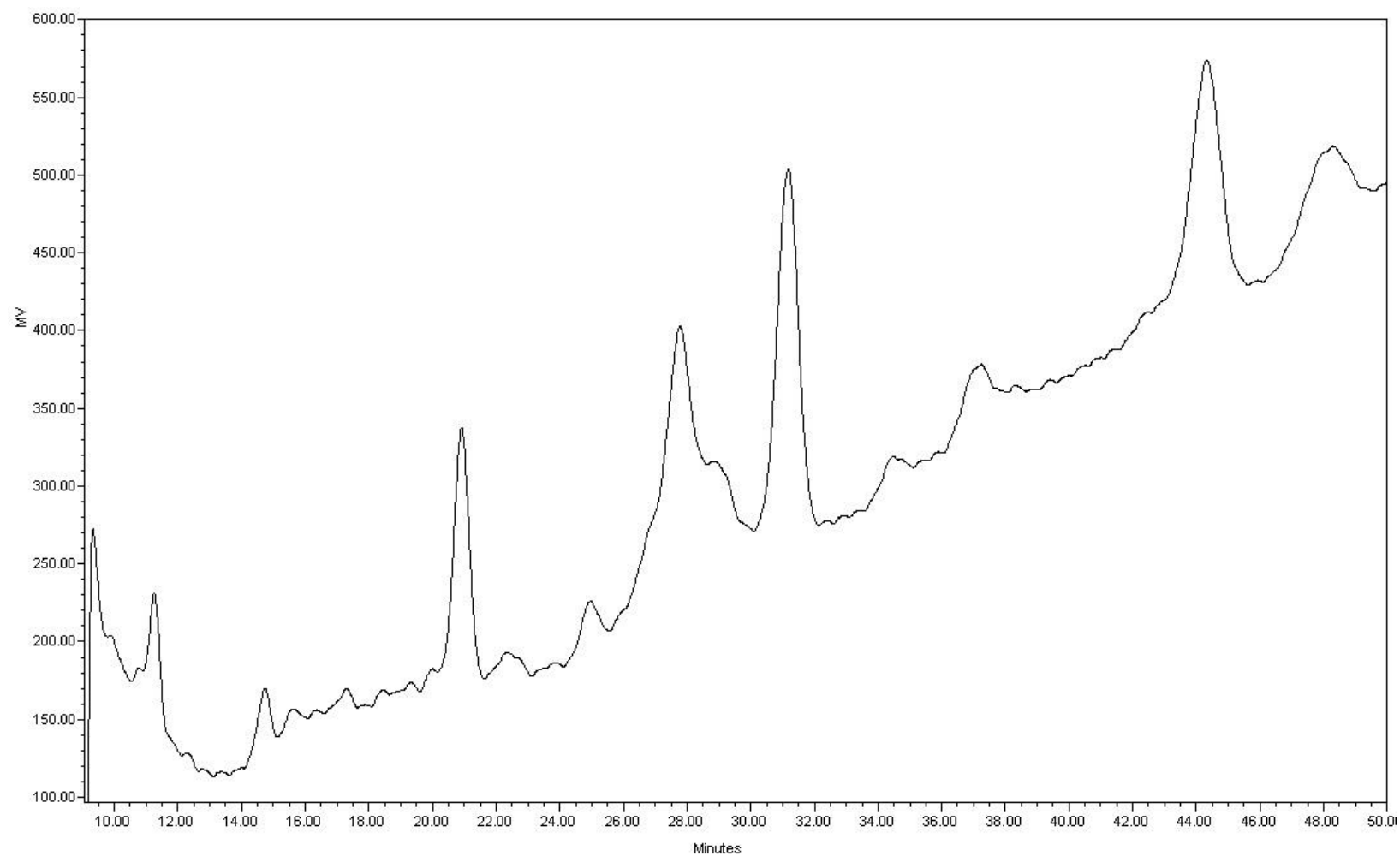


Figura 3. Perfil cromatográfico a escala analítica de la Fracción B (clorofórmico). Fase móvil: MeOH-H₂O (9:1). Flujo:0,4 mL/min. Columna C₁₈ (4,6 x 250 mm). Volumen de inyección: 20 µL. Concentración: 1 mg / 20 µL.

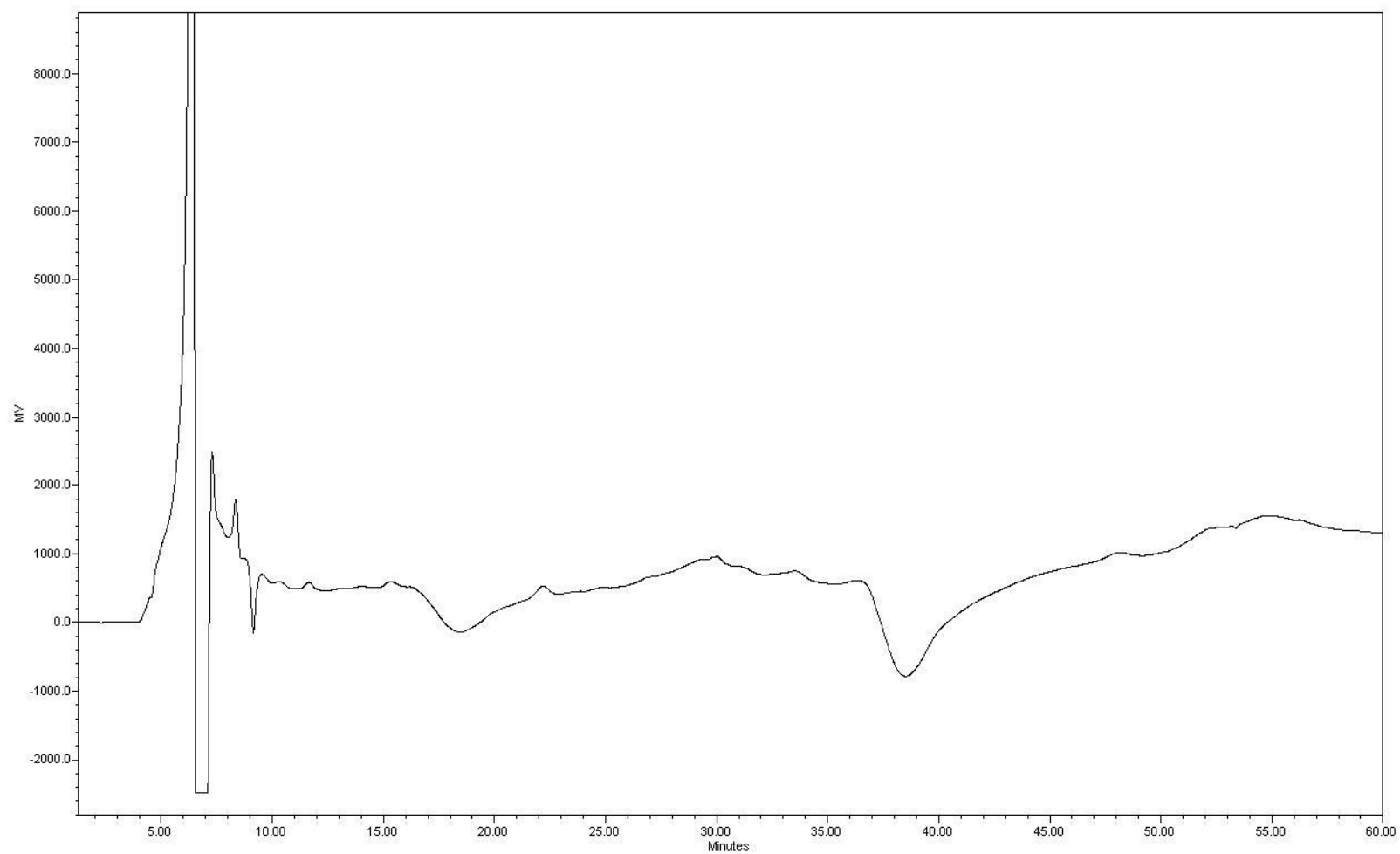


Figura 4. Perfil cromatográfico a escala analítica de la Fracción C (metanólico). Fase móvil: AcN-H₂O (9:1). Flujo:0,4 mL/min. Columna C₁₈ (4,6 x 250 mm). Volumen de inyección: 20 µL. Concentración: 1 mg / 20 µL.

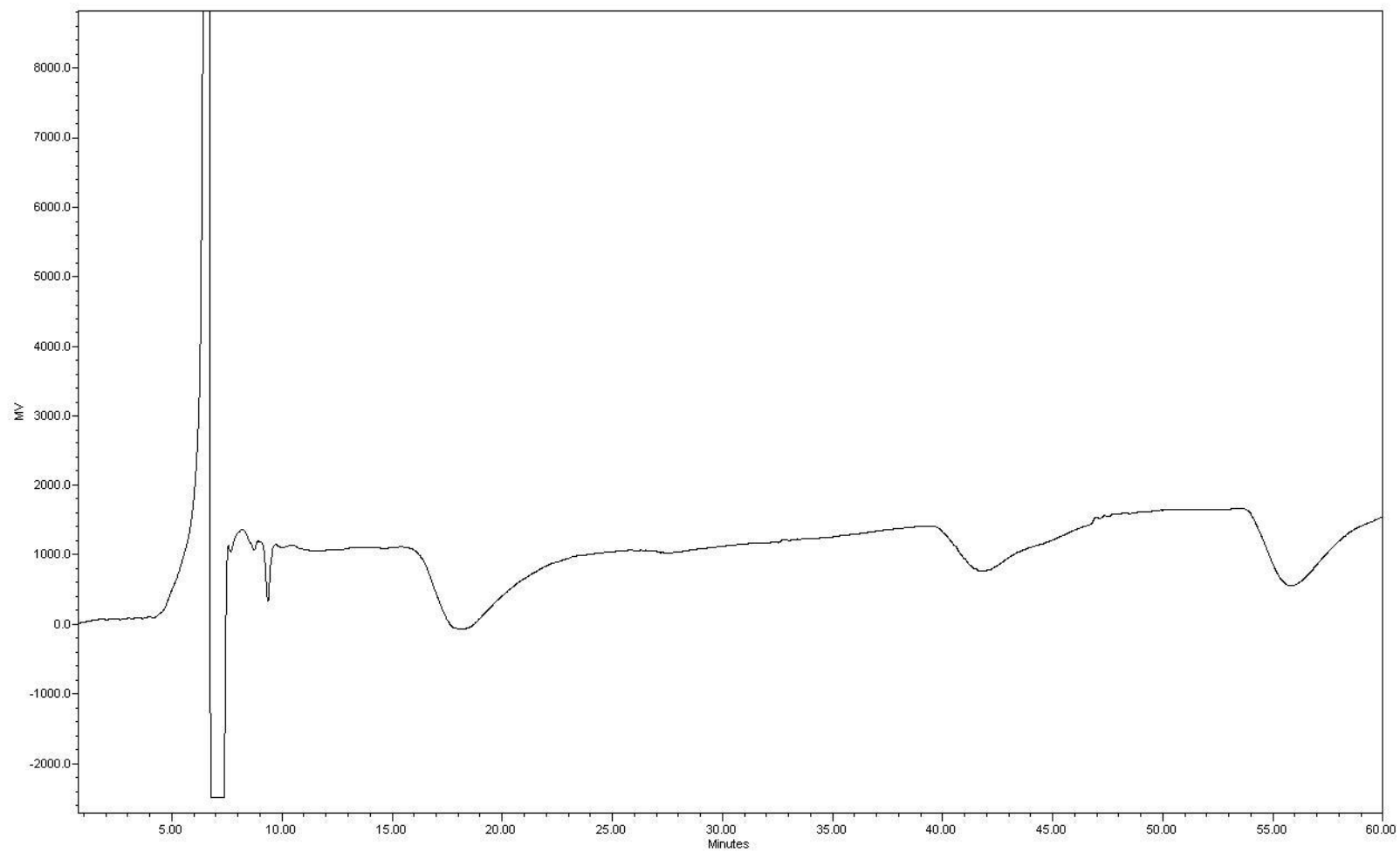


Figura 5. Perfil cromatográfico a escala analítica de la Fracción D (metanólico). Fase móvil: AcN-H₂O (9:1). Flujo:0,4 mL/min. Columna C₁₈ (4,6 x 250 mm). Volumen de inyección: 20 µL. Concentración: 1 mg / 20 µL.

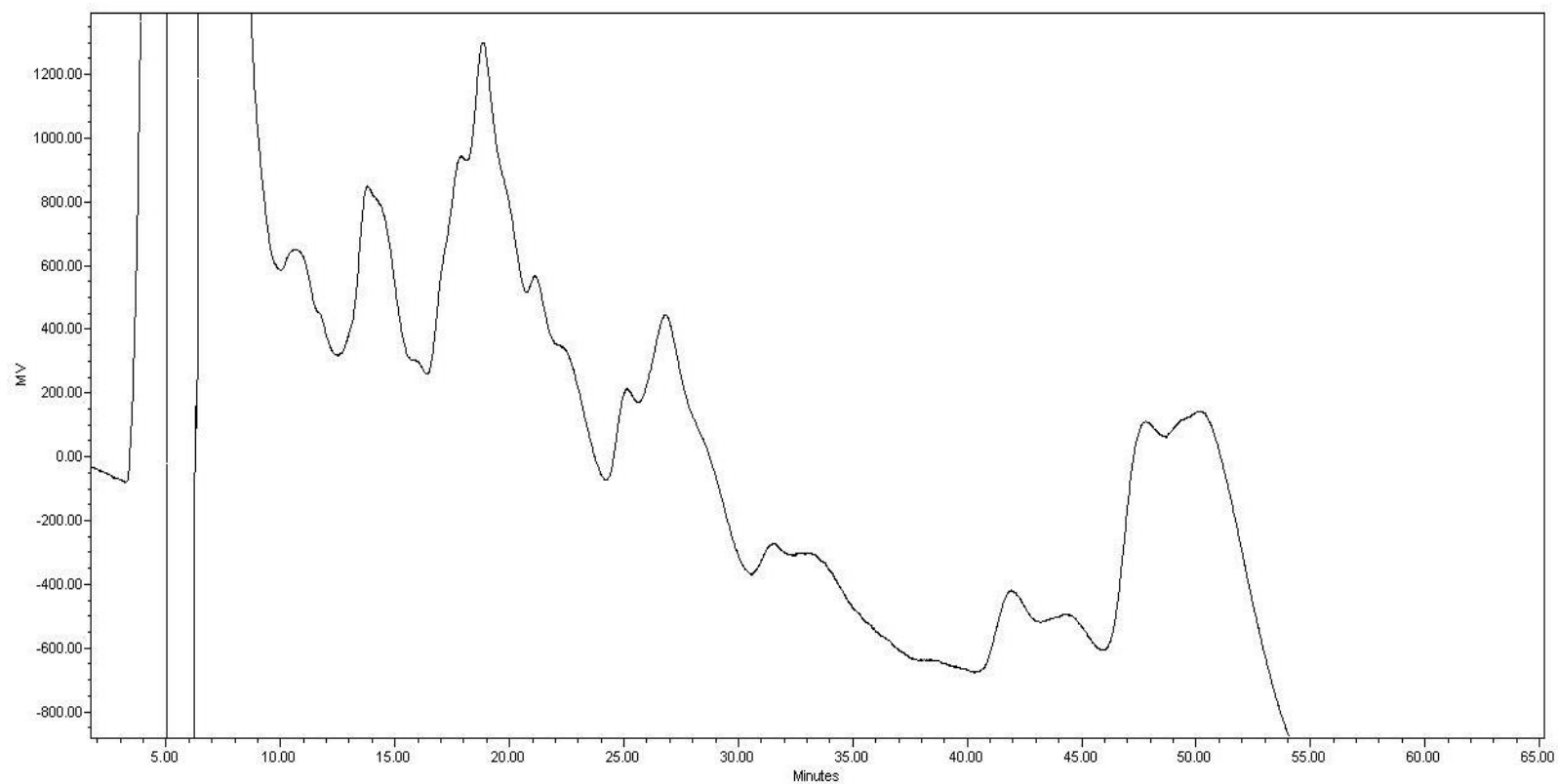


Figura 6. Perfil cromatográfico a escala semipreparativa de la Fracción A (hexánico). Fase móvil: MeOH-H₂O (9:1). Flujo: 4 mL/min. Columna C₁₈ (19 x 150 mm). Volumen de inyección: 500 µL. Concentración: 50 mg / 500 µL.

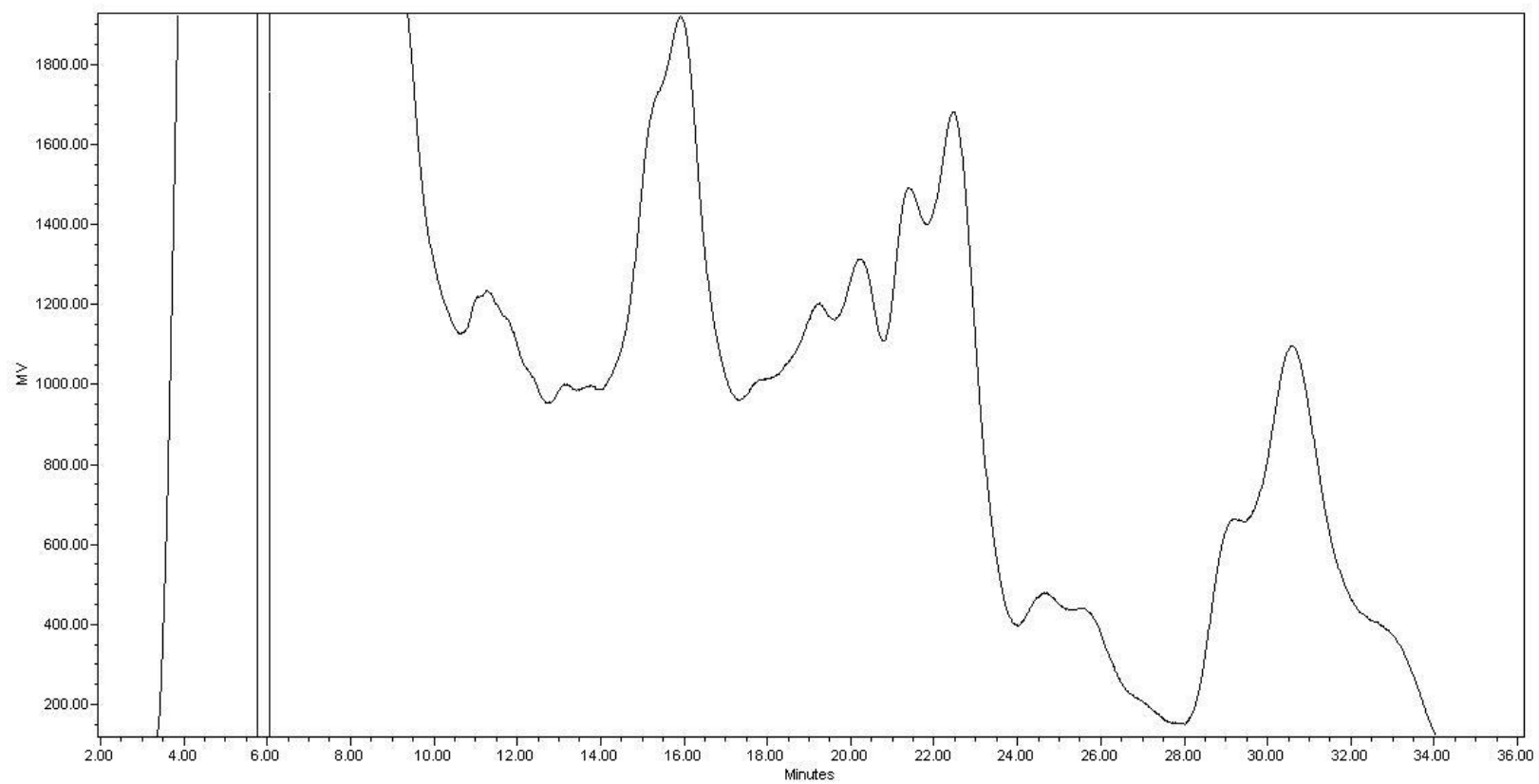


Figura 7. Perfil cromatográfico a escala semipreparativa de la Fracción B (clorofórmico). Fase móvil: MeOH-H₂O (9:1). Flujo: 4 mL/min. Columna C₁₈ (19 x 150 mm). Volumen de inyección: 500 µL. Concentración: 50 mg / 500 µL.

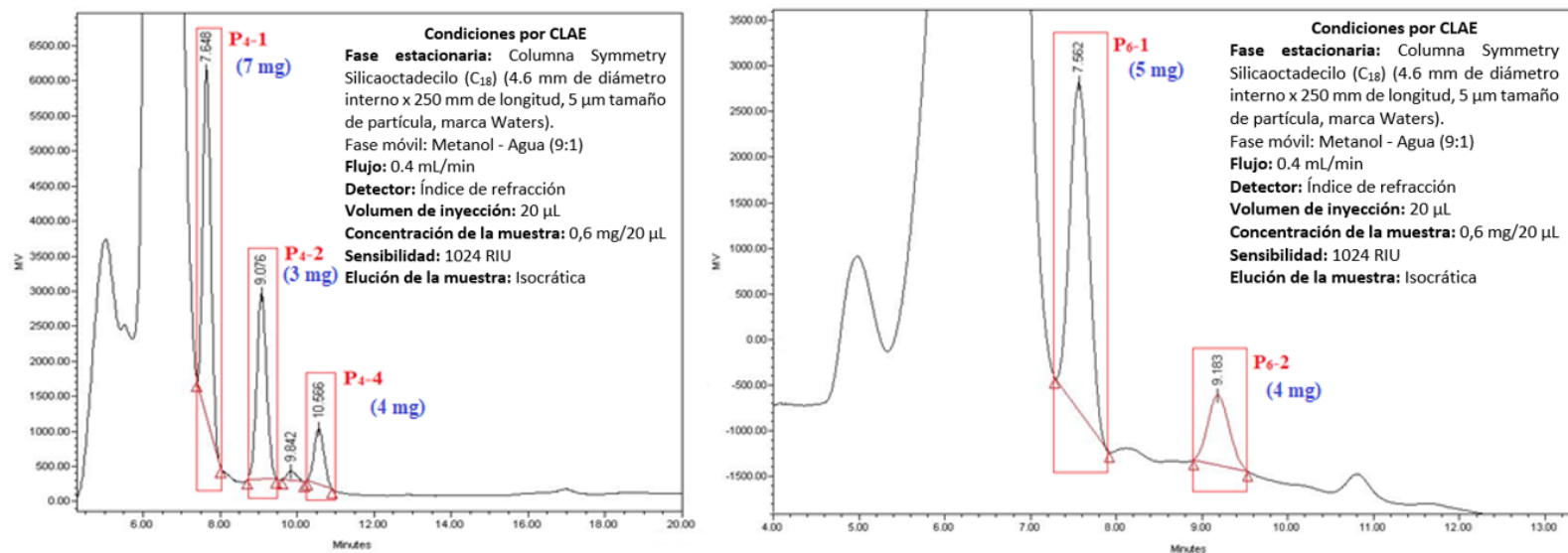


Figura 8. Perfil cromatográfico a escala analítica de la Fracción A (hexano). Fase móvil: MeOH-H₂O (9:1). Flujo:0,4 mL/min. Columna C₁₈ (4,6 x 250 mm). Volumen de inyección: 20 µL. Concentración: 1 mg / 20 µL.