



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO**

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

DESARROLLO Y VALIDACIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO PARA LA CUANTIFICACIÓN  
MEDIANTE HPLC-MS DE LOS ÁCIDOS GLICOSÍDICOS CONSTITUTIVOS MAYORITARIOS DE LAS  
RESINAS GLICOSÍDICAS DE *Operculina hamiltonii*

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

M. en C. MARÍA EMMA MONTIEL AYALA

TUTOR PRICIPAL:

DR. ROGELIO G. PEREDA MIRANDA  
FACULTAD DE QUÍMICA, DEPTO. DE FARMACIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CIUDAD DE MÉXICO, MAYO DE 2023



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## **JURADO ASIGNADO**

### **Presidente**

Dr. Eduardo Guillermo Delgado Lamas

### **Vocal**

Dr. Carlos Martín Cerda García Rojas

### **Vocal**

Dr. José Federico del Río Portilla

### **Vocal**

Dra. Helgi Helen Francisca Jung Cook

### **Secretario**

Dra. Blanca Estela Rivero Cruz

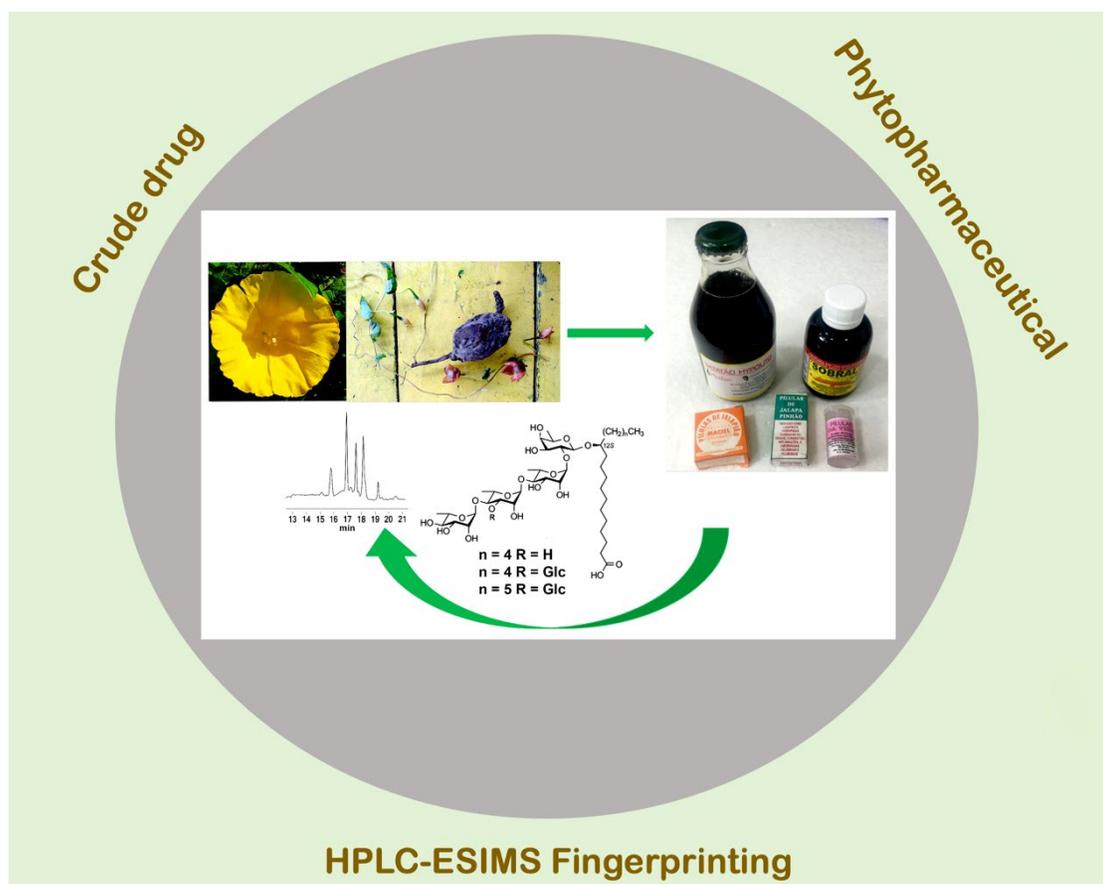
Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia, Laboratorio 123, Conjunto E, Facultad de Química.

Universidad Nacional Autónoma de México

**Los resultados de este trabajo se publicaron parcialmente en:**

Montiel-Ayala, M.E., Jiménez-Bárceñas, N.R., Castañeda-Gómez, J., Moreno-Velasco, A., Lira-Ricárdez J., Fragoso-Serrano, M., Leitão, S.G., Pereda-Miranda, R. (2021). Glycosidic Acid Content from the Roots of *Operculina hamiltonii* (Brazilian Jalap) and Some of Their Phytopharmaceuticals with Purgative Activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. **31**, 698–708 <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00190-1>



Asimismo, se presentaron en:

M. E. Montiel Ayala, M. Fragoso Serrano, S. Guimarães Leitão, R. Pereda Miranda. Contenido de resinas glicosídicas en raíces de *Operculina hamiltonii* (jalapa brasileña) y algunos productos herbolarios con actividad purgante. 17a Reunión Internacional de Investigación en Productos Naturales. Monterrey, Nuevo León, 18-20 de mayo de 2022.

---

# AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por brindarme la oportunidad de formar parte de esta gran comunidad y poner a mi alcance las herramientas necesarias para continuar con mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CB220535) por el financiamiento parcial de la investigación y la beca otorgada (CVU: 815602) durante el periodo correspondiente a febrero 2019 – enero 2023.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (IN202123) por el financiamiento parcial de esta investigación.

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

A la Dra. Mabel Fragoso Serrano por su invaluable ayuda brindada a lo largo de la realización del presente trabajo de investigación.

Al personal de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, USAII Facultad de Química) por los servicios prestado, en forma especial, a la Q.F.B. Margarita Guzmán Villanueva por su apoyo para la obtención de los cromatogramas generados mediante la técnica de HPLC-ESIMS.

A los miembros del jurado quienes, con observaciones objetivas y asertivas, contribuyeron al enriquecimiento de este escrito.

---

## RESUMEN

Diversos productos herbolarios preparados a partir de la droga cruda o de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa, popularmente conocida en el norte y noreste del territorio brasileño como “*batata-de-purga*”, “*jalapa*” y “*batatão*”, se utilizan como remedios purgantes; dicha actividad se debe a su contenido de glicolípidos o resinas glicosídicas, como sucede con otras especies de la familia Convolvulaceae, por ejemplo, las raíces de las jalapas mexicanas. Estos principios activos son los responsables de la acción farmacológica de todas las especies más representativas de esta familia, utilizadas en la medicina tradicional alrededor del mundo. El efecto catártico de estas drogas se debe al aumento en los movimientos peristálticos provocados en el intestino delgado; algunos de estos compuestos han sido evaluados en diversos bioensayos, encaminados a la identificación de principios activos como agentes moduladores de la resistencia a los antibióticos y fármacos antineoplásicos.

La tintura de *O. hamiltonii*, conocida como “tintura de jalapa”, se usa para tratar la constipación intestinal y el accidente vascular encefálico. Esta tintura tiene un bajo costo, así como diversas presentaciones y se utiliza ampliamente, en forma indiscriminada, por personas con estreñimiento. En los mercados municipales y en diversos establecimientos herbolarios se ofrecen para su comercialización desde tubérculos -drogas crudas intactas, en rodajas o pulverizados-, hasta formulaciones hidroalcohólicas y comprimidos, elaboradas en algunos casos por laboratorios farmacéuticos establecidos. Es por lo anterior, que surge la necesidad de validar un método analítico enfocado al control de calidad de estos preparados fitofarmacéuticos.

En el presente trabajo, se plantea el desarrollo y validación de un método analítico mediante HPLC-ESIMS para la cuantificación del contenido de resinas glicosídicas en productos herbolarios elaborados a partir de la raíz de jalapa brasileña (*O. hamiltonii*), mismo que pueda ser considerado en procesos de control de calidad de preparados farmacéuticos constituidos por oligosacáridos o glicoconjugados. En este contexto, se verificó la efectividad de la secuencia de reacciones que incluyeron la hidrólisis básica (saponificación) seguida de la peracetilación de los extractos totales para la identificación cualitativa y cuantitativa de los marcadores químicos que están representados por los ácidos glicosídicos distintivos para la droga cruda.

---

## ABSTRACT

Various herbal products prepared from the crude drug or glycosidic resins of the jalap root, popularly known in the north and northeast of the Brazilian territory as "*batata-de-purga*", "*jalapa*" and "*batatão*", are used as purgative remedies. This activity is due to its content of glycolipids or resin glycosides, as is the case with other species of the Convolvulaceae family, for example, the roots of the Mexican jalaps. These active ingredients are responsible for the pharmacological action of all the representative species of this family used in traditional medicine around the world. The cathartic effect of these drugs is due to the increase in peristaltic movements provoked in the small intestine. Some of these compounds have been evaluated in various bioassays, aimed at identifying active ingredients as modulating agents of resistance to antibiotics and antineoplastic drugs.

The tincture of *Operculina hamiltonii*, known as "jalap tincture," in Brazil is used to treat intestinal constipation and stroke. This tincture has a low cost, as well as various commercial presentations and is widely used, indiscriminately, by people with constipation. In municipal markets and in various herbal establishments, everything from tubers – intact, sliced or powdered crude drugs – to hydroalcoholic formulations and pills, made in some cases by established pharmaceutical laboratories, are offered for commercialization. It is for this reason that the need arises to validate an analytical method focused on the quality control of these phytopharmaceutical preparations. In the present work, the development and validation of an analytical method using HPLC-ESIMS for the quantification of the content of glycosidic resins in herbal products made with the Brazilian jalap root (*O. hamiltonii*) is presented, which can be considered in other quality control processes of pharmaceutical preparations consisting of oligosaccharides or glycoconjugates.

In this context, the effectiveness for the sequence of reactions that included a basic hydrolysis (saponification) followed by peracetylation of total extracts, for the qualitative and quantitative identification of the chemical markers that were represented by the distinctive glycosidic acid cores for the crude drug, was verified.

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>ANTECEDENTES</b> .....	<b>4</b>
<b>Familia Convolvulaceae y el género operculina</b> .....	<b>4</b>
Generalidades de las convolvuláceas .....	4
El género <i>Operculina</i> Silva Manso, morfología.....	5
<b>Historia de la raíz de jalapa</b> .....	<b>8</b>
<b>Raíz de jalapa brasileña</b> .....	<b>10</b>
<b><i>Operculina hamiltonii</i></b> .....	<b>13</b>
Descripción botánica .....	13
Taxonomía, sinonimia y nombres vernáculos.....	13
Ubicación geográfica.....	16
Usos etnomedicinales y medicamentos fitoterápicos.....	17
<b>Principios activos</b> .....	<b>18</b>
<b>Actividad purgante de las resinas glicosídicas</b> .....	<b>20</b>
<b>Identificación de plantas medicinales y control de calidad</b> .....	<b>21</b>
Descripción organoléptica, macroscópica y microscópica.....	23
Ensayos químicos y Métodos espectroscópicos .....	25
Métodos cromatográficos .....	29
Técnicas espectroscópicas .....	30
Ensayos genéticos: código de barras .....	32
<b>Validación de métodos analíticos</b> .....	<b>34</b>
Método analítico .....	34
Organismos regulatorios .....	34

NIST ( <i>National Institute of Standards and Technology</i> ) .....	34
FDA ( <i>Food and Drug Administration</i> ).....	35
ICH ( <i>International Conference on Harmonisation Guidelines</i> ).....	35
ISO ( <i>International Organization for Standardization</i> ) .....	36
IUPAC ( <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> ) .....	37
Farmacopeas.....	37
FEUM (Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos).....	38
Farmacopea de Brasil.....	38
Clasificación de los métodos de validación.....	39
Parámetros de validación.....	40
Contenido o potencia.....	40
Límite .....	40
Identificación.....	41
Evaluación de un procedimiento analítico.....	42
Estándares y materiales botánicos de referencia .....	42
Especificidad.....	42
Linealidad.....	42
Exactitud .....	43
Precisión .....	43
Límite de detección .....	44
Límite de cuantificación .....	44
Rango.....	44
Robustez .....	44
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>45</b>
<b>Objetivo General .....</b>	<b>45</b>
<b>Objetivos Específicos.....</b>	<b>45</b>
<b>METODOLOGÍA.....</b>	<b>46</b>

<b>Material vegetal y productos comerciales .....</b>	<b>46</b>
Material botánico de referencia .....	46
Material vegetal para purificación de estándares .....	47
Fitofármacos comerciales.....	47
<b>Obtención de extractos.....</b>	<b>48</b>
<b>Tratamiento de las muestras comerciales.....</b>	<b>48</b>
<b>Derivatización de las muestras.....</b>	<b>48</b>
Hidrólisis básica.....	48
Peracetilación.....	49
<b>Estándares .....</b>	<b>49</b>
Análisis cualitativo (HPLC-índice de refracción) .....	49
Purificación de estándares (HPLC-DAD).....	50
<b>Desarrollo del método analítico.....</b>	<b>50</b>
<b>Validación del método analítico .....</b>	<b>51</b>
Disoluciones stock.....	51
Evaluación del sistema.....	51
Adecuabilidad (idoneidad) y precisión.....	51
Linealidad.....	51
Validación del método.....	52
Exactitud y recobro .....	52
Precisión intermedia y repetibilidad .....	53
<b>Cuantificación .....</b>	<b>53</b>
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>54</b>
<b>Extractos totales y derivatización.....</b>	<b>55</b>

<b>Derivatización de las muestras comerciales .....</b>	<b>55</b>
<b>Desarrollo del método analítico.....</b>	<b>56</b>
Aislamiento y purificación de estándares.....	57
<b>Evaluación del sistema .....</b>	<b>58</b>
Análisis cualitativo mediante HPLC-ESIMS: especificidad .....	58
Adecuabilidad (idoneidad) y precisión.....	66
Linealidad.....	68
Ácido operculínico A.....	68
Ácido operculínico B.....	76
<b>Evaluación del método.....</b>	<b>82</b>
Exactitud y recobro .....	82
Repetibilidad y precisión intermedia .....	86
Cuantificación en muestras comerciales.....	88
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>91</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO A. Registro ANVISA del producto Tintura de Jalapa Sobral ®.....</b>	<b>93</b>
<b>ANEXO B. Fichas informativas de productos comerciales .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>98</b>
<b>ARTÍCULO PUBLICADO .....</b>	<b>105</b>

---

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Parámetros de desempeño que integran los diferentes protocolos de validación.....	41
<b>Cuadro 2.</b> Productos comerciales que se analizaron de forma cualitativa y cuantitativa.....	47
<b>Cuadro 3.</b> Sistemas de trabajo a partir de una disolución stock 80 ppm de ácido operculínico A, peracetilado.....	52
<b>Cuadro 4.</b> Sistemas de trabajo a partir de una disolución stock 210 ppm de ácido operculínico B, peracetilado.....	52
<b>Cuadro 5.</b> Cantidades iniciales de cada una de las muestras comerciales analizadas, así como de sus productos de derivatización (hidrólisis básica y peracetilación).....	55
<b>Cuadro 6.</b> Relación de valores de m/z obtenida en HPLC-ESIMS para cada eluato registrado del material botánico de referencia de <i>O. hamiltonii</i> .....	59
<b>Cuadro 7.</b> Estudio de la adecuabilidad de los sistemas de cuantificación para los productos de peracetilación de los ácidos operculínicos A y B.....	66
<b>Cuadro 8.</b> Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad del sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado. ....	70
<b>Cuadro 9.</b> Valores ajustados y residuales para la evaluación de linealidad del sistema. ....	71
<b>Cuadro 10.</b> Análisis de varianza, correspondiente al ácido operculínico A, peracetilado. ....	75
<b>Cuadro 11.</b> Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad del sistema correspondiente al ácido operculínico B peracetilado. ....	77
<b>Cuadro 12.</b> Valores ajustados y residuales para la evaluación de linealidad del sistema. ....	77
<b>Cuadro 13.</b> Análisis de varianza, correspondiente al ácido operculínico B, peracetilado. ....	81
<b>Cuadro 14.</b> Porcentajes de recobro para el ácido operculínico A peracetilado.....	82

<b>Cuadro 15.</b> Porcentajes de recobro para el ácido operculínico B peracetilado.....	83
<b>Cuadro 16.</b> Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad, correspondiente al ácido operculínico A peracetilado. ....	84
<b>Cuadro 17.</b> Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad, correspondiente al ácido operculínico B peracetilado.....	84
<b>Cuadro 18.</b> Resumen de la evaluación de bondad de ajuste en la linealidad del método para ambos analitos .....	84
<b>Cuadro 19.</b> Evaluación de repetibilidad del método de cuantificación para el ácido operculínico A peracetilado. ....	86
<b>Cuadro 20.</b> Evaluación de repetibilidad del método de cuantificación para el ácido operculínico B peracetilado. ....	87
<b>Cuadro 21.</b> Evaluación de precisión intermedia para el ácido operculínico A peracetilado.....	87
<b>Cuadro 22.</b> Evaluación de precisión intermedia para el ácido operculínico B peracetilado.....	88
<b>Cuadro 23.</b> Cuantificación del ácido operculínico A peracetilado en las muestras comerciales analizadas.....	88
<b>Cuadro 24.</b> Cuantificación del ácido operculínico B peracetilado en las muestras comerciales analizadas.....	89

---

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Crecimiento típico de las enredaderas con tallos volubles de la familia Convolvulaceae. .....	4
<b>Figura 2.</b> Distribución global del género <i>Operculina</i> Silva Manso..	5
<b>Figura 3.</b> Etapas de desarrollo de frutos del género <i>Operculina</i> .....	6
<b>Figura 4.</b> Hábitos, morfología y micromorfología floral del género <i>Operculina</i> Silva Manso.....	7
<b>Figura 5.</b> Las mujeres conocidas como <i>Ticitl temixihuiani</i> . Imágenes extraídas del Códice Florentino.....	9
<b>Figura 6.</b> Monografía de la auténtica jalapa, <i>Ipomoea purga</i> , en la cual se muestra de manera esquemática su morfología, misma que incluye el detalle de la raíz tuberosa, considerada como la droga vegetal .....	10
<b>Figura 7.</b> Mapa de distribución de la Jalapa de Brasil, <i>O. macrocarpa</i> .....	12
<b>Figura 8.</b> <i>Operculina hamiltonii</i> en fotografías. Tubérculo, hojas y fruto (A), flor (B), fruto seco con opérculo cerrado conteniendo semillas (C).....	14
<b>Figura 9.</b> Mapa de distribución de <i>O. hamiltonii</i> var. <i>hamiltonii</i> (cuadros negros) y <i>O. hamiltonii</i> var. <i>mucronata</i> (triángulo rojo).....	16
<b>Figura 10.</b> Raíz de jalapa brasileña: droga cruda, polvos y productos fitofarmacéuticos .....	17
<b>Figura 11.</b> Estructura química de los ácidos macrocarposídicos A-C, principios activos de la <i>Operculina macrocarpa</i> .....	18
<b>Figura 12.</b> Estructura química de los ácidos operculínicos A-F, principios marcadores de las jalapas brasileñas. ....	19

<b>Figura 13.</b> Diarrea inducida en ratas por administración de una mezcla de resinas glicosídicas de las semillas de <i>Ipomoea nil</i> .....	20
<b>Figura 14.</b> Características anatómicas microscópicas de la raíz de <i>Operculina macrocarpa</i> (L.) Urban.....	24
<b>Figura 15.</b> Ilustración de <i>Hydrastis canadensis</i> L. Ranunculaceae.....	26
<b>Figura 16.</b> Ilustración de <i>Ginkgo biloba</i> L., Ginkgoaceae.....	28
<b>Figura 17.</b> Resumen de un ensayo típico de código de barras de ADN de una planta medicinal. ....	33
<b>Figura 18.</b> Material botánico de referencia a partir del cual se obtuvo el extracto principal que se utilizó para el aislamiento y la caracterización de los ácidos operculínicos mayoritarios de la especie <i>O. hamiltonii</i> . ....	46
<b>Figura 19.</b> Cromatograma HPLC-RI a nivel preparativo del extracto derivatizado del material botánico de referencia, en que se indican los ácidos glicosídicos mayoritarios que fueron caracterizados.....	56
<b>Figura 20.</b> Cromatograma HPLC-PDA ( $\lambda = 215 \text{ nm}$ ), obtenido de una muestra auténtica de <i>O. hamiltonii</i> que contiene los ácidos operculínicos A y B, con tiempos de retención $t_R$ 13.4 min y $t_R$ 15.8 min, respectivamente (A). Cromatograma HPLC-RI de la misma muestra, bajo las mismas condiciones de trabajo (B).....	57
<b>Figura 21.</b> Cromatogramas HPLC-ESIMS del producto de peracetilación de los ácidos glicosídicos contenidos en el material botánico de referencia de <i>O. hamiltonii</i> (A), así como el correspondiente al material crudo Sobral (B), a partir del cual se purificaron los ácidos operculínicos A y B. ....	60
<b>Figura 22.</b> Espectros de masas por elctroespray para el ácido operculínico A con valores de $m/z$ para el catión fragmento diagnóstico ( $m/z$ 280) y para los aductos de la molécula catiónica $[M + Na]^+$ ( $m/z$ 1545) y $[M + Na + 2H_2O]^+$ ( $m/z$ 1581) y generados por el eluato de $t_R = 16.9$ min. ....	61

<b>Figura 23.</b> Espectros de masas por elctrospray para el ácido operculínico B con valores de $m/z$ para el catión fragmento diagnóstico ( $m/z$ 254) y para los aductos de la molécula catiónica $[M + Na]^+$ ( $m/z$ 1603) y $[M + Na + 2H_2O]^+$ ( $m/z$ 1639) y generados por el eluato de $t_R = 15.8$ min. ....	62
<b>Figura 24.</b> Cromatogramas para las muestras de la raíz jalapa brasileña registradas por HPLC-ESI-MS.....	63
<b>Figura 25.</b> Espectros de masas por electrospray para el ácido operculínico H con valores de $m/z$ para el catión fragmento diagnóstico ( $m/z$ 1011) generado por el eluato de $t_R = 14.25$ min.....	64
<b>Figura 26.</b> Cromatogramas en HPLC-ESI-MS de las muestras comerciales de la raíz de jalapa brasileña.....	65
<b>Figura 27.</b> Linealidad del sistema desarrollado para la cuantificación del ácido operculínico A peracetilado.....	69
<b>Figura 28.</b> Gráfico de la probabilidad normal de los valores residuales del sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado.....	72
<b>Figura 29.</b> Gráfico de la probabilidad normal de las respuestas analíticas que conforman el sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado.....	73
<b>Figura 30.</b> Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de las observaciones...	74
<b>Figura 31.</b> Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de los valores ajustados. ....	74
<b>Figura 32.</b> Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de la concentración. ....	75
<b>Figura 33.</b> Linealidad del sistema desarrollado para la cuantificación del ácido operculínico B peracetilado.....	76
<b>Figura 34.</b> Gráfico de la probabilidad normal de los valores residuales del sistema correspondiente al ácido operculínico B peracetilado.....	78

<b>Figura 35.</b> Gráfico de la probabilidad normal de las respuestas analíticas que conforman el sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado. ....	79
<b>Figura 36.</b> Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de las observaciones...	80
<b>Figura 37.</b> Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de los valores ajustados. ....	80
<b>Figura 38.</b> Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de la concentración. ....	81
<b>Figura 39.</b> Linealidad y exactitud del método de cuantificación para el ácido operculínico A ..	85
<b>Figura 40.</b> Linealidad y exactitud del método de cuantificación para el ácido operculínico B ...	85

---

# INTRODUCCIÓN

Desde sus orígenes, el ser humano se encontró con la necesidad de utilizar los diversos elementos de la naturaleza para su beneficio; en especial, las plantas medicinales. La necesidad por la búsqueda de medicamentos de origen natural es tan extensa entre todos los asentamientos humanos que se considera como un comportamiento evolutivo propio de nuestra especie. Existe una abundante evidencia en nuestro pasado paleolítico (3.4 millones de años) y prehistórico posterior, de la supervivencia de individuos después de enfermedades periodontales, traumas y tratamientos médicos invasivos que incluyen trepanaciones y amputaciones, que sugiere un conocimiento detallado y aplicado de los metabolitos secundarios de plantas medicinales.<sup>1</sup> Con el tiempo, el hombre clasificó y ordenó dichos elementos según el uso que hacía de ellos (alimentarios, medicinales, tóxicos, ritualistas, entre otros). En esta clasificación, el uso medicinal de las plantas adquirió una gran importancia hasta la época reciente; según la Organización Mundial de la Salud, alrededor del 80% de la población mundial utiliza la medicina tradicional para atender las necesidades primarias de asistencia médica, así como complemento a su medicación habitual.<sup>2</sup>

Numerosas investigaciones científicas han demostrado claramente la eficacia terapéutica de las plantas a lo largo del tiempo y muchos países usan plantas para tratar diferentes enfermedades, incluidas las infecciosas de los sistemas respiratorio, gastrointestinal, urinario y biliar, entre otros;<sup>3</sup> por lo que la medicina tradicional es una fuente importante de compuestos novedosos, potencialmente útiles para el desarrollo de agentes terapéuticos. El primer paso hacia este objetivo es la identificación de plantas utilizadas en la medicina popular;<sup>3,4</sup> tal es el caso de la familia Convolvulaceae [del latín *convolvere*; entrelazar o envolver, en referencia al crecimiento de dichas plantas],<sup>4</sup> de la cual una centena de glicolípidos o resinas glicosídicas han sido aislados a partir de los diferentes géneros que la componen, siendo estos los principios activos responsables de la acción farmacológica de las especies más representativas de esta familia.<sup>5,6,7</sup> Las resinas glicosídicas se clasifican en dos grupos, de acuerdo a su solubilidad en éter: jalapina (soluble) y convolvulina (insoluble). Estas resinas son una mezcla de ácidos glicosídicos que corresponden a metabolitos secundarios de origen biosintético mixto de alto peso molecular, elevada complejidad estructural y carácter anfipático: con una parte hidrofóbica, la aglicona, y

una hidrofílica, el núcleo oligosacárido. Estos compuestos exhiben diversas actividades farmacológicas, tales como citotoxicidad, reversión de la resistencia a múltiples fármacos en células microbianas y tumorales humanas, así como efectos en el sistema nervioso central, entre otras.<sup>5,8</sup>

Diversos productos herbolarios preparados a partir de la droga cruda o de las resinas glicosídicas de la raíz de jalapa, popularmente conocida en el norte y noreste del territorio brasileño como “batata de purga”, “jalapa” y “batatão”, se utilizan como remedios purgantes; dicha actividad se debe a su contenido de resinas glicosídicas, como sucede con otras especies de la familia Convolvulaceae, por ejemplo, las raíces de las jalapas mexicanas.<sup>9</sup> Estos principios activos son los responsables de la acción farmacológica de todas las especies más representativas de esta familia, utilizadas en la medicina tradicional alrededor del mundo. El efecto catártico de estas drogas se debe al aumento en los movimientos peristálticos provocados en el intestino delgado; algunos de estos compuestos han sido evaluados en diversos bioensayos, encaminados a la identificación de agentes antifúngicos específicos y al establecimiento de su potencial citotóxico y antimicrobiano, entre otros.<sup>10</sup>

La tintura de Jalapa, con indicación terapéutica como laxante, es el insumo farmacéutico activo vegetal (IFAV) del fitoterápico Tintura de Jalapa Sobral ®, único producto registrado en la Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria de Brasil (ANVISA) que contiene jalapa y se encuentra en la categoría de Producto Tradicional Fitoterápico del Área 1 (medicamentos), distribuido en farmacias de todo Brasil; cada mililitro del extracto hidroalcohólico de la raíz (tintura) contiene de quince a diecinueve miligramos de resinas glicosídicas (ver **Anexo A**). Por otro lado, en los mercados municipales y diversos establecimientos herbolarios se comercializan drogas crudas completas –tubérculos completos, en rodajas o pulverizados–, hasta formulaciones hidroalcohólicas y píldoras, elaboradas en algunos casos por laboratorios farmacéuticos establecidos. Varios jarabes de hierbas medicinales que contienen Jalapa de purga son conocidos como “aguardiente alemán” y vendidos como remedios de Batatão Hypólito, Tiro Seguro y aguardiente alemán Santa Fe, son indicados tradicionalmente para el tratamiento de la indigestión estomacal, problemas circulatorios, trastornos hepáticos y del bazo, parálisis facial, así como para manos, piernas y brazos temblorosos y como depurativo sanguíneo. Los

comprimidos tienen una presentación simple sin etiquetas, en pequeños envases plásticos y/o de cartón que contienen tabletas, que parecen haber sido moldeadas a mano; algunos envases contienen sólo el nombre del producto, el fabricante o la forma de uso, otros también contienen la composición.

En este contexto, el presente trabajo surge de la necesidad de desarrollar y validar un método analítico enfocado al control de calidad de estos preparados fitofarmacéuticos; el estudio se realizó mediante HPLC-ESIMS y, de este modo, se llevó a cabo la cuantificación del contenido de dos de los ácidos glicosídicos mayoritarios en productos herbolarios presuntamente elaborados a partir de la raíz de jalapa brasileña (*O. hamiltonii*).

## FAMILIA CONVULVULACEAE Y EL GÉNERO OPERCULINA

### GENERALIDADES DE LAS CONVULVULÁCEAS

Las plantas de la familia Convolvulaceae son enredaderas herbáceas o leñosas principalmente, aunque también se conocen arbustos y árboles; en términos generales, los miembros de esta familia son de tallos volubles, pero sin zarcillos y su distribución es cosmopolita, pues estos taxones tienen una amplia distribución en gran parte del mundo.<sup>11</sup> Su nombre proviene del latín *convolvere*, que significa entrelazar o envolver, término que hace referencia a la forma en la que dichas plantas suelen crecer (**Fig. 1**), pues necesitan una superficie de apoyo para su desarrollo; sus tallos son dextrosos, pues éstos se entrelazan hacia la derecha -en el sentido de las agujas del reloj-, como las ranuras de un tornillo "diestro" típico.<sup>12</sup> Un aspecto fitoquímico a destacar de esta familia, es que cuentan con células secretoras de resinas glicosídicas en semillas, raíces tuberosas, así como en los tejidos foliares y florales; dichas resinas tienen un alto impacto en el campo de la etnomedicina mundial, debido a su actividad purgante.

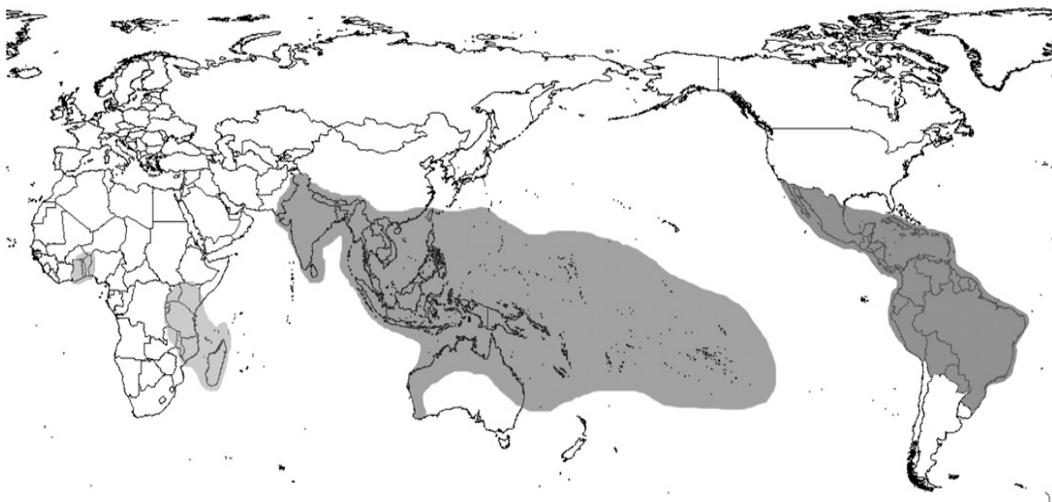


**FIGURA 1.** Crecimiento típico de las enredaderas con tallos volubles de la familia Convolvulaceae.

Esta familia está compuesta por 58 géneros y cerca de 1800 especies<sup>7,13</sup> y tiene mayor diversidad en las regiones tropicales/subtropicales de todo el mundo; generalmente, no se encuentra en latitudes más altas<sup>7</sup>, aunque algunos géneros se diseminan en regiones templadas, como *Convolvulus*, *Calystegia* e *Ipomoea*. Al menos 15 géneros y aproximadamente 217 especies se encuentran en México, mismas que comprenden seis de las mundialmente conocidas como “*morning glories*”. El aislamiento de México desde el Paleoceno, así como sus climas variados, ha dado origen a un alto grado de endemismo, especialmente a nivel de subgéneros y especies respecto a otros países.<sup>14</sup> En el caso de Brasil, más de 400 especies son conocidas, pertenecientes a 24 géneros. En cuanto al número de especies y la variación morfológica, el género *Ipomoea* es el más diverso: cerca de 150 son conocidas, de las cuales, más de un tercio de ellas son endémicas y se encuentran en diferentes tipos de vegetación.<sup>15</sup>

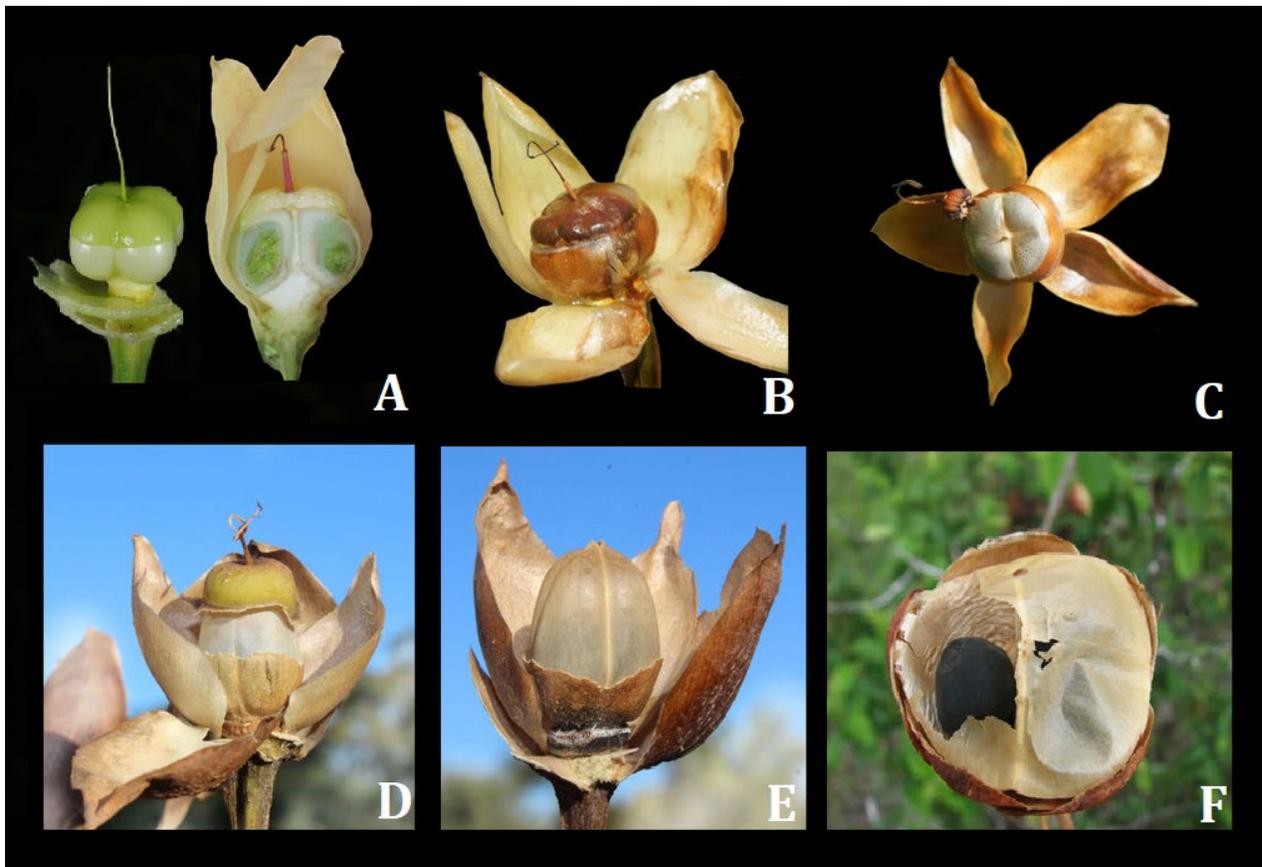
### **EL GÉNERO *OPERCULINA* SILVA MANSO, MORFOLOGÍA**

Perteneciente también a la familia convolvulaceae, el género *Operculina* se considera relativamente pequeño, pues está compuesto por trece especies, de acuerdo con la monografía realizada por Staples, Austin y Simões en el año 2020, entre las cuales se incluye una variante y un supuesto híbrido; estos taxones se encuentran distribuidos globalmente en los trópicos y subtrópicos, tal como se muestra en la **Fig. 2**.



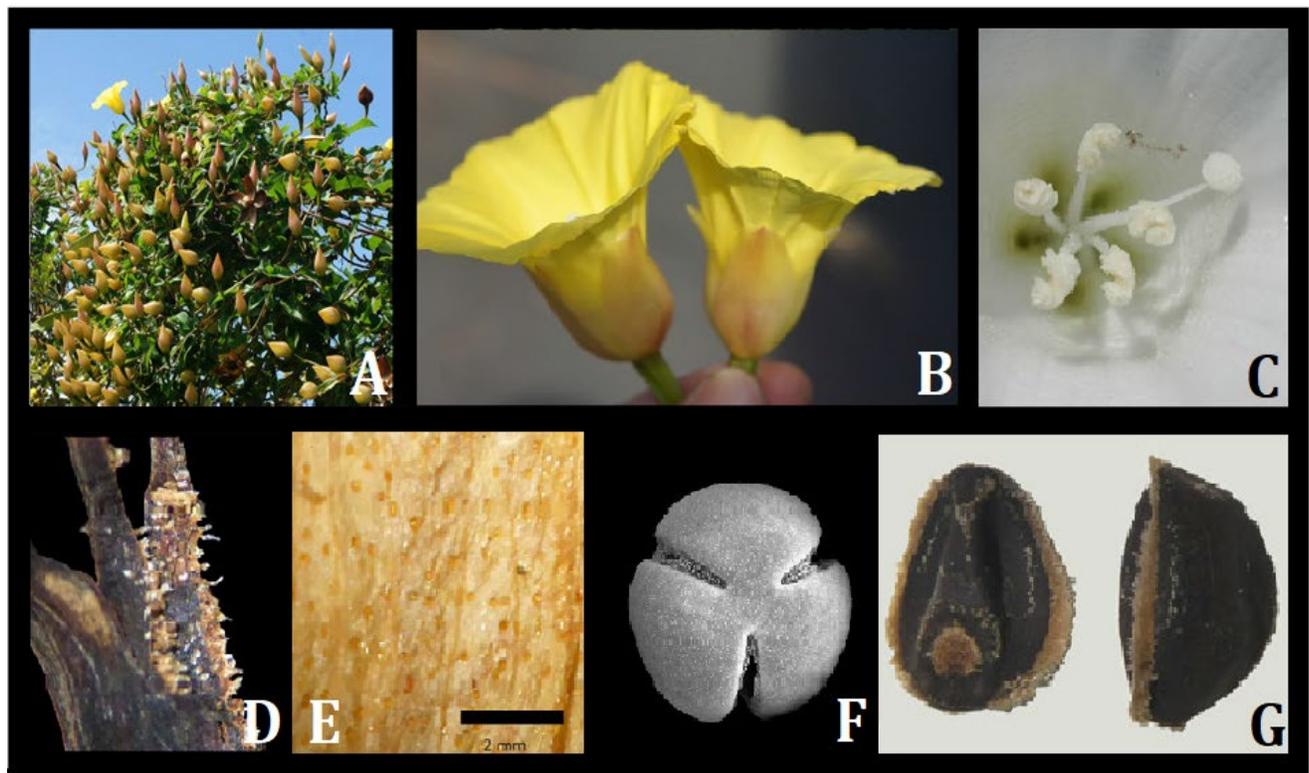
**FIGURA 2.** Distribución global del género *Operculina* Silva Manso. La zona de sombreado oscuro, indica la distribución natural de especies; el sombreado claro, refiere las poblaciones en que se introdujo la especie *O. macrocarpa*.

Anteriormente, este género se incluía en la tribu *Merremieae* D.F. Austin; sin embargo, estudios filogenéticos establecen que el género *Operculina* es monofilético, pues estas especies cuentan con una cápsula operculada, descrita como una capa coriácea y decidua en el ápice del fruto que le da una estructura carnosa a los frutos inmaduros, lo que las hace perfectamente diferenciables, además de tener sépalos largos que forman un cáliz en “forma de pera” y corolas pubescentes.<sup>16,17</sup> Cuando el fruto es inmaduro, muestra el opérculo *in situ* como base del estilo y sépalos apesados en el fruto (**Fig. 3A**); cercano a su madurez, conserva *in situ* su opérculo y estilo, comenzando el proceso de separación sobre la línea de abscisión (**Fig. 3B**). Cuando el fruto se encuentra maduro, el cáliz se desplaza a 90° del pedicelo, su opérculo es dehiscente y las semillas se encuentran contenidas en endocarpio (**Fig. 3C**); mientras el proceso de dehiscencia del fruto avanza, el opérculo se separa cada vez más, hasta desprenderse en su totalidad (**Fig. 3D-E**). Por último, el opérculo se desprende en su totalidad, el cáliz encierra firmemente el fruto, el endocarpio se fragmenta y las semillas salen a la superficie (**Fig. 3F**).



**FIGURA 3.** Etapas de desarrollo de frutos del género *Operculina* (*O. hamiltonii*; A-C y *O. pteripes*; D-F).

Las especies pertenecientes al género *Operculina*, al igual que otras convolvuláceas, son plantas leñosas, sin zarcillos e inflorescencias compuestas de unidades cimosas, que llevan flores con corolas simpétalas radialmente simétricas. Utilizan plantas, árboles o alguna superficie para trepar, enredando sus tallos; cuando no cuentan con un soporte, éstas crecen como enredaderas postradas (**Fig. 4A**). La mayoría son perennes y anuales; sin embargo, algunas de ellas no cuentan con registros sobre sus hábitos o duración. Las flores son campanuladas, con sépalos aprehendidos al tubo de la corola y la elongación del cáliz depende de la especie (**Fig. 4B**); el color de la corola es diferente para cada especie. Los estambres y pistilos con anteras en espiral dehiscentes (**Fig. 4C**). En cuanto a caracteres florales micromorfológicos, poseen indumentos densos y puntos glandulares en el exterior de la corola (**Fig. 4D**), así como pelos glandulares en la base de los filamentos (**Fig. 4E**); granos de polen tri o hexazonocolpados (**Fig. 4F**) y semillas glabras con tricomas de coloración marrón-dorada en los bordes (**Fig. 4G**).



**FIGURA 4.** Hábitos, morfología y micromorfología floral del género *Operculina* Silva Manso. (*O. hamiltonii*, A-B; *O. turpethum*, C y E; *O. riedeliana*, D y G; *O. pteripes*, F).

## HISTORIA DE LA RAÍZ DE JALAPA

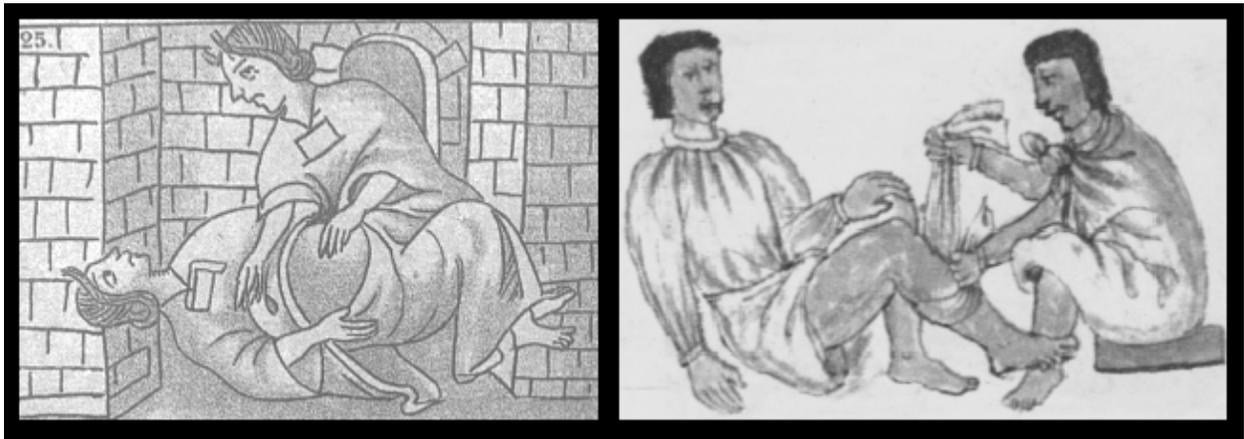
Al llegar los españoles a México en abril de 1519, encontraron un sistema médico náhuatl integral, que contaba con el conocimiento de diversas enfermedades y su tratamiento. Los frailes franciscanos de la época colonial sabían que en Tenochtitlán existió una estructura de salud bien establecida; en este contexto, la *ticiotl* (medicina) era ejercida por el *tícitl* (*titicih*, en plural), quien poseía el conocimiento necesario para diagnosticar enfermedades, así como en el uso y manejo de hierbas, raíces, árboles y minerales necesarios para el tratamiento de numerosos padecimientos conocidos en su época y de acuerdo con su cosmovisión.<sup>18,19</sup> El término *tícitl* se utilizó para toda persona que practicaba la medicina y se sabe que entre ellos se catalogaban en diversas especialidades médicas; sin embargo, se desconoce cuántas actividades existían o si cualquier *tícitl* podía llevarlas a cabo en caso de ser necesario.<sup>20</sup> Hombres y mujeres ejercían la medicina por igual, transmitiendo sus conocimientos de generación en generación, pues eran oficios familiares; incluso, algunas mujeres se especializaban en numerosas actividades, tal como quedó plasmado en el Códice Florentino (**Fig. 5**).<sup>21</sup>

La taxonomía de las plantas fue de gran utilidad en el ámbito etnomedicinal náhuatl, por lo que se necesitó un especialista en plantas, el *panamacani*, quien sabía dónde, cuándo y cómo colectarlas, las partes de la planta que se consideraban como la droga vegetal y los diferentes métodos de preparación de las sustancias medicamentosas. Estos personajes quienes, de acuerdo a sus creencias religiosas, tenían la protección de *Tzapotlatenan* (deidad descubridora de los medicamentos), distribuían y comerciaban plantas en los mercados (*tianquiztli*) de grandes ciudades, como Tenochtitlan, donde tenían puestos llamados *pacalli-panamacoyan*.<sup>22,23</sup> Al entrar en el ámbito mágico-religioso, se sabe que los métodos mágicos usados eran sólo complementarios a los tratamientos medicinales; el *paini*, conocido como “quien bebe purga”, era hábil en el uso de drogas psicotrópicas para viajar al mundo de los dioses e indagar las causas de las enfermedades de sus pacientes.<sup>24</sup>

El uso de sustancias laxantes en Mesoamérica era una práctica común, debido a la idea de que les era posible alcanzar la “purificación del cuerpo” por medio de su consumo. Los remedios purgantes, conocidos por los aztecas bajo el nombre de “*cacamotli tlanquiloni*”, “*caxtlatlapan*” o

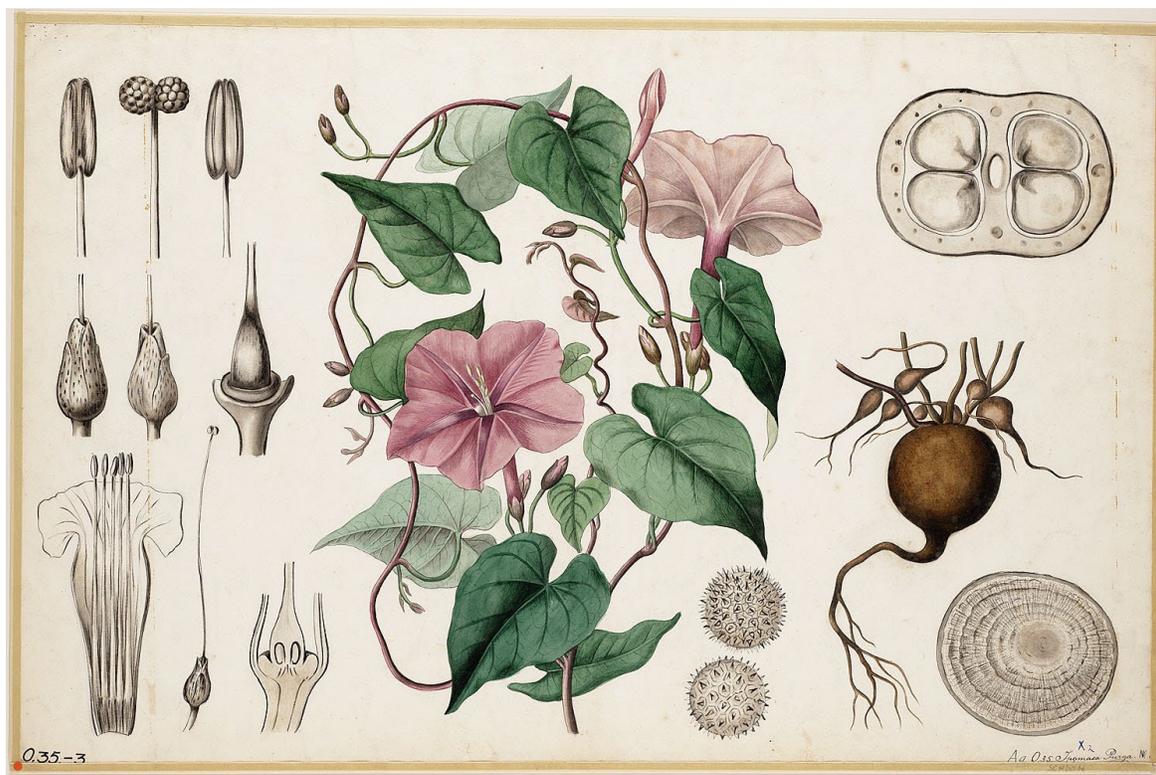
“*apitzalpatli*”, correspondían a diversos tipos de raíces tuberosas que variaban en sus características morfológicas, hábitat y poder laxante; solían tomarse antes de dormir para purgar el estómago, preferidas por su efecto suave y sabor agradable. Investigaciones etnobotánicas contemporáneas confirman que estas especies forman parte del género *Ipomoea* de la familia Convolvulaceae, mismas que fueron conocidas y comercializadas como “jalapas” desde el inicio de la colonia española.<sup>25,26</sup> Algunos ejemplos de jalapas mexicanas se citan a continuación:

- *Ipomoea purga* (Wender) Hayne, considerada como la raíz auténtica de jalapa (**Fig. 6**).
- *Ipomoea orizabensis* (G. Pelletan) Lebed. Ex Steud, la escamonea mexicana o falsa jalapa.
- *Ipomoea stans* Cav., conocida como la tumbavaqueros.
- *Ipomoea jalapa* (L.) Pursh, raíz de Michoacán
- *Ipomoea simulans* D. Hanb., llamada como la jalapa de Tampico.



**Figura 5.** Las mujeres conocidas como *Tíciatl temixihuiani*, asistían a las mujeres en su proceso de embarazo y labor de parto, además de realizar actividades como: purgar, curar heridas, gota, enfermedades oculares y sangramientos (A). Los *tíciatl tepoztecpahtiani*, eran especialistas en curar y concertar huesos y usaban productos naturales para sus tratamientos, como polvos de raíz de tuna (B). Imágenes extraídas del Códice Florentino.<sup>27</sup>

Estas raíces llamaron la atención de los colonizadores españoles durante el siglo XVI y se introdujeron en Europa como sustituto de la especie purgante del Mediterráneo y del Medio Oriente conocida como escamonea (*Convolvulus scammonia* L.) debido a que su efecto laxante era más suave, por lo que pronto se popularizó en Europa como ruibarbo de las Indias, michoacán o escamonea mexicana.<sup>9</sup>



**FIGURA 6.** Monografía de la auténtica jalapa, *Ipomoea purga*, en la cual se muestra de manera esquemática su morfología, misma que incluye el detalle de la raíz tuberosa, considerada como la droga vegetal.<sup>28</sup>

Un claro ejemplo de la diseminación de estos taxones mexicanos fuera de la Península Ibérica, es la aparición de la “raíz de Michoacán” en el tratado “*Great Herbal or Generall Historie of Plantes*”, del naturalista inglés John Gerard, que se consideró como uno de los libros botánicos más importantes del siglo XVII y hasta antes del inicio del siglo XX.<sup>25</sup> El uso de la raíz de jalapa ha disminuido considerablemente en los últimos años; probablemente, se debe a la aparición de otras drogas vegetales que tienen con un efecto laxante aún más suave, como el plántago (*Plantago psyllium* L., Plantaginaceae).

## RAÍZ DE JALAPA BRASILEÑA

De manera análoga a lo que sucedió en la Nueva España, los colonizadores portugueses introdujeron la medicina galénica europea en el territorio brasileño, en la que los remedios purgantes tenían una gran importancia terapéutica; por lo anterior, también fueron capaces de

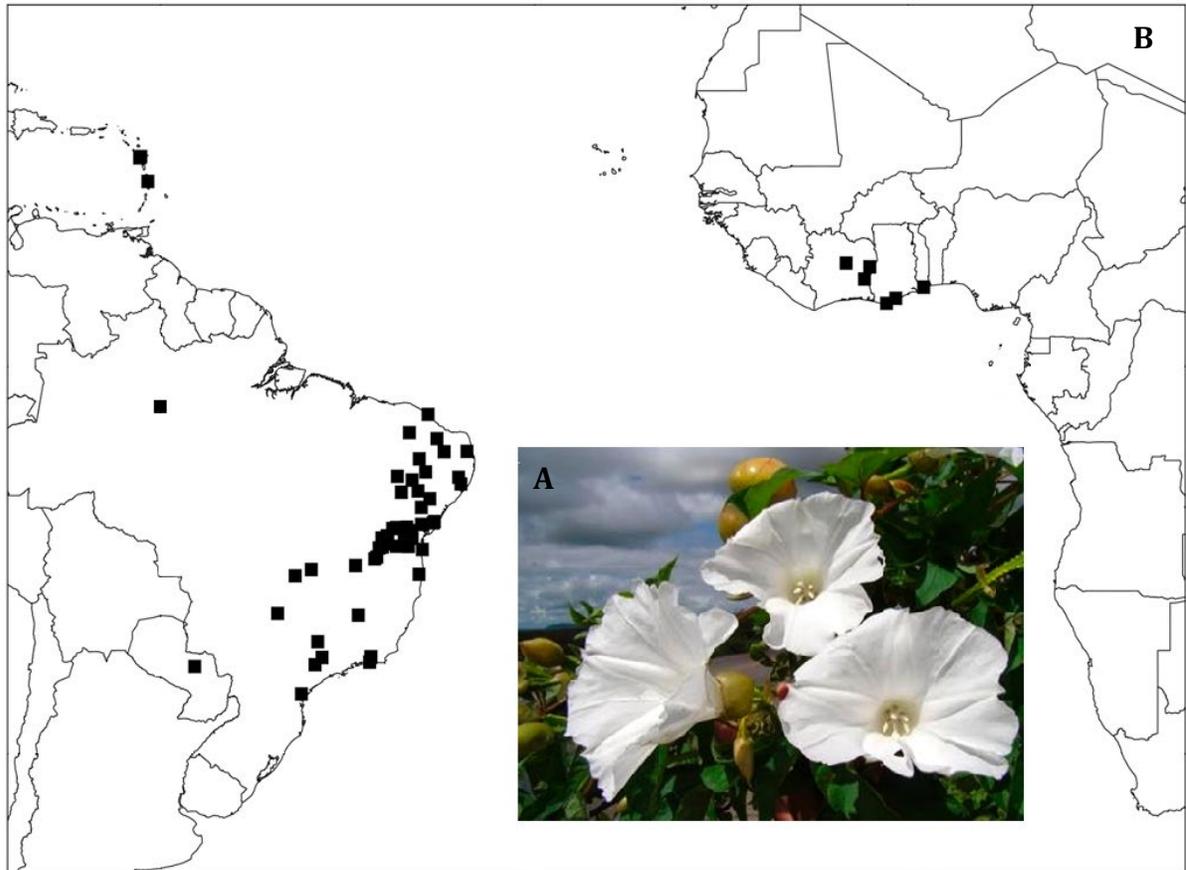
reconocer las propiedades medicinales de ciertas raíces tuberosas locales, ampliamente distribuidas en dicho territorio.<sup>25</sup> En la llamada “Colección Descriptiva de Plantas de la Capitanía de Ceará”, publicada por J. S. Feijó (1799), se hace referencia a la jalapa bajo el nombre vernáculo de “*mechoacam*”, siendo una de las menciones más antiguas sobre la utilización de la “*batata de purga*” en el noreste brasileño.

En la actualidad, la identificación precisa de las raíces laxantes brasileñas corresponde a *Operculina macrocarpa* (L.) Urb., una especie con flores blancas. En reconocimiento a sus importantes beneficios terapéuticos, similares a los de las raíces de la jalapa mexicana, los pobladores de Sudamérica otorgaron el nombre común de “jalapa-de-purga” a esta especie característica del noreste y sureste del territorio brasileño, cuya distribución se limita a los bosques de la selva atlántica, el bioma brasileño más amenazado.

En la primera edición de la Farmacopea Brasileña (1929), a los tubérculos de esta planta se les designa con el nombre popular de “*jalapa-do-Brasil*” y se menciona que cuenta con al menos 15% de resina. Esta referencia de principios del siglo XX destaca el amplio uso decimonónico de la jalapa brasileña de flores blancas (**Fig. 7A**) durante el período colonial y el imperio; sin embargo, ha sido discontinuado en la actualidad en todo el territorio brasileño. Esta especie, llamada *Operculina macrocarpa*, casi confinada a Brasil en el Neotrópico, también tiene poblaciones establecidas en África tropical occidental,<sup>29</sup> tal como se muestra en la **Fig. 7B**. Esta peculiar distribución anfiatlántica sugiere que podría haber sido transportada desde Brasil a través del Atlántico hasta África, posiblemente por marineros portugueses u otros involucrados en el comercio de esclavos o por misioneros.<sup>30</sup>

Actualmente, los nombres populares de “*batata-de-purga*”, “*jalapão*” o “*batatão*” corresponden a otra especie de flores amarillas, común en el norte y noreste de Brasil, y cuyas raíces tuberosas son objeto de un extenso comercio con fines medicinales en estas regiones, ya que su distribución es superior a la de la especie *O. macrocarpa*, lo que facilita su comercialización a las diversas comunidades de la cuenca del río Amazonas, en los estados de Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí y Ceará, entre otros. La “jalapa-de-purga” dio nombre al parque estatal de “*Jalapão*” en Tocantins ya que se puede encontrar en todos los ambientes de esta extensa región

norteña de Brasil. La jalapa brasileña de flores amarillas, *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples, no se menciona en la edición de 1929 de la Farmacopea Brasileña, lo que demuestra que su uso es reciente, posterior de la expansión de la población hacia las regiones del norte.



**FIGURA 7.** Mapa de distribución de la Jalapa de Brasil, *O. macrocarpa*

Aunque no tan conocidas en el comercio internacional, las raíces secas de *O. macrocarpa* se usaban medicinalmente como sustituto de la *O. turpethum*, y esto proporciona un motivo adecuado para su transporte a través del Atlántico. En 1960, Heine propuso otra teoría, basada en observaciones de campo en la República de Gana, con respecto a los motivos para el transporte transcontinental de esta especie: los misioneros católicos procedentes de asentamientos portugueses en Brasil introdujeron deliberadamente *O. macrocarpa* en África, porque sus semillas se utilizaron como cuentas en la fabricación de los rosarios.<sup>16</sup>

## ***OPERCULINA HAMILTONII***

### **DESCRIPCIÓN BOTÁNICA**

La *O. hamiltonii* es una planta enredadera perenne de lianas leñosas; de raíces tuberosas con savia clara o blanca, que es considerada como la droga vegetal. De tallos rojizos, las partes leñosas más viejas se estrían en espiral de forma longitudinal, con diámetro de al menos 5 milímetros, son glabros o ligeramente pubescentes. Hojas simples y enteras, anchas en la base y angostas hacia la punta, donde la base tiene aspecto redondeado; peciolo alato o estriado, subglabro de 0.8-3.5 centímetros. Inflorescencias axilares, rara vez en cimas. Pedúnculos estriados o angulares, distales y glabros, más grandes que los peciolo (3.3-8 centímetros). Flores erectas, inoloras y de carácter diurno; cáliz con sépalos iguales y ovados, miden 2.3-3 x 1.6-2.1 centímetros, redondeados y glabros, de color café rojizo; corola en forma de campana, de color amarillo brillante, 3.5-5.2 x 3.3-5.1 centímetros. Frutos de forma estrellada, con un aspecto de flor seca y oscura. Fruto maduro con cáliz marrón rojizo reflejado a 90° al pedicelo, opérculo café rojizo (1.2-1.4 cm de diámetro) que revela un endocarpio blanquecino por debajo y que contiene cuatro semillas (4-8 mm), comenzando a desprenderse alrededor de la línea de abscisión. En la **Fig. 8**, se muestran imágenes de las características botánicas de la batata de purga.

### **TAXONOMÍA, SINONIMIA Y NOMBRES VERNÁCULOS**

Durante siglos se intentó realizar una delimitación genérica y sistemática de las especies que conforman a la familia de las convolvuláceas, con el propósito de reconocer y delinear las características que describieran a cada género, aunque esta sea una tarea muy compleja y difícil de alcanzar; sin embargo, el método conocido como "taxonomía aglomerativa",<sup>16</sup> fue una práctica común a lo largo de la historia de los estudios para Convolvulaceae. Al transcurrir el tiempo, la aglomeración de especies superficialmente similares conduce a conceptos de género que son altamente polimórficos y, cuando se acumulan suficientes excepciones de caracteres genéricos, el "género" se vuelve indistinguible, por lo que nuevas reclasificaciones intentan ordenar de una mejor manera los taxones conocidos. Gracias a la aplicación de métodos de clasificación más rigurosos que involucran a la filogenética molecular basados en códigos de barras de DNA, en la

actualidad se trabaja en estudios sistemáticos de linajes taxonómicos para la generación de sistemas de nomenclatura precisos.



**FIGURA 8.** *Operculina hamiltonii* en fotografías. Tubérculo, hojas y fruto (A), flor (B), fruto seco con opérculo cerrado conteniendo semillas (C).

El caso de la jalapa amarilla no fue la excepción: desde inicios del siglo XVII, este taxón se reclasificó en numerosas ocasiones, por lo que se encuentra referida en la literatura con diferentes nombres;<sup>16</sup> algunos de ellos se presentan en la siguiente lista cronológica:

- ✓ *Convolvulus alatus* Ham. (1825)
- ✓ *Ipomoea hamiltonii* G. Don (1838)
- ✓ *Ipomoea alulata* Linnaea (1845)
- ✓ *Ipomoea altissima* Mart. ex Choisy (1845)
- ✓ *Operculina alata* Urb. (1902)
- ✓ *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples (1983)

A continuación, se muestra la clasificación taxonómica de la *batata de purga*, de acuerdo a lo descrito anteriormente:

**Reino:** Plantae  
**División:** Magnoliophyta  
**Clase:** Magnoliopsida  
**Orden:** Solanales  
**Familia:** Convolvulaceae  
**Género:** *Operculina* Silva Manso  
**Epíteto específico:** *hamiltonii*  
**Especie (Nombre científico):** *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples

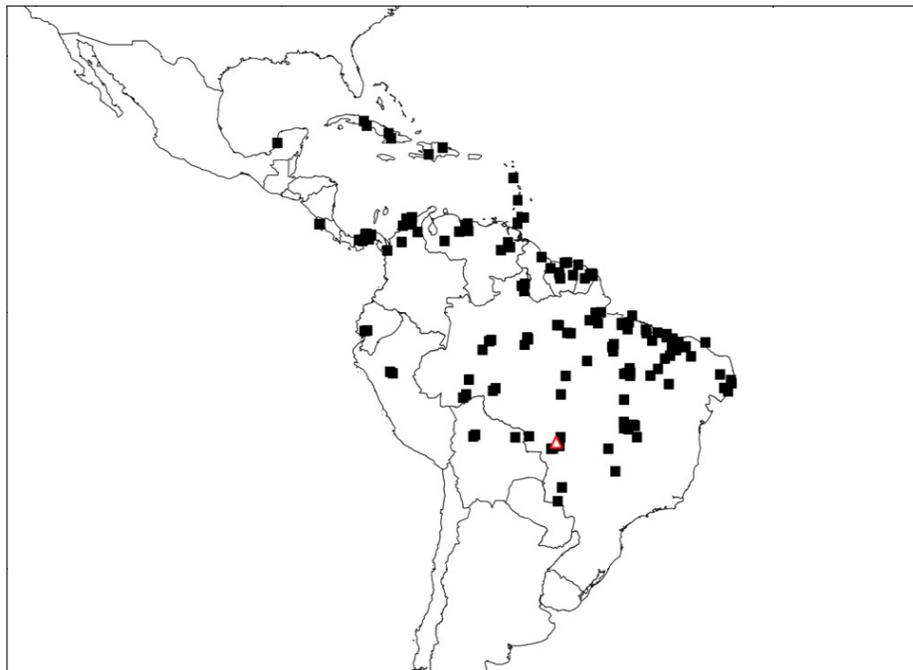
De acuerdo con estudios realizados recientemente, se sabe que existen dos variedades de esta especie conocidas hasta ahora, mismas que pueden distinguirse de la siguiente forma:

- 1. Hojas ampliamente ovaladas, hastadas o cordadas .....  
..... *O. hamiltonii* var. *hamiltonii*
  
- 1'. Hojas estrechamente lanceoladas-hastadas y mucronadas .....  
..... *O. hamiltonii* var. *mucronata*

Esta especie se conoce bajo distintos nombres vernáculos, de acuerdo a la zona geográfica a la que se haga referencia: en Brasil se le conoce como batata-de-purga, batatão, batatão-da-mata, flor-de-pau, jalapa-amarela, jalapa-da-terra, purga-do-cipo, batata-amarela y batatarana; en Cuba es conocida como bejuco mechuacan; en Panamá, batatilla y en Trinidad y Tobago, se llama *wild-morning-glory*.<sup>16</sup>

## UBICACIÓN GEOGRÁFICA

En el caso específico de *O. hamiltonii* var. *hamiltonii*, se distribuye en la zona centro y sur del Continente Americano, principalmente en los matorrales de las regiones tropicales del norte y noreste del territorio brasileño, incluyendo países como Cuba y Bolivia. El único avistamiento en México de esta variante, fue en la ciudad de Campeche; lo registró William Houstoun en 1730, expedición que abarcó la península mexicana, Cuba y Jamaica, en la que colectó muestras de la especie *Ipomoea ampliata* Choisy y jalapa amarilla, por lo que pudo tratarse de una confusión desafortunada. Por otro lado, la *O. hamiltonii* var. *mucronata* es endémica de Brasil. En la **Fig. 9**, se muestra la biodistribución geográfica de ambas variedades de la especie.<sup>16</sup>



**FIGURA 9.** Mapa de distribución de *O. hamiltonii* var. *hamiltonii* (cuadros negros) y *O. hamiltonii* var. *mucronata* (triángulo rojo).

## USOS ETNOMEDICINALES Y MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS

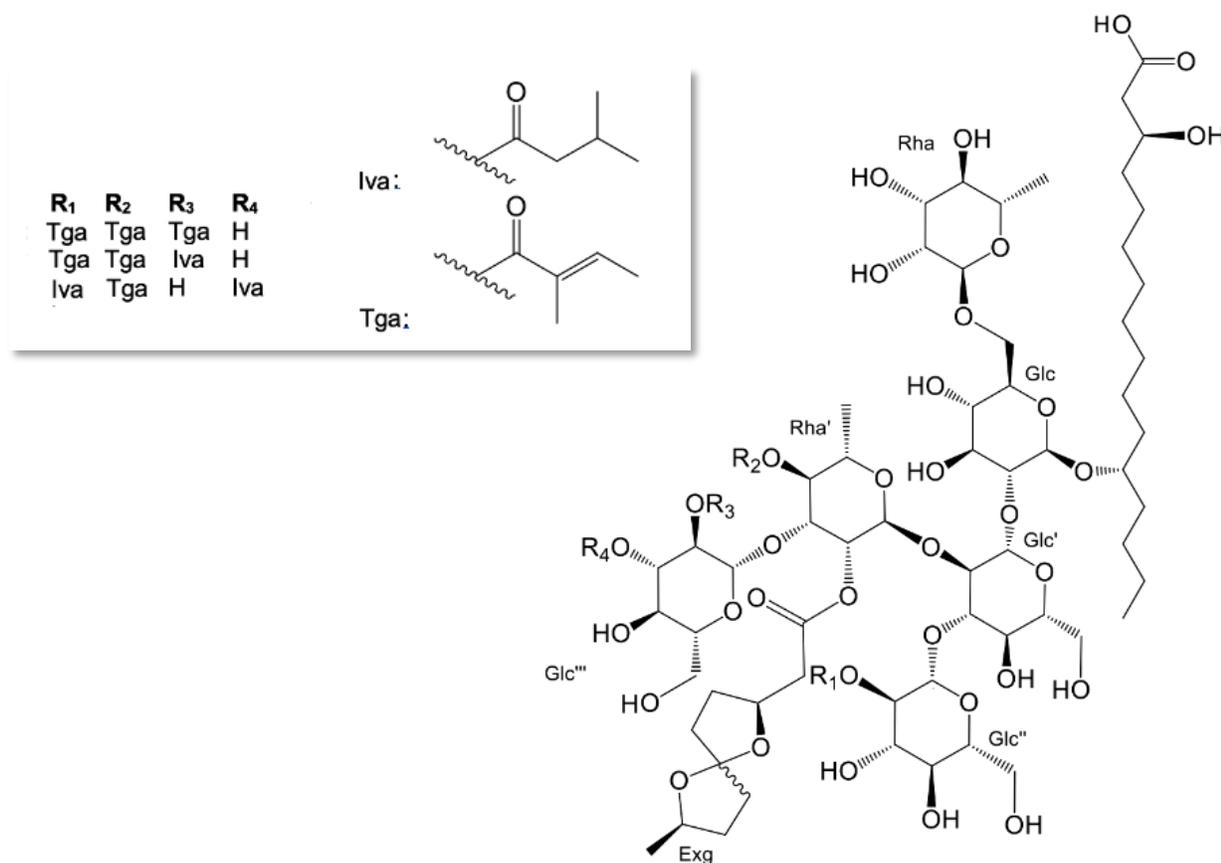
La raíz de jalapa brasileña (*O. hamiltonii*), se utiliza con fines laxantes o purgantes, dependiendo de la cantidad administrada, además de tener usos vermífugos.<sup>31</sup> La información registrada por los recolectores de material vegetal, menciona lo siguiente: la raíz rallada o en polvo se usa para elaborar purgantes para curar ameba y otras dolencias; de manera depurativa y purgante; y como purgante drástico, venenos en dosis elevadas.<sup>16</sup> Las raíces son ampliamente utilizadas como remedio purgante y comercializadas como drogas crudas, polvos y fitofármacos (**Figura 10**) en diversas comunidades de la cuenca del río Amazonas, en los estados de Amazonas, Pará, Maranhão, Piauí y Ceará, entre otros.<sup>5</sup>



**FIGURA 10.** Raíz de jalapa brasileña: droga cruda, polvos y productos fitofarmacéuticos. A) raíz; B) droga cruda en trozos; C) Polvos comercializados bajo el nombre de “batatão” o “jalapa” en mercados populares; D) extractos hidroalcohólicos (Industria Farmacéutica Sobral y jarabes de batatão (Tiro Seguro e Hypólito); E) comprimidos (pímulas Maciel, etc.). Estos productos fueron adquiridos en el Mercado 2000, Santarém, Pará, Brasil, en septiembre de 2015.

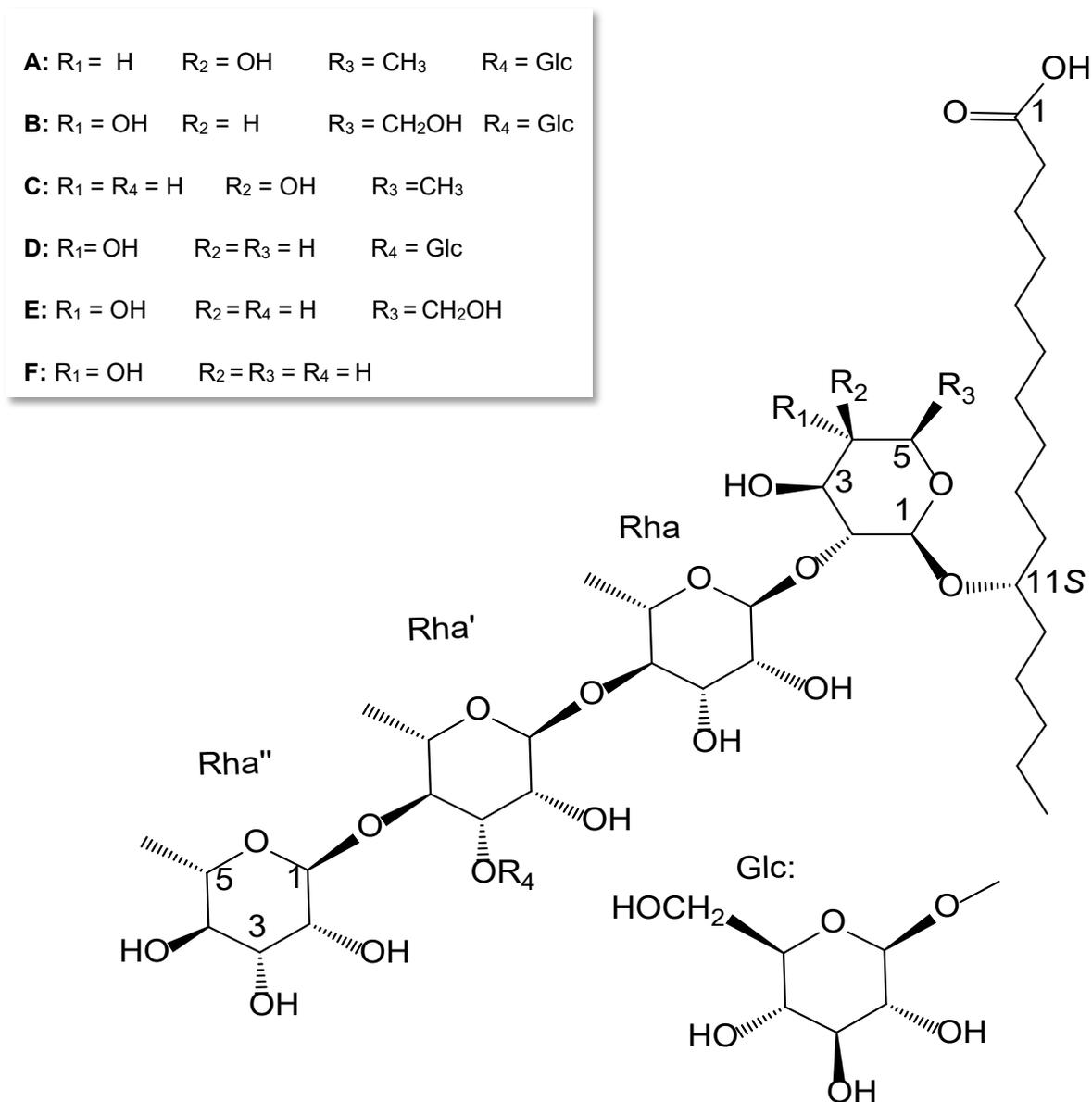
## PRINCIPIOS ACTIVOS

Estudios químicos demostraron que glicósidos complejos de ácidos grasos hidroxilados en las posiciones C<sub>11</sub> o C<sub>12</sub> y con cadenas hidrocarbonadas con una extensión de C<sub>14</sub>-C<sub>18</sub> átomos de carbono (resinas glicosídicas) son las principales entidades químicas de las jalapas brasileñas. Los compuestos glicolipídicos presentes en la fracción soluble en metanol del extracto de la raíz de jalapa brasileña de flores blancas corresponden a lipohexasacáridos denominados ácidos macrocarposídicos A-C derivados del ácido operculínico H (**Fig. 11**), que se reconoció como el ácido glicosídico mayoritario presente en esta especie<sup>5</sup> junto con otros compuestos glicolipídicos minoritarios novedosos denominados como los ácidos operculínicos I-K y al ácido púrgico A,<sup>10</sup> anteriormente descrito en la raíz de jalapa mexicana (*Ipomoea purga*).



**FIGURA 11.** Estructura química de los ácidos macrocarposídicos A-C, principios activos de la *Operculina macrocarpa*, que contienen dos unidades de ramnosa (Rha) y cuatro de glucosa (Glc) aciladas por residuos de los ácidos isovalérico (Iva), tíglico (Tga) y exogonónico (Exg).

Por otra parte, seis ácidos glicosídicos nombrados como los ácidos operculínicos A-F,<sup>32</sup> se describieron como constituyentes mayoritarios de la resina glicosídica de *O. macrocarpa* (Fig. 12). Los ácidos operculínicos A y B se encuentran entre los pentasacáridos más ampliamente distribuidos del ácido jalapinólico (ácido 11S-hidroxihexadecanoico) en la familia Convolvulaceae.<sup>5</sup>

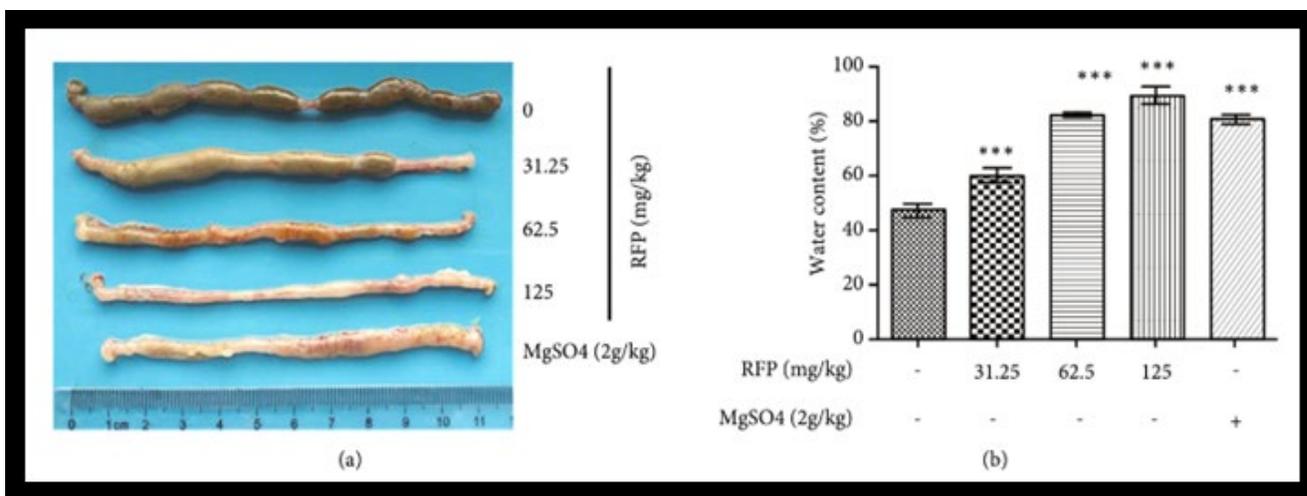


**FIGURA 12.** Estructura química de los ácidos operculínicos A-F, principios marcadores de las jalapas brasileñas.

## ACTIVIDAD PURGANTE DE LAS RESINAS GLICOSÍDICAS

Las resinas glicosídicas de las convolvuláceas han demostrado tener la capacidad de aumentar la permeabilidad de la membrana y el transporte de cationes y aniones para desencadenar un desequilibrio en la homeostasis celular a través de una actividad formadora de poros. Este puede ser el mecanismo de acción para la actividad catártica de las raíces, actuando como laxantes osmóticos, que causan un aumento en la eliminación de agua y un aumento de los movimientos peristálticos intestinales, facilitando la evacuación.

Recientemente, se realizó un estudio *in vitro* e *in vivo* del efecto laxante del crudo de resinas glicosídicas de las semillas de *Ipomoea nil* (L.) Roth; para dicho estudio, se administró cierta cantidad de resinas en ratas vía oral y, después de seis horas, se examinó el contenido de agua en heces fecales, la cantidad de la enzima acuaporina-3 (AQP3) y del factor nuclear-kappa B (NF- $\kappa$ B), así como la expresión de la ciclooxigenasa-2 (COX-2) y la concentración de prostaglandina E2 (PGE2) en colon. Por otro lado, se estudió el mecanismo de acción de las resinas glicosídicas en el cual se suprime la expresión de AQP3 en células epiteliales de intestino humano (HT-29).



**FIGURA 13.** Diarrea inducida en ratas por administración de una mezcla de resinas glicosídicas de las semillas de *Ipomoea nil*. a, b) Administración oral de diversas dosis de resinas (31, 25, 62.5 y 125 mg/kg) a ratas o MgSO<sub>4</sub> (2g/kg) como control positivo. (a) Imagen macroscópica del colon tomada después de 6 h de la administración, en que se muestra el aumento de la cantidad de agua en heces respecto a la cantidad de resinas administradas. (b) Contenido de agua fecal respecto a la cantidad de resinas glicosídicas. \*\*\*  $P < 0,001$  vs grupo control. Reproducido de Zhu et al., 2019.

A partir de los estudios, se observó que la excreción de heces y del contenido de agua fecal en el colon de ratas aumentó de manera dependiente a la dosis de resinas administradas (**Fig.13**); asimismo, se activó la producción de PGE2. Aquellas ratas que fueron tratadas con inhibidores del factor nuclear o de COX-2 (llamada también prostaglandina-endoperóxido sintasa 2) y, posteriormente, con resinas glicosídicas, no presentaron diarrea ni disminuyeron la expresión de AQP3 en el colon.

De acuerdo a lo antes descrito, en dicho trabajo se concluyó que el tratamiento con resinas glicosídicas inhibió la expresión de la AQP3, tanto en el colón de ratas como en células HT-29, debido a que se desencadenó la expresión de COX-2 para acelerar la síntesis de PGE2, inhibiendo la expresión de la AQP3. De este modo, disminuye la absorción de agua desde el intestino hacia los vasos sanguíneos, lo que resulta en un efecto laxante.<sup>33</sup>

## **IDENTIFICACIÓN DE PLANTAS MEDICINALES Y CONTROL DE CALIDAD**

Para poder identificar un material vegetal específico, deberán considerarse todas sus características morfológicas, fitoquímicas y genéticas (códigos de barras de DNA mitocondrial),<sup>34</sup> para lo cual se utiliza un conjunto de técnicas analíticas encaminadas a dicha tarea, además de todas aquellas que son necesarias para realizar un buen control de calidad del material en cuestión. El consumo de plantas medicinales conlleva ciertas desventajas, sobre todo si se utilizan en su estado natural pues, en muchos casos, sólo es posible su ingestión en forma de cocciones. A finales del siglo XX, se produjo un gran desarrollo galénico: la pulverización de plantas como medio para preservar sus principios activos y la actividad de éstos. La encapsulación de dichos polvos, abrió el paso al desarrollo de productos fitofarmacéuticos; dichos productos, deben cumplir con requisitos de calidad similares a los productos de síntesis. Las técnicas que ayudan a alcanzar este objetivo se encuentran referidas en las Farmacopeas, que documentan diversos criterios de estandarización en la elaboración de métodos de validación adecuados para cada caso, adaptándose a las normas nacionales e internacionales.

Previo a la transformación de cualquier material vegetal en un medicamento, éste debe identificarse de manera adecuada. La droga vegetal puede obtenerse por cultivo directo o por colecta; ésta última corresponde al 40% del consumo actual de plantas medicinales y se recurre a ella cuando su cultivo es complejo o imposible; sin embargo, los procesos de colecta se deben realizar de forma controlada para evitar algún desequilibrio ecológico. Al contar con la materia prima recolectada y limpia, es necesario conservarla hasta el momento de su uso pues, una vez en trozos, experimenta alteraciones debidas a reacciones enzimáticas que, dicho sea de paso, suceden en medio acuoso; éstas pueden influir en su actividad terapéutica y la calidad de la droga vegetal. Es por lo anterior que, el reducir la cantidad de agua residual en el material (niveles de humedad menores al 10%) es un paso primordial para su conservación y evitar la proliferación de hongos y bacterias; el proceso mayormente usado para ello es la desecación o bien, la destrucción/inactivación de dichas enzimas mediante procesos de estabilización.<sup>2,34</sup>

En este sentido, existen numerosos factores biológicos, químicos y conceptuales que influyen en la composición de un extracto de origen vegetal que incluyen, entre otras, las siguientes variables:

- Las condiciones de crecimiento y procesamiento/almacenamiento inicial del material botánico y el principio farmacéutico herbolario resultante.
- La fecha de recolección, etapa de desarrollo, protocolos de cosecha y daño por respuesta a plagas y enfermedades.
- Las diferentes formas de procesamiento (extracción) de estos materiales vegetales o drogas crudas.
- Su preparación y modo de aplicación en experimentos *in vitro* o *in vivo*.
- Contaminación con sustancias exógenas como pesticidas y metales pesados.

De acuerdo con la estructura general de una monografía de farmacopea, los aspectos generales a considerar para el control de calidad de drogas vegetales, son los siguientes:

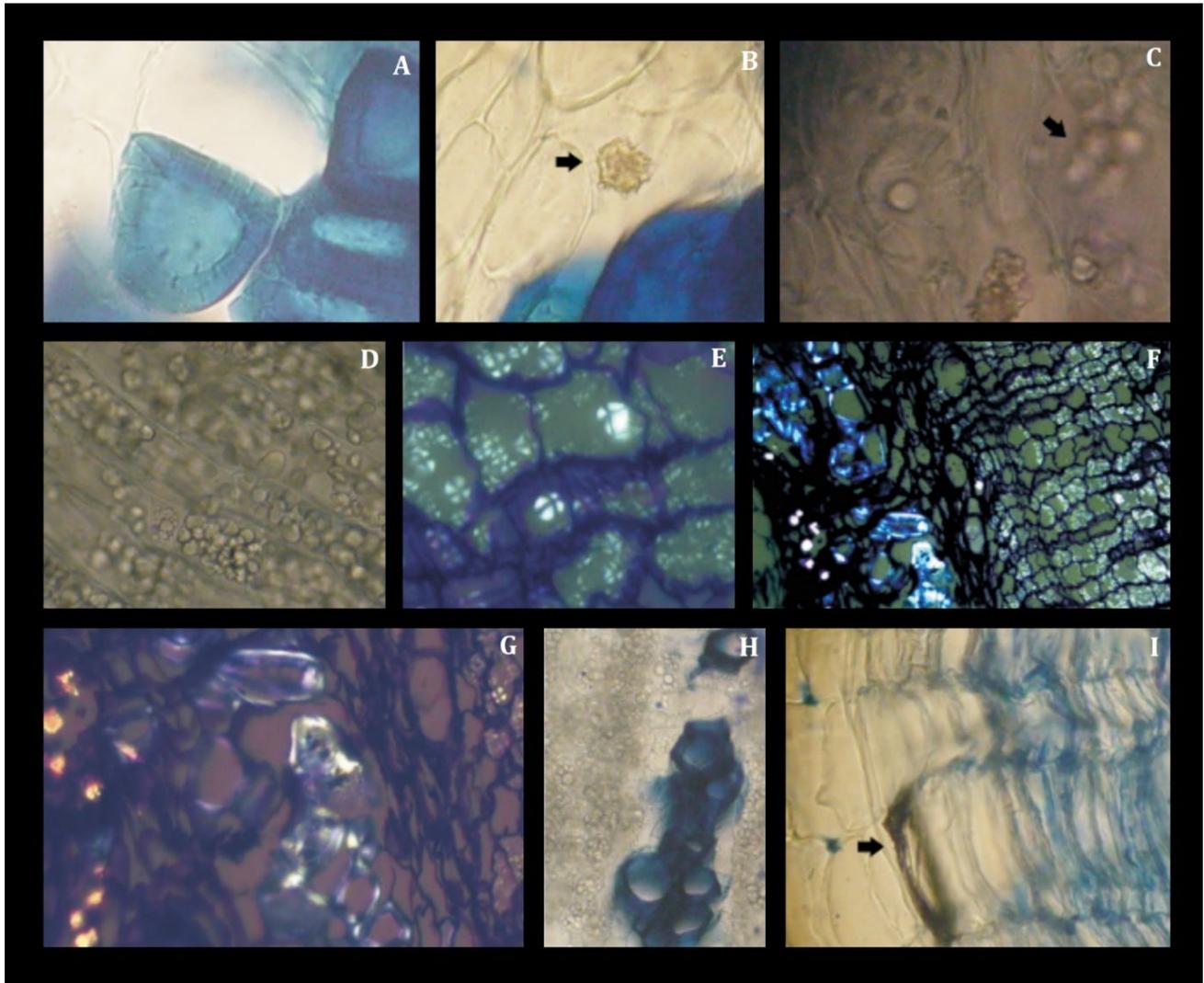
- Características (propiedades organolépticas)
- Identificación
  - a. Características macroscópicas
  - b. Características microscópicas
  - c. Métodos espectroscópicos
- Ensayos
  - a. Elementos extraños
  - b. Pérdida por desecación
  - c. Cenizas totales
- Valoración (contenido de principios activos o marcadores fitoquímicos)

En el caso de las plantas que no cuentan con una monografía reportada en farmacopeas, se debe elaborar una propia, siguiendo los mismos pasos descritos, para garantizar la calidad farmacéutica de la planta; a continuación, se describen brevemente estos aspectos.

### **DESCRIPCIÓN ORGANOLÉPTICA, MACROSCÓPICA Y MICROSCÓPICA**

Las técnicas de identificación macroscópica y examen sensorial (alternativamente denominadas como características organolépticas) se aplican principalmente a drogas vegetales crudas. La materia médica, los textos de farmacognosia del pasado no muy lejano y las farmacopeas contemporáneas proporcionan una guía detallada, por ejemplo, mediante descripciones de forma y tamaño; color, marcas externas y textura; color interno; caracteres organolépticos (olor, sabor y sensación en la boca). La presencia de las características esperadas representa indicaciones clave en cuanto a la identidad de la planta, mientras que la intensidad, ya sea de color, aroma o sabor, proporciona indicaciones directas de la calidad de la planta. La evaluación macroscópica de los materiales vegetales crudos permite la detección inmediata de materias extrañas, suciedad y materiales potencialmente adulterantes y proporciona información valiosa para determinar si la calidad del material es aceptable para su uso en medicamentos.<sup>35</sup> La inspección visual proporciona el medio más simple y rápido para establecer

la identidad, la pureza y, posiblemente, la calidad del material vegetal; si se descubre que una muestra es significativamente diferente, en términos de color, consistencia, olor o sabor, de las especificaciones, se considera que no cumple con los requisitos.<sup>36</sup>



**FIGURA 14.** Características anatómicas microscópicas de la raíz de *Operculina macrocarpa* (L.) Urban. A: Esclereidas isodiamétricas con punteaduras (barra de escala: 30  $\mu\text{m}$ ); B: drusa (flecha) (barra: 10 $\mu\text{m}$ ); C: drusas y granos de almidón (flecha) (barra: 10 $\mu\text{m}$ ); D: aspecto general del parénquima de reserva que muestra granos de almidón de poliedro (bar: 100 $\mu\text{m}$ ); E: detalle del parénquima de reserva en luz polarizada (barra: 50 $\mu\text{m}$ ); F y G: distribución de drusas, esclereidas y granos de almidón en el tejido radicular en luz polarizada (bar: 10 $\mu\text{m}$ ); H: detalle del parénquima de reserva que muestra uno de los polos del xilema (barra: 100 $\mu\text{m}$ ); I: célula con depósito fenólico en la pared celular (flecha) (barra: 30 $\mu\text{m}$ ).

La microscopía botánica es excepcionalmente valiosa para la evaluación de materiales vegetales secos, cuyas características a menudo se alteran dramáticamente desde el estado fresco. El secado y la fragmentación de las plantas, generalmente no resultan en la pérdida de características microscópicas de diagnóstico; las muestras cortadas, tamizadas o incluso finamente molidas pueden identificarse en los casos en que las muestras revelan características peculiares como tipos especiales de tricomas, cristales, estomas, incrustaciones como cistolitos, etc. La microscopía botánica también es de gran ayuda para detectar mezclas de una planta diferente o diferentes partes de la misma planta. La **Figura 14** ilustra las características anatómicas microscópicas de la raíz de jalapa de flores blancas. La microscopía no es aplicable para la evaluación de materiales botánicos que están tan finamente pulverizados, extractos y, a veces, especies estrechamente relacionadas, pues las estructuras características ya no son reconocibles o diferenciables, según el caso. La combinación de caracteres organolépticos, macroscópicos y microscópicos proporciona un alto grado de confianza en la evaluación física de la materia prima.<sup>37</sup>

## **ENSAYOS QUÍMICOS Y MÉTODOS ESPECTROSCÓPICOS**

El material vegetal pulverizado, así como sus extractos, requieren del empleo de pruebas analíticas alternativas para su identificación y control de calidad, pues carecen de los elementos anatómicos que permiten la identificación de la especie. Las técnicas analíticas, como la cromatografía (HPTLC, HPLC-UV, HPLC-EM) y los métodos espectroscópicos (UV, IR y RMN) proporcionan información cualitativa y cuantitativa; éstos representan herramientas indispensables para la generación de perfiles cromatográficos (huellas dactilares) y la cuantificación de los componentes en las drogas crudas y los preparados herbolarios. Usando estas técnicas, el “contenido total” de la matriz o muestra vegetal se puede evaluar. Sin embargo, muchos ensayos químicos pueden ser fácilmente alterados y falseados. La preparación de los extractos vegetales considera la descripción completa de los parámetros de fabricación, como la relación disolvente-planta, el tiempo de extracción, la composición del disolvente, etc., junto con la cuantificación de marcadores y los análisis cromatográficos de huellas dactilares mediante HPLC. Para garantizar la reproducibilidad y la interpretación de los estudios biológicos que

utilizan extractos vegetales, la selección, caracterización y evaluación de la calidad y consistencia del material vegetal es un paso importante. Las características ideales de un extracto de planta medicinal o producto utilizado para estudios de investigación farmacológica, toxicológica y clínica son: autenticación y caracterización en términos de ingredientes activos/compuestos marcadores de calidad y consistencia suficientes, libre de adulteración y/o contaminación, estabilidad y baja variación entre los lotes.<sup>38,39</sup>



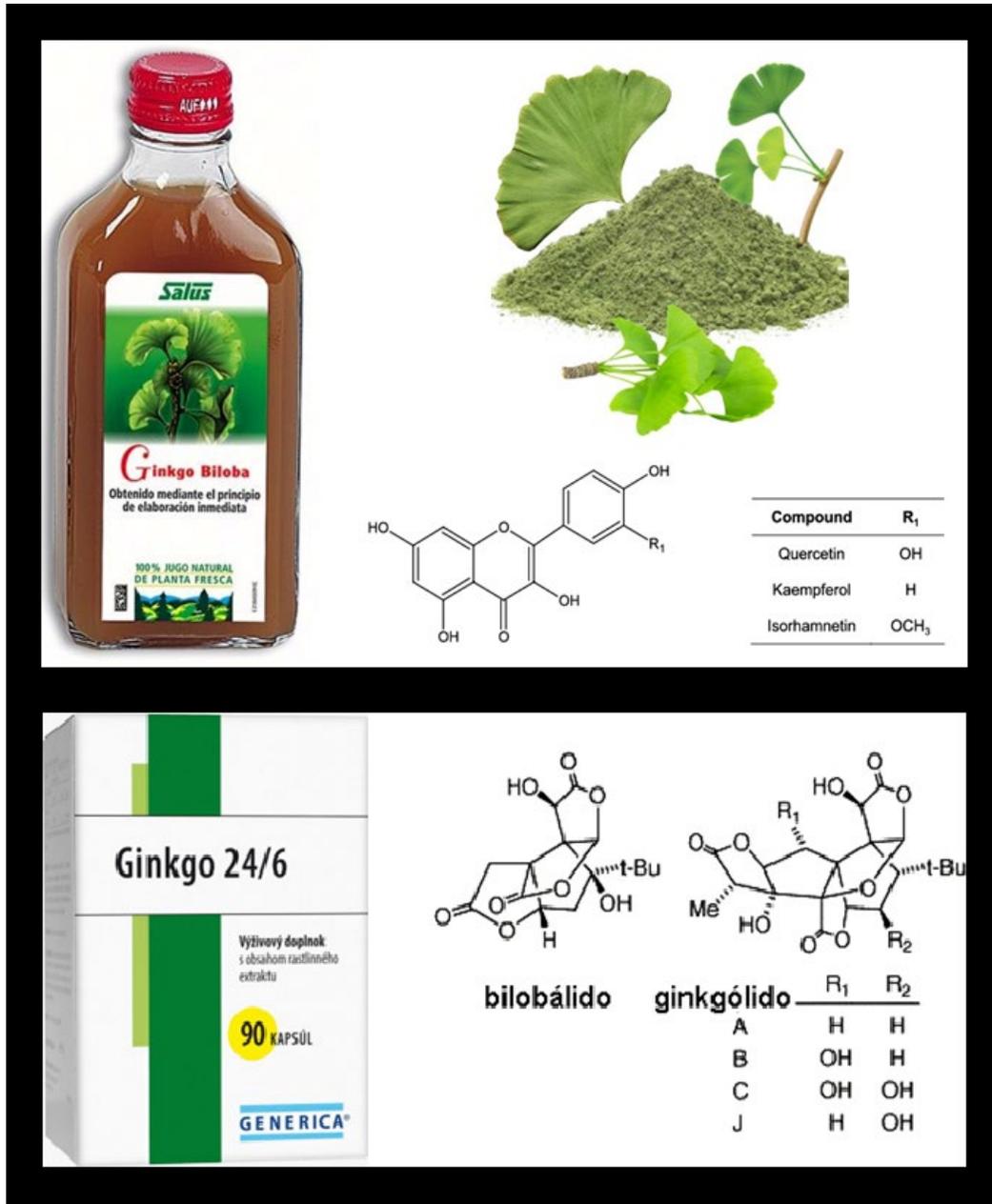
**FIGURA 15.** Ilustración de *Hydrastis canadensis* L. Ranunculaceae. A) Raíz (droga cruda) y el principio activo mayoritario, el alcaloide bencilisoquinolínico berberina. B) Preparados fitofarmacéuticos comerciales.

La raíz de la cúrcuma canadiense o sello de oro, *Hydrastis canadensis* L., Ranunculaceae, por ejemplo, es uno de los ingredientes botánicos de mayor comercialización en todo el mundo. Debido a su alto contenido del alcaloide berberina con propiedades antimicrobianas para el tratamiento del cólera, la amibiasis y la diarrea bacteriana,<sup>40</sup> éste se adultera con frecuencia con otras plantas de las familias Berberidaceae (*Berberis* L.), Papaveraceae (*Argemone* L.) e Ranunculaceae (*Coptis* Salisb.), que también contienen berberina y cuyas similitudes fitoquímicas con *H. canadensis* son difíciles de detectar.<sup>41</sup> Numerosos productos fitofarmacéuticos de esta planta medicinal se comercializan como remedios herbolarios o suplementos alimenticios (**Fig. 15**).

Otro ejemplo son los extractos de *Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae, de baja calidad que pueden pasar desapercibidos en las detecciones de rutina si se enriquecen con flavonoides puros o extractos de otras fuentes vegetales ricas en flavonoides, incluso cuando se usan la mayoría de los métodos farmacopeicos.<sup>42</sup> Esta hierba medicinal se utiliza para mejorar la función cognitiva y resulta beneficiosa en pacientes con enfermedad degenerativas como el Alzheimer, la demencia, el Parkinson, la esclerosis, así como coadyuvante en el tratamiento de insuficiencia circulatoria asociada a alteraciones neurosensoriales como vértigo y tinnitus. Se ha convertido en uno de los suplementos alimenticios más populares en los Estados Unidos de Norteamérica como vasodilatador para las varices, hemorroides, trombos, embolias y derrames cerebrales. En México, existen diversos productos elaborados a partir de dicho material vegetal, mismos que están registrados ante la COFEPRIS como medicamentos herbolarios; tal es el caso del fármaco Tebonin (40 mg), Tebonin Forte (80 mg) y Tebonin OD (240 mg) ®, en forma de tabletas.

Los extractos de *G. biloba* contienen compuestos de dos grupos químicos farmacológicamente importantes: los glucósidos de flavonoles (agliconas: quercetina, kaempferol e isorhamnetina) y las lactonas sesquiterpénicas (bilobárido y ginkgólidos A, B, C y J). Los extractos de ginkgo utilizados en preparaciones comerciales a menudo están estandarizados al 6% de lactonas sesquiterpénicas y al 24% de glucósidos de flavonoles, ya que este extracto ginkgo “24/6” estandarizado en forma de cápsulas se ha estudiado considerablemente en ensayos clínicos en humanos (**Fig. 16**). Sin embargo, debido al alto costo de producción y la alta demanda, existe un incentivo para adulterar extractos de ginkgo con flavonoles puros (por ejemplo, quercetina y/o

kaempferol) o materiales ricos en flavonoides de fuentes menos costosas para lograr el contenido deseado del 24% de glucósidos totales de flavonoles.<sup>43</sup>



**FIGURA 16.** Ilustración de *Ginkgo biloba* L., Ginkgoaceae. A) Raíz (droga cruda) y el principio activo mayoritario. B) Preparados fitofarmacéuticos comerciales.

## Métodos cromatográficos

Las técnicas químicas más utilizadas en la identificación y evaluación de la calidad de los ingredientes de plantas medicinales son la cromatografía en capa fina (TLC), la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) y la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC). Ambos proporcionan patrones cualitativos y cuantitativos característicos de los constituyentes. La TLC es una técnica principalmente apropiada para las pruebas cualitativas, mientras que HPLC permite el análisis cualitativo y cuantitativo de los componentes individuales.

La TLC es una técnica manual, rápida y económica que requiere de una instrumentación de laboratorio simple. Aunque se usa ampliamente, con mayor frecuencia en los países vías de desarrollo, TLC tiene la desventaja de una reproducibilidad deficiente y baja sensibilidad.<sup>44</sup> Muchas de estas desventajas se mejoran parcialmente con la aplicación de la cromatografía en capa fina de alta resolución (HPTLC) que introduce una serie de procedimientos automatizados que permiten una mayor estandarización y, por lo tanto, una mayor reproducibilidad de las condiciones cromatográficas.

La HPLC permite la determinación cualitativa y cuantitativa de componentes individuales definidos o indefinidos. La detección de compuestos individuales y los límites de detección dependen del dispositivo de detección, que incluye principalmente el detector de matriz de diodos en el ultravioleta (UVDAD), el detector de dispersión de luz de electrones (ELSD), el detector de índice de refracción o el detector de aerosoles cargados (CAD). El HPLC y ultra-HPLC (UHPLC), una técnica avanzada con capacidad de separación mejorada mediante la introducción de soportes con tamaños de partícula inferiores a 2  $\mu\text{m}$  que proporciona una mejor separación que en la HPLC convencional, donde el tamaño de partícula está limitado a 5  $\mu\text{m}$ , ofrecen la posibilidad de separación y monitoreo de los constituyentes de una matriz de origen vegetal mediante el acoplamiento con la espectrofotometría de masas (MS) y/o la resonancia magnética nuclear (RMN) que proporciona valiosa información estructural adicional.<sup>45</sup> Dado que un gran número de espectros se registran por minuto, se genera una gran cantidad de datos en poco tiempo; el conjunto de datos se maneja con análisis quimiométricos y permiten obtener los respectivos perfiles cromatográficos y la determinación de huellas dactilares de los metabolitos presentes en la muestra. El perfil de metabolitos comprende la identificación y la cuantificación

de metabolitos (seleccionados), mientras que la huella digital de metabolitos se basa en la comparación de patrones químicos para detectar coincidencias.<sup>37</sup> Esto último requiere la aplicación de métodos estadísticos para la interpretación de los resultados.

Sin embargo, estas técnicas se centran exclusivamente en la composición química y no incluyen ninguna evaluación de las propiedades físicas de la planta. La combinación de una prueba física (botánica, macroscópica, organoléptica y/o microscópica) con una prueba química permite una mayor confianza para asegurar la identificación y la calidad.

### **Técnicas espectroscópicas**

Las técnicas espectroscópicas permiten la cuantificación de compuestos individuales (cuando se prueban sustancias relativamente puras) o de mezclas simples que comparten similitudes en su absorbancia en el UV. Debido a esto, la espectroscopia proporciona una visión más holística de las hierbas medicinales en contraste con la cuantificación de un solo compuesto.

La espectroscopia UV, por ejemplo, permite la determinación exhaustiva de grupos de compuestos estructuralmente similares que se correlacionan con la actividad farmacológica; muchos métodos espectrofotométricos que utilizan el UV se encuentran bien determinados y estandarizados en las farmacopeas. Con pocas excepciones, estos “contenidos totales” representan marcadores sustitutos de la planta y se implementan junto con pruebas de identificación física. A diferencia de la evaluación botánica, macroscópica y sensorial, los métodos UV no analizan el contenido metabólico de la planta en sí, sino que intentan representar aspectos físicos y químicos de la planta; una desventaja de la cuantificación mediante el UV es que consume mucho tiempo.

La espectroscopia IR es un método rápido que brinda un alto rendimiento, debido a la medición directa de muestras aún sin preparación. Registra la calidad y cantidad de componentes en la superficie de los materiales biológicos y abarca parámetros específicos de la planta como una epidermis glabra o vellosa con respecto a la composición química de las respectivas ceras cutáneas epidérmicas. La aplicación de IR requiere trabajar con métodos de análisis de datos multivariantes. El uso de la espectroscopia IR se derivó del examen exitoso de compuestos puros

en polvo y ganó importancia creciente en la última década en el análisis tanto de extractos de hierbas como de drogas crudas.<sup>35</sup>

La identificación de los compuestos presentes en las muestras vegetales debe llevarse a cabo utilizando patrones cromatográficos de muestras auténticas mediante HPLC-EM, ya sea adquiridas en el mercado o aislados de la planta analizada mediante la comparación del tiempo de retención en el método validado, por su absorción UV y espectro de masas EM a través de la identificación de los cationes  $[M + H]^+$ ,  $[M + \text{metal}]^+$ ,  $[M + \text{disolvente} + H]^+$  y  $[2M + \text{metal}]^+$ , entre otros en el modo positivo (MS/MS), y de los aniones  $[M - H]^-$  y  $[M + Cl]^-$  en el modo negativo.<sup>46</sup> Para la identificación –“dereplication” en inglés- de los metabolitos secundarios de interés, el flujo de trabajo implica una anotación inicial de las características moleculares basadas en mediciones de la masa exacta en equipos de alta resolución y la fórmula molecular calculada. Idealmente, las anotaciones de metabolitos putativos se confirman aplicando la espectrometría de masas en tándem MS<sup>2</sup> (MS/MS) a la(s) característica(s) de interés, seguida de una comparación con una base de datos de espectros MS/MS y/o análisis del espectro de un estándar auténtico.<sup>47</sup>

La obtención del perfil químico de extractos naturales con RMN se utiliza ampliamente en la investigación con el objetivo de obtener rápidamente información estructural para la separación y purificación de una mezcla, con el propósito de eliminar constituyentes conocidos e identificar rápidamente los novedosos;<sup>48</sup> en este sentido, se han compilado varias bases de datos para la identificación que se encuentran disponibles para consulta.<sup>48</sup> Una vez más, se aplican los mismos requisitos que para IR y EM, es decir, se requiere establecer la calidad de las bibliotecas de referencia para determinar la validez de la información. Las ventajas de la RMN son la reproducibilidad, la preservación de la muestra y la preparación sencilla de la misma debido a un amplio rango de disolventes deuterados de baja, mediana y alta polaridad. Su baja resolución y sensibilidad en comparación con la EM, se consideran las principales limitaciones cuando se consideran para un análisis con una baja concentración de analitos.<sup>49</sup> Sin embargo, la RMN en combinación con la quimiometría, ya se usa ampliamente para evaluar la adulteración en los alimentos.<sup>50</sup> Los altos costos de inversión de la RMN en relación con otras técnicas analíticas, impiden su uso generalizado para el control de calidad rutinario; en la actualidad, la RMN es una herramienta de mayor utilidad para la investigación básica en centros e instituciones académicas

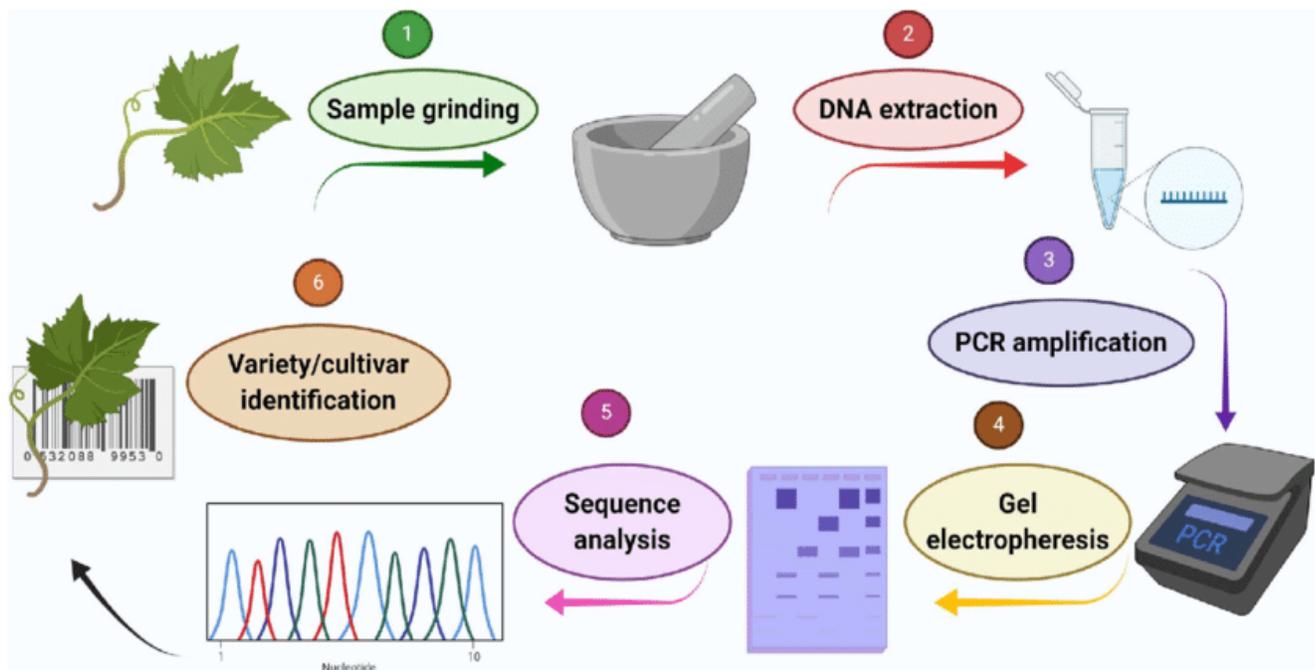
que para el control de calidad de rutina realizado en las pequeñas empresas y laboratorios fitofarmacéuticos.<sup>35</sup>

## ENSAYOS GENÉTICOS: CÓDIGO DE BARRAS

En los últimos años, las pruebas genéticas específicas han surgido como un conjunto de posibles técnicas de identificación de plantas medicinales y para proponer revisiones taxonómicas.<sup>35</sup> El término “código de barras de ADN”, se utiliza para describir secuencias de ADN que pueden identificar de forma inequívoca a una especie. Hay tres organizaciones principales dedicadas al avance de la investigación de códigos de barras: *The International Barcode of Life* (IBoL 2019), el *Consortium for the Barcode of Life* (CBoL 2019) y *Barcode of Life Data Systems* (BoLD 2019).

El gen mitocondrial citocromo C oxidasa CO1, se propuso como el código de barras estándar para las especies pertenecientes al reino animal y se puede utilizar para distinguir más del 90% de las especies en la mayoría de los grupos de animales.<sup>34</sup> En cambio, los genomas de las plantas evolucionan más rápidamente que los de los animales, impidiendo el establecimiento de un locus (ubicación específica de un genoma) universal de códigos de barras. En la mayoría de los casos, se requiere una combinación de dos o más loci genéticos para hacer una identificación con un alto grado de confianza;<sup>51</sup> por lo anterior, diferentes organizaciones recomiendan el uso de grupos de diferentes loci para plantas terrestres, tales como las regiones de genes en el cloroplasto *matK* y *rbcl*. En general, se encuentran identificadas 17 regiones de códigos de barras diferentes que se han utilizado para estudiar plantas medicinales. Los códigos de barras documentados, incluyen regiones de cloroplastos y genomas nucleares que contienen las tasas más altas de sustitución y las regiones individuales más utilizadas han sido *matK*, *rbcl*, *trnH-psbA*, ITS, *trnL-F*, 5S-rRNA y 18S-rRNA.<sup>34,51</sup> En particular, el uso de ITS2 ha aumentado debido a su alta tasa de discriminación a un nivel taxonómico bajo; sin embargo, un enfoque de código de barras de ADN multilocus constituye la herramienta procedente para identificar adecuadamente las plantas medicinales.<sup>34,52</sup>

La identificación de especies, comienza con la obtención de los especímenes a estudiar; estos pueden conseguirse en el campo, colecciones en museos de historia natural, zoológicos, bancos de semillas o jardines botánicos, entre otras fuentes. A partir de dichas muestras vegetales, se toma una fracción pequeña de tejido del espécimen de la cual se extrae su ADN y se aísla la región del código de barras; posteriormente, ésta se replica mediante amplificación por PCR y es secuenciada. A tener la secuencia del código de barras de la especie, se busca en diversas bibliotecas y bases de datos creadas para dicho fin. En el caso específico de BoLD, se trata de un repositorio de búsqueda, registro y almacenamiento de códigos de barras, así como imágenes y archivos de seguimiento; lo anterior, hace posible la identificación basada en una biblioteca de código de barras actualizada y supervisa las nuevas secuenciaciones. En la **Fig. 17**, se incluye un diagrama que explica de forma sencilla el proceso antes descrito.<sup>52</sup>



**FIGURA 17.** Resumen de un ensayo típico de código de barras de ADN de una planta medicinal.<sup>53</sup>

## **VALIDACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS**

### **MÉTODO ANALÍTICO**

Un método analítico se define como la descripción de la secuencia de actividades, recursos materiales y parámetros que se deben cumplir para llevar a cabo el análisis de un componente específico de una muestra (analito), por lo que dicho método debe ser confiable para el propósito requerido y debe validarse. La validación de un método analítico es el proceso por el cual se demuestra, mediante diversos procesos y estudios de laboratorio, que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica deseada y cumple con su propósito, motivado por aspectos éticos, económicos, regulatorios y/o procesos de calidad.<sup>54</sup> Dicho de otro modo, la validación del método es el proceso de adquisición de datos y documentación para demostrar que un método específico producirá datos fiables con un alto grado de seguridad y, por lo tanto, es aceptable para el propósito previsto.<sup>55</sup>

### **ORGANISMOS REGULATORIOS**

A la par de laboratorios analistas, diversos corporativos químicos están comprometidos con el desarrollo y la validación de métodos analíticos, encaminados al control de calidad y la identificación de la composición química de materiales de origen vegetal, así como la cuantificación de los diversos compuestos que la conforman. Debido a que ésta es una tarea copiosa, es necesario contar con organizaciones que estandaricen los procesos y prácticas dedicados a estos fines; algunas de las organizaciones de interés para los analistas son, en su mayoría gubernamentales, dada su naturaleza regulatoria.<sup>55</sup> A continuación, se mencionan algunas de mayor relevancia para el quehacer analítico, tanto nacionales como de índole internacional.

#### **NIST (*National Institute of Standards and Technology*)**

Creada en 1901 por el viejo Laboratorio de Investigación en Ciencias Físicas para Gobierno Federal (EE.UU.) y ahora parte del Departamento de Comercio, la misión de NIST es la de desarrollar y promover la medición, uso de estándares y tecnología para el mejoramiento de la productividad, facilitar el comercio y mejorar la calidad de vida. Este organismo se dedica a

desarrollar métodos de medición, instrumentación y estándares de referencia para el gobierno y la industria, por lo que cobra gran importancia; además, provee un gran número de publicaciones, bases de datos y librerías virtuales de acceso en línea. Las tareas que le competen son: la Ciencia de la Medición, trazabilidad rigurosa, así como el desarrollo y uso de normas.<sup>56</sup>

### **FDA (*Food and Drug Administration*)**

La FDA es una agencia regulatoria creada en 1938, cuya misión es la de proteger la salud pública, salvaguardando la seguridad, eficacia, calidad y protección de los medicamentos, vacunas y otros productos biológicos y dispositivos médicos para uso humano y veterinario. Esta agencia también está encargada de proteger la mayor parte del suministro de alimentos (excepto carne de ganado, aves de corral y algunos productos de huevo, regulados por el Departamento de Agricultura de EE.UU.), cosméticos, suplementos alimenticios y productos que emiten radiación, así como de la regulación de los productos del tabaco.<sup>57</sup>

Una de las principales guías que la comunidad científica utiliza en nuestros días para el desarrollo y la validación de métodos analíticos es el llamado “*Analytical Procedures for Methods Validation for Drugs and Biologics*”; en éste se abordan temas de suma importancia para los procesos analíticos, estándares de referencia, parámetros de validación, modelos y análisis estadísticos. Ésta, a su vez, complementa la guía Q2(R1) “*Validation of Analytical Procedures*”, elaborada por la ICH (mencionada más adelante).<sup>58</sup>

### **ICH (*International Conference on Harmonisation Guidelines*)**

A medida que el comercio internacional se desarrollaba, fue necesario coordinar y “armonizar” los requerimientos regulatorios. Dicha armonización comenzó en la década de 1980, en manos de la Comisión Europea (EC, por sus siglas en inglés), mientras la unificación del mercado farmacéutico se encontraba en proceso. Al mismo tiempo, este tópico estuvo en discusión y debate entre Europa, Japón y Estados Unidos, para llegar a su implementación. Por otro lado, la *International Federation of Pharmaceutical Manufacturers and Associations* (IFPMA) comenzó un diálogo con las autoridades para proponer una iniciativa reguladora para la armonización industrial a nivel internacional, dando origen al ICH en 1990, en una reunión en

Bruselas; desde la primera reunión se establecieron los Términos de Referencia, donde se asentaron los tópicos seleccionados para la armonización, divididos en seguridad, calidad y eficacia, criterios básicos en la aprobación y autorización de nuevos productos medicinales.<sup>59</sup> La posición de la FDA con respecto a este esfuerzo se informó en el Registro Federal en 1995, comenzando así un compromiso de participar y cooperar con la ICH. Cualquier documento que surge de la participación de ambos organismos, se publican en la sección de documentos de orientación del sitio web de la FDA. Esta guía contiene un glosario sobre validación, incluidas las definiciones de términos básicos como precisión y exactitud.

### **ISO (*International Organization for Standardization*)**

Es una organización internacional no gubernamental establecida en 1947 y su oficina central se encuentra en Ginebra, Suiza. La palabra ISO no es una sigla o acrónimo de su nombre, sino que se trata de un prefijo que proviene del griego *isos*, que significa “igual”, haciendo referencia a “lo mismo o estándar”, independientemente del idioma del usuario.<sup>55</sup> El trabajo de esta organización consiste en el desarrollo de estándares internacionales que se encuentren al alcance de todos; la venta de estos, permite financiar su desarrollo en un ambiente neutral. Un estándar internacional, es un documento que contiene información concreta y buenas prácticas de uso/operación/tratamiento y, a menudo, describe una forma acordada de hacer algo o una solución a un problema global. ISO proporciona también una plataforma para desarrollar herramientas prácticas a través de un entendimiento común y la cooperación con todas las partes interesadas.<sup>60</sup>

En la actualidad, esta organización está conformada por 167 países, integrada por 809 comités técnicos para el cuidado del desarrollo de estándares (24,533), que cubren casi todos los procesos de tecnología y manufactura. Sus miembros (uno de cada país) son expertos que comparten sus conocimientos y desarrollan estándares internacionales basados en el consenso y que son relevantes para el mercado, apoyan la innovación y brindan soluciones a desafíos globales. En el ámbito regulatorio, sus objetivos son armonizar las regulaciones entre los países para impulsar el comercio mundial, aumentar la credibilidad y la confianza en toda la cadena de suministro y facilitar que los países se especialicen en regulación.<sup>60</sup>

Una norma general de particular interés para los cromatógrafos es la ISO/IEC 17025, *General Requirements for the Competence of Testing and Calibration Laboratories*, publicada en 1999 y actualizada en 2017; se ocupa de áreas generales como términos y definiciones, requisitos de gestión y requisitos técnicos. También, esta norma aborda cuestiones que incluyen sistemas de calidad, personal, auditorías internas, validación de métodos, muestreo, estándares, equipos y manejo de datos. Por último, la ISO 9000 es una familia de normas que se ocupan de los sistemas de gestión de la calidad; son estándares genéricos, lo que significa que pueden aplicarse a cualquier organización que desee mejorar la satisfacción del cliente al satisfacer sus necesidades y los requisitos reglamentarios. La mayoría de los fabricantes y proveedores de cromatografía han cumplido con estas normas y han emitido certificados ISO 9000. Cabe señalar, que ISO no lleva a cabo la certificación y no emite certificados.<sup>55,61</sup>

### **IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*)**

Desde su inicio en 1919, la IUPAC sirve en todo el mundo como la principal agencia que fomenta la armonización entre los grupos químicos, industriales y académicos. Se reconoce como la autoridad en nomenclatura química y terminología, pesos atómicos y métodos estandarizados para mediciones; de sus ocho divisiones, la química analítica pertenece a la división 5. La IUPAC publica tres revistas, que incluye el *Pure and Applied Chemistry* y un boletín en línea, *Chemical Education International*. Entre sus libros publicados, existe un compendio sobre nomenclatura analítica. Las recomendaciones de la IUPAC sobre nomenclatura cromatográfica se publicaron originalmente en 1993 y resolvieron muchos símbolos y términos conflictivos. Algunos proyectos actuales de la IUPAC incluyen la armonización de los esquemas internacionales de garantía de calidad para los laboratorios analíticos y el estudio de las definiciones de picos cromatográficos asimétricos.<sup>55</sup>

### **Farmacopeas**

La palabra farmacopea procede del griego  $\varphi\alpha\rho\mu\alpha\kappa\omicron\nu\pi\omicron\iota\epsilon\iota\nu$ , que significa “hacer o confeccionar medicamentos o fármacos”; se conoce de esta forma al libro en que están las descripciones de los medicamentos. De acuerdo con el Reglamento de Insumos para la Salud, la farmacopea es un documento expedido por la Secretaría que consigna los métodos generales de

análisis y los requisitos sobre identidad, pureza y calidad de los fármacos, aditivos, medicamentos, productos biológicos y demás insumos para la salud.<sup>18</sup>

### **FEUM (*Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos*)**

Los orígenes de nuestra Farmacopea se remontan a los antiguos mexicanos, quienes se dieron a la tarea de organizar las características y usos de sus prácticas curativas. En 1552, Martín de la Cruz escribe en náhuatl su opúsculo sobre las hierbas medicinales: *Libellus de medicinalibus indorum herbis*, traducido al latín por el indio xochimilca Juan Badiano, y en donde se reúne a los principales medicamentos utilizados por los indígenas, incluyendo el método de preparación, indicaciones y usos. En el México independiente, fue publicado el “Formulario Magistral y Memorial Farmacéutico de Gassicourt” (1821), considerado como el antecedente directo de una farmacopea nacional. La primera Farmacopea Mexicana se publicó en 1846 por la Academia Farmacéutica de la Capital de la República. En el año 2000 se publicó la 7ª edición, a partir de la cual, un año después, se realizó la primera versión electrónica de la FEUM; este mismo año, surgieron las primeras ediciones de la Farmacopea Herbolaria (FHEUM) y la Farmacopea Homeopática y se estableció el Laboratorio de Sustancias de Referencia FEUM (SRef-FEUM). Estas características, la convierten en el conjunto de Farmacopeas más completo a nivel mundial, que abarca controles de calidad para los medicamentos alopáticos, homeopáticos, herbolarios, dispositivos médicos y controles de calidad para los establecimientos, como son las farmacias.<sup>18</sup> Actualmente, todas las farmacopeas en México se encuentran actualizadas y disponibles de manera impresa o digital (FEUM 13.0, FHEUM 3.0).

### ***Farmacopea de Brasil***

Es una organización científica independiente y sin fines de lucro; la supervisa la Agencia Brasileña de Vigilancia Sanitaria (ANVISA) y está enfocada en generar confianza en el suministro de medicamentos seguros y de calidad, en convergencia con las necesidades del Sistema Único de Salud y el desenvolvimiento científico y tecnológico nacional. La Farmacopea Brasileña es el código farmacéutico oficial del país, donde se establecen los requisitos mínimos de calidad para insumos farmacéuticos, medicamentos y productos sanitarios. La actualización de su sexta edición (2019; actualización 2022) se encuentra disponible en forma electrónica; además,

ANVISA cuenta con una Farmacopea Homeopática, formularios de productos homeopático y de fitoterápicos, así como un catálogo de sustancias químicas de referencia, entre otros documentos que son de gran utilidad en el quehacer analítico y de identificación de aquel país.<sup>62</sup> El Volumen II de la Farmacopea se compone de diversos documentos, entre los cuales destaca el de Plantas Medicinales, en el cual se encuentra el registro de la “raíz de Jalapa” con su clave de registro PM055-00; sin embargo, esta hace referencia a *Operculina macrocarpa* (L.) Urb., e incluye las características para su identificación a nivel macro y microscópico, cromatográfico (TLC) y un método analítico espectrofotométrico para la determinación de polisacáridos totales.

## **CLASIFICACIÓN DE LOS MÉTODOS DE VALIDACIÓN**

Un procedimiento analítico se desarrolla para evaluar una característica definida de la sustancia o producto farmacéutico, de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos para esa característica. Al principio del desarrollo de un nuevo procedimiento, la elección de la instrumentación analítica y la metodología debe seleccionarse en función del propósito y el alcance previstos para el método analítico.<sup>58</sup> A partir de esta premisa, los métodos analíticos pueden clasificarse en función a los siguientes aspectos:

1. Estado regulatorio
  - a. Métodos farmacopeicos
  - b. Métodos no farmacopeicos
2. Normativas para la industria
3. Naturaleza de la respuesta analítica
  - a. Métodos fisicoquímicos
  - b. Métodos biológicos
4. Propósito analítico
  - a. Métodos para cuantificar al analito (contenido o potencia)
  - b. Métodos para establecer la presencia del analito a un límite (impurezas)
  - c. Métodos para identificar al analito

De acuerdo con la Guía Q2(R1) de la ICH, la última clasificación es la que se utiliza para establecer los parámetros de desempeño a estudiar en la validación del método analítico.

## **PARÁMETROS DE VALIDACIÓN**

Los parámetros de validación, son aquellos que conforman una secuencia de pruebas específicas para demostrar que un proceso genera resultados que cumplen con los criterios preestablecidos de manera consistente (protocolo de validación).<sup>54,55</sup> Dicho protocolo se planifica de acuerdo con el propósito analítico que pretende satisfacer el método analítico a desarrollar, mismo que puede estar constituido por técnicas de separación, extracción o derivatización y por técnicas de medición (espectrofotometría, colorimetría, volumetría, potenciometría, etc.), que permitan medir la respuesta del analito en la muestra.<sup>54,63</sup> El Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A.C., realizó una Guía de Validación de Métodos Analíticos, basada en la Guía Q2(R1) de la ICH y en concordancia con la FDA, que ofrece información concisa y sistemática para la elección del protocolo de validación correcto, así como los parámetros a evaluar. A continuación, se describe brevemente el tipo de metodología a realizar, de acuerdo al uso que tendrá el método analítico:

### **Contenido o potencia**

Su propósito es el de establecer la cantidad de analito presente en una o varias muestras; este se utiliza en métodos para el análisis de productos a granel y/o terminados, materia prima, fármacos o para la determinación de la estabilidad del analito; del mismo modo, se utiliza en métodos de cuantificación, ya sea en pruebas de disolución, valoraciones, titulaciones y ensayos de cuantificación. Este tipo de protocolo también es funcional en la determinación de la cantidad de principio activo liberado y uniformidad de dosis, en el caso concreto de evaluación de productos farmacéuticos.<sup>54</sup>

### **Límite**

Este tipo de protocolo ayuda a establecer la presencia del analito a un límite determinado, por lo cual es útil en aquellos métodos de pruebas límite, así como también en aquellos en los que es preciso conocer el límite de impurezas y de residuos, además de aquellos métodos en los que el nivel de limpieza debe ser determinado.<sup>54</sup>

## Identificación

La identificación de uno o varios analitos es requerido en cualquier método analítico; sin embargo, este puede realizarse de manera aislada, constituyendo un ensayo de identidad, mismo que es útil en la determinación de la especificidad del sistema de trabajo.<sup>54</sup>

Con base en lo anteriormente descrito, es posible identificar el tipo de método a desarrollar y, de este modo, se determina el protocolo a seguir; los parámetros de evaluación para cada caso, se encuentran descritos en el **Cuadro 1**.<sup>54,55</sup>

**CUADRO 1.** Parámetros de desempeño que integran los diferentes protocolos de validación.

Parámetro de desempeño	Contenido Potencia Valoración	Pruebas de impurezas		Identificación	
		Contenido Valoración	Límite		
SISTEMA	Precisión / Adecuabilidad	Sí	Sí	Sí	*
	Linealidad	Sí	Sí	-	-
	Especificidad <sup>1</sup>	Sí <sup>3</sup>	Sí	Sí	Sí
MÉTODO	Exactitud y repetibilidad	Sí	Sí	-	-
	Linealidad	Sí	Sí	-	-
	Precisión / Precisión intermedia <sup>2</sup>	Sí	Sí	-	-
	Estabilidad analítica de la muestra <sup>2</sup>	*	*	-	-
	Límite de detección	No	-	Sí	-
	Límite de cuantificación	No	Sí	-	-
	Robustez	*	*	*	-
Tolerancia	*	*	*	-	

\*Puede requerirse dependiendo de la naturaleza del método

<sup>1</sup>La falta de especificidad de un método analítico, se puede compensar con otra alternativa analítica de soporte.

<sup>2</sup>También se define como un estudio de tolerancia.

<sup>3</sup>Un método que es exacto y lineal, por definición es específico al placebo analítico o a los otros componentes de la muestra.

## **EVALUACIÓN DE UN PROCEDIMIENTO ANALÍTICO**

Según lo indicado por la Guía Tripartita de Armonización (ICH), la validación de procedimientos analíticos requiere cumplir con algunos o todos los parámetros de desempeño, de acuerdo con la naturaleza del método. A continuación, se da una breve definición de cada uno de ellos.

### **Estándares y materiales botánicos de referencia**

De acuerdo con el NIST, una sustancia, mezcla compleja o muestra auténtica, suficientemente homogénea y estable respecto a una o más propiedades (cualitativas o cuantitativas), puede utilizarse de manera comparativa en procesos de medición e identificación. Los especímenes botánicos de referencia son materiales bien caracterizados para algunas plantas o partes de las mismas,<sup>64</sup> y son necesarios para hacer pruebas botánicas que proporcionen la información necesaria para identificación por especie y el perfil de las sustancias constituyentes de una muestra vegetal, de acuerdo a lo establecido por la FDA.<sup>65,55</sup>

### **Especificidad**

La especificidad es la capacidad de evaluar inequívocamente el analito en presencia de componentes que se puede esperar que estén presentes. Por lo general, éstos pueden incluir impurezas, degradantes, matriz, etc. La falta de especificidad de un procedimiento analítico individual puede compensarse con otros procedimientos analíticos de apoyo.<sup>55</sup>

### **Linealidad**

La linealidad es un aspecto útil para asegurar que los resultados, obtenidos directamente o por medio de una transformación matemática definida, sean proporcionales a la concentración del analito dentro de un intervalo determinado.

## **Exactitud**

La exactitud de un procedimiento analítico expresa la estrecha concordancia entre el valor que se acepta como un valor verdadero convencional o un valor de referencia aceptado y el valor encontrado. Esto a veces se denomina veracidad.

## **Precisión**

La precisión de un procedimiento analítico expresa la estrecha concordancia (grado de dispersión) entre una serie de mediciones obtenidas a partir de muestreos múltiples de la misma muestra homogénea en las condiciones prescritas. La precisión puede considerarse en tres niveles: repetibilidad, precisión intermedia y reproducibilidad.

La precisión debe investigarse utilizando muestras homogéneas y auténticas. Sin embargo, si no es posible obtener una muestra homogénea, puede investigarse utilizando muestras preparadas artificialmente o una solución de muestra. La precisión de un procedimiento analítico generalmente se expresa como la varianza, desviación estándar o coeficiente de variación de una serie de mediciones.

### **- Repetibilidad**

La repetibilidad expresa la precisión en las mismas condiciones de funcionamiento durante un corto intervalo de tiempo. La repetibilidad también se denomina precisión intraensayo.

### **- Precisión intermedia**

La precisión intermedia expresa variaciones dentro de los laboratorios: diferentes días, diferentes analistas, diferentes equipos, etc.

### **- Reproducibilidad**

La reproducibilidad expresa la precisión entre laboratorios (estudios colaborativos, generalmente aplicados a la estandarización de la metodología).

De acuerdo con la finalidad del método, se seleccionarán los parámetros necesarios.

## **Límite de detección**

El límite de detección de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede detectarse, pero no necesariamente cuantificarse como un valor exacto. No sólo depende del detector, sino también de otros factores, como son: presencia de oxígeno en la fase móvil, el sistema de inyección, el ancho de pico en la columna utilizada y la diferencia de temperatura entre los componentes del sistema.

## **Límite de cuantificación**

El límite de cuantificación de un procedimiento analítico individual es la cantidad más baja de analito en una muestra que puede determinarse cuantitativamente con la precisión y exactitud adecuadas y bajo las condiciones de operación establecidas. El límite de cuantificación es un parámetro de los ensayos cuantitativos para niveles bajos de compuestos en matrices de muestra, y se utiliza particularmente para la determinación de impurezas y/o productos de degradación.

## **Rango**

El rango de un procedimiento analítico es el intervalo entre la concentración superior e inferior (cantidades) de analito en la muestra (incluidas estas concentraciones) para las que se ha demostrado que el procedimiento analítico tiene un nivel adecuado de precisión, exactitud y linealidad.

## **Robustez**

La robustez de un procedimiento analítico es una medida de su capacidad para no verse afectada por variaciones pequeñas, pero deliberadas, en los parámetros del método y proporciona una indicación de su fiabilidad durante el uso normal.

## OBJETIVO GENERAL

Desarrollar y validar un método analítico para la cuantificación de los ácidos glicosídicos mayoritarios de la especie *Operculina hamiltonii*, mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), para el control de calidad de muestras comerciales elaboradas a partir de jalapa brasileña.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Derivatización química de una muestra de material auténtico de *O. hamiltonii* para purificar los ácidos operculínicos A y B peracetilados, marcadores químicos mayoritarios de esta especie, con la finalidad de utilizarlos como estándares en el desarrollo del método analítico.
- Desarrollo de un método analítico para la cuantificación de los ácidos glicosídicos A y B peracetilados.
- Validación del método analítico, de acuerdo con los criterios de aceptación establecidos por la ICH, en colaboración con la FDA.
- Derivatización química de las cinco muestras comerciales a las que se realizará el control de calidad, mismas que son utilizadas en el tratamiento de la constipación intestinal y presuntamente son elaboradas a partir de la droga vegetal conocida como jalapa brasileña,
- Cuantificación de los ácidos operculínicos A y B peracetilados en las muestras comerciales de estudio.

## MATERIAL VEGETAL Y PRODUCTOS COMERCIALES

Tanto el material vegetal como las muestras comerciales utilizadas en el presente trabajo, se adquirieron en la expedición realizada durante el mes de septiembre de 2015, que abarcó diversos mercados municipales (Belém, Santarém y Oriximiná, Pará, Brasil) y comunidades ribereñas quilombolas ubicadas en el estado de Pará, en el norte de Brasil. Debido al hermetismo de los habitantes, se recurrió a informantes respetados en la zona, tales como agentes de salud, matriarcas, parteras y curanderos, quienes compartieron sus conocimientos para recolectar e identificar las muestras vegetales, además de compartir los usos etnomedicinales.

## MATERIAL BOTÁNICO DE REFERENCIA

Una muestra compuesta por raíces tuberosas de jalapa amarilla se recolectó en el Quilombo de Varre-Vento, perteneciente a la comunidad de Oriximiná en Pará, Brasil, bajo la aprobación del Consejo de Gestión del Patrimonio Genético (CGEN, acrónimo en portugués), asentado en la resolución CGEN No. 213 (6.12.2007), renovada en la resolución CGEN No. 87/2012 y con la autorización AEAC3E9 en 2018 (**Fig.18**).



**FIGURA 18.** Material botánico de referencia a partir del cual se obtuvo el extracto principal que se utilizó para el aislamiento y la caracterización de los ácidos operculínicos mayoritarios de la especie *O. hamiltonii*.

La identificación y clasificación botánica la llevó a cabo el Dr. Rogelio G. Pereda Miranda, tras comparar la muestra con ejemplares auténticos de *O. hamiltonii* que forman parte del catálogo del Herbario Nacional (Instituto de Biología, UNAM), con los números de depósito MEXU: 1238977 y 977986. Este material vegetal se utilizó como material botánico de referencia (MBR).

## MATERIAL VEGETAL PARA PURIFICACIÓN DE ESTÁNDARES

Los ácidos operculínicos peracetilados que sirvieron como estándares en el desarrollo de los métodos analíticos que integran el presente trabajo, se purificaron a partir de raíces cultivadas en los campos agronómicos de la Industria Farmacéutica Sobral, ubicada en Floriano, Piauí, Brasil. Dichas raíces se autenticaron a partir de su comparación cualitativa HPLC-ESIMS con el material botánico de referencia.

## FITOFÁRMACOS COMERCIALES

Se analizaron cinco productos fitoterapéuticos con distintas presentaciones farmacéuticas, como son: comprimidos, polvos, extractos hidroalcohólicos (tinturas) y jarabes herbales (**Cuadro 2**); éstos se adquirieron en mercados municipales de la zona norte del territorio brasileño (Belém, Santarém y Oriximiná) y droguerías locales del estado de Pará. En cada caso, el fabricante informa el contenido del producto y la dosis recomendada para lograr el efecto terapéutico deseado. En el **Anexo B**, se presenta la información relacionada con cada uno de ellos.

**CUADRO 2.** Productos comerciales que se analizaron de forma cualitativa y cuantitativa

Producto comercial	Marca y descripción
Píldoras Maciel	Maciel Phytotherapeutic Industry. Pímulas (comprimidos)
Tintura de Jalapa Sobral ®	Sobral Pharmaceutical Industry Ext. Hidroalcohólico de raíz de jalapa (tintura)
Tintura Batatão Hypólito	Jarabe. Raíz de jalapa y otros ingredientes activos.
Tiro Seguro	Brazilian Industry. Raíz de jalapa y otros ingredientes activos.
Batata de purga en polvo, Jalapa	Mercadão Natural Polvo obtenido a partir de raíz seca de jalapa brasileña.

## **OBTENCIÓN DE EXTRACTOS**

En ambos casos, la droga vegetal fresca se cortó en rodajas delgadas para facilitar su secado; posteriormente, ésta se fragmentó a un tamaño de 2 mm con un molino de cuchillas Thomas Wiley (Modelo. 4; Thomas Scientific, EU). Posteriormente, se sometió a un proceso de maceración exhaustiva (extracción sólido-líquido) con una mezcla extractiva  $\text{CH}_2\text{Cl}_2$ -EtOH en proporción 1:1; el producto de maceración se filtró y concentró a sequedad a presión reducida a temperaturas menores a 40°C.

## **TRATAMIENTO DE LAS MUESTRAS COMERCIALES**

En el caso del producto comercial de nombre Pímulas Maciel, se pesaron veinte comprimidos de manera independiente y se obtuvo el valor promedio; posteriormente, se trituraron cinco comprimidos con el uso de un mortero de porcelana y se pesó la cantidad de polvo obtenido, el total se utilizó para el análisis. Las muestras líquidas y los comprimidos pulverizados se utilizaron de manera directa en los procesos de derivatización.

## **DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS**

La derivatización de las resinas glicosídicas contenidas en el producto de maceración del material botánico de referencia y de las muestras comerciales, se inició con un proceso de hidrólisis básica seguido de una peracetilación, para obtener una mezcla de ácidos glicosídicos peracetilados. De acuerdo con el tipo de formulación del producto se eligieron las condiciones de reacción; a continuación, se describen brevemente ambos procedimientos:

### **HIDRÓLISIS BÁSICA**

Para los extractos hidroalcohólicos, se tomaron 30 mL de muestra y se adicionaron 1.5 g de hidróxido de potasio; en el caso de las muestras sólidas pulverizadas, se agregó un volumen determinado de una solución de KOH 5%. Dicha mezcla de reacción, se mantuvo en reflujo a una temperatura de 96 °C en baño de aceite y con agitación constante durante cuatro horas. Posteriormente, el pH de la mezcla de reacción se ajustó a 5, mediante la adición de una solución de ácido clorhídrico 4 M y se realizaron tres extracciones con diclorometano. Se reservó la fase

orgánica y se llevó a cabo una segunda serie extractiva con *n*-butanol; la fase butanólica se lavó por triplicado con agua desionizada, con la finalidad de eliminar las sales formadas y se llevó a sequedad, obteniendo así la mezcla de ácidos glicosídicos presentes en cada una de las muestras.

## **PERACETILACIÓN**

Al producto de hidrólisis, se agregó la cantidad necesaria de una mezcla de piridina/anhídrido acético en proporción 2:1. La mezcla de reacción se dejó en agitación constante durante 48 horas; posteriormente, se agregó un volumen equivalente de agua helada. Para el aislamiento del producto peracetilado, se realizó una serie de tres extracciones con acetato de etilo como disolvente extractivo y se reservó la fase orgánica; acto seguido, ésta se lavó por duplicado con una disolución de ácido clorhídrico 1M. Para neutralizar, se realizaron dos lavados con una solución saturada de bicarbonato de sodio y, para la eliminación de las sales formadas, se lavó por duplicado con agua desionizada. Por último, se secó con sulfato de sodio anhidro y se llevó a sequedad, obteniendo así el producto de peracetilación.

## **ESTÁNDARES**

### **ANÁLISIS CUALITATIVO (HPLC-ÍNDICE DE REFRACCIÓN)**

Para la obtención del perfil cromatográfico de los ácidos operculínicos peracetilados mayoritarios de las muestras vegetales MBR y Sobral, se utilizó la técnica analítica de cromatografía de líquidos de alta eficiencia de fase reversa (*High-Performance Liquid Chromatography*, HPLC); para ello, se usó un cromatógrafo de la marca Waters (Millipore Corporation Waters, Chromatography Division Milford, MA, US), conformado por un detector de índice de refracción Modelo 2410 (*Refractive Index Detector*, RI) y una bomba semipreparativa de la marca Jasco, Modelo PU-4086. Para el procesamiento de las respuestas analíticas se utilizó el Programa Empower 2, desarrollado por la industria Waters.

En el análisis cualitativo se utilizó una columna analítica de octadecilsilano C-18 Marca Shiseido Modelo MGII con un tamaño de partícula de 5  $\mu\text{m}$ , 300 mm de longitud y 3.9 mm de diámetro interno. Como sistema de elución se utilizó una fase móvil binaria compuesta por  $\text{CH}_3\text{CN}$  (grado HPLC, J.T. Baker) y agua desionizada en una proporción 9:1 en elución isocrática,

temperatura interna del equipo de 40 °C flujo de 0.4 mL/min y volúmenes de inyección de 20 µL con MeOH (grado HPLC, J.T. Baker) como vehículo de inyección.

### **PURIFICACIÓN DE ESTÁNDARES (HPLC-DAD)**

Los productos peracetilados de los ácidos operculínicos A y B no se encuentran disponibles a nivel comercial, por lo que se aislaron y purificaron a partir del material destinado para dicho fin. El procedimiento se realizó mediante la técnica analítica HPLC fase reversa, con un cromatógrafo de líquidos marca Waters, provisto de un detector de UV de arreglo de diodos Modelo 2996 (*Photodiode Array Detector*, DAD), una bomba Modelo 600 y una válvula de recirculación de muestra y disolvente.

Para el procesamiento de las respuestas analíticas se utilizó el Programa Empower 2, desarrollado por Waters. En esta etapa experimental, se utilizó la columna Shiseido bajo las mismas condiciones de trabajo que en el análisis cualitativo de dichas muestras.

### **DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO**

La técnica analítica que se utilizó para el desarrollo del método analítico fue la cromatografía líquida de alta eficiencia, acoplada a espectrometría de masas con ionización mediante electrospray (HPLC-ESIMS) con un equipo de la marca Agilent (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, US), equipado con una bomba binaria de la serie 1260 Modelo G1312B9, acoplada a un espectrómetro de masas tipo triple cuadrupolo Modelo Agilent 6410, ajustado para coleccionar datos de  $m/z$  50 a 1650. El voltaje para la ionización en modo positivo fue de 100 V, con nitrógeno como gas nebulizador a 50 psi con un flujo de 12 L/min, temperatura 350 °C, voltaje del capilar, 4 kV.

Para el segmento de cromatografía de líquidos, se utilizó una columna Agilent C-8 Modelo G1316A (3.0 × 150 mm × 3.5 µm); con una velocidad de flujo de 0.3 mL/min y fase móvil binaria compuesta por CH<sub>3</sub>CN-H<sub>2</sub>O y previamente acidulada con ácido fórmico 0.1%, comenzando con una proporción 60% de CH<sub>3</sub>CN hasta incrementarlo linealmente a 100% en un lapso de 22 minutos.

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Los parámetros de desempeño considerados en la validación del método analítico presentado en este trabajo, se implementaron de acuerdo al documento *Validation of Analytical Procedures Q2(R1): Text and Methodology* (ICH), en concordancia con la guía emitida por la FDA de nombre *Analytical Procedures and Methods Validation for Drugs and Biologics (Guidance for Industry)*. Dado que el propósito analítico es el de cuantificar un analito en una o diversas muestras, se evaluaron los siguientes aspectos: especificidad, adecuabilidad y linealidad del sistema; así como exactitud, precisión (repetibilidad) y recobro del método.

### DISOLUCIONES STOCK

Las disoluciones stock de los ácidos operculínicos A y B peracetilados, se prepararon de manera independiente, a una concentración de 80 y 210 ppm, respectivamente; en ambos casos se utilizó MeOH (grado HPLC, J.T. Baker) como disolvente. A partir de ellas se realizaron las diluciones necesarias para la preparación de las disoluciones usadas en los ensayos de validación.

### EVALUACIÓN DEL SISTEMA

#### Adecuabilidad (idoneidad) y precisión

En ambos sistemas, la adecuabilidad y la precisión se evaluó a partir de la inyección por sextuplicado de una disolución de concentración 25 ppm. Para dicho sistema se calcularon diferentes parámetros cromatográficos, tales como el coeficiente de variación, el factor de retención, el factor de coleo, la resolución y el número de platos teóricos, de acuerdo con lo planteado en la *Guía de validación de métodos analíticos*, editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos de México.

#### Linealidad

La linealidad del método se determinó a partir del análisis de tres curvas de calibración para cada sistema; inicialmente, se prepararon las disoluciones stock, de las cuales se realizaron las diluciones de trabajo. Los niveles de concentración fueron los siguientes: 5, 25, 50, 75 y 100 ppm para ambos marcadores a evaluar (**Cuadros 3 y 4**). A partir de la respuesta analítica en cada caso,

se realizó su análisis estadístico con el software Statgraphics Centurion XVI ®, mediante regresión lineal por el método de mínimos cuadrados y se calculó la ordenada al origen, la pendiente de la recta, el coeficiente de correlación (R) y el coeficiente de determinación (R<sup>2</sup>), además del coeficiente de variación entre las mediciones.

**CUADRO 3.** Sistemas de trabajo a partir de una disolución stock 80 ppm de ácido operculínico A, peracetilado.

Nivel de concentración	Volumen Stock (μL)	Aforo con MeOH (mL)	Concentración (ppm)
1	63	1	5
2	312	1	25
3	625	1	50
4	937	1	75
5	1250	1	100

**CUADRO 4.** Sistemas de trabajo a partir de una disolución stock 210 ppm de ácido operculínico B, peracetilado.

Nivel de concentración	Volumen Stock (μL)	Aforo con MeOH (mL)	Concentración (ppm)
1	24	1	5
2	120	1	25
3	238	1	50
4	357	1	75
5	476	1	100

## VALIDACIÓN DEL MÉTODO

### Exactitud y recobro

Se preparó el placebo analítico, que consistió en una disolución que contiene cantidades constantes de los ácidos operculínicos A y B peracetilados (50 ppm de cada uno de ellos); este placebo se utilizó en todas las muestras analíticas de este ensayo. Para evaluar los parámetros requeridos, se realizaron nueve determinaciones conformadas por tres niveles de concentración, para lo cual, se agregó el volumen necesario de una disolución Stock del analito por analizar (ver

sección: Disoluciones stock) y así aumentar la concentración en 5, 25 y 50 ppm bajo el esquema antes explicado. A partir de las señales analíticas obtenidas, se realizó su análisis estadístico y se calculó el índice de recobro por medio de interpolación en la ecuación de linealidad, así como el porcentaje de exactitud. El análisis correspondiente a la linealidad del comportamiento existente entre las concentraciones recuperadas y las esperadas, se llevó a cabo con el software Statgraphics Centurion XVI ®.

### **Precisión intermedia y repetibilidad**

La evaluación de la repetibilidad del método consistió en el análisis estadístico de nueve sistemas para cada analito, tres niveles de concentración (5, 50 y 100 ppm) y tres replicaciones, para los cuales se determinó el coeficiente de variación.

El estudio de la precisión intermedia comprendió la realización del análisis similar al de repetibilidad, llevado a cabo por dos analistas y dos días distintos y se compararon los coeficientes de variación para cada analista, por día y por niveles de concentración.

## **CUANTIFICACIÓN**

Se prepararon soluciones Stock del producto de peracetilación de cada una de las muestras comerciales; a partir de ellas, se realizaron las disoluciones problema a una concentración de 50 ppm de resinas peracetiladas totales y se analizaron bajo las condiciones de trabajo establecidas para el método de cuantificación de los ácidos operculínicos A y B derivatizados.

Se registró el área de cada uno de los picos de interés y, por medio de la interpolación en la ecuación de linealidad correspondiente, se determinó la concentración de cada analito en las disoluciones problema y, mediante los cálculos pertinentes, se llegó a la cantidad total de ambos marcadores fitoquímicos presente en los productos analizados.

---

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Las resinas glicosídicas o azúcares acilados (glicolípidos) son compuestos anfipáticos, debido a que están constituidos por un ácido alifático de cadena larga (aglicona o genina) unido a un núcleo oligosacárido (glicona o glúcido); es por ello que su aislamiento y purificación no representan una tarea sencilla, pues se encuentran en mezclas complejas de homólogos que, aun cuando éstos cuentan con sustituyentes alquilo que los diferencian entre sí, tienen una polaridad muy similar. Se han utilizado diversas técnicas cromatográficas destinadas a la purificación de esta clase de azúcares acilados, tales como la cromatografía en capa fina y en columna abierta o de baja presión usando sílica gel, sephadex, intercambio iónico, filtración en gel; sin embargo, ninguna de ellas conduce a resultados satisfactorios.<sup>5</sup> La cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC, por sus siglas en inglés) es la técnica que, hasta ahora, ofrece mejores resultados en la separación de resinas glicosídicas. La técnica de corte de núcleo y rasurado de pico, de manera individual o combinada, se han utilizado en la purificación de resinas glicosídicas de manera exitosa, sirviendo como una herramienta analítica eficaz en la autenticación de diversos materiales vegetales y en su control de calidad;<sup>66</sup> para lograr la homogeneidad, cada pico eluido se recicla manualmente o de manera automática, mediante una válvula de reciclaje hasta que los componentes superpuestos se separan y su resolución proporcione eluatos totalmente puros o con un alto grado de pureza (>98%).<sup>5</sup>

Por lo tanto, en el presente trabajo de investigación, se utilizó la cromatografía HPLC como técnica fundamental en el desarrollo del método analítico encaminado a la cuantificación de dos de los marcadores químicos de la especie *O. hamiltonii*: los ácidos operculínicos A y B. Para dicho propósito, se llevó a cabo un proceso de derivatización, que consistió en la hidrólisis básica del extracto total (raíces tuberosas) o de cierta cantidad del producto comercial para liberar los ácidos grasos esterificantes de los diversos núcleos oligosacáridos y, de este modo, obtener una mezcla de los ácidos glicosídicos libres, una vez que la ruptura del enlace éster de la macrolactona sucede durante el proceso de saponificación. Posteriormente, se realizó la peracetilación de los productos con la intención de hacerlos diferenciables entre sí -en cuanto a polaridad y su afinidad por una fase inversa C<sub>18</sub> en HPLC- y lograr una mejor resolución de las bandas cromatográficas.<sup>66</sup>

## EXTRACTOS TOTALES Y DERIVATIZACIÓN

La maceración exhaustiva correspondiente a la muestra auténtica de *O. hamiltonii*, considerado como material botánico de referencia; se realizó a partir de 80.5 g de raíz tuberosa pulverizada, obteniendo 1.06 g de un sólido resinoso de color ámbar oscuro. El macerado total seco se sometió a un proceso de hidrólisis básica, dando como resultado 70 mg de producto hidrolizado seco, a partir del cual se llevó a cabo un proceso de peracetilación, del cual se obtuvieron 47 mg de producto total peracetilado seco.

En el caso de la muestra destinada a la purificación de estándares (raíces Sobral), se contó con 211.3 g de material vegetal seco y pulverizado, del cual se obtuvieron 2.40 g de extracto total y 180 mg de producto hidrolizado, a partir del cual se generaron 221 mg de producto total peracetilado seco.

## DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS COMERCIALES

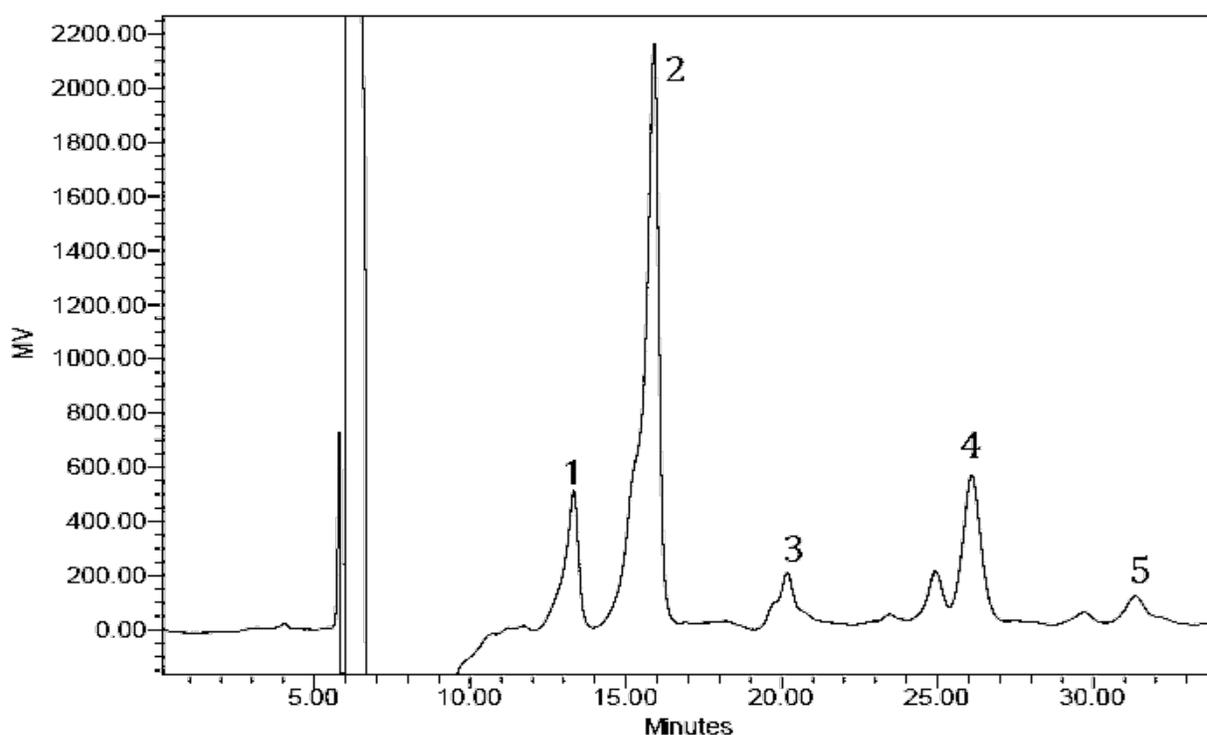
Para iniciar el proceso de análisis de las muestras comerciales, se tomó una cantidad de la muestra problema para realizar el proceso de derivatización, que consistió en una hidrólisis básica, seguida de la peracetilación del producto de hidrólisis, de manera análoga al procedimiento realizado en el material botánico de referencia. Las cantidades obtenidas se enumeran en el **Cuadro 5**.

**CUADRO 5.** Cantidades iniciales de cada una de las muestras comerciales analizadas, así como de sus productos de derivatización (hidrólisis básica y peracetilación).

Muestra comercial	Cantidad de muestra		
	Inicial	Hidrólisis (mg)	Peracetilación (mg)
Pímulas Maciel	3.64 g (5 píldoras)	8.6	6.7
Tintura de Jalapa Sobral ®	30 mL	29.2	18.5
Batatao Hypólito	30 mL	67.7	50.5
Tiro Seguro	30 mL	5.7	4.9
Batata de purga en polvo	50 mg	14.1	16.1

## DESARROLLO DEL MÉTODO ANALÍTICO

Se inició el desarrollo del método analítico con la purificación y elucidación estructural de los ácidos operculínicos mayoritarios constitutivos de la especie *O. hamiltonii* a partir del material botánico de referencia; para ello, se usó la técnica analítica de cromatografía de líquidos HPLC-RI a nivel preparativo, utilizando la técnica de corte de núcleo y, posteriormente, se purificaron los cinco compuestos mayoritarios mediante el reciclaje de la muestra en un columna de fase reversa C-18 en HPLC preparativo. Tras el análisis de experimentos mono y bidimensionales de RMN, se realizó la elucidación estructural de cada uno de ellos, misma que concuerda con las fórmulas moleculares calculadas por medio del uso de la espectrometría de masas de alta resolución.<sup>66</sup> En la **Fig. 19**, se muestra dicho cromatograma, indicando los ácidos glicosídicos mayoritarios que fueron caracterizados (huella digital), entre los cuales se encuentran el ácido operculínico B (**1**) y el ácido operculínico A (**2**).

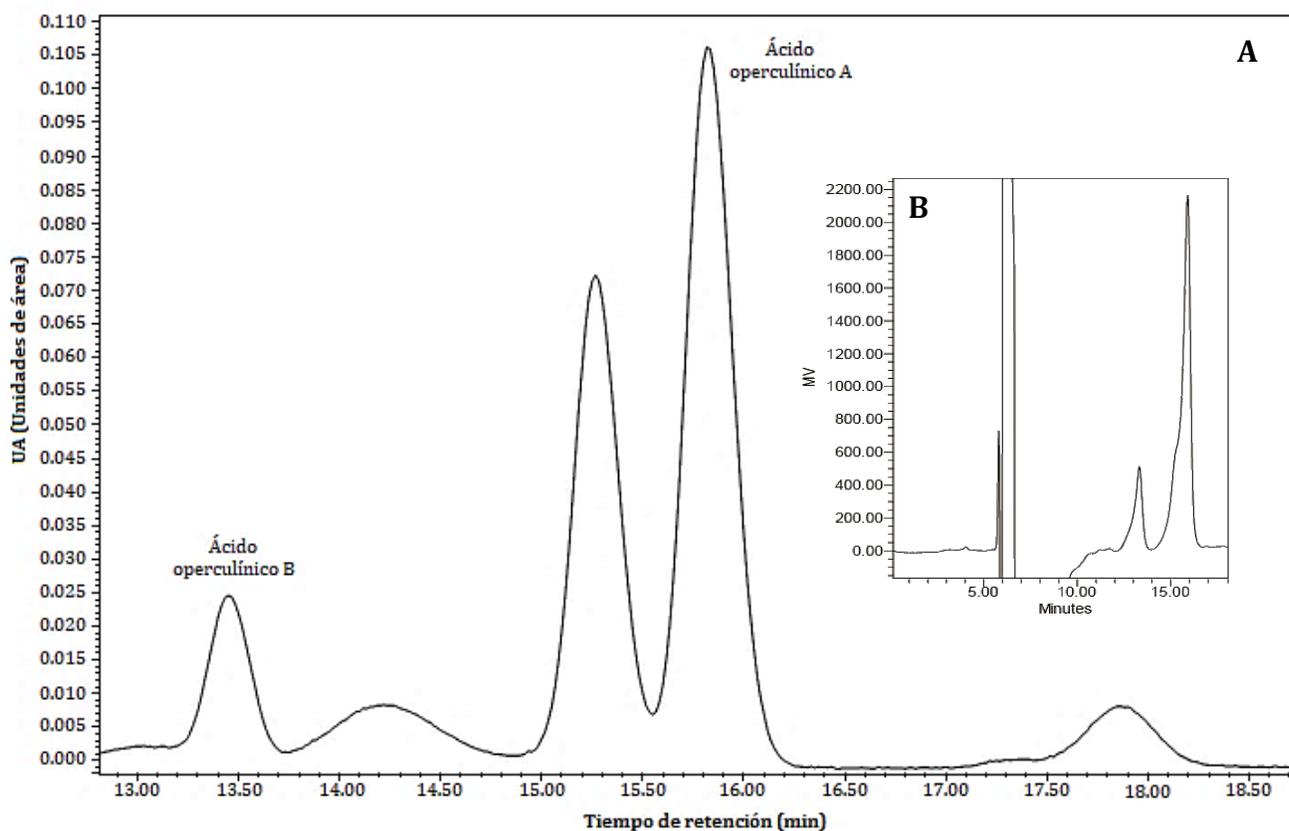


**FIGURA 19.** Cromatograma HPLC-RI a nivel preparativo del extracto derivatizado del material botánico de referencia, en que se indican los ácidos glicosídicos mayoritarios que fueron caracterizados: ácido operculínico B (1), ácido operculínico (2), ácido turpético C (3), ácido operculínico L (4) y ácido operculínico M (5).

## AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE ESTÁNDARES

Para desarrollar y validar un método analítico, es preciso contar con sustancias que puedan ser utilizadas como referencia o estándar.<sup>63</sup> Debido a que los productos peracetilados de los ácidos operculínicos A y B no se encuentran disponibles a nivel comercial, fue necesario purificar una cantidad suficiente de ambos compuestos mayoritarios a partir del extracto derivatizado de la muestra cruda Sobral.

Tomando en consideración el hecho de que el límite de detección de equipos HPLC-ESIMS se encuentra en el rango de picogramos, el proceso de purificación se llevó a cabo utilizando la técnica HPLC-DAD, pues este tipo de instrumentos cuentan con un límite de detección del orden de 100 pg si se elige una longitud de onda que permita observar eficientemente los componentes de la muestra y diferenciar entre ellos lo mejor posible.<sup>65</sup>



**FIGURA 20.** Cromatograma HPLC-PDA ( $\lambda = 215 \text{ nm}$ ), obtenido de una muestra auténtica de *O. hamiltonii* que contiene los ácidos operculínicos A y B, con tiempos de retención  $t_R$  13.4 min y  $t_R$  15.8 min, respectivamente (A). Cromatograma HPLC-RI de la misma muestra, bajo las mismas condiciones de trabajo (B).

El estudio de la muestra se realizó bajo las mismas condiciones de trabajo usadas en el análisis cualitativo HPLC-RI (**Figura 19**). Se monitoreó la absorbancia de los componentes presentes en la muestra en un intervalo de longitudes de onda de  $200 < \lambda < 400 \text{ nm}$  y, de este modo, se determinó la longitud de onda óptima ( $\lambda = 215 \text{ nm}$ ) en que se observó una mejor detección de las bandas correspondientes a los compuestos de análisis. En la **Fig. 20** se muestra el cromatograma obtenido a la longitud de onda elegida (A), así como un fragmento del adquirido mediante índice de refracción (B); en los cuales es posible confirmar que la técnica de HPLC-DAD logra definir adecuadamente las bandas de los compuestos presentes, hecho que permitió aislar los componentes de interés, utilizando la técnica de corte de núcleo de una forma eficaz y más rápida con respecto a HPLC-RI, pues esta última es apropiada para rangos en la escala de nanogramos o mayores, además de ser una técnica más general y menos específica.<sup>65</sup> Finalmente, se purificaron 0.2 g de ácido operculínico A y 0.1 g de ácido operculínico B.

## EVALUACIÓN DEL SISTEMA

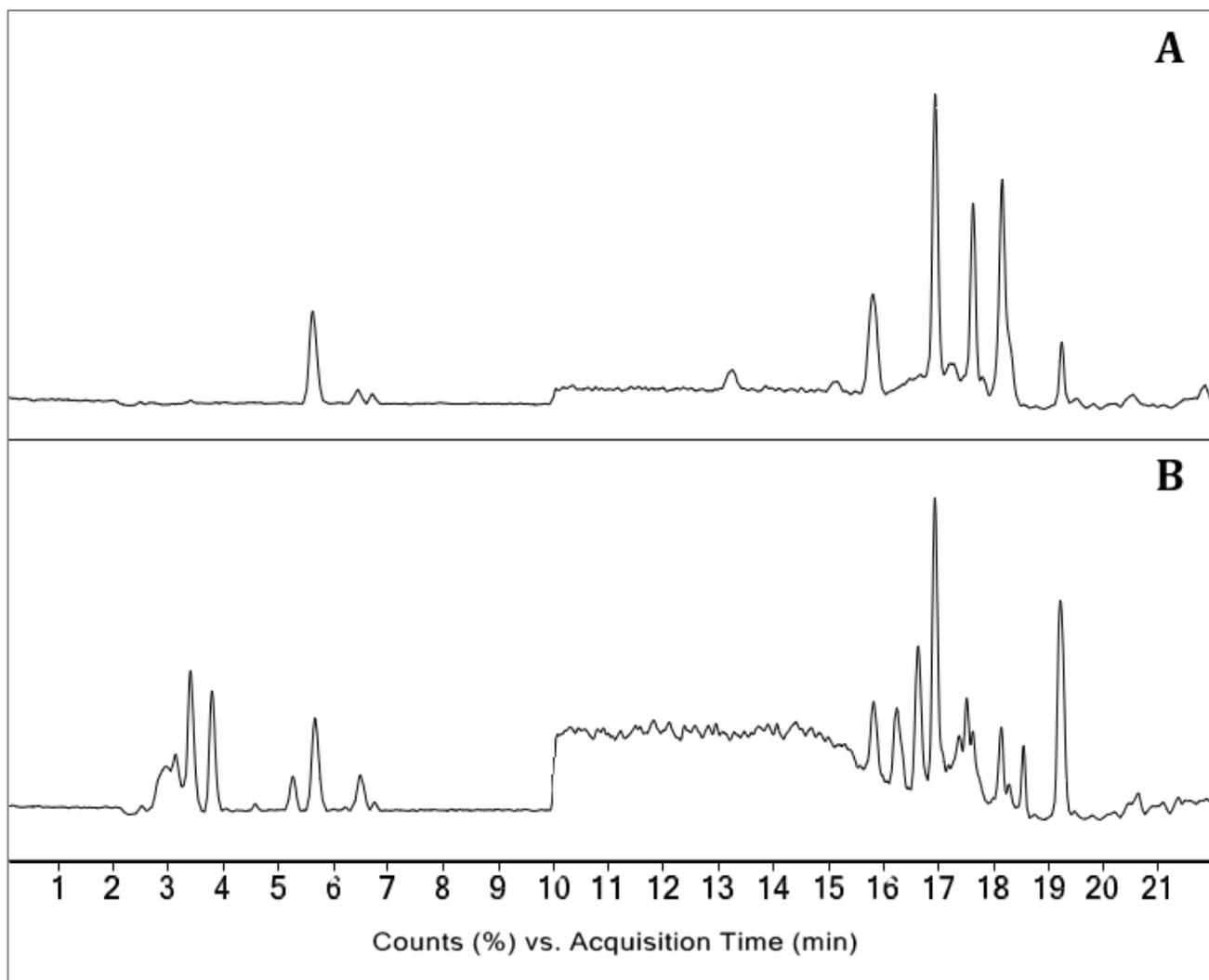
### ANÁLISIS CUALITATIVO MEDIANTE HPLC-ESIMS: ESPECIFICIDAD

Previamente, se utilizó como método analítico a la cromatografía de líquidos acoplada fuera de línea a la espectrometría de masas HPLC-MS (FAB y ESI) para la identificación de nuevos constituyentes de las resinas glicosídicas obtenidas del extracto metanólico de las especies *I. alba* e *I. tricolor*. En esta ocasión, se demostró que el cambio en el voltaje para la ionización de las resinas glicosídicas, permitía la detección de las especies protonadas  $[M + H]^+$  y cationizadas  $[M + Na]^+$  de los analitos a voltajes bajos, en tanto que el empleo de voltajes altos generaba una fragmentación profusa que permitió la detección de fragmentos de bajo peso ( $m/z$ ) fácilmente registrables por sus elevadas abundancias relativas en la corriente iónica total. Con base en estos resultados de nuestro grupo de investigación, se realizó un estudio mediante HPLC-ESIMS pues, a través de los espectros de masas, sería posible identificar cada uno de los constituyentes mayoritarios, debido a que se disponía de las muestras auténticas de los ácidos glicosídicos constitutivos de la jalapa brasileña con flores amarillas (batata de purga en polvo).

El cromatograma generado mediante HPLC-ESIMS se ilustra en la **Figura 21**. Para cada una de las muestras analizadas, se realizó el mismo procedimiento; sin embargo, debido a que el equipo utilizado con un analizador de masas triple cuadrupolo de baja resolución operado con una resolución de masa unitaria sólo permitió el registro de datos de  $m/z$  en el intervalo de 50 a 1650 unidades de masa/carga, se utilizó un voltaje de ionización alto para inducir la fragmentación de los iones  $[M+Na]^+$  y obtener iones de  $m/z$  pequeños y con una abundancia relativa del 100 %, a partir de los cuales fue posible identificar cada uno de los picos mayoritarios generados en dicha muestra, mismos que se consideraron como fragmentos diagnósticos. En la **Figura 21**, se muestran los tiempos de retención correspondientes a cada uno de los picos detectados en la batata de purga comercial utilizada como referencia, dada su simplicidad cromatográfica (**A**), así como la detección de éstos en una de las muestras de material vegetal crudo Sobral (**B**). En el **Cuadro 6**, se presentan los valores de masa/carga detectados para la molécula catiónica  $[M + Na]^+$  (MS trampa iónica mediante aspersión directa) y los fragmentos diagnósticos (HPLC-MS cuadrupolo, baja resolución) asociados a cada una de las fracciones identificadas en el material botánico comercial de referencia de *O. hamiltonii* (**Fig. 21 A**), así como la relación  $m/z$  obtenida en cada método respecto a los tiempos de retención registrados.

**CUADRO 6.** Relación de valores de  $m/z$  obtenida en HPLC-ESIMS para cada eluato registrado del material botánico de referencia de *O. hamiltonii*

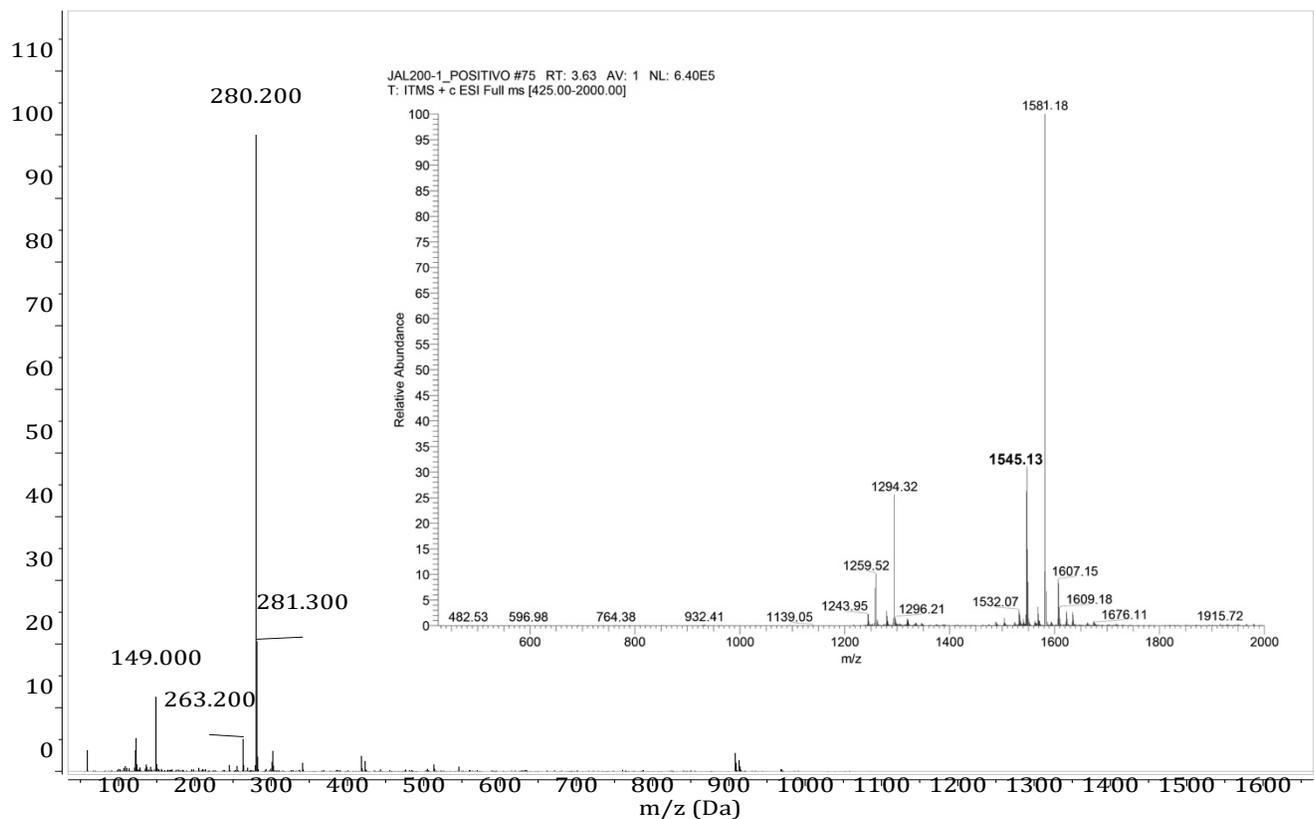
Fracción	$t_R$ (min)	$m/z$ $[M+Na]^+$	$m/z$
		(trampa iónica)	(triple cuadrupolo)
Ácido operculínico B	15.80	1603.93	254.20
Ácido operculínico A	16.90	1545.13	280.20
Ácido turpético C	17.60	1617.65	256.30
Ácido operculínico L	18.10	1559.64	282.30
Ácido operculínico M	19.20	1573.67	486.30



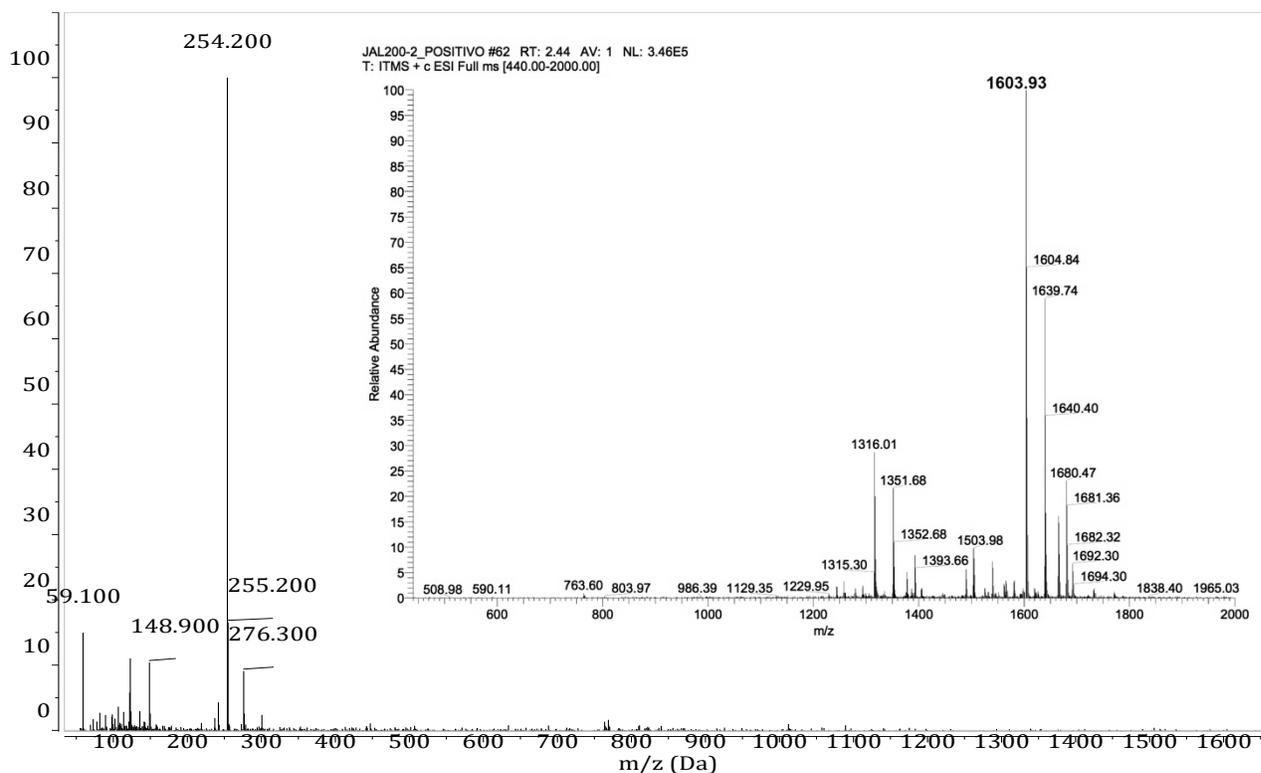
**FIGURA 21.** Cromatogramas HPLC-ESIMS del producto de peracetilación de los ácidos glicosídicos contenidos en el material botánico de referencia de *O. hamiltonii* (A), así como el correspondiente al material crudo Sobral (B), a partir del cual se purificaron los ácidos operculínicos A y B.

A partir de perfiles HPLC-RI, se realizó un análisis cualitativo de diversas muestras (material vegetal fresco y productos comerciales), mismo que permitió detectar múltiples similitudes entre estas con el material botánico de referencia; sin embargo, no fue posible asegurar que los picos con tiempos de retención similares correspondieran de manera inequívoca con los marcadores fitoquímicos de dicha especie; por lo anterior, se realizó un estudio mediante HPLC-ESIMS pues, a través de los espectros de masas sería posible identificar cada uno de los componentes correlacionados con los respectivos tiempos de retención, además de la posibilidad de generar

una base de datos para su dereplicación. De esta forma, se determinó el valor de  $m/z$  de cada uno de los iones generados bajo ionización por electrospray de los productos peracetilados bajo las condiciones de análisis descritas en la parte experimental, mismos que se correlacionaron con los valores obtenidos en alta resolución para cada una de las moléculas cationizadas  $[M+Na]^+$ . De esta forma, es posible asegurar que la señal analítica registrada corresponde al ácido peracetilado a cuantificar, lo que hace que los métodos desarrollados sean específicos para cada uno de ellos, por lo que el sistema cumple con el criterio de aceptación requerido. La Figuras 22 y 23 muestran los espectros de masas generados por ionización en electrospray a baja resolución en un analizador de masas triple cuadrupolo y otro de trampa iónica que permitieron la identificación inequívoca de los marcadores mayoritarios para *O. hamiltonii*, los ácidos operculínicos A y B (**Cuadro 6**), respectivamente.

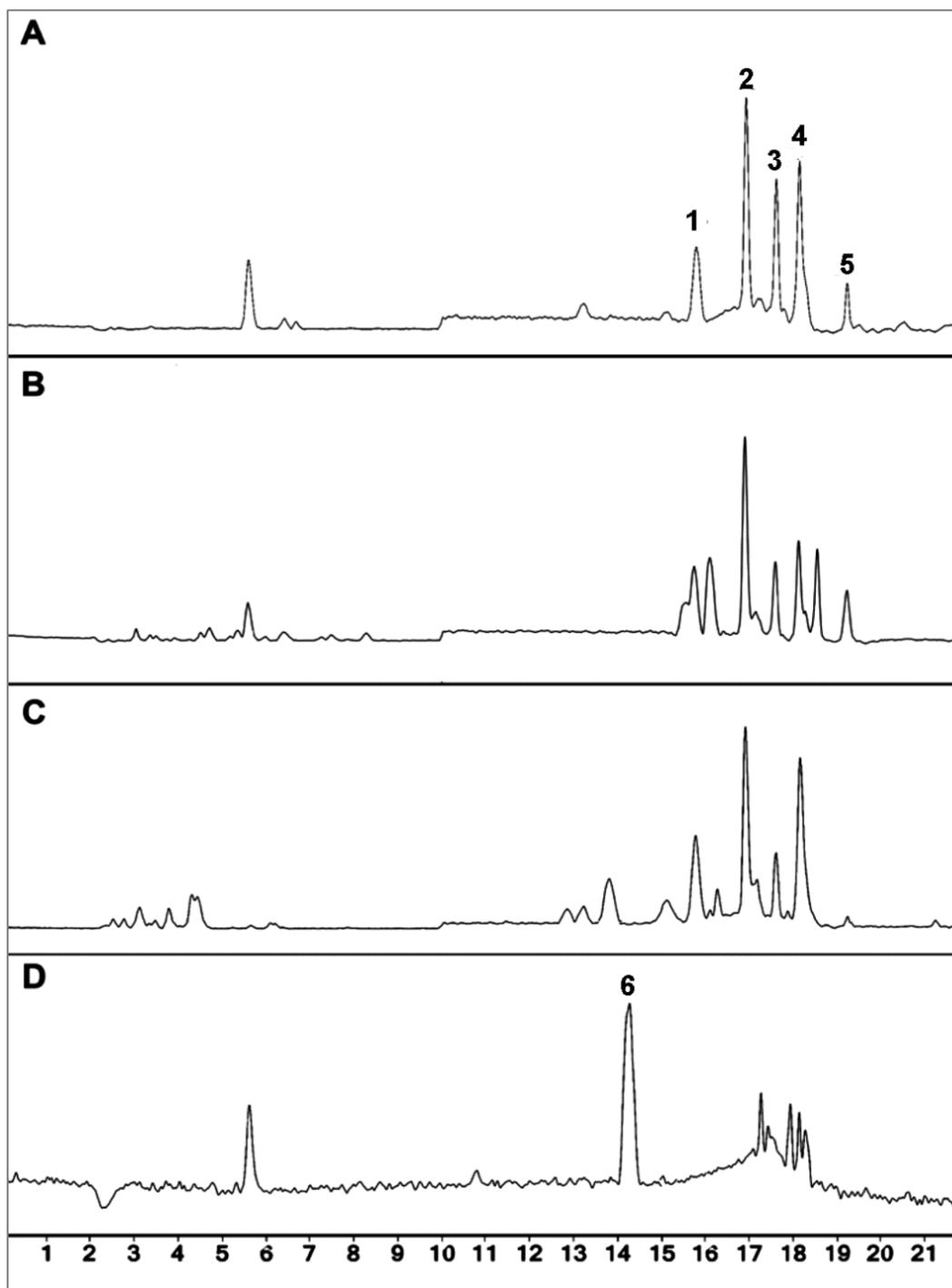


**FIGURA 22.** Espectros de masas por electrospray para el ácido operculínico A con valores de  $m/z$  para el catión fragmento diagnóstico ( $m/z$  280) y para los aductos de la molécula cationica  $[M + Na]^+$  ( $m/z$  1545) y  $[M + Na + 2H_2O]^+$  ( $m/z$  1581) y generados por el eluato de  $t_R = 16.9$  min.



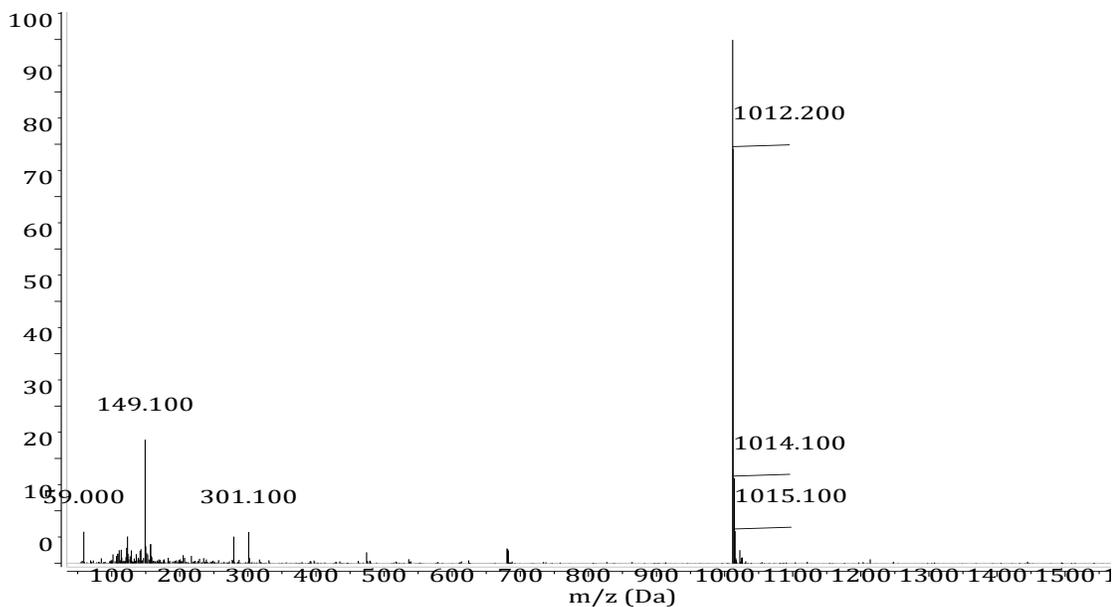
**FIGURA 23.** Espectros de masas por electrospray para el ácido operculínico B con valores de  $m/z$  para el catión fragmento diagnóstico ( $m/z$  254) y para los aductos de la molécula catiónica  $[M + Na]^+$  ( $m/z$  1603) y  $[M + Na + 2H_2O]^+$  ( $m/z$  1639) y generados por el eluato de  $t_R = 15.8$  min.

Se analizó el patrón de fragmentación de los picos obtenidos en cada una de las muestras y se compararon con los iones diagnóstico detectados a partir del material botánico comercial de referencia de *O. hamiltonii*. En el caso de las muestras derivadas de las drogas vegetales crudas, no sólo se observaron los picos diagnósticos, sino que también se detectó una mayor complejidad en la elución cromatográfica (15-20 min), lo que refleja una hiperdiversidad estructural en cuanto a las resinas glicosídicas de la especie en estudio (**Figura 24**). También, se observaron abundantes componentes de mayor polaridad (2 a 9 min) quizá correspondientes a sacáridos simples. En el caso de la muestra auténtica de *O. macrocarpa*, ésta presentó un perfil cromatográfico disímil (14-16 min) al obtenido para las drogas crudas estudiadas ya que, aun cuando contenía pequeñas cantidades de los compuestos marcadores (16-20 min), los picos mayoritarios no se observaron en la droga cruda de la jalapa (*O. hamiltonii*), hecho que denota la diferencia esperada entre ambas especies vegetales por la presencia de hexasacáridos como los constituyentes mayoritarios de las resinas de *O. macrocarpa* (**Figura 11**).<sup>67</sup>



**FIGURA 24.** Cromatogramas para las muestras de la raíz jalapa brasileña registradas por HPLC-ESI-MS. A) droga cruda pulverizada comercial. B) Material vegetal auténtico para *Operculina hamiltonii* recolectado en Varre-Vento Quilombo, Oriximiná, Pará, Brasil. C) Tintura de jalapa Sobral. D) Resinas de *Operculina macrocarpa*, la raíz de jalapa brasileña de flores de blancas. Asignación de pico (Cuadro 6: *O. hamiltonii*): 1, ácido operculínico B; 2, ácido operculínico A; 3, ácido turpético C; 4, ácido operculínico L; 5, ácido operculínico M; 6, ácido operculínico H (*O. macrocarpa*).

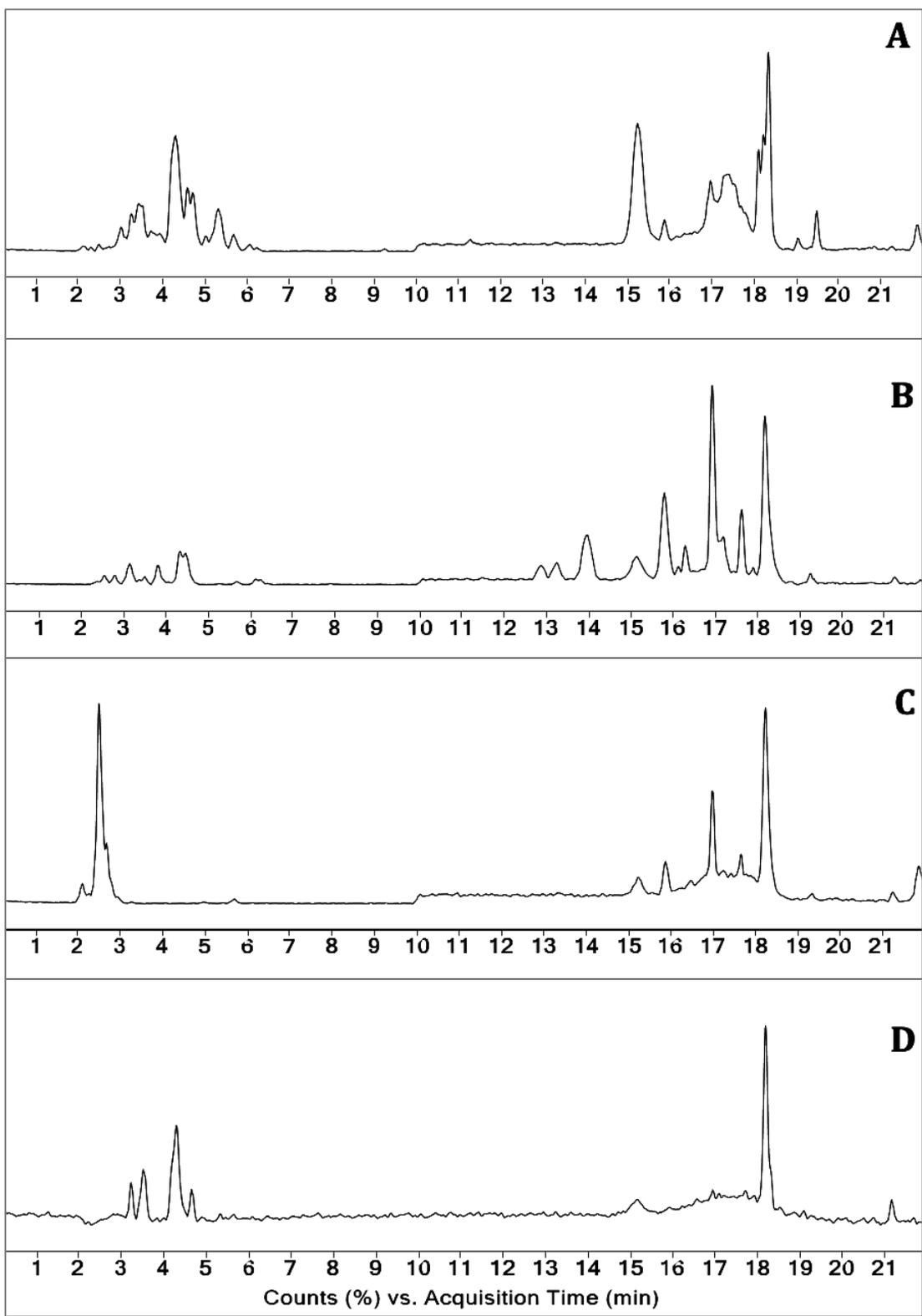
El patrón de fragmentación para el ácido operculínico H ( $t_R = 14.25$  min: HRESIMS  $m/z$  2007.73859  $[M + Na]^+$ ) generó en el analizador de masa de tipo triple cuadrupolo un ion de  $m/z$  1011 que se utilizó para identificar al marcador de la raíz de jalapa brasileña de raíz blanca (**Figura 25**).



**FIGURA 25.** Espectros de masas por electro spray para el ácido operculínico H con valores de  $m/z$  para el catión fragmento diagnóstico ( $m/z$  1011) generado por el eluato de  $t_R = 14.25$  min.

En el caso de los preparados fitoterápicos, todos presentaron la mayoría de las señales características para los ácidos glicosídicos constitutivos de las resinas glicosídicas de *O. hamiltonii* (**Figura 26**). Todos estos preparados presentaron las señales diagnósticas y, por lo tanto, éstos pueden servir como herramientas analíticas para la identificación y el control de calidad de estos preparados fitofarmacéuticos purgantes elaborados a partir de la raíz de jalapa de flores amarillas y que se comercializan ampliamente en el territorio brasileño.

Este proceso analítico, se puso en práctica en la purificación de los estándares: se obtuvo el cromatograma del material vegetal Sobral, se registró el  $m/z$  de los componentes mayoritarios detectados y se compararon con aquellos que conforman la huella digital de *O. hamiltonii*, llegando a la identificación positiva de dicho material vegetal (**Cuadro 6**). Este procedimiento, aunado al análisis comparativo de los tiempos de retención para cada pico (**Figuras 24 y 26**), da como resultado un procedimiento altamente confiable.



**FIGURA 26.** Cromatogramas en HPLC-ESI-MS de las muestras comerciales de la raíz de jalapa brasileña. A) Píldoras Maciel; B) Tintura de Jalapa Sobral; C) Tintura Tiro Seguro; D) Tintura Hypólito.

## ADECUABILIDAD (IDONEIDAD) Y PRECISIÓN

Con la finalidad de verificar que el sistema analítico opera con base en los criterios requeridos, independientemente de las condiciones ambientales, es altamente recomendable evaluar la idoneidad del mismo pues, de esa forma, se asegura su funcionamiento óptimo.<sup>54,68</sup> De acuerdo con el documento de nombre “*Validation of analytical procedures: definitions and methodology*” (ICH Q2 R1), la adecuabilidad no forma parte de los parámetros para evaluar un sistema;<sup>63</sup> sin embargo, en cualquier método cromatográfico es necesario tomarla en consideración para establecer la confiabilidad de éste en su implementación rutinaria.<sup>54</sup> Para ello, es preciso considerar diversos factores propios del sistema, que están vinculados directamente en la calidad de las determinaciones a realizar, tales como la columna, la fase móvil, la velocidad de flujo y la temperatura, entre otros; la eficiencia con la cual se resuelvan las señales analíticas, son consecuencia directa de la elección correcta de las condiciones de análisis.

**CUADRO 7.** Estudio de la adecuabilidad de los sistemas de cuantificación para los productos de peracetilación de los ácidos operculínicos A y B.

Inyecciones	Área (uA)		Parámetro
	Ácido operculínico A	Ácido operculínico B	
1	521633	495438	
2	522227	495039	
3	517191	493651	
4	521633	495446	
5	522227	495034	
6	517191	493643	
<b>Promedio</b>	520350.3	494708.5	
<b>DE</b>	2461.585	842.004	
<b>% CV</b>	0.5	0.2	CV < 2.0 %
<b>T</b>	1	1	T < 2
<b>R</b>	3	3	R > 2
<b>k (k')</b>	2.0	2.8	2 < k < 10
<b>N</b>	48988	43820	N > 2000

Algunos de los parámetros más utilizados para verificar la idoneidad de un sistema cromatográfico son la reproducibilidad de las señales analíticas a partir de inyecciones repetidas

(CV), el factor de coileo del pico ( $T$ ), la eficiencia de la columna reflejada en el número de platos teóricos ( $N$ ), el factor de retención ( $k$ ) y la separación/resolución idónea entre los componentes de la muestra analizada ( $R$ ). En el **Cuadro 7** se resumen los resultados obtenidos para los sistemas desarrollados.

En primera instancia, se realizó el análisis de la respuesta analítica a partir de la lectura por sextuplicado de una disolución a la concentración de 25 ppm. En ambos casos, los coeficientes de variación (CV) son menores al 2.0 %, por lo que ambos cumplen con una precisión adecuada para los métodos cromatográficos.

Otro aspecto a considerar es el factor de retención  $k$ , conocido anteriormente como factor de capacidad, el cual determina la interacción existente entre el analito y la fase estacionaria; para ambos sistemas, dicho parámetro está dentro de los límites de aceptación, por lo que se considera que la elección de columna y fase móvil es adecuada para la resolución de los analitos de estudio.

Se evaluó también la simetría de las señales analíticas de interés, a partir del parámetro conocido como factor de coileo pues, entre mayor sea la deformación de un pico cromatográfico, disminuye considerablemente la exactitud de la determinación analítica en procesos cuantitativos al no ser posible determinar el inicio y el fin de la señal analítica, por lo que el programa computacional tendría dificultades en el cálculo del área. En el caso particular de los sistemas de interés en esta disertación, se observa que el factor de coileo es menor a dos unidades, por lo que se considera que la señal analítica cuenta con una buena definición y simetría para su análisis.

Por último, la eficiencia de la columna utilizada se determina a partir del número de platos teóricos ( $N$ ) y de su resolución ( $R$ ) o su capacidad para separar dos picos adyacentes; para los dos ácidos operculínicos utilizados como marcadores, dichos parámetros se encuentran dentro de los intervalos de aceptación. Cabe mencionar que todos los cálculos realizados en esta sección son válidos para la fase móvil, columna cromatográfica y condiciones de elución especificadas en la metodología descrita anteriormente. El cálculo de los parámetros evaluados, se realizó con base en lo establecido en diversas farmacopeas, como es el caso de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM), así como algunas guías de validación de métodos analíticos.

## LINEALIDAD

La linealidad en un procedimiento analítico hace referencia a su capacidad de obtener resultados directamente proporcionales a la concentración o cantidad del analito; lo anterior, dentro de un rango de trabajo definido, el cual es el rango que existe dentro de la más baja y la más alta concentración de analito en donde el procedimiento analítico presenta niveles de precisión, exactitud y linealidad adecuados.<sup>63</sup>

Para ambos sistemas, este parámetro se evaluó mediante el análisis de tres curvas de calibración con cinco niveles de concentración (5, 25, 50, 75 y 100 ppm), preparadas por pesadas independientes. Para determinar el grado de ajuste existente entre la señal analítica y la concentración del analito de estudio, se realizó una regresión lineal simple. El análisis estadístico se llevó a cabo mediante el uso del programa computacional Statgraphics Centurion XVI ® y Excel.

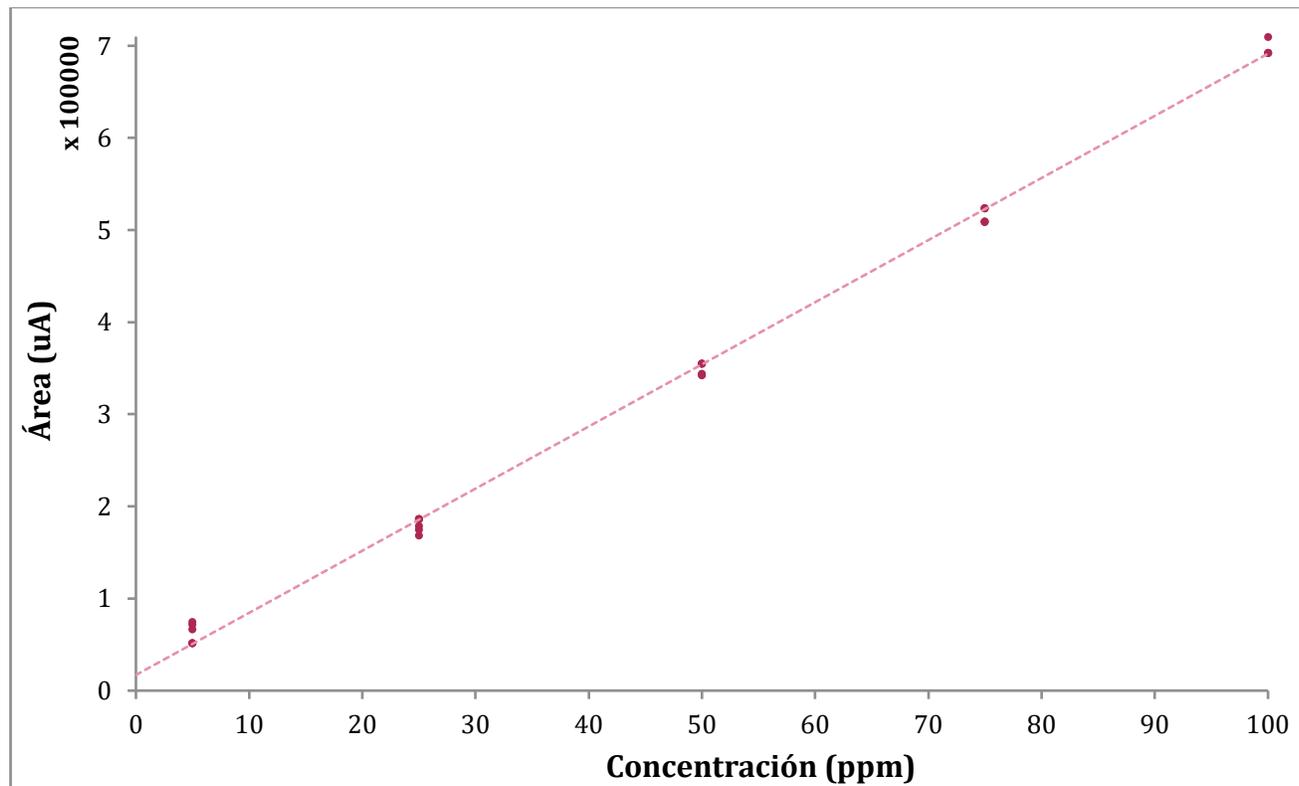
### Ácido operculínico A

Con base en los resultados adquiridos, se realizó el estudio de regresión para el ácido operculínico A peracetilado; a partir de éstos, se obtuvo el siguiente modelo lineal ajustado de la forma  $y = \beta_1x + \beta_0$ :

$$\text{Área} = 6743.87 * \text{Concentración} + 17031.79$$

Donde la concentración está dada en ppm, en tanto que la respuesta analítica en unidades de área (uA). El valor de la pendiente ( $\beta_1 = 6743.87$ ), así como el correspondiente a la ordenada al origen ( $\beta_0 = 17031.79$ ), se calcularon por medio del método de mínimos cuadrados. De acuerdo con el valor del coeficiente de correlación ( $R = 0.9976$ ), se puede considerar que existe una relación lineal del 99.76% entre la variable independiente (concentración) y la dependiente (área bajo la curva). En cuanto al coeficiente de determinación ( $R^2 = 0.9953$ ), concluye que el modelo lineal propuesto explica la variación en la respuesta analítica respecto a la cantidad de analito en un 99.53%. La **Fig. 22**, corresponde al diagrama de dispersión de datos y la línea de regresión ajustada que describe el comportamiento lineal existente entre la respuesta analítica respecto a

la concentración. Sin embargo, se requiere de un análisis estadístico para determinar si el modelo describe correctamente la relación entre ambas variables, mismo que se describe a continuación.



**FIGURA 27.** Linealidad del sistema desarrollado para la cuantificación del ácido operculínico A peracetilado.

Con la finalidad de explicar la relación que existe entre la respuesta analítica y la concentración del analito, se realizó el contraste de regresión, en el cual se contrastó la hipótesis nula, que plantea la inexistencia de una dependencia lineal entre ambas variables; es decir, que la pendiente, que es la constante de proporcionalidad entre ellas, es igual a cero. De manera análoga, en el caso de la ordenada al origen, la hipótesis nula supone que esta es igual a cero. Así:

Prueba de la pendiente

$$H_0: \beta_1 = 0$$

$$H_1: \beta_1 \neq 0$$

Prueba de la ordenada al origen

$$H_0: \beta_0 = 0$$

$$H_1: \beta_0 \neq 0$$

Para evaluar las hipótesis antes mencionadas, se hizo una prueba *t* y se utilizó el método del valor-*P*; en el **Cuadro 8**, se presenta un resumen de los resultados obtenidos para ambas pruebas.

En cuanto al estadístico  $t$ , se tomó en consideración un valor de confianza del 95%, que implica un valor de  $\alpha = 0.05$ ; por otro lado, se tienen 13 grados de libertad (número de observaciones menos dos), de tal manera que  $|t_0| > (t_{\alpha/2,(n-2)} = 2.160)$ . Así, al contrastar el valor crítico de  $t$  ( $t_{\alpha/2,(n-2)}$ ) y el estadístico  $t$  para la pendiente de la recta, se observa que este último es mayor ( $t=52.385$ ), por lo que la hipótesis nula se rechaza; es decir, existe una relación lineal entre la respuesta analítica respecto al incremento en la concentración de analito. En el caso de la ordenada al origen, el valor de la prueba  $t$  ( $t = 2.159$ ) es menor que el valor crítico de  $t$ , por lo que la hipótesis nula no se rechaza, por lo que se infiere que la recta que mejor se ajusta pasa por cero.

**CUADRO 8.** Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad del sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado.

	Mínimos cuadrados		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coefficientes	Error típico	Estadístico t	Valor-P	Inferior 95%	Superior 95%
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	17031.79	7888.73	2.1590	0.0501	-10.79	34074.36
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	6743.87	128.74	52.3850	1.64E-16	6465.75	7021.99

Por otro lado, en el caso del valor- $P$ , el valor asociado a la pendiente de la recta (1.64E-16) es menor que el nivel de significancia ( $\alpha = 0.05$ ), por lo que puede confirmarse el rechazo de la hipótesis nula. Asimismo, para la ordenada al origen, el valor de dicho parámetro es ligeramente mayor al nivel de  $\alpha$  (0.0501), por lo que la hipótesis nula no puede rechazarse.

En cuanto al intervalo de confianza de la pendiente, éste no incluye el cero, lo que implica que existe una relación de proporcionalidad entre la respuesta analítica registrada respecto a la concentración evaluada. En el caso de la ordenada al origen, su intervalo incluye el cero, hecho que es consistente con el resto de los parámetros analizados.

Una forma de determinar la adecuación del modelo de regresión, es la evaluación de los residuales; un residual ( $e_i$ ) es la diferencia que existe entre un valor de respuesta observado ( $y$ ) respecto al valor calculado a partir de los coeficientes de regresión (valor ajustado,  $\hat{y}$ ).<sup>69</sup> Los residuos describen el error aleatorio en el ajuste del modelo respecto a la tendencia natural de los datos, por lo que la sumatoria de éstos debe tender a cero.<sup>70</sup> Dada la naturaleza de cálculo, la

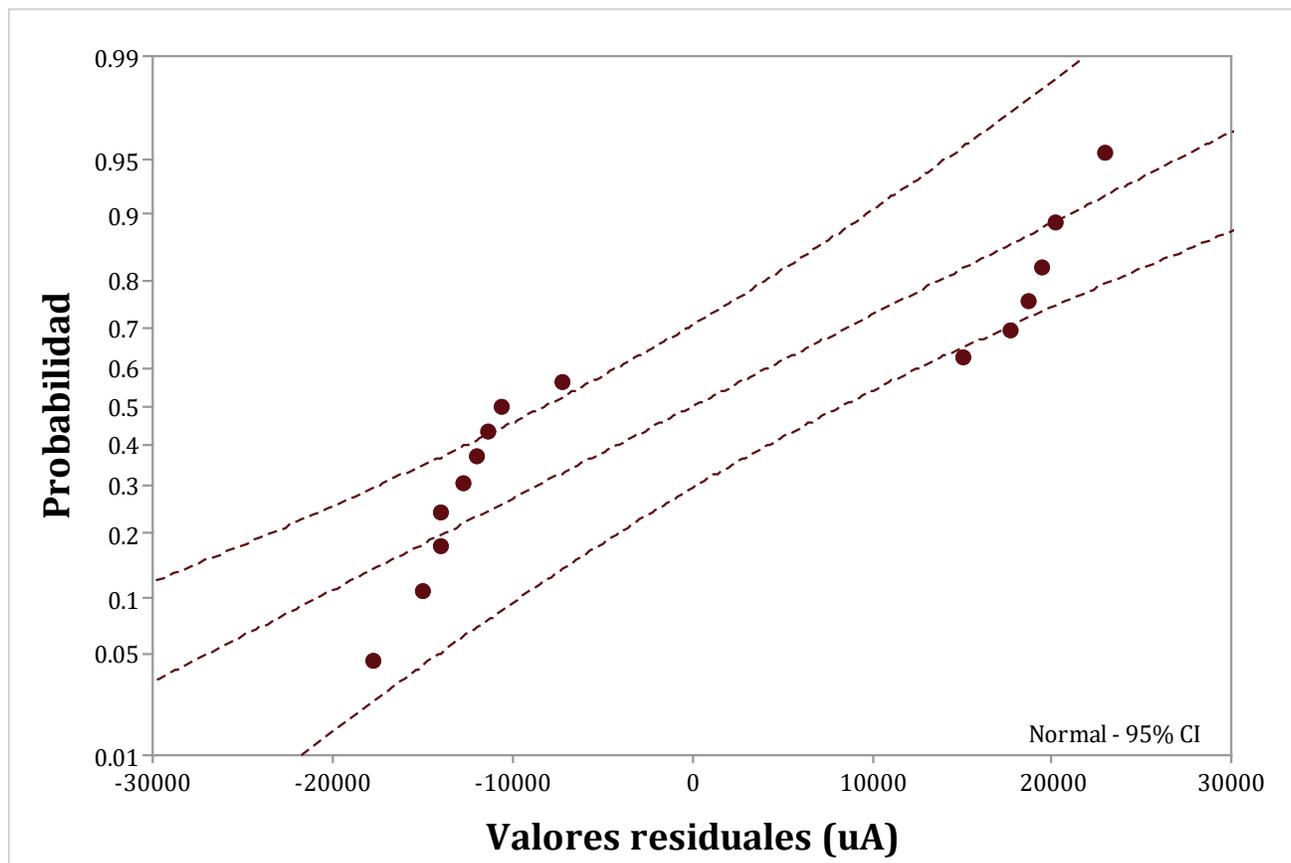
sumatoria de los valores observados debe ser igual a la sumatoria de valores ajustados. En el **Cuadro 9**, se presenta el resumen de los resultados obtenidos para la evaluación de los residuales; como puede observarse, tanto la sumatoria de los residuos como los residuos estandarizados tiende a cero ( $e_i = 5.3E-10$  y  $d_i = 3.3E-14$ , respectivamente). En este caso, la sumatoria de los valores ajustados es equivalente a la sumatoria de los valores observados, hechos que hablan de un buen ajuste del modelo matemático.

**CUADRO 9.** Valores ajustados y residuales para la evaluación de linealidad del sistema.

<b>Observación</b>	<b>Valor observado <math>y</math></b>	<b>Valor ajustado <math>\hat{y}</math></b>	<b>Residuos <math>e_i</math></b>	<b>Residuos estandarizados <math>d_i</math></b>
1	65864	50751.1531	15112.84691	0.925950574
2	178473	185628.623	-7155.62276	-0.43841859
3	342293	354225.46	-11932.4598	-0.73109111
4	508910	522822.297	-13912.2969	-0.85239395
5	710914	691419.134	19494.86597	1.194432952
6	70968	50751.1531	20216.84691	1.238668076
7	167964	185628.623	-17664.6228	-1.08229559
8	341567	354225.46	-12658.4598	-0.77557248
9	508840	522822.297	-13982.2969	-0.85668279
10	709101	691419.134	17681.86597	1.083352068
11	73776	50751.1531	23024.84691	1.410711717
12	174250	185628.623	-11378.6228	-0.69715801
13	343685	354225.46	-10540.4598	-0.64580452
14	507829	522822.297	-14993.2969	-0.91862585
15	710106	691419.134	18686.86597	1.144927517
<b>Sumatorias</b>	<b><math>\sum y = 5414540</math></b>	<b><math>\sum \hat{y} = 5414540</math></b>	<b><math>\sum e_i = 5.31145E-10</math></b>	<b><math>\sum d_i = 3.28626E-14</math></b>

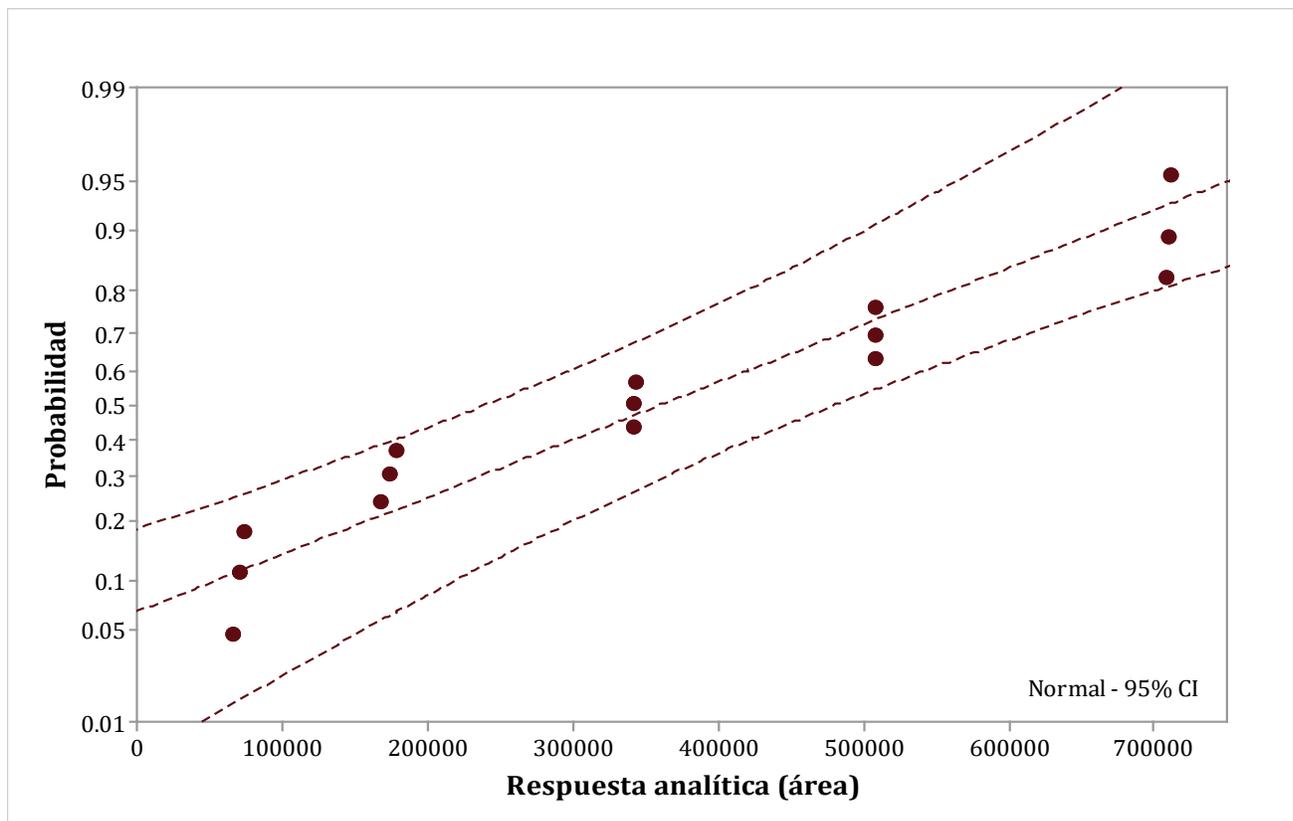
Otra manera de saber si los datos tienen una distribución normal, es mediante el análisis del comportamiento de los valores residuales  $e_i$  en un gráfico de probabilidad; ésta debe seguir, aproximadamente, una línea recta y es un mejor descriptor entre mayor sea la cantidad de datos de análisis (veinte o mayor). El sesgo y la curtosis estandarizados, son de particular interés, pues son los que determinan si la muestra proviene de una distribución normal. Valores de estos estadísticos fuera del rango de  $-2$  a  $+2$  indican desviaciones significativas de la normalidad, lo que tendería a invalidar cualquier prueba estadística con referencia a la desviación estándar. En este caso, el valor del sesgo estandarizado tiene un valor de 0.6695 y se encuentra dentro del rango esperado para datos provenientes una distribución normal. El valor de curtosis

estandarizada, que es de  $-1.5528$ , se encuentra también dentro del rango esperado para datos provenientes de una distribución normal. Gráficamente (**Fig. 23**), se observa dicha tendencia, donde los residuales se encuentran dentro de los intervalos de confianza (IC = 95%) o muy próximos al mismo; sin embargo, podría tenerse una mejor descripción con un mayor número de ensayos.



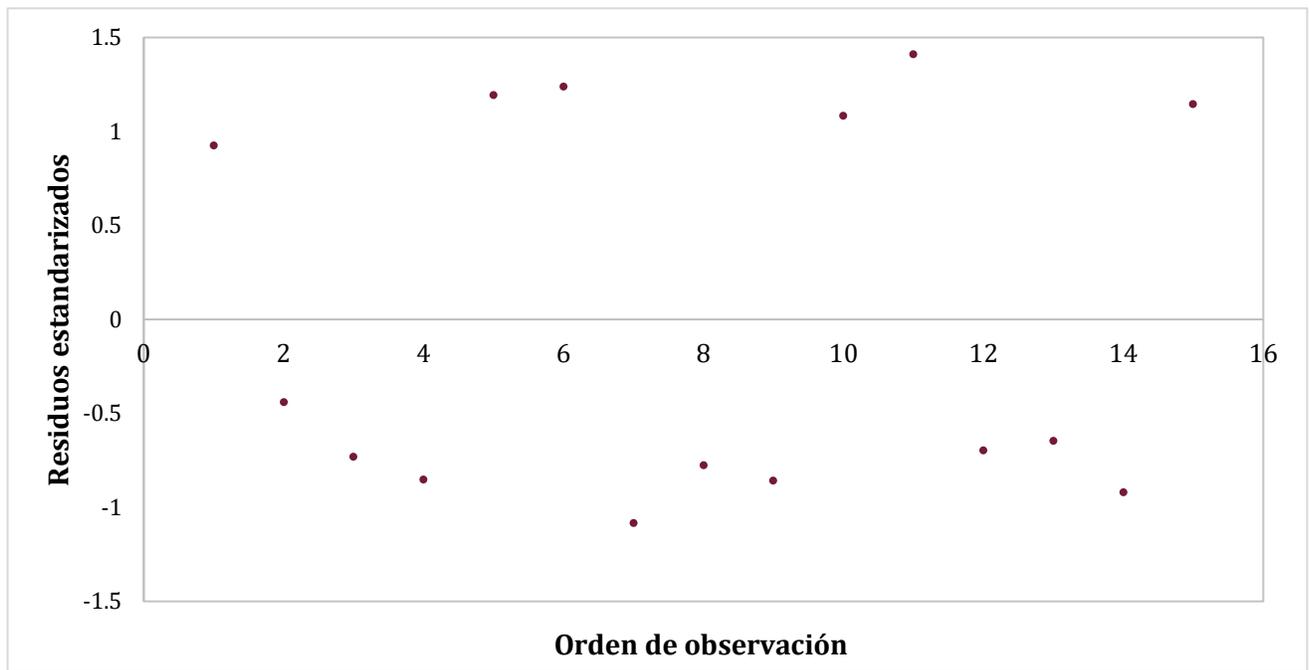
**FIGURA 28.** Gráfico de la probabilidad normal de los valores residuales del sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado.

Este comportamiento es consistente si se analiza el gráfico de la probabilidad normal del grupo de respuestas analíticas observadas (**Fig. 24**), donde se confirma que están dentro del intervalo de confianza del 95% y tienen un comportamiento de distribución normal, pues sus valores de sesgo y curtosis estandarizados ( $0.4238$  y  $-1.0437$ , respectivamente), se encuentran dentro del rango de  $-2$  a  $+2$ , hecho que indica un comportamiento normal.

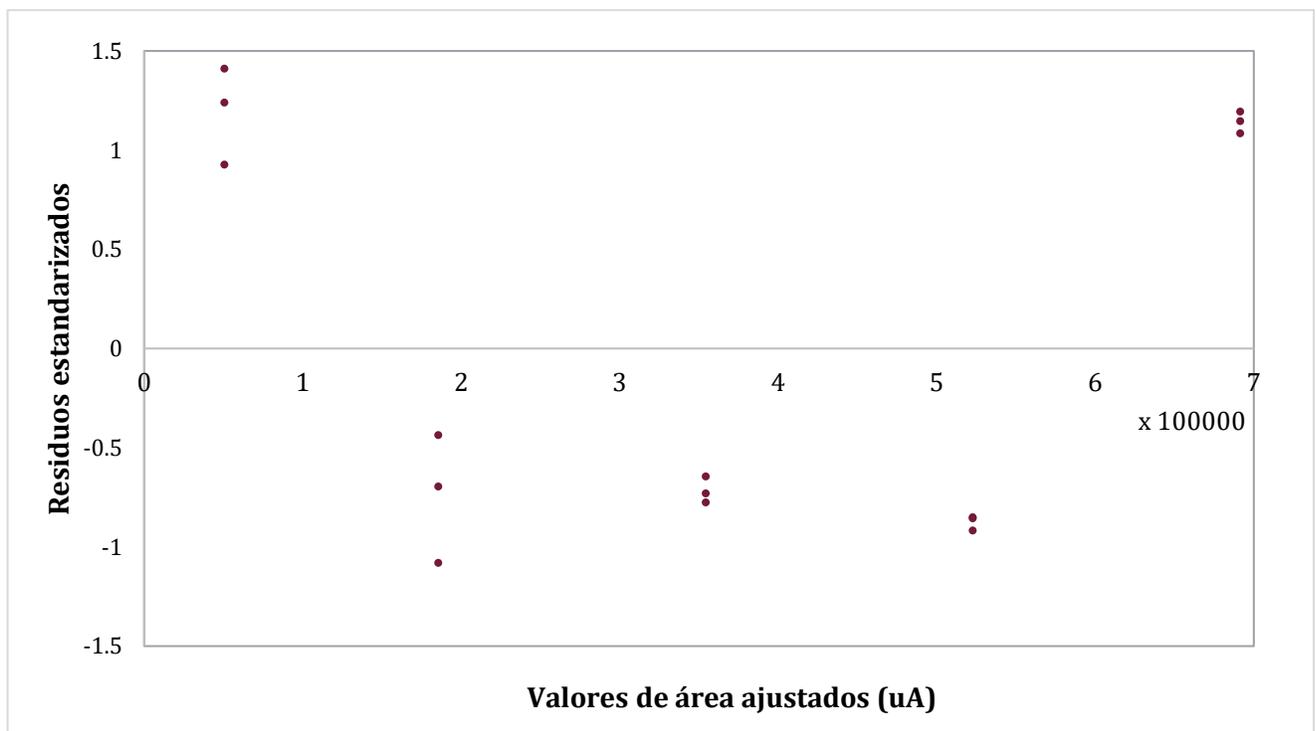


**FIGURA 29.** Gráfico de la probabilidad normal de las respuestas analíticas que conforman el sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado.

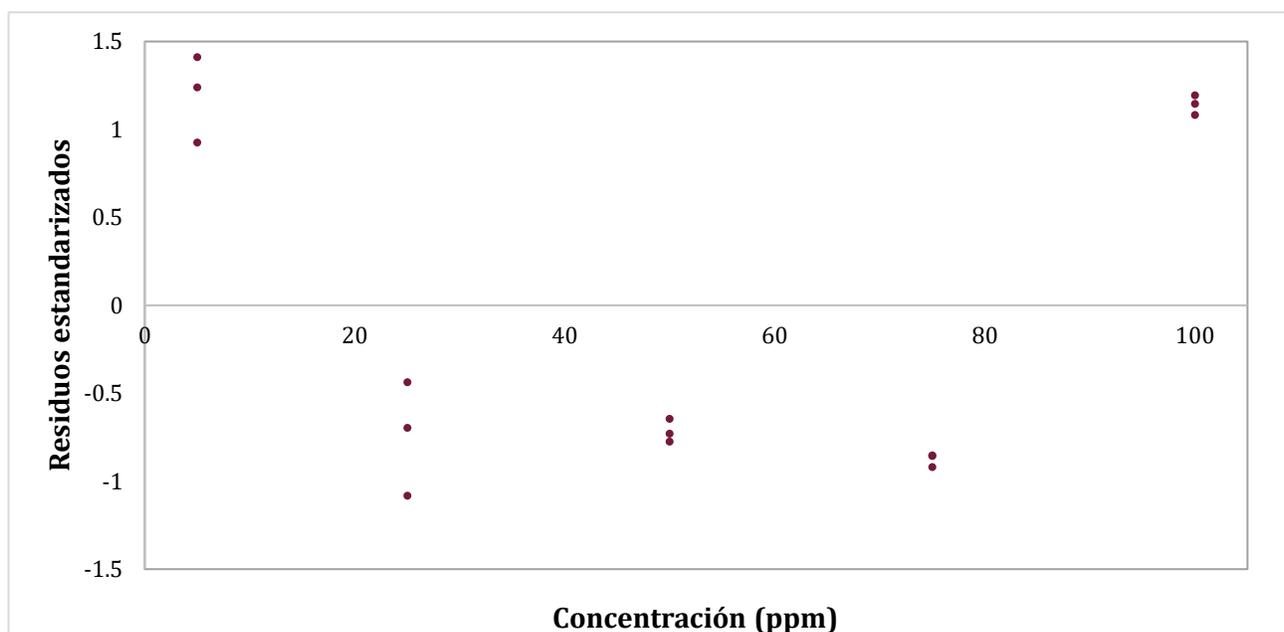
Con la intención de verificar que los residuos son independientes entre sí, se analizaron los valores residuales estandarizados con respecto al orden cronológico de ensayos (**Fig. 25**); dicho gráfico, tiene la intención de evaluar en qué grado se desvían los valores experimentales de aquellos pronosticados a partir de los coeficientes de linealidad (modelo ajustado). En el caso del sistema de estudio, no se muestran tendencias ni patrones aparentes en los residuos; es por lo anterior que se consideran valores independientes, con lo cual, se concluye que no se encuentran relacionados entre sí y no existen defectos en el modelo. También se analizaron los residuales estandarizados respecto a los valores ajustados (**Fig. 26**) y a la concentración de analito (**Fig. 27**); en ninguno de estos gráficos se observan patrones no aleatorios en los residuos. En los tres análisis gráficos, los valores se encuentran distribuidos aleatoriamente alrededor de la línea central (cero), acotados por una banda horizontal, determinada por el intervalo  $-1.5 < d_i < 1.5$ .



**FIGURA 30.** Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de las observaciones.



**FIGURA 31.** Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de los valores ajustados.



**FIGURA 32.** Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de la concentración.

Por último, en el análisis de varianza (ANOVA) de la regresión, se contrastaron las hipótesis:

$H_0: \beta_1 = 0$  El modelo no describe una dependencia lineal entre variables

$H_1: \beta_1 \neq 0$  El modelo describe una dependencia lineal entre variables

Para realizar la prueba de hipótesis, se usó la prueba F, considerando que la hipótesis nula se rechaza si  $F_0 > F_{\alpha,1,n-2}$ , donde el valor de significancia  $\alpha = 0.05$ , con quince observaciones. De acuerdo con los resultados registrados en el **Cuadro 10**, el parámetro  $F$  (2744.19) es mayor que su valor crítico (1.64E-16); con lo anterior, se concluye que el modelo analítico describe una dependencia lineal entre variables. Puesto que el *valor-P* en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la respuesta analítica y la concentración de analito, con un nivel de confianza del 95.0%.

**CUADRO 10.** Análisis de varianza, correspondiente al ácido operculínico A, peracetilado.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Prom. de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	7.8726E+11	7.8726E+11	2744.19	1.64E-16
Residuos	13	3.7295E+9	2.8688E+8		
Total	14	7.9099E+11			

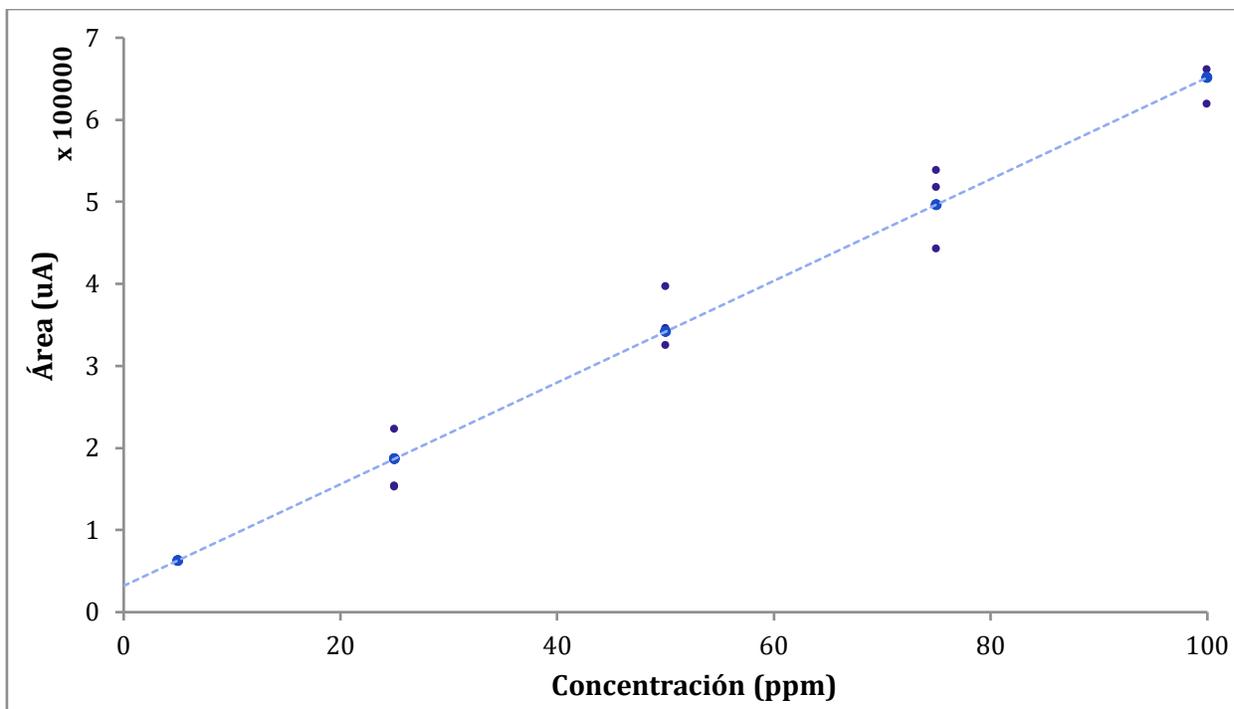
**Valor-P < 0.05**

## Ácido operculínico B

La evaluación de la linealidad del sistema del ácido operculínico B peracetilado, se realizó de manera análoga al sistema correspondiente al ácido operculínico A (antes descrito), comenzando con el estudio de regresión; a partir de tres curvas de calibración y cinco niveles de concentración (5, 25, 50, 75 y 100 ppm), se obtuvo el siguiente modelo lineal ajustado de la forma  $y = \beta_1 x + \beta_0$ :

$$\text{Área} = 6195.72 * \text{Concentración} + 31999.77$$

Donde la concentración está dada en ppm, en tanto que la respuesta analítica en unidades de área ( $\mu\text{A}$ ). En cuanto a la estadística de regresión, el valor de la pendiente ( $\beta_1 = 6195.72$ ), así como el correspondiente a la ordenada al origen ( $\beta_0 = 31999.77$ ), se calcularon por medio del método de mínimos cuadrados. De acuerdo con el valor del coeficiente de correlación ( $R=0.9902$ ), se puede considerar que existe una relación lineal del 99.02% entre la variable independiente (concentración) y la dependiente (área bajo la curva). En cuanto al coeficiente de determinación ( $R^2=0.9806$ ), concluye que el comportamiento lineal propuesto (**Fig. 28**) explica la variación en la respuesta analítica respecto a la cantidad de analito en un 98.06%.



**FIGURA 33.** Linealidad del sistema desarrollado para la cuantificación del ácido operculínico B peracetilado.

El contraste de regresión explica la relación lineal que existe entre la respuesta analítica y la concentración del analito; en el **Cuadro 11**, se presentan los resultados obtenidos para la prueba  $t$  y el método del valor- $P$ . Para el estadístico  $t$  (IC = 95%,  $\alpha = 0.05$  y 13 grados de libertad), se tiene que el valor crítico de  $t$   $|t_0| > (t_{\alpha/2, (n-2)} = 2.160)$ ; en el caso de la pendiente, este parámetro es menor que  $t = 25.6217$ , rechazando la hipótesis nula. En el caso de la ordenada al origen, el valor de  $t = 2.1595$  es menor, aceptando la hipótesis nula. De esta forma, se infiere que la respuesta analítica y la concentración se encuentran relacionadas de forma lineal y que la recta que describe cierta relación, pasa por cero.

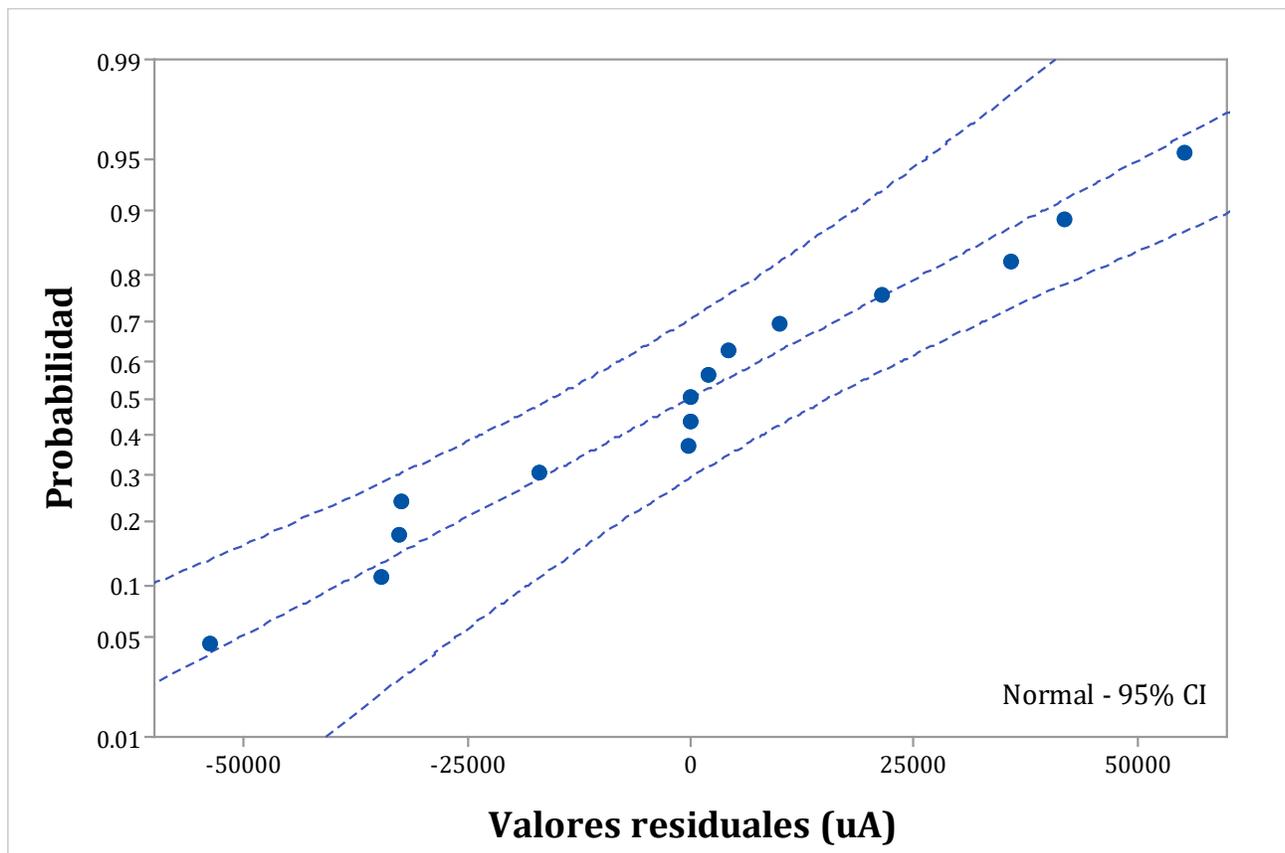
**CUADRO 11.** Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad del sistema correspondiente al ácido operculínico B peracetilado.

	Mínimos cuadrados		Prueba $t$	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	Coefficientes	Error típico	Estadístico $t$	Valor- $P$	Inferior 95%	Superior 95%
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	31999.77	14817.98	2.1595	0.0500	-12.53	64012.07
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	6195.72	241.82	25.6217	1.64E-12	5673.31	6718.13

**CUADRO 12.** Valores ajustados y residuales para la evaluación de linealidad del sistema.

Observación	Valor observado $y$	Valor ajustado $\hat{y}$	Residuos $e_i$	Residuos estandarizados $d_i$
1	63032	62978.3547	53.6452917	0.00174981
2	154203	186892.693	-32689.6932	-1.06627828
3	324863	341785.616	-16922.6164	-0.55198494
4	442884	496678.54	-53794.5396	-1.75467995
5	653653	651571.463	2081.53726	0.06789596
6	62981	62978.3547	2.64529174	8.6285E-05
7	222779	186892.693	35886.3068	1.170546
8	396939	341785.616	55153.3836	1.79900297
9	518047	496678.54	21368.4604	0.69700028
10	619084	651571.463	-32487.4627	-1.05968189
11	62833	62978.3547	-145.354708	-0.00474121
12	152291	186892.693	-34601.6932	-1.12864424
13	346135	341785.616	4349.38359	0.14186897
14	538498	496678.54	41819.4604	1.36407467
15	661498	651571.463	9926.53726	0.32378557
<b>Sumatorias</b>	$\sum y = 5219720$	$\sum \hat{y} = 5219720$	$\sum e_i = 9.459E-10$	$\sum d_i = 3.048E-14$

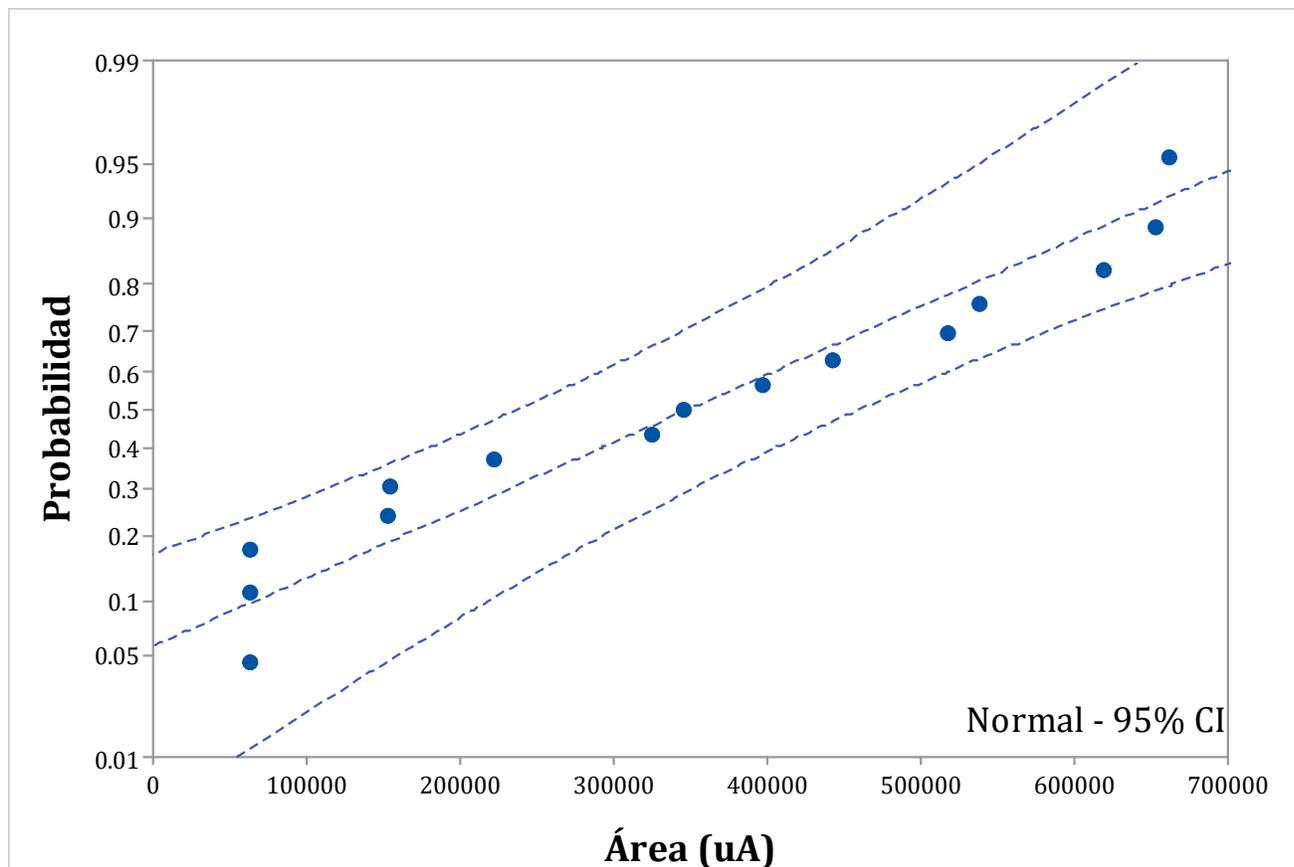
El resumen del análisis de valores residuales se presenta en el **Cuadro 12**; tanto la sumatoria de los residuos como los residuos estandarizados tiende a cero ( $e_i=9.5E-10$  y  $d_i=3.0E-14$ , respectivamente) y la sumatoria de los valores ajustados es equivalente a la sumatoria de los valores observados, hechos que hablan de un buen ajuste del modelo. A partir de estos datos, se realizó el análisis del comportamiento de los valores residuales  $e_i$  en un gráfico de probabilidad; el valor del sesgo estandarizado tiene un valor de 0.1211, en tanto que el valor de curtosis estandarizada es de  $-0.3901$ , donde ambos valores se encuentran dentro del rango esperado para datos con una distribución normal. En forma gráfica (**Fig. 29**), se observa dicha tendencia, donde los residuales se encuentran dentro de los intervalos de confianza (IC = 95%).



**FIGURA 34.** Gráfico de la probabilidad normal de los valores residuales del sistema correspondiente al ácido operculínico B peracetilado.

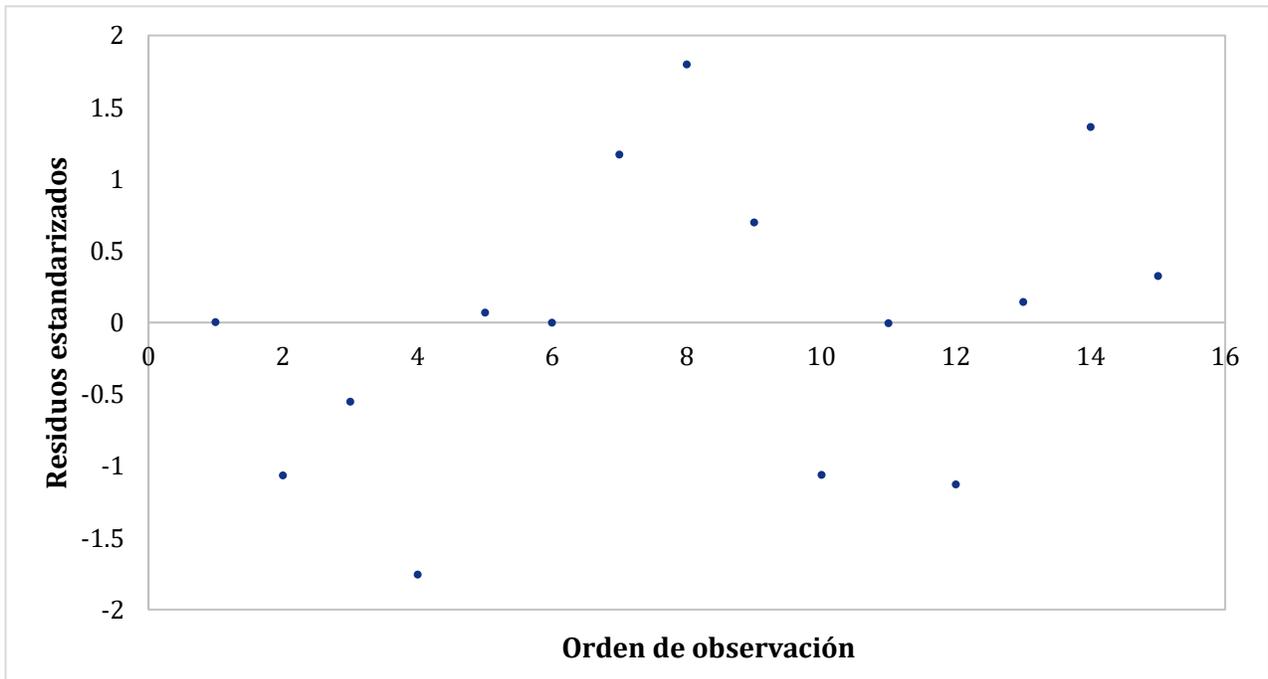
Este comportamiento es consistente si se analiza el gráfico de la probabilidad normal del grupo de respuestas analíticas observadas (**Fig. 30**), donde se confirma que están dentro del

intervalo de confianza del 95% y tienen un comportamiento de distribución normal, pues sus valores de sesgo y curtosis estandarizados (0.0721 y  $-1.1644$ , respectivamente), se encuentran dentro del rango de  $-2$  a  $+2$ , hecho que habla de un comportamiento normal.

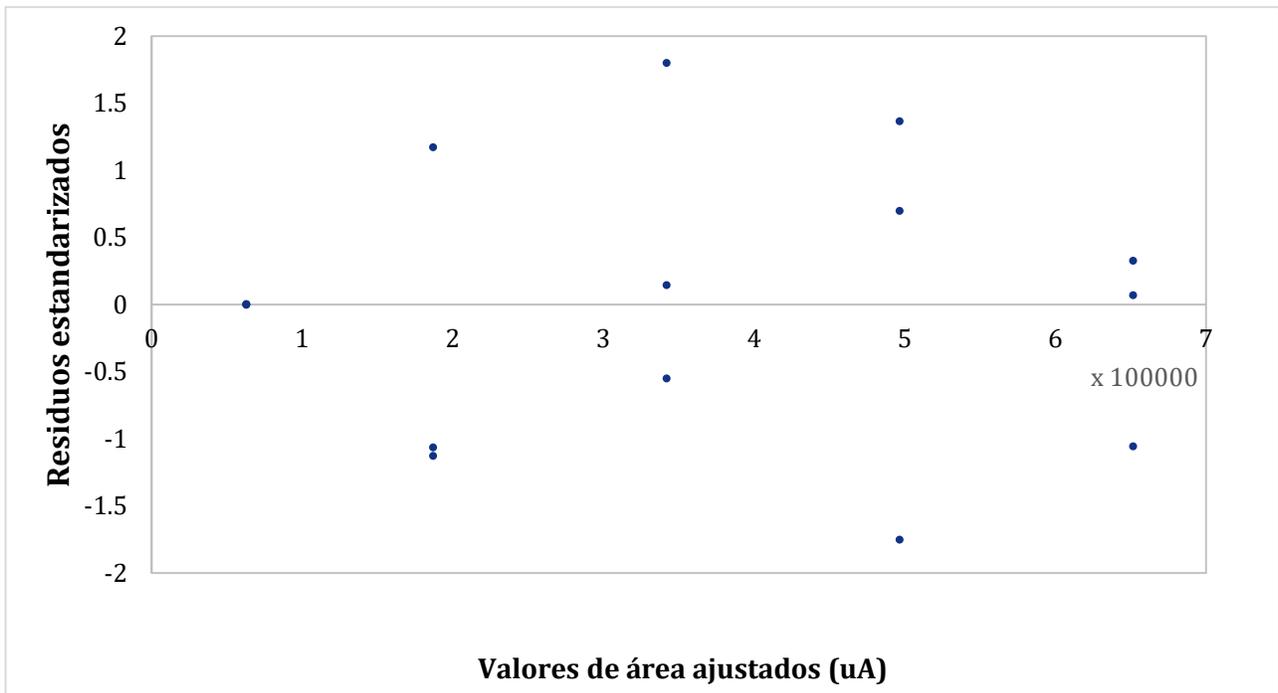


**FIGURA 35.** Gráfico de la probabilidad normal de las respuestas analíticas que conforman el sistema correspondiente al ácido operculínico A peracetilado.

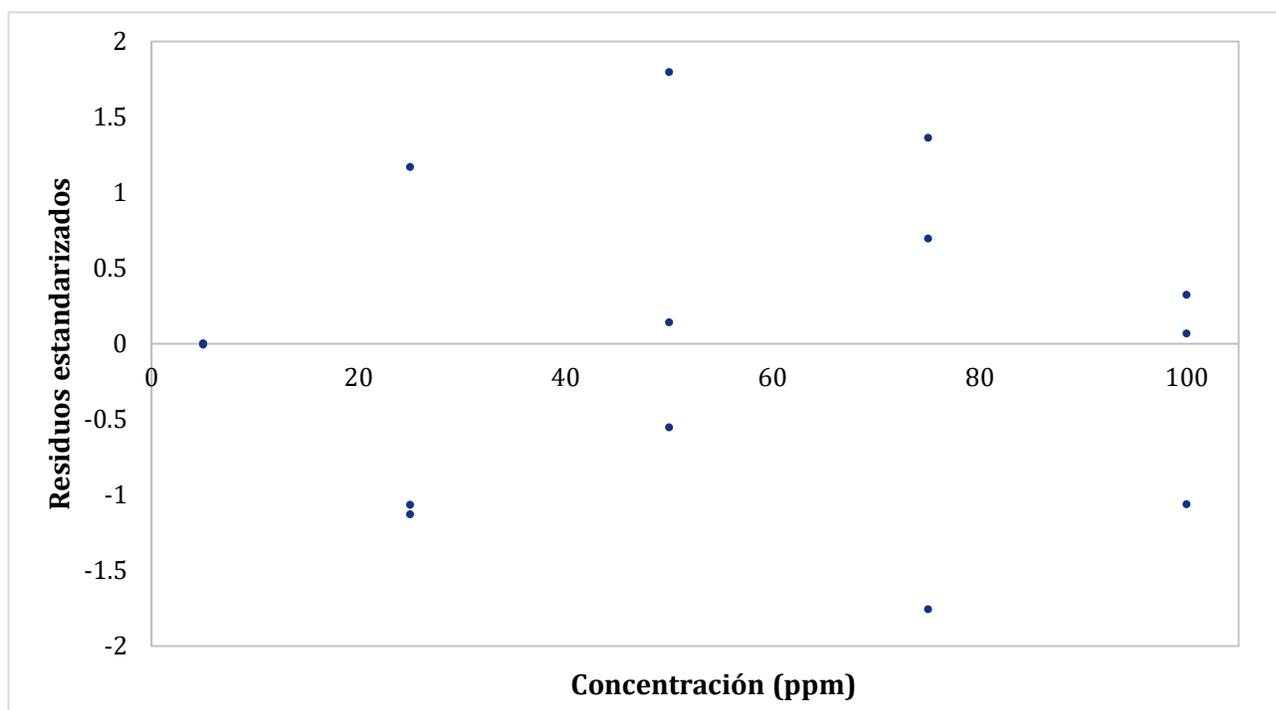
Para verificar que los residuos son independientes entre sí, se analizaron los valores residuales estandarizados con respecto al orden cronológico de ensayos (**Fig. 31**), a los valores de área ajustados (**Fig. 32**) y a la concentración de analito (**Fig. 33**); en éstos, no se muestran tendencias ni patrones aparentes en los residuos; por lo que se consideran valores independientes y se concluye que no están relacionados entre sí, pues no existen defectos en el modelo, al ser valores que se encuentran distribuidos aleatoriamente alrededor de la línea central (cero), acotados por una banda horizontal, determinada por el intervalo  $-2.0 < d_i < 2.0$ .



**FIGURA 36.** Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de las observaciones.



**FIGURA 37.** Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de los valores ajustados.



**FIGURA 38.** Gráfico de los residuos estandarizados respecto en función de la concentración.

En el análisis de varianza (ANOVA) de la regresión, el parámetro  $F$  (656.47) es mayor que su valor crítico ( $1.64E-12$ ); con lo anterior, se concluye que el modelo analítico describe una dependencia lineal entre variables. Puesto que el *valor-P* en la tabla ANOVA es menor que 0.05, existe una relación estadísticamente significativa entre la respuesta analítica y la concentración de analito, con un nivel de confianza del 95.0%. En el **Cuadro 13**, se presenta un resumen de lo antes descrito.

**CUADRO 13.** Análisis de varianza, correspondiente al ácido operculínico B, peracetilado.

	<i>Grados de libertad</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Prom. de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Valor crítico de F</i>
Regresión	1	7.8726E+11	7.8726E+11	2744.19	1.64E-16
Residuos	13	3.7295E+9	2.8688E+8		
Total	14	7.9099E+11			

*Valor-P < 0.05*

## EVALUACIÓN DEL MÉTODO

### EXACTITUD Y RECOBRO

La existencia de concordancia entre los valores obtenidos a partir del método desarrollado y la verdadera cantidad de analito contenido en las muestras, conocida como exactitud, puede inferirse cuando se demuestra que dicho método cumple con los criterios de especificidad, linealidad y precisión; sin embargo, se aplicó un procedimiento estadístico para determinarla. Para cada marcador evaluado se realizaron nueve determinaciones, conformadas por tres niveles de concentración y tres repeticiones para cada uno; debido a que la intención es determinar el índice de recobro, estos sistemas se prepararon a partir del placebo analítico descrito en la metodología y se agregó el volumen necesario de una disolución Stock del analito por analizar para aumentar la concentración en 5, 25 y 50 ppm bajo el esquema antes explicado. Con los datos adquiridos, se realizó el análisis del sesgo en las mediciones; en los **Cuadros 14 y 15**, se encuentra el estudio estadístico para la determinación de la exactitud en la cuantificación de los ácidos operculínicos A y B, respectivamente. Para ambos casos, los porcentajes de recobro se encuentran en el intervalo de (98 – 102) % y sus coeficientes de variación o desviación estándar relativa son menores al 2 % en todos los casos, cumpliendo así con los criterios de aceptación para métodos cromatográficos, por lo que, en ambos se consideran exactos.

**CUADRO 14.** Porcentajes de recobro para el ácido operculínico A peracetilado.

Concentración inicial (ppm)	A	Concentración		% Recobro	% Exactitud	S	CV	IC
		Total	Recuperada					
5	387567	54.94	4.94	98.88	98.88	0.93	0.94	1.05
	387883	54.99	4.99	99.82				
	387256	54.90	4.90	97.96				
25	521633	74.82	24.82	99.29	98.53	1.63	1.66	1.85
	522227	74.91	24.91	99.65				
	517191	74.16	24.16	96.66				
50	691984	100.08	50.08	100.17	100.36	0.44	0.44	0.50
	691600	100.03	50.03	100.05				
	694360	100.44	50.44	100.87				

**CUADRO 15.** Porcentajes de recobro para el ácido operculínico B peracetilado.

Concentración inicial (ppm)	A	Concentración (ppm)		% Recobro	% Exactitud	S	% CV	IC
		Total	Recuperada					
5	373740	55.16	5.16	103.15	101.34	1.64	1.62	1.86
	373048	55.05	5.05	100.97				
	372750	55.00	5.00	99.95				
25	495440	74.80	24.80	99.20	98.73	0.61	0.61	0.69
	495039	74.74	24.74	98.94				
	493650	74.51	24.51	98.04				
50	656027	100.72	50.72	101.44	100.18	1.24	1.23	1.40
	651952	100.06	50.06	100.12				
	648380	99.48	49.48	98.97				

A partir de los datos de recobro obtenidos, se estudió la relación existente entre la cantidad adicionada respecto a la cantidad recuperada, mediante un análisis de estimación por mínimos cuadrados para cada uno de los métodos (**Cuadros 16 y 17**). Así, considerando los resultados de la prueba  $t$ , se tiene un valor crítico de  $|t_0| > (t_{\alpha/2, (n-2)} = 2.365)$ , con un IC = 95%,  $\alpha = 0.05$  y 7 grados de libertad. De esta forma, se infiere que la respuesta analítica y la concentración se encuentran relacionadas de forma lineal y que la recta que describe cierta relación, pasa por cero.

Para la prueba del valor-P, el valor asociado a la pendiente de ambos analitos es menor que el nivel de significancia considerado ( $\alpha = 0.05$ ), por lo que puede confirmarse el rechazo de la hipótesis nula. Asimismo, para la ordenada al origen, los valores de dicho parámetro son mayores que  $\alpha$ , por lo que la hipótesis nula no puede rechazarse.

En cuanto al intervalo de confianza de la pendiente, en ningún caso incluye el cero, lo que implica que existe una relación de proporcionalidad entre la respuesta analítica registrada respecto a la concentración evaluada. En el caso de la ordenada al origen, ambos intervalos incluyen el cero, hecho que es consistente con los demás parámetros analizados. Finalmente, los resultados de la regresión lineal para cada uno de los métodos (**Cuadro 18**), sugieren que las

cantidades de analito recuperadas guardan un alto grado de concordancia respecto a la cantidad agregada (valor nominal), dado que todos los parámetros se encuentran en el rango de aceptación; todo lo anterior, confirma que el método analítico desarrollado para ambos sistemas ofrece resultados exactos y lineales para fines de cuantificación, hecho que es observable en los gráficos presentados en las **Figuras 34 y 35**.

**CUADRO 16.** Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad, correspondiente al ácido operculínico A peracetilado.

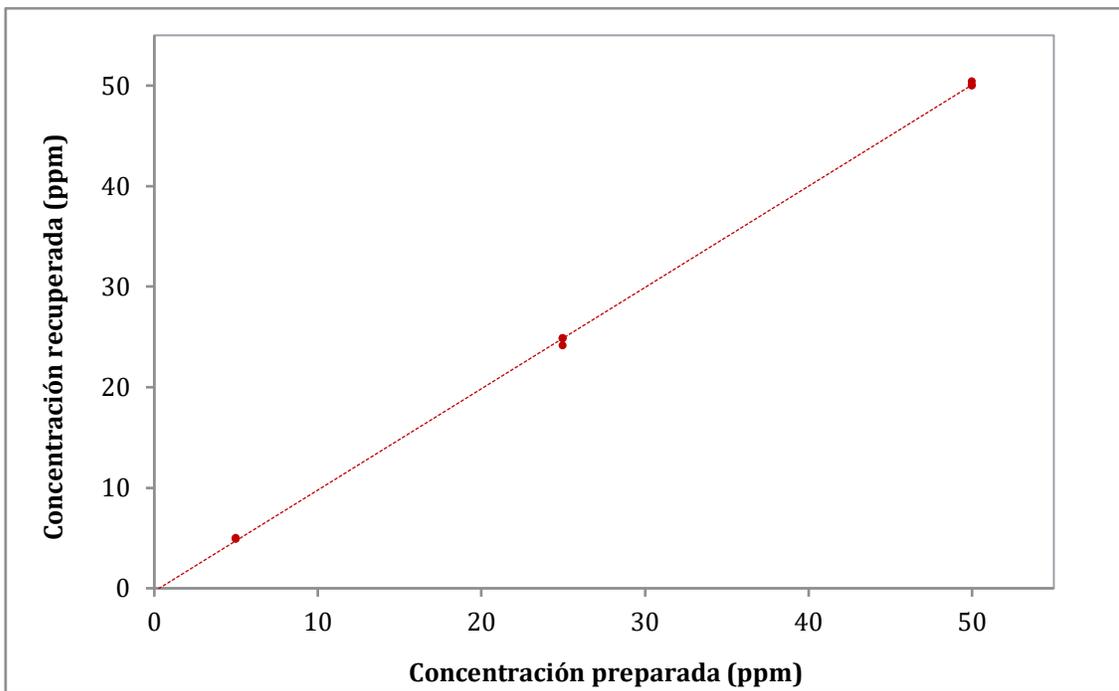
	Mínimos cuadrados		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	-0.30	0.24	-1.25	0.26	-0.89	0.29
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	1.01	0.01	143.17	7.83E-12	0.99	1.02

**CUADRO 17.** Análisis de varianza de una vía del modelo de linealidad, correspondiente al ácido operculínico B peracetilado.

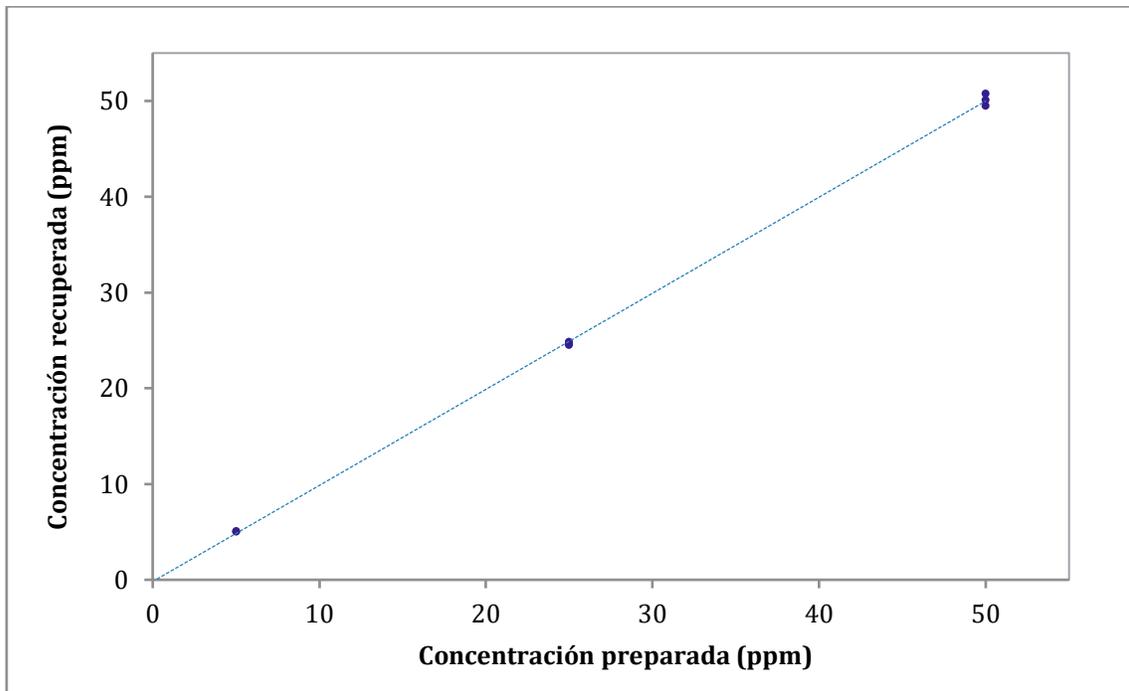
	Mínimos cuadrados		Prueba t	Probabilidad	Intervalos de confianza	
	<i>Coefficientes</i>	<i>Error típico</i>	<i>Estadístico t</i>	<i>Valor-P</i>	<i>Inferior 95%</i>	<i>Superior 95%</i>
<b>Ordenada al origen (<math>\beta_0</math>)</b>	-0.18	0.29	-0.63	0.55	-0.88	0.52
<b>Pendiente de la recta (<math>\beta_1</math>)</b>	1.00	0.01	120.10	2.25E-11	0.98	1.02

**CUADRO 18.** Resumen de la evaluación de bondad de ajuste en la linealidad del método para ambos analitos

Criterio de aceptación	Parámetro	Ácido operculínico A	Ácido operculínico B
Pendiente ( $b_1$ )	-	1.007	1.003
Ordenada al origen ( $b_0$ )	-	-0.302	-0.181
Coefficiente de determinación ( $R^2$ )	$R^2 > 0.98$	$R^2 = 0.999$	$R^2 = 0.999$
Coefficiente de correlación (R)	$R \geq 0.99$	$R = 0.999$	$R = 0.999$



**FIGURA 39.** Linealidad y exactitud del método de cuantificación para el ácido operculínico A.



**FIGURA 40.** Linealidad y exactitud del método de cuantificación para el ácido operculínico B.

## REPETIBILIDAD Y PRECISIÓN INTERMEDIA

El estudio de precisión de ambos procedimientos analíticos tiene como finalidad la determinación del grado de dispersión en los datos de medición en muestras homogéneas, obtenidos tanto en un evento repetido bajo las mismas condiciones de operación en un intervalo corto de tiempo (repetibilidad), como en aquellos que provienen de varios muestreos dentro del mismo laboratorio, en los que pueden tenerse variaciones en la forma de obtención de resultados, como diferentes días, distintos analistas, entre otros (precisión intermedia).<sup>64</sup>

Para la evaluación de la repetibilidad del método desarrollado en cada sistema, se consideraron tres niveles de concentración (5, 50 y 100 ppm), incluyendo el límite inferior y superior del rango de concentraciones de trabajo. Las mediciones se realizaron el mismo día y por el mismo analista. Los resultados de las mediciones se registraron en los **Cuadros 19 y 20**; para su evaluación se calculó la concentración promedio recuperada y el coeficiente de variación, el cual es menor al 2.0 % en ambos casos, con lo cual es posible observar que los resultados analíticos se obtienen con un alto grado de repetibilidad, de acuerdo a los parámetros establecidos para la evaluación de métodos cromatográficos.

**CUADRO 19.** Evaluación de repetibilidad del método de cuantificación para el ácido operculínico A peracetilado.

Nivel de concentración	Área (uA)	Concentración recuperada (ppm)	Promedio	S	CV	Intervalo de confianza
5	50634	4.98	5.05	0.06	1.1	0.06
	51198	5.07				
	51340	5.09				
50	353615	49.91	50.18	0.29	0.6	0.33
	357493	50.48				
	355229	50.15				
100	687047	99.35	100.17	0.71	0.7	0.81
	694852	100.51				
	695798	100.65				

**CUADRO 20.** Evaluación de repetibilidad del método de cuantificación para el ácido operculínico B peracetilado.

Nivel de concentración	Área (uA)	Concentración recuperada (ppm)	Promedio	S	CV	Intervalo de confianza
5	63989	5.16	5.09	0.06	1.2	0.07
	63275	5.05				
	63359	5.06				
50	346279	50.73	50.37	0.31	0.6	0.35
	342890	50.18				
	343054	50.20				
100	657745	100.99	100.20	0.70	0.7	0.79
	649657	99.69				
	650987	99.91				

En cuanto a la evaluación de la precisión intermedia, se trabajaron las mismas condiciones experimentales utilizadas en el ejercicio de repetibilidad del método, registrando las respuestas analíticas obtenidas por dos analistas y dos días diferentes. En los **Cuadros 21 y 22**, se incluyen dichos resultados; la estadística consistió en el análisis de los coeficientes de variación obtenidos para las mediciones de cada analista por día y las totales para cada valor nominal de concentración; en ambos casos se obtuvieron valores menores al 2.0 %, por lo que no existen diferencias significativas entre analistas y que la respuesta analítica no cambia respecto al día de análisis, manteniendo constantes las demás condiciones de trabajo. Así, se concluye que el método desarrollado cumple con los parámetros de precisión según su propósito.

**CUADRO 21.** Evaluación de precisión intermedia para el ácido operculínico A peracetilado.

Nivel de concentración	Analista	Día 1			Día 2			Totales		
		Promedio	S	CV	Promedio	S	CV	Promedio	S	CV
5	1	4.98	0.05	1.0	5.00	0.07	1.5	4.99	0.06	1.2
	2	5.08	0.04	0.8	5.06	0.08	1.7	5.07	0.06	1.2
	Global	5.03	0.07	1.4	5.03	0.08	1.5	5.03	0.07	1.4
50	1	50.26	0.33	0.6	50.23	0.31	0.6	50.25	0.29	0.6
	2	50.37	0.32	0.6	50.37	0.23	0.5	50.37	0.25	0.5
	Global	50.32	0.30	0.6	50.30	0.26	0.5	50.31	0.29	0.6
100	1	99.46	0.36	0.4	99.55	0.09	0.1	99.51	0.24	0.2
	2	100.54	0.84	0.8	100.51	0.85	0.9	100.52	0.76	0.8
	Global	100.00	0.82	0.8	100.03	0.75	0.8	100.02	0.69	0.7

**CUADRO 22.** Evaluación de precisión intermedia para el ácido operculínico B peracetilado.

Nivel de concentración	Analista	Día 1			Día 2			Totales		
		Promedio	S	CV	Promedio	S	CV	Promedio	S	CV
5	1	5.15	0.03	0.5	5.14	0.04	0.8	5.14	0.03	0.6
	2	5.18	0.02	0.4	5.22	0.07	1.4	5.20	0.05	1.0
	Global	5.17	0.03	0.6	5.18	0.07	1.3	5.17	0.05	1.0
50	1	50.39	0.27	0.5	50.32	0.23	0.5	50.35	0.23	0.5
	2	50.64	0.33	0.7	50.50	0.33	0.7	50.57	0.31	0.6
	Global	50.51	0.30	0.6	50.41	0.27	0.5	50.46	0.28	0.6
100	1	100.16	0.37	0.4	100.44	0.41	0.4	100.30	0.38	0.4
	2	99.89	0.31	0.3	100.66	0.59	0.6	100.27	0.60	0.6
	Global	100.02	0.34	0.3	100.55	0.47	0.5	100.29	0.40	0.4

## CUANTIFICACIÓN EN MUESTRAS COMERCIALES

A partir del método desarrollado y previamente evaluado, se cuantificó el producto de peracetilación de los ácidos operculínicos A y B en cinco productos herbolarios de mayor venta en el territorio brasileño. La respuesta analítica obtenida para cada una de las disoluciones problema sirvió como punto de partida pues, con ella se calculó la concentración de ambos ácidos glicosídicos mediante interpolación en las respectivas curvas de calibración; posteriormente, se realizaron los cálculos necesarios para conocer la concentración total en los productos comerciales. En los **Cuadros 23 y 24**, se muestra la compilación de los mencionados cálculos.

**Cuadro 23.** Cuantificación del ácido operculínico A peracetilado en las muestras comerciales analizadas.

Muestra	Concentración (ppm)		Concentración muestra (mg/L)	Cantidad de analito (mg/mL) líquidos (g) sólidos
	Disolución problema	Disolución madre		
Tintura Sobral	32.52	143.24	200.75	0.20
Batatao Hypólito	50.65	121.47	170.25	0.17
Tiro seguro	26.26	103.03	144.39	0.14
Píldoras Maciel	15.37	46.17	283.27	0.06 (comprimido)
Polvo de batatao	27.12	226.75	56.27	0.06

**Cuadro 24.** Cuantificación del ácido operculínico B peracetilado en las muestras comerciales analizadas.

Muestra	Concentración (ppm)		Concentración muestra (mg/L)	Cantidad de analito (mg/mL) líquidos (g) sólidos
	Disolución problema	Disolución madre		
Tintura Sobral	39.11	172.27	241.44	0.24
Batidão Hypólito	61.00	146.29	205.02	0.21
Tiro seguro	33.69	78.17	109.56	0.11
Píldoras Maciel	25.12	75.43	462.83	0.09 (comprimido)
Polvo de batatão	47.64	257.53	63.91	0.06

En ambos cuadros, las dos primeras columnas hacen referencia a la concentración del respectivo ácido glicosídico peracetilado en la disolución problema y la disolución de partida; la tercera columna corresponde a la concentración de la muestra comercial y la cuarta es la cantidad de miligramos de analito presentes en un mililitro de muestra (en el caso de los productos líquidos), la cantidad de sustancia analizada en un comprimido o la cantidad de éste en un gramo de muestra sólida (polvos).

Aun cuando todos los productos analizados se venden habitualmente en todo el territorio brasileño, con especial atención en los estados de norteros de la cuenca del río Amazonas, sólo la Tintura Sobral refiere una concentración de resinas totales (0.997 mg/mL, según el marbete). De acuerdo con los resultados obtenidos en la presente disertación, dicho producto fitoterapéutico contendría 0.20 mg/mL de ácido operculínico A y 0.24 mg/mL de ácido operculínico B que corresponde a un total aproximado del 50% de su contenido de resinas glicosídicas cuantificadas. Por otro lado, dicho producto es el que contiene una mayor cantidad de ambos analíticos, mientras que el pó-de-batatão tiene la menor concentración; sin embargo, esto es entendible, ya que este producto corresponde a la droga cruda pulverizada y el resto de los productos herbolarios se manufacturan a partir de tinturas donde se concentran los principios terapéuticos polares, es decir las resinas glicosídicas.

En los países en vía en desarrollo que buscan promover el uso racional de sus hierbas medicinales, la identificación correcta de las plantas medicinales es de primordial importancia para garantizar la calidad de las drogas crudas y sus derivados fitofarmacéuticos, ya que muy pocas hierbas medicinales son cultivadas y casi toda la materia prima se obtiene a través de la recolección. En consecuencia, la identificación errónea o la adulteración pueden ocurrir fácilmente. La combinación de HPLC mediante la generación de “perfiles cromatográficos” y la detección mediante el acoplamiento con ESIMS añade un valor a los métodos botánicos convencionales utilizados en el control de calidad de las hierbas medicinales que se utilizan para la elaboración de los productos comerciales, como quedó demostrado en la presente investigación para la droga cruda de la raíz de jalapa y sus preparados fitofarmacéuticos.

---

## CONCLUSIONES

1.- Los perfiles cromatográficos en HPLC-ESIMS constituyen una herramienta analítica (“huella digital”) para la identificación y el control de calidad de los preparados fitofarmacéuticos a base de la raíz de jalapa y de cualquier droga cruda de origen vegetal rica en oligosacáridos complejos.

2.- En el presente estudio, las condiciones de HPLC-ESIMS se optimizaron para la determinación cualitativa de cinco ácidos glicosídicos constitutivos de la raíz de jalapa brasileña, pertenecientes a la serie de oligosacáridos conocidos como los ácidos operculínicos. El método de cuantificación de los dos marcadores seleccionados, los ácidos operculínicos A y B, es rápido y permitió determinar que las drogas crudas adquiridas en diferentes locales comerciales del norte de Brasil corresponden a la raíz de jalapa de flores amarillas (*O. hamiltonii*), ya que su distribución es superior a la de la especie *O. macrocarpa* restringida al sudeste de Brasil. Por lo anterior, parece que el uso tradicional de *O. macrocarpa* pudo ser discontinuado en todo el territorio brasileño.

3.- Para el aislamiento y la purificación de los núcleos oligosacáridos extremadamente hidrófilos a partir de las matrices de glicolípidos como las resinas glicosídicas, se utilizó la degradación de los constituyentes complejos de alto peso molecular mediante reacciones químicas simples, en moléculas lipofílicas más pequeñas y manejables, para su resolución mediante HPLC. Por lo tanto, en este contexto, se verificó la efectividad del enfoque de la secuencia de reacciones que incluyen la hidrólisis básica (saponificación) seguida de la peracetilación para la identificación cualitativa y cuantitativa de los marcadores químicos que están representados por los núcleos oligosacáridos distintivos para la droga cruda.

4.- El empleo de la metodología analítica mediante la cromatografía de líquidos acoplada a la espectrometría de masas (ESI) permitió identificar en los perfiles cromatográficos diferencias significativas en la composición química de las especies que conforman el complejo medicinal de la raíz de jalapa brasileña; es decir, entre la raíz de jalapa de flores blancas (*O. macrocarpa*) y la de flores amarillas (*O. hamiltonii*).

5.- Se identificaron diferencias significativas de tipo cualitativo en el contenido de los ácidos glicosídicos entre los diferentes tipos de productos comerciales y las drogas crudas analizadas; sin embargo, todos contienen al ácido operculínico A, constituyente mayoritario de las resinas glicosídicas de *O. hamiltonii*.

6.- El resto de los marcadores químicos también se identificaron fácilmente, aunque en niveles bajos en todas las muestras, a través de tiempos de retención y valores de masa en HPLC-ESIMS mediante el modo de monitoreo de iones seleccionado utilizando iones objetivo en  $[M + Na]^+$  e iones fragmentos seleccionados.

7.- Los resultados confirmaron la importancia de realizar un control de calidad de los productos comerciales y se espera que este método de HPLC, a través de la derivatización química, proporcione una nueva base para la evaluación de muestras complejas en su contenido de glicolípidos individuales en matrices oligosacáridas. Este desarrollo analítico puede ser aplicado para el control de calidad de preparados farmacéuticos constituidos por oligosacáridos complejos y glicoconjugados.

8.- La aplicación de métodos analíticos y farmacéuticos para el control de calidad, así como la evaluación de la seguridad y la eficacia de los medicamentos tradicionales, constituye el primer paso en el proceso de transferir el conocimiento de la medicina tradicional al campo de la investigación clínica para su aplicación en el ámbito médico.

## ANEXO A. REGISTRO ANVISA DEL PRODUCTO TINTURA DE JALAPA SOBRAL

®

20/9/22, 17:41

Registro ANVISA nº 1096300560028 - TINTURA DE JALAPA SOBRAL - VÁLIDO

## Registro ANVISA nº 1096300560028 - TINTURA DE JALAPA SOBRAL

	<b>Princípio Ativo</b>
	OPERCULINA ALATA (HAM.) URB.
<b>Área</b>	<b>Categoria Regulatória</b>
1 - MEDICAMENTOS	Fitoterápico
<b>Registro</b>	<b>Nome da Empresa/Detentor</b>
1096300560028	THEODORO F SOBRAL & CIA LTDA (06.597.801/0001-62) -
<b>Produto</b>	<b>Origem</b>
TINTURA DE JALAPA SOBRAL	THEODORO F SOBRAL & CIA LTDA - 06597801000162 - BRASIL - PI - FLORIANO -
<b>Classe Terapêutica</b>	
LAXANTES FITOTERAPICO SIMPLES	<b>Apresentação Ativa</b>
<b>Autorização</b>	Sim
1009636	<b>Forma de Apresentação</b>
<b>Processo</b>	TINT FR PLAS AMB X 100 ML
25000.039439/96-32	<b>Forma Farmacêutica</b>
<b>Validade/Situação</b>	TINTURA
01/08/2026 Publicado deferimento » conforme visto em 13/09/2022	<b>Nº Apresentação</b>
	2
	<b>Data Publicação</b>
	28/08/2006

Consultas / Medicamentos / Medicamentos

## Detalhe do Produto: TINTURA DE JALAPA SOBRAL

<b>Nome da Empresa Detentora do Registro</b>	THEODORO F SOBRAL & CIA LTDA	<b>CNPJ</b>	06.597.801/0001-62	<b>Autorização</b>	1.00.963-6
<b>Processo</b>	25000.039439/9632	<b>Categoria Regulatória</b>	Fitoterápico	<b>Data do registro</b>	28/08/2006
<b>Nome Comercial</b>	TINTURA DE JALAPA SOBRAL	<b>Registro</b>	109630056	<b>Vencimento do registro</b>	08/2026
<b>Princípio Ativo</b>	OPERCULINA ALATA (HAM.) URB.			<b>Medicamento de referência</b>	-
<b>Classe Terapêutica</b>	LAXANTES FITOTERAPICO SIMPLES			<b>ATC</b>	FITOTERAPICO SIMPLES
<b>Parecer Público</b>	-			<b>Bulário Eletrônico</b>	-
<b>Rotulagem</b>					

Nº	Apresentação	Registro	Forma Farmacêutica	Data de Publicação	Validade
1	TINT FR PLAS AMB X 30 ML <b>ATIVA</b>	1096300560011	TINTURA	27/08/2006	24 meses
2	TINT FR PLAS AMB X 100 ML <b>ATIVA</b>	1096300560028	TINTURA	27/08/2006	24 meses
3	TINT FR PLAS AMB X 200 ML <b>ATIVA</b>	1096300560036	TINTURA	27/08/2006	24 meses
4	TINT FR PLAS AMB X 300 ML <b>ATIVA</b>	1096300560044	TINTURA	27/08/2006	24 meses
5	TINT FR PLAS AMB X 500 ML <b>ATIVA</b>	1096300560052	TINTURA	27/08/2006	24 meses
6	TINT FR PLAS AMB X 1000 ML <b>ATIVA</b>	1096300560060	TINTURA	27/08/2006	24 meses

## ANEXO B. FICHAS INFORMATIVAS DE PRODUCTOS COMERCIALES

### Pímulas Maciel (comprimidos)



#### Contenido

Jalapa  
*Aloe ferox*  
*Rheum palmatum*  
Excipiente c.b.p.

#### Posología

Dosis	Efecto
1-3 años, 1 píldora	Laxante
4-12 años, 2 píldoras	Laxante
Adultos, 3 - 5 píldoras	Laxante - Purgante

### Tintura de jalapa Sobral ®



#### Contenido

Tintura de jalapa (*O. hamiltonii*)

#### Posología

Dosis	Efecto
Sólo adultos:	
15 mL	Laxante
30-45 mL	Purgante

## Batidão Hypólito

---



### Contenido

Goma de "batata de purga"  
Yoduro de potasio  
"Laranja-amarga" (*Citrus aurantium*)  
"Caroba" (*Jacaranda procera*)

---

### Posología

---

#### Dosis

Niños, 15mL (mañana y noche)  
Adultos, 30 mL (mañana y noche)

#### Efecto

Indicado para depurar la sangre,  
disentería, diarrea, para efecto purgante,  
reumatismo y problemas de piel. Auxiliar  
en problemas ginecológicos.

---

## Tiro Seguro

---



### Contenido

Batata de purga  
Sumo de Mastruz (*Dysphania ambrosioides*)  
Sumo de mastruz indiano (*Lepidium virginicum*)  
Melão de São Caetano (*Momordica charantia*)  
Hortelã miúdo (*Mentha piperita*)  
Propóleo y miel

---

### Posología

---

#### Dosis

Después de la comida:  
Niños, 15 mL  
Adultos, 30 mL

#### Efecto

Vermífugo

---

## Batata de purga en polvo

---



### Contenido

Jalapa en polvo

---

### Posología

---

#### Dosis

#### Efecto

---

2 g disueltos en una taza de agua

Purgante

2 cucharadas disueltas en una taza de agua

Purgante drástico en caso de hidropesía cardíaca o renal, congestión, inflamación, hemorragia cerebral y pulmonar.

1 cucharada disuelta en una taza de agua  
(antes de acostarse)

Laxante

---

---

## REFERENCIAS

1. Hardy, K. (2021). Paleomedicine and the evolutionary context of medicinal plant use. *Revista Brasileña de Farmacognosia*, 31, pp. 1–15.
2. Castillo-García, E. & Martínez-Solís, I. (2007). *Manual de fitoterapia*. Elsevier-Masson SAS.
3. Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry. Rev.* 9, pp. 1199–1209.
4. Alonso, E., Cerdeiras M.P., Fernández, J., Ferreira, F., Moyna, P., Soubes, M., Vázquez, A., Vero, S., Zunino, L. (1995). Screening of Uruguayan medicinal plants for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*. 45, pp. 67–70.
5. Pereda-Miranda, R., Rosas-Ramírez, D., Castañeda-Gómez, J. (2010). *Progress in the chemistry of organic natural products*. (eds. Kinghorn, A. D., Falk, H. & Kobayashi, J.), Vol. 92., pp. 77–147. Springer Verlag Wien.
6. Fan, B.Y., Jiang, X., Li, Y.X., Wang, W.L., Yang, M., Li, J.L., Wang, A.D., Chen, G.T. (2022). Chemistry and biological activity of resin glycosides from Convolvulaceae species. *Medicinal Research Reviews*. 42(6), pp. 2025-2066.
7. Austin, D. F., Costea, M., Felger, R. S., Sánchez, J. J. & Van Devender, T. R. Convolvulaceae of Sonora, México: I. *Convolvulus*, *Cressa*, *Dichondra*, *Evolvulus*, *Ipomoea*, *Jacquemontia*, *Merremia*, and *Operculina*. (2012). *Journal of the Botanical Research Institute of Texas*. 6, pp. 459–527.
8. Song, W.B, Wang, W., Zhang, S. & Xuan, L.J. (2015). Multidrug resistance-reversal effects of resin glycosides from *Dichondra repens*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 25(4), pp. 795-8.
9. Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Escalante-Sánchez E, Hernández-Carlos B, Linares E, Bye R. (2006). Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *Journal of Natural Products*. 69, 1460–1466.

10. Lira-Ricárdez, J. & Pereda-Miranda, R. (2020). Reversal of multidrug resistance by amphiphilic morning glory resin glycosides in bacterial pathogens and human cancer cells. *Phytochemistry*. Rev. 19, pp. 1211–1229.
11. Josep Cuerda Quintana. (1995). *Atlas de Botánica: El mundo de las plantas*. Editorial Cultural.
12. Simpson, M. G. (2010). Diversity and classification of flowering plants: Eudicots. *Plant systematics and evolution*. pp. 275–448.
13. Staples, G., Wiersema, J., Chambers, N., & Austin, D. (2005). The restoration of *Ipomoea muricata* (L.) Jacq. (Convolvulaceae). *Taxon*. 54, pp. 1075-1079.
14. McDonald, A. (1991). Origin and diversity of Mexican Convolvulaceae. *Anales del Instituto de Biología, UNAM*. 62, pp. 65–82.
15. Sousa-Santos, F. D., Geadelane, D. J. & Buril-Aureliano, M. T. (2018). New records of *Ipomoea chiquitensis* (Convolvulaceae) from the Brazilian northeast. *Revista Mexicana de Biodiversidad*. 89, pp. 954–960.
16. Staples, G., Simões, A.R. & Austin†, D.F. (2020). A Monograph of *Operculina* (Convolvulaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 105, pp. 64–138.
17. Royal Botanic Garden. *Plants of the World Online*. (2022). Recuperado de: <https://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:11960-1#source-KB>
18. Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios. (2019) *¿Qué es la Farmacopea?* <https://www.gob.mx/cofepris/acciones-y-programas/que-es-la-farmacopea>
19. Viesca T., C. & Ramos de Viesca, M. (2014). Aportaciones de la medicina náhuatl prehispánica. *Arqueología Mexicana*, pp. 67–73.
20. Viesca Treviño, C. (1984). El médico mexicana. *Historia General de la Medicina en México, INAH*, pp. 217–230.

21. Bourdin, G. (2016). Antropología de las emociones: conceptos y tendencias. *Revista de Ciencias Antropológicas*. 67, pp. 55–74.
22. Pardal, R. (1998). *Medicina aborígen americana*. Editorial Renacimiento.
23. Viesca Treviño, C. (1992). *Medicina prehispánica de México: El conocimiento médico de los nahuas*. Panorama Editorial.
24. Andalón González, M. G. (2016). El tícitl en la cultura náhuatl del Posclásico. *Revista de Ciencias Antropológicas*. 23, pp. 181–202.
25. Pereda-Miranda, R. (2021). A viagem da jalapa desde a Vera Cruz mexicana até o jalapão brasileiro, Artigo de Capa. *Revista A Flora*. 1(3), pp. 4–7.
26. Hernández, F. (2015). Del cacamotli tlanquiloni o batata purgante. Historia Natural de la Nueva España. *Obras completas de Francisco Hernández*. Tomo II, Capítulo XXXV. Recuperado de: [http://www.franciscohernandez.unam.mx/tomos/02\\_TOMO/tomo002\\_004/tomo002\\_004\\_035.html](http://www.franciscohernandez.unam.mx/tomos/02_TOMO/tomo002_004/tomo002_004_035.html)
27. de Sahagún, Fr. B. (1829). Historia General de las cosas de Nueva España. *Colección Cien de México*. pp. 913–960.
28. Stichting Academisch Erfgoed. (2022). *Ipomoea purga*. *The art of knowledge: educational botanical wall charts (1870-1960)*. Recuperado de: <https://geheugen.delpher.nl/en>
29. Heine, H. (1960). *Operculina macrocarpa* (L.) Urban (Convolvulaceae) in west tropical Africa. *Kew Bulletin*. 14, 397–399.
31. Sobral, F., Brandão, P.A., Freitas, F., Athayde, A. & Souza, A. (2010). *Operculina hamiltonii* (G. Don) DF Austin & Staples (1983) e *Cucurbita pepo* L. no controle de ovos e larvas de helmintos gastrintestinais de *Gallus domesticus*. *Revista Verde de Agroecología y Desarrollo Sostenible*. 5, pp. 131–135.

32. Ono, M., Nishioka, H., Fukushima, T., Kunimatsu, H., Mine, A., Kubo, H., Miyahara, K. (2009). Components of ether-insoluble resin glycoside (Rhamnoconvolvulin) from rhizoma *jalapae braziliensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Japan*. 57, pp. 262–268.
33. Ono, M., Kawasaki, T. & Miyahara, K. (1989). Resin glycosides V. Identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the ether-soluble crude resin glycosides ('jalapin') from rhizoma *jalapae braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Japan*. 37, 3209–3213.
34. Zhu, D., Chen, C., Bai, L., Kong, L. & Luo, J. (2019). Downregulation of aquaporin 3 mediated the laxative effect in the rat colon by a purified resin glycoside fraction from *pharbitis* semen. Evidence-based complement. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. pp. 10.
35. Gesto-Borroto, R., Medina-Jiménez, K., Lorence, A. & Villarreal, M. L. (2021). Application of DNA barcoding for quality control of herbal drugs and their phytopharmaceuticals. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 31, pp. 127–141.
36. Upton, R., David, B., Gafner, S. & Glasl, S. (2020). Botanical ingredient identification and quality assessment: strengths and limitations of analytical techniques. *Phytochemistry Review*. 19, pp. 1157–1177.
37. World Health Organization, WHO. (1998). Quality control methods for medicinal plant materials, World Health Organization, Geneva. *WHO Library Cataloguing in Publication Data*. pp. 122.
38. Simmler, C., Anderson, J.R., Gauthier, L., Lankin, D.C., McAlpine, J.B., Chen, S.N., Pauli, G.F. (2015). Metabolite profiling and classification of DNA-authenticated licorice botanicals. *Journal of Natural Products*. 78, pp. 2007–2022.
39. Heinrich, M., Jalil, B., Abdel-Tawab, M., Echeverria, J., Kulić, Ž., McGaw, L.J., Pezzuto, J.M., Potterat, O., Wang, J.B. (2022). Best practice in the chemical characterization of extracts used in pharmacological and toxicological research. *Frontiers in Pharmacology*. 13, pp. 1–20.
40. Heinrich, M. (2000). Ethnobotany and its role in drug development. *Phytotherapy Research*. 14, pp. 479–488.

41. Pereda-Miranda, R. (2022). Molécula em foco: Berberina. *Revista A Flora*. 3, pp. 14.
42. Liu, Y., Finley, J., Betz, J.M. & Brown, P.N. (2018). FT-NIR characterization with chemometric analyses to differentiate goldenseal from common adulterants. *Fitoterapia*. 127, pp. 81–88.
43. Avula, B., Sagi, S., Gafner, S., Upton, R., Wang, Y.H., Wang, M., Khan, I.A. (2015). Identification of ginkgo biloba supplements adulteration using high performance thin layer chromatography and ultra-high performance liquid chromatography-diode array detector-quadrupole time of flight-mass spectrometry. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 407(25), pp. 7733-46.
44. Wohlmuth, H., Savage, K., Dowell, A. & Mouatt, P. (2014). Adulteration of ginkgo biloba products and a simple method to improve its detection. *Phytomedicine*. 21, pp. 912–918.
45. Li, M., Au, K.Y., Lam, H., Cheng, L., Jiang, R.W., But, P.P., Shaw, P.C. (2012). Identification of baiying (*Solani Lyrati*) commodity and its toxic substitute xungufeng (*Aristolochiae Mollissimae*) using DNA barcoding and chemical profiling techniques. *Food Chemistry*. 135, pp. 1653–1658
46. Li, Y., Geng, L., Liu, Y., Chen, M., Mu, Q., Zhang, X., Zhang, Z., Ren, G., Liu, C. (2018). Identification of three daphne species by DNA barcoding and HPLC fingerprint analysis. *Plos One*. pp. 17.
47. Demarque, D.P., Crotti, A.E.M., Vessecchi, R., Lopes, J.L. C. & Lopes, N.P. (2016). Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: An important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. *Natural Product Reports*. 33, pp. 432–455.
48. Blaženović, I., Kind, T., Ji, J. & Fiehn, O. (2018). Software tools and approaches for compound identification of LC-MS/MS data in metabolomics. *Metabolites*. 8(2), pp. 31.
49. Wolfender, J. L., Marti, G., Thomas, A. & Bertrand, S. (2015). Current approaches and challenges for the metabolite profiling of complex natural extracts. *Journal of Chromatography A*. 1382, pp. 136–164.
50. Heyman, H. M. & Meyer, J. J. M. (2012). NMR-based metabolomics as a quality control tool for herbal products. *South African Journal of Botany*. 82, pp. 21–32.

51. Danezis, G. P., Tsagkaris, A. S., Camin, F., Brusica, V. & Georgiou, C. A. (2016). Food authentication: Techniques, trends & emerging approaches. *Trends in Analytical Chemistry*. 85, pp. 123–132.
52. Mishra, P., Kumar, A., Nagireddy, A., Mani, D. N., Shukla, A. K., Tiwari, R., & Sundaresan, V. (2016). DNA barcoding: an efficient tool to overcome authentication challenges in the herbal market. *Plant Biotechnology Journal*. 14(1), pp. 8–21.
53. Peruvian Barcode of life. (2023). *Código de barras de ADN – Pebol*. Recuperado de: <https://pebol.org/codigo-de-barras/>
54. Azizi, M. M. F., Lau, H. Y., & Abu-Bakar, N. (2021). Integration of advanced technologies for plant variety and cultivar identification. *Journal of biosciences*. 46, 91.
55. Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biólogos México, A. C. (2002). *Guía de validación de métodos analíticos*. CNQFB. pp. 123.
56. Miller, J. M. (2005). *Chromatography: Concepts and contrasts*. John Wiley & Sons.
57. National Institute of Standards and Technology (NIST)/U.S. Department of Commerce. (2009). *About NIST*. Recuperado de: [www.nist.gov/about-nist](http://www.nist.gov/about-nist)
58. Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA)/U.S. Department of Agriculture. (2021) *¿Qué hace la FDA?* Recuperado de: [www.fda.gov/about-fda/fda-basics/respuestas-preguntas-frecuentes-sobre-la-fda](http://www.fda.gov/about-fda/fda-basics/respuestas-preguntas-frecuentes-sobre-la-fda)
59. Food and Drug Administration (2015). Analytical procedures and methods validation for drugs and biologics, guidance for industry. *FDA/U.S. Department of Health and Human Services*, pp. 18.
60. International Council for Harmonization. ICH. (2023). *About ICH*. Recuperado de: <https://www.ich.org>
61. International Organization for Standardization. (2019). *About us; ISO*. Recuperado de: <https://www.iso.org/about-us.html>

62. International Electrotechnical Commission. (2017). ISO/IEC 17025: General requirements for the competence of testing and calibration laboratories. *Int. Stand.* 2005, 1–36
63. Agencia Nacional de Vigilancia Sanitaria, ANVISA. *Farmacopea Brasileira*. Recuperado de: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/farmacopeia>
64. Harmonised Tripartite Guideline. (2005). Validation of analytical procedures: Text and methodology Q2(R1). *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use*.
65. Gratzfeld-Hüsgen, A. & Schuster, R. (1995). *HPLC for food analysis: A primer*. Hewlett-Packard Company. pp. 132.
66. Pereda-Miranda, R., Fragoso-Serrano, M., Escalante-Sánchez, E., Hernández-Carlos, B., Linares, E., & Bye, R. (2006). Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *Journal of Natural Products*, 69(10), pp. 1460–1466.
67. Lira-Ricárdez, J., Pereda-Miranda, R., Castañeda-Gómez, J., Fragoso-Serrano, M., Simas, R. C., & Leitão, S. G. (2019). Resin glycosides from the roots of *Operculina macrocarpa* (Brazilian jalap) with purgative activity. *Journal of Natural Products*, 82(6), pp. 1664–1677.
68. Diario Oficial de la Federación (DOF). (2013). *Norma oficial mexicana NOM-177-SSA1-2013*. Secretaría de Gobernación. Recuperado de: [https://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0](https://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5314833&fecha=20/09/2013#gsc.tab=0)
69. Montgomery, D., Peck, E. & Vining, G. (2007). *Introducción al análisis de regresión lineal*. Compañía Editorial Continental, 3ª edición, pp. 612.
70. Walpole, R., Myers, R. & Myers, S. (1999). *Probabilidad y estadística para ingenieros*. Pearson, Prentice Hall.

---

ARTÍCULO PUBLICADO



# Glycosidic Acid Content from the Roots of *Operculina hamiltonii* (Brazilian Jalap) and Some of Their Phytopharmaceuticals with Purgative Activity

María Emma Montiel-Ayala<sup>1</sup> · Nadia Rosalina Jiménez-Bárceñas<sup>1</sup> · Jhon Castañeda-Gómez<sup>2</sup> · Armando Moreno-Velasco<sup>1</sup> · Jesús Lira-Ricárdez<sup>1</sup> · Mabel Fragoso-Serrano<sup>1</sup> · Suzana Guimarães Leitão<sup>3</sup> · Rogelio Pereda-Miranda<sup>1</sup>

Received: 20 August 2021 / Accepted: 9 September 2021  
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Farmacognosia 2021

## Abstract

Brazilian jalap root, *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staple, Convolvulaceae, belongs to the morning glory family and is used as a purgative or laxative medicinal plant. After hydrolysis and peracetylation of the EtOH-soluble extract, the known operculinic acids A and B and turpethic acid C, in addition to three undescribed glycosidic acids, operculinic acids L-N with a tetrasaccharide or pentasaccharide moieties with unusual 12-hydroxy fatty acid aglycones of different chain lengths (C<sub>17</sub> and C<sub>18</sub>), were isolated from a commercial sample of pulverized roots by preparative recycling HPLC. Analysis of sixteen samples, including crude drugs and commercial phytopharmaceuticals based on jalap root, led to the generation of distinctive chromatographic profiles for each sample. The major isolated glycosidic acids were used as diagnostic peaks for HPLC-ESIMS fingerprinting by selected ion monitoring mode using target ions at [M + Na]<sup>+</sup>.

**Keywords** Herbal remedies · (12*S*)-Hydroxyheptadecanoic acid · (12*S*)-Hydroxyoctadecanoic acid · Intestinal constipation · Jalapinic acid · Oligosaccharides · Resin glycosides

## Introduction

Various herbal products prepared with the Brazilian jalap root, popularly known in the north and northeast of Brazil as “batata-de-purga,” “jalapa,” and “batatão,” are used as purgative remedies in the north and northeast of Brazil

(Brandão et al. 2009; Galvão et al. 2014). *Operculina macrocarpa* (L.) Urban (Fig. S1) or *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples (Fig. S2), two members of the morning glory family (Convolvulaceae), are used to prepare tinctures and other phytopharmaceuticals based on their roots for intestinal disorders (Fig. S3). *O. macrocarpa* is an annual climbing vine with a tuberous root and white flowers (Staples et al. 2020), distributed mainly in the tropical and subtropical regions of the Atlantic Forest in northeastern and southeastern Brazil (Fig. S1). *O. hamiltonii*, a vine with yellow flowers (Fig. S2), is dispersed in Central America, the West Indies, and mainly in the north of the Brazilian territory (Staples et al. 2020).

Ethnobotanical publications describe the popular uses of *Operculina* species as purgative, anthelmintic, blood purifier, and anti-stroke remedies (Ahmad et al. 2017; Staples et al. 2020). Several of these biological activities are attributed to their resin glycosides (Lira-Ricárdez and Pereda-Miranda 2020; Rosas-Ramírez et al. 2020), which are complex mixtures of acylsugars composed of

This article is part of a Special Issue to celebrate the 35th anniversary of the *Brazilian Journal of Pharmacognosy*.

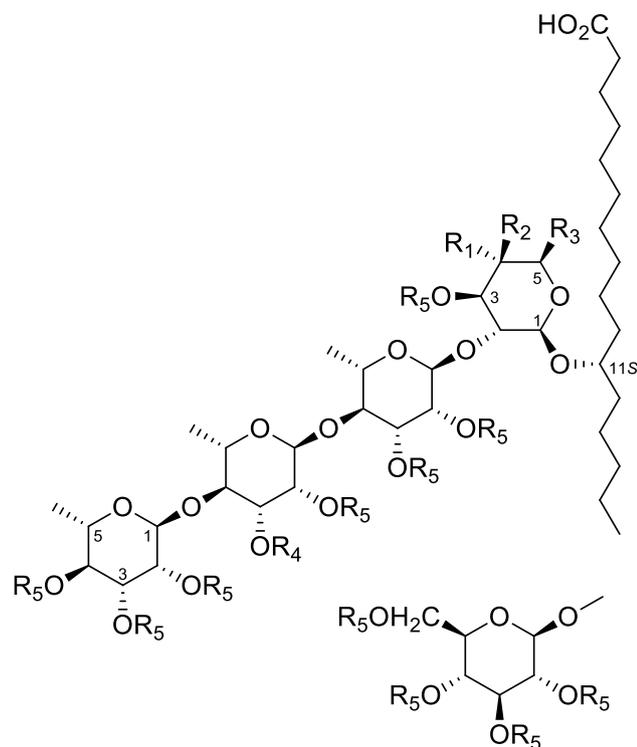
✉ Rogelio Pereda-Miranda  
pereda@unam.mx

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Mexico City 04510, Mexico

<sup>2</sup> Grupo Químico de Investigación y Desarrollo Ambiental. Programa de Licenciatura en Ciencias Naturales y Educación Ambiental. Facultad de Educación, Universidad Surcolombiana, Neiva, Colombia

<sup>3</sup> Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Centro de Ciências da Saúde, Bloco A, Ilha do Fundão, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil

oligosaccharides of monohydroxylated and dihydroxylated  $C_{14}$  and  $C_{16}$  fatty acids (Pereda-Miranda et al. 2010). Resin glycosides increase membrane permeability to cations and anions (Fan et al. 2014; Zhu et al. 2019b), acting as osmotic laxatives by producing water elimination and peristalsis of the intestine by a decreased expression of aquaporin 3 in colon cells (Zhu et al. 2019a).

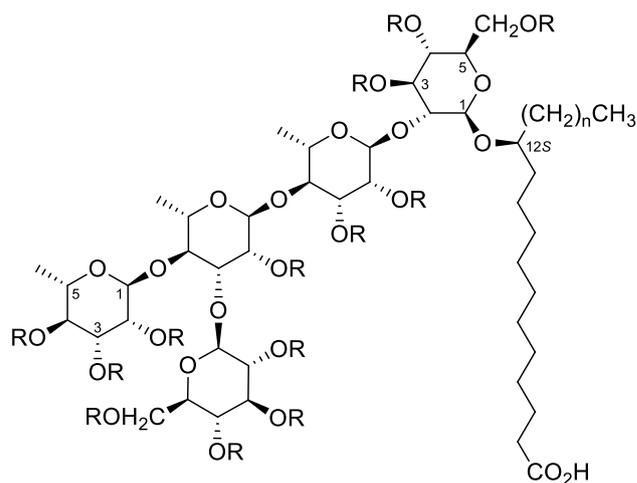


- 1**  $R_1=R_5=H$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=CH_3$ ;  $R_4=Glc$   
**2**  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_5=H$ ;  $R_3=CH_2OH$ ;  $R_4=Glc$   
**3**  $R_1=R_4=R_5=H$ ;  $R_2=OH$ ;  $R_3=CH_3$   
**4**  $R_2=OH$ ;  $R_2=R_3=R_5=H$ ;  $R_4=Glc$   
**5**  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_4=R_5=H$ ;  $R_3=CH_2OH$   
**6**  $R_1=OH$ ;  $R_2=R_3=R_4=R_5=H$   
**16**  $R_1=H$ ;  $R_2=OAc$ ;  $R_3=CH_3$ ;  $R_4=Glc$ ;  $R_5=Ac$   
**17**  $R_1=OAc$ ;  $R_2=H$ ;  $R_3=CH_2OAc$ ;  $R_4=Glc$ ;  $R_5=Ac$   
**22**  $R_1=H$ ;  $R_2=OAc$ ;  $R_3=CH_3$ ;  $R_4=R_5=Ac$

Operculinic acids A–F (**1–6**) were described as the major constituents from *O. macrocarpa*, the Brazilian jalap with white flowers (Ono et al. 1989, 1990). Compounds **1** and **2** are among the most widely distributed pentasaccharides of jalapinic acid (11*S*-hydroxyhexadecanoic acid) in the Convolvulaceae (Pereda-Miranda et al. 2010). *Operculina* species also contained several additional mono- and dihydroxylated fatty acids as their aglycones (Wagner et al. 1978; Ono 2017). For example, turpethic acids A–C (**7–9**), pentasaccharides having a monohydroxylated 12*S*-hydroxy fatty acid as

their aglycone with a  $C_{15}$  (**7**),  $C_{16}$  (**8**), or  $C_{17}$  (**9**) chain, were isolated from the Indian Jalap (Ding et al. 2012), *O. turpethum* S. Manso (Akbar 2020). From the roots of *O. macrocarpa*, operculinic acid H (**10**), a hexasaccharide of 3*S*,12*S*-dihydroxyhexadecanoic acid (Ono et al. 2009), was isolated, in addition to operculinic acids I (**11**) and J (**12**), containing the same glycoside of **10** and diverging in their aglycones, 12*S*-hydroxyhexadecanoic and 11*S*-hydroxyhexadecanoic acids, respectively (Lira-Ricárdez et al. 2019).

Currently, there is a wide variety of products containing the Brazilian jalap (Figs. S3 and S5). In municipal and open-air markets, as well as in herbal stores located in the north and northeastern of the Brazilian territory, these phytopharmaceuticals are sold by herbalists and consist of crude drugs (sliced or pulverized roots), tinctures, herbal syrups (“aguardente alemã”), flours, and pills. Tinctures, herbal syrups, and powders are easily acquired through the internet. The jalap tincture Sobral, a registered product by the Brazilian Health Regulatory Agency in the category of traditional phytotherapeutic product, is used to treat constipation (Fig. S16). Pre-clinical studies confirmed its laxative action in mice (Michelin and Salgado 2004; Gonçalves et al. 2007) and the lack of toxicity in patients (Cunha et al. 2011; Santos et al. 2012).

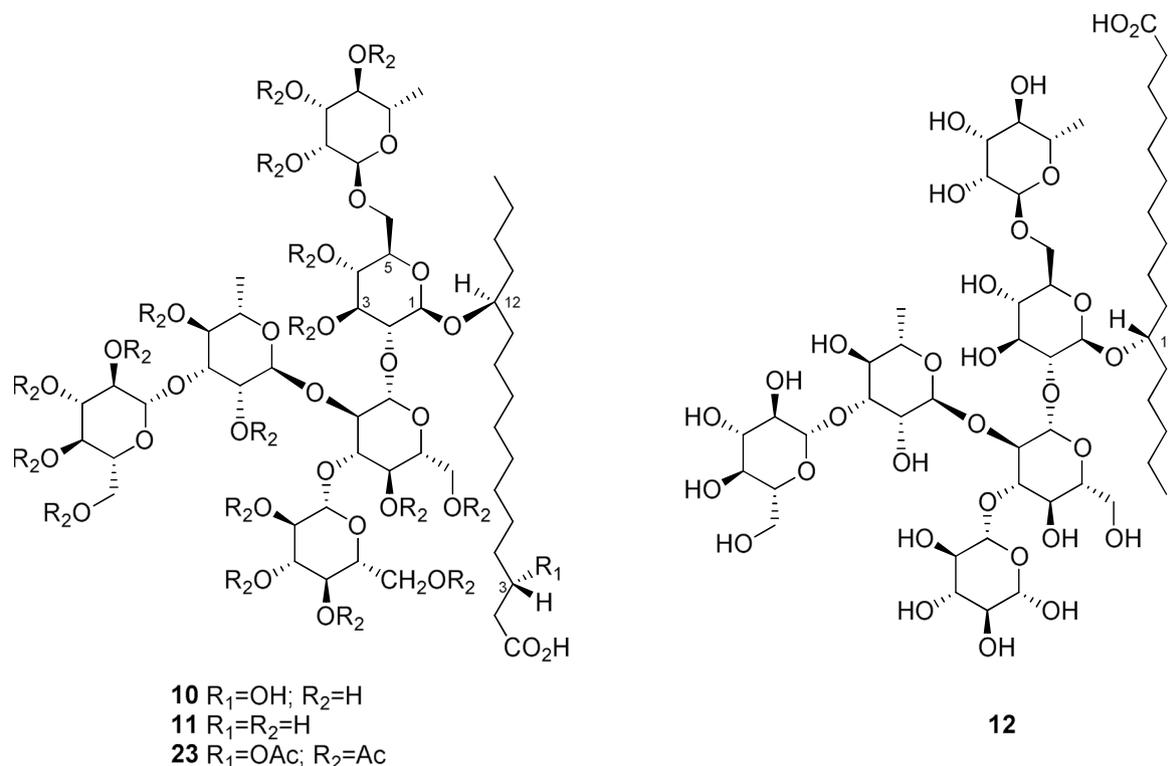


- 7**  $n=2$ ;  $R=H$   
**8**  $n=3$ ;  $R=H$   
**9**  $n=4$ ;  $R=H$   
**18**  $n=4$ ;  $R=Ac$

In continuation of our chemical studies on the Brazilian jalaps (Lira-Ricárdez et al. 2019), operculinic acids L–N (**13–15**) were isolated as peracetylated glycosidic acids (**19–21**). Compound **19** is a tetrasaccharide with the same oligosaccharide core of operculinic acid C (**3**) with

12*S*-hydroxyheptadecanoic acid as the aglycone. Compounds **20** and **21** contain the glycoside core of operculinic acid A (**1**) with a 12-hydroxy C<sub>17</sub> or C<sub>18</sub> fatty acids as aglycones, respectively. These derivatives, in addition to compounds **16–18**, were used as diagnostic peaks for

HPLC-ESIMS fingerprinting (Ciesla 2012) of some phytopharmaceutical products based on the Brazilian Jalap with yellow flowers, *O. hamiltonii*.



## Materials and Methods

### General Experimental Procedures

NMR spectra were recorded in C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N solution on NMRS instruments at 400–700 MHz, using tetramethylsilane as an internal standard. Recycling preparative HPLC analyses were carried out on Waters equipment (Milford, USA). HRMS were carried out by using a quadrupole time-of-flight mass spectrometer (MS Q-TOF G6530, Agilent Technologies) equipped with an electrospray ionization ion. GC-MS was performed on a Hewlett-Packard 5890-II instrument coupled to a JEOL SX-102A spectrometer.

### Plant Material and Phytopharmaceuticals

All samples were collected or purchased in September of 2015. Figures S4 and S5 summarize the authentic botanical reference material (BRM) and the analyzed commercial

products with a brief description of each one. These samples were classified into six different types: (1) authentic plant material for *Operculina hamiltonii* (G. Don) D.F. Austin & Staples, Convolvulaceae, was collected at the Quilombo Varre-Vento, Oriximiná, Pará, Brazil (Sample 1 BRM-OH 1; Figs. S2 and S6). The identification was done by Prof. R. Pereda-Miranda by comparison with accession numbers MEXU:1238977 and 977986 on deposit at the National Herbarium, UNAM. A voucher was deposited under the registration MEXU: RPM-BRM-OH1-15092015. The plant collection was authorized by the Brazilian Directing Council of Genetic Heritage (CGEN) by Resolution CGEN no. 213 (6.12.2007), renewed in Resolution CGEN no. 87/2012 and by the authorization AEAC3E9 in 2018. Sample BRM-OH 2, root acquired from local farmers at Óbidos, Pará who commercialized dried sliced or pulverized roots in local markets (Fig. S7); and Sample BRM-H3, the material collected in the town of Floriano, Piauí, Brazil in the agronomic fields of the Sobral Pharmaceutical Industry (Fig. S8, Supporting Information). BRM-OM 1, crude resin glycosides extracted

from *O. macrocarpa* sample on deposit at the Pharmacognosy Drug Collection, Departamento de Produtos Naturais e Alimentos Dispensary, Faculdade de Farmacia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (Fig. S9). For the phytopharmaceutical products (Fig. S5): (2) sliced and dried roots were purchased in the Municipal Market “Feira Livre Municipal” in Oriximiná, Pará (Fig. S10) and in a local Pharmacy, Santarém, Pará (Fig. S11); (3) pulverized roots of jalap (Figs. S12 and S13) and jalap flour (“tapioca”) or “pó-de-batatao” (Figs. S14 and S15), acquired in the Municipal Market 2000 in Santarém, Pará; (4) hydroalcoholic formulations or jalap tinctures: Sobral® Jalap Tincture (Fig. S16) and Jalapa D1 (Fig. S17); (5) herbal syrups, formulations made with jalap root and other active ingredients: Batatão Hypólito (Fig. S18), Tiro Seguro (Fig. S19), and Santa Fé, Aguardente Alemã (Fig. S20); (6) pílulas de jalapião Maciel (Fig. S21). For the isolation of the glycosidic acids, a commercial sample of pulverized jalap root was purchased in the Municipal Market 2000 in Santarém, Pará, Brazil, in September 2015 (Fig. S13). The plant material (868.5 g) was extracted by macerations with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOH (1:1). The resulting solution was concentrated to afford dark brown syrups (42 g).

### Alkaline Hydrolysis of the Resin Glycoside Mixture

A solution of the CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-EtOH-soluble extract (7 g) in 5% KOH-H<sub>2</sub>O (200 ml) was refluxed at 95 °C for 3 h. The reaction mixture was acidified to pH 5 with HCl 4 N and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (3 × 250 ml). The residue from the organic phase was directly analyzed by GC-MS and afforded eight peaks: isobutyric acid (*t*<sub>R</sub> 1.12 min): *m/z* [M]<sup>+</sup> 88 (20), 73 (28), 70 (55), 61 (100); 2-methylbutyric acid (*t*<sub>R</sub> 2.0 min): *m/z* [M]<sup>+</sup> 102 (8), 87 (2), 74 (12), 57 (100); *n*-hexanoic acid (*t*<sub>R</sub> 6.5 min): *m/z* [M]<sup>+</sup> 116 (2), 99 (3), 87 (21), 73 (63), 60 (100), 41 (16), 39 (7); *n*-octanoic acid (*t*<sub>R</sub> 7.0 min): *m/z* [M]<sup>+</sup> 144 (2), 115 (8), 101 (18), 73 (75), 60 (100), 55 (28); *n*-decanoic acid (*t*<sub>R</sub> 7.5 min): *m/z* [M]<sup>+</sup> 172 (2), 155 (3), 143 (12), 129 (62), 115 (15), 112 (12), 87 (20), 73 (100), 60 (90), 57 (40), 55 (45), 43 (30), 41 (35), 39 (6); cinnamic acid (*t*<sub>R</sub> 7.7 min): *m/z* [M]<sup>+</sup> 148 (84), 147 (100), 131 (22), 103 (42), 102 (21), 77 (28), 74 (5), 51 (12), 50 (5); *n*-dodecanoic acid (*t*<sub>R</sub> 8.0 min): [M]<sup>+</sup> 200 (9), 183 (2), 171 (15), 157 (38), 143 (9), 129 (45), 115 (22), 101 (15), 85 (30), 73 (100), 60 (68), 57 (30), 55 (30); and *n*-hexadecanoic acid (*t*<sub>R</sub> 9.1 min): *m/z* [M]<sup>+</sup> 256 (0.03), 239 (0.04), 213 (0.4), 200 (15), 183 (2), 171 (18), 157 (40), 143 (10), 129 (48), 115 (20), 101 (15), 85 (33), 73 (100), 60 (80), 57 (30), 55 (47), 43 (44), 41 (30). The aqueous layer was extracted with *n*-BuOH (3 × 50 ml) and concentrated to give a pale yellowish solid (1.47 g), which was divided into two portions. The first one (25 mg) was used for an acidic hydrolysis to accomplish sugar analysis and identification of aglycones.

The remaining material was acetylated (Ac<sub>2</sub>O-C<sub>5</sub>H<sub>2</sub>N, 2:1) to give a waxy yellowish-brown residue (1.50 g).

### Acid Hydrolysis and Sugar Analysis

A sample of the total saponified resin glycoside (25 mg) in 4 N HCl (10 ml) was heated at 90 °C for 2 h. The reaction mixture was diluted with H<sub>2</sub>O (10 ml) and extracted with CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (2 × 40 ml). The aqueous phase was neutralized with 1 N KOH and extracted with *n*-BuOH (5 ml), then washed with H<sub>2</sub>O (2 × 5 ml) and concentrated. The sugar residues (4.8 mg each) were reacted with L-cysteine hydrochloride (0.5 mg) in pyridine (150 μl) at 60 °C for 1 h. Then, the thiazolidine products were converted into volatile derivatives by treatment with chlorotrimethylsilane (0.5 ml, Sigma Sil-A). The reaction mixtures were independently dried, dissolved in CHCl<sub>3</sub> (100 μl), filtered, and then analyzed (injection volume: 1 μl) by CG: HPMS-5 (20 m × 0.18 mm, film thickness 0.18 μm); injector temperature: 300 °C; oven temperature: 100 °C isothermal for 3 min, linear gradient to 300 °C at 20 °C/min; carrier gas, He (1 ml/min). Retention times for TMS derivatives of common sugars were used for identification by coelution experiments: D-xylose, *t*<sub>R</sub> 10.74 min; L-rhamnose (Rha), *t*<sub>R</sub> 11.10 min; D-quinovose (Qui), *t*<sub>R</sub> 11.45; D-fucose (Fuc), *t*<sub>R</sub> 11.60 min; D-glucose (Glc), *t*<sub>R</sub> 11.73 min; L-glucose, *t*<sub>R</sub> 14.85 min. This analysis led to the identification of Rha, Fuc, and Glc (9:3:2).

### Identification of Aglycones

The organic layer residues obtained from the acidic hydrolysis of the saponified resin glycoside were evaporated to dryness, dissolved in CHCl<sub>3</sub> (5 ml), and treated with CH<sub>2</sub>N<sub>2</sub> to give a residue (15.3 mg) that was separated by recycling HPLC using a previously reported methodology (Pereda-Miranda et al. 2006). This mixture (14 mg) was submitted to normal-phase HPLC (ISCO, 21.2 × 250 mm, 10 μm), using an isocratic elution of *n*-hexane-CHCl<sub>3</sub>-Me<sub>2</sub>CO (6:3:1) and a flow rate of 6 ml/min to give three major aglycones: methyl (11*S*)-hydroxyhexadecanoate (*t*<sub>R</sub> 16.8 min; 8.7 mg), methyl (12*S*)-hydroxyheptadecanoate (*t*<sub>R</sub> 15.4 min; 2.5 mg) and methyl (12*S*)-hydroxyoctadecanoate (*t*<sub>R</sub> 14.1 min; 1.4 mg).

(11*S*)-Hydroxyhexadecanoic acid methyl ester: mp 42–43 °C; [α]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 7.0 (*c* 0.1, CHCl<sub>3</sub>); <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) δ 3.67 (3H, s, OCH<sub>3</sub>), 3.59 (1H, m, H-11), 2.30 (2H, t, *J* = 7.6 Hz, H-2), 1.62 (2H, m, H-3), 1.49–1.37 (8H, m), 1.28 (10H, m), 0.89 (3H, t, *J* = 6.9 Hz, H-16); <sup>13</sup>C NMR δ 174.4 (C-1), 72.0 (C-11), 51.4 (OCH<sub>3</sub>), 37.5 (C-10), 37.4 (C-12), 34.1 (C-2), 31.9 (C-14), 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (C-4 to C-8), 25.6 (C-9), 25.3 (C-13), 24.9 (C-3), 22.6 (C-15), 14.1 (C-16). LRESI-MS (positive mode) *m/z*: 309 [M + Na]<sup>+</sup>, 287 [M + H]<sup>+</sup>, 269 [M + H - H<sub>2</sub>O]<sup>+</sup>. This aglycon (1 mg) was derivatized by treatment with Sigma Sil-A

**Table 1**  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR data of compounds **19–21** in  $\text{C}_3\text{D}_5\text{N}$ 

Position	19 <sup>a</sup>		20 <sup>a</sup>		21 <sup>b</sup>	
	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$ (J in Hz)	$\delta_{\text{C}}$
Fuc-1	4.99 d (8.0)	100.2	4.99 d (7.7)	100.6	4.99 d (7.5)	100.7
2	4.38 dd (9.6, 8.0)	73.2	4.34 dd (9.6, 7.7)	74.4	4.34 (9.6, 7.5)	74.6
3	5.53 dd (9.6, 3.2)	75.2	5.52*	75.0	5.52*	75.0
4	5.60*	71.5	5.57*	71.3	5.59*	71.4
5	4.08 q (6.4)	69.3	4.07 qd (6.4, 0.8)	69.4	4.05 q (6.4)	69.5
6	1.26 d (6.4)	16.5	1.26 d (6.4)	16.5	1.27 d (6.4)	16.7
Rha-1	5.56 brs	97.8	5.51 brs	98.4	5.51 brs	98.6
2	5.61*	71.6	5.62*	71.2	5.62*	71.3
3	5.75*	72.2	5.77 dd (9.6, 3.0)	71.6	5.76 dd (9.6, 3.0)	71.7
4	4.29*	80.6	4.18 dd (9.6, 9.6)	81.9	4.19 dd (10.0, 9.6)	81.9
5	4.98 dd (10.0, 6.1)	67.8	4.85 dq (9.6, 6.1)	68.0	4.85 dq (9.6, 6.1)	68.1
6	1.74 d (6.1)	18.5	1.70 d (6.1)	18.6	1.71 d (6.0)	18.4
Rha'-1	5.46 brs	100.6	5.35 brs	100.7	5.35 brs	100.8
2	5.61*	70.7	5.53*	72.8	5.53*	72.9
3	5.74*	71.6	4.56 dd (8.4, 3.6)	77.7	4.57 dd (8.0, 3.5)	77.7
4	4.28 dd (9.0, 9.0)	79.6	4.30–4.23*	77.8	4.30*	77.9
5	4.39*	68.7	4.30–4.23*	68.0	4.30*	68.1
6	1.64 d (6.1)	18.4	1.60 d (5.6)	18.9	1.60 d (5.5)	18.7
Rha''-1	5.48 brs	100.3	5.70 brs	98.5	5.70 brs	98.5
2	5.72 dd (3.2, 1.2)	71.1	5.77 dd (3.2, 1.2)	70.6	5.79 dd (3.5, 1.5)	70.8
3	5.62*	69.5	5.67 dd (10.3, 3.5)	69.7	5.67 dd (10.5, 3.5)	69.8
4	5.60*	72.1	5.57*	71.7	5.58*	71.8
5	4.29*	68.1	4.30*	68.4	4.30*	68.5
6	1.37 d (6.2)	17.7	1.35 d (6.4)	17.7	1.35 d (6.5)	17.5
Glc-1			5.21 d (7.9)	100.6	5.21 d (7.9)	100.7
2			5.36 dd (9.2, 8.0)	72.7	5.37 dd (9.5, 9.5)	72.8
3			5.73 dd (9.2, 9.2)	73.2	5.73 dd (9.5, 9.5)	73.4
4			5.54*	68.9	5.53*	69.0
5			4.09*	73.0	4.10*	73.1
6 <sup>a</sup>			4.52 dd (12.4, 2.0)	61.9	4.52 (12.5, 2.5)	62.0
6 <sup>b</sup>			4.80 dd (12.4, 3.6)		4.80 (12.5, 3.5)	

<sup>a</sup>Data measured at 400 MHz. <sup>b</sup>Data measured at 700 MHz. \*Overlapped signal

for 5 min at 70 °C and analyzed by GC–MS analysis to afford a peak with  $t_{\text{R}}$  14.3 min; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (rel. int): 358 (0.3)  $[\text{M}]^+$ , 343 (0.5)  $[\text{M} - 15]^+$ , 311 (10.5), 287 (45,  $[\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_3\text{TMS}]^+$ ), 173 (100,  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{OTMS}]^+$ ), 75 (38.2), 73 (46.3). The identification of this derivate was accomplished by comparison with an authentic sample (Pereda-Miranda et al. 2006).

(12S)-Hydroxyheptadecanoic acid methyl ester: Colorless oil,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 1.9$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.67 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.59 (1H, m, H-12), 2.30 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 1.62 (2H, m, H-3), 1.23–1.50 (20H, m), 0.93 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-17);  $^{13}\text{C}$  NMR  $\delta$  (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  174.4 (C-1), 72.0 (C-12), 51.4 ( $\text{OCH}_3$ ), 37.4 (C-11 and C13), 34.1 (C-2), 31.9 (C-15), 29.6, 29.5, 29.4, 29.2, 29.1 (C-4 to C-9), 25.6 (C-10), 25.3 (C-14), 24.9 (C-3), 22.6 (C-16), 14.0 (C-17); LRESI-MS (positive mode)  $m/z$ : 323

$[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 301  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 283  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ . This aglycon (1 mg) was treated with Sigma Sil-A and analyzed by GC–MS analysis to yield an eluate with  $t_{\text{R}}$  15.0 min; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (rel. int): 372 (0.4)  $[\text{M}]^+$ , 357 (5.3)  $[\text{M} - 15]^+$ , 301 (46.2,  $[\text{C}_{13}\text{H}_{24}\text{O}_3\text{TMS}]^+$ ), 173 (100,  $[\text{C}_6\text{H}_{12}\text{OTMS}]^+$ ), 75 (36.0), 73 (49.5). The  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR spectroscopic data were identical with those previously described (Ding et al. 2012).

(12S)-Hydroxyoctadecanoic acid methyl ester: Colorless oil,  $[\alpha]_{\text{D}}^{20} + 5.5$  (c 0.1,  $\text{CHCl}_3$ );  $^1\text{H}$  NMR (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ )  $\delta$  3.67 (3H, s,  $\text{OCH}_3$ ), 3.59 (1H, m, H-12), 2.30 (2H, t,  $J = 7.6$  Hz, H-2), 1.61 (2H, m), 1.43 (6H, m, H-3), 1.28 (18H, m), 0.90 (3H, t,  $J = 6.9$  Hz, H-18); LRESI-MS (positive mode)  $m/z$ : 337  $[\text{M} + \text{Na}]^+$ , 315  $[\text{M} + \text{H}]^+$ , 297  $[\text{M} + \text{H} - \text{H}_2\text{O}]^+$ . This aglycon (1 mg) was treated with Sigma Sil-A and analyzed by GC–MS analysis to yield an eluate with  $t_{\text{R}}$

15.7 min; EI-MS (70 eV)  $m/z$  (rel. int): 386 (1.0)  $[M]^+$ , 371 (5.3)  $[M - 15]^+$ , 301 (45,  $[C_{13}H_{24}O_3TMS]^+$ ) and 187 (100,  $[C_7H_{14}OTMS]^+$ ), 75 (33.2), 73 (39.9).

### HPLC Separation of Peracetylated Glycosidic Acids

A preliminary clean-up of the peracetylated glycosidic acids (1.5 g) was performed by Si gel CC with mixtures of increasing polarity of  $CH_2Cl_2$ -MeOH to give three eluates ( $CH_2Cl_2$ -MeOH, 9:1) containing the sample (1.32 g). Preparative HPLC on a Waters Symmetry Prep C<sub>18</sub> column (19 × 300 mm; 7 μm) was used to achieve its resolution. The elution was isocratic with  $CH_3CN - H_2O$  (9:1), using a flow rate of 8 ml/min and a sample injection of 500 μl (20–50 mg/500 μl MeOH). Each eluate across six observed resolved peaks was collected by the heart cutting technique, independently reinjected, and further recycled (10 to 20 cycles) to afford pure peracetylated operculinic acid A (**16**, 734.1 mg,  $t_R = 15.5$  min) (Chérigo and Pereda-Miranda 2006); peracetylated operculinic acid B (**17**, 126.2 mg,  $t_R = 13.0$  min) (Castañeda-Gómez and Pereda-Miranda 2011), peracetylated turpethic C (**18**, 38.0 mg,  $t_R = 20.5$  min) (Ding et al. 2012), peracetylated operculinic acid L (**19**, 89.6 mg,  $t_R = 26.2$  min); peracetylated operculinic acid M (**20**, 32.0 mg,  $t_R = 31.5$  min;) and, finally, peracetylated operculinic acid N (**21**, 33.4 mg,  $t_R = 25.0$  min).

*Peracetylated operculinic acid L (19)*: White solid; mp 92–94 °C; ORD ( $c$  0.2, MeOH)  $[\alpha]_{589}^{22} -28.3$ ,  $[\alpha]_{578} -29.2$ ,  $[\alpha]_{546} -33.3$ ,  $[\alpha]_{436} -52.5$ ,  $[\alpha]_{365} -79.2$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Tables 1 and 2 (Fig. S42 and S43); HRESIMS (positive mode):  $m/z$  1271.56649  $[M+Na]^+$  (calc. C<sub>59</sub>H<sub>92</sub>O<sub>28</sub>+Na<sup>+</sup> for 1271.56673).

*Peracetylated operculinic acid M (20)*: White solid; mp 104–105 °C; ORD ( $c$  0.1, MeOH)  $[\alpha]_{589}^{22} -32.0$ ,  $[\alpha]_{578} -33.0$ ,  $[\alpha]_{546} -37.0$ ,  $[\alpha]_{436} -60.0$ ,  $[\alpha]_{365} -91.0$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Tables 1 and 2 (Fig. S53 and S54); HRESIMS (positive mode):  $m/z$  1559.64502  $[M+Na]^+$  (calc. C<sub>71</sub>H<sub>108</sub>O<sub>36</sub>Na for 1559.65125).

*Peracetylated operculinic acid N (21)*: White solid; mp 94–95 °C; ORD ( $c$  0.1, MeOH)  $[\alpha]_{589}^{22} -42.0$ ,  $[\alpha]_{578} -43.0$ ,  $[\alpha]_{546} -50.0$ ,  $[\alpha]_{436} -80.0$ ,  $[\alpha]_{365} -91.3$ ; <sup>1</sup>H NMR (400 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) and <sup>13</sup>C NMR (100 MHz, C<sub>5</sub>D<sub>5</sub>N) data, see Tables 1 and 2 (Fig. S67 and S68); HRESIMS (positive mode):  $m/z$  1573.66748  $[M+Na]^+$  (calc. C<sub>72</sub>H<sub>110</sub>O<sub>36</sub>+Na<sup>+</sup> for 1573.66690).

### Qualitative HPLC-ESIMS Profiling

For sample derivatization, all collected crude drugs and commercial powders were individually subjected to a maceration

process with  $CH_2Cl_2$ -EtOH (1:1). Each solution was filtered and concentrated to dryness at a temperature below 40 °C and under reduced pressure. Liquid samples and pills (previously powdered) were used directly in the derivatization processes. For the hydroalcoholic extracts and herbal syrups, 1.5 g of KOH was added to 30 ml of each sample. For solid samples (3.5 g), 10–30 ml of a solution 5% KOH was added. This mixture of reaction was maintained in reflux at 96 °C for 4 h. Subsequently, the pH was acidified to pH 5 and extracted with  $CH_2Cl_2$ . The inorganic layer was extracted with *n*-BuOH, concentrated, and acetylated with pyridine/acetic anhydride (2:1) for 48 h under constant agitation. Subsequently, an equivalent volume of ice water was added and extracted with EtOAc and the organic phase was washed with a solution of HCl 1 M; then, it was neutralized with a saturated solution of NaHCO<sub>3</sub>, washed with H<sub>2</sub>O and dried over anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and concentrated to dryness.

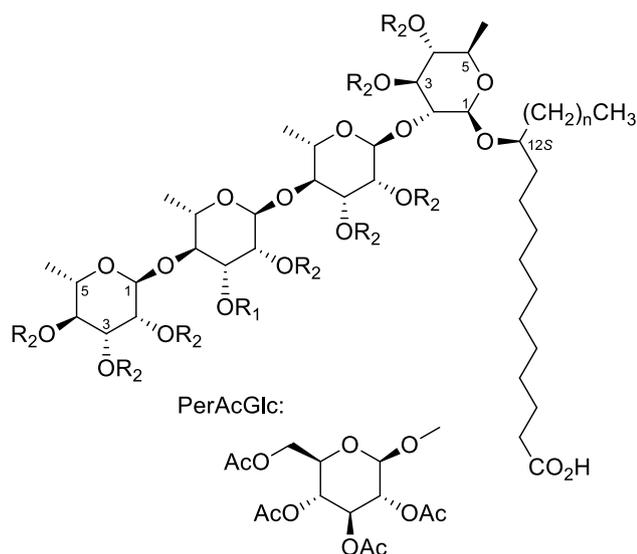
For the HPLC-ESIMS analysis, each sample (10 mg) were dissolved in 1 ml of MeOH. All the solutions were vortexed for a few seconds and centrifuged for 10 min. Each solution (250 μl) was diluted with 100 μl of MeOH-H<sub>2</sub>O (9:1, v/v) acidified with 0.1% formic acid. The analysis was made in triplicate for each sample (injection volume 150 μl) and performed using an Agilent C-8 (3.0 × 150 mm × 3.5 μm) column with the mobile phase consisting of 0.1% (v/v) aqueous formic acid (A) and acetonitrile (B) with a flow rate of 0.25 ml/min. The gradient elution was 60% B for 30 min, 60–80% B for 5 min, and 80–100% B for 2 min. After each injection, the column was washed with 100% B for 5 min and re-equilibrated for 5 min. The detection parameters in the positive-ionization mode were set as described above with a higher energy setting of 42 V on the capillary and 40 V on the skimmer to increase fragmentation of the parent ions  $[M+Na]^+$  (Castañeda-Gómez et al. 2017, 2019).

The presence of the glycosidic acids used as standard compounds was determined by comparing their retention times,  $m/z$  values for the cationized molecule  $[M+Na]^+$ , which were set as the target ions, and the fragmentation pattern (Arslan and Cenzano 2021) in the generated mass spectra as follows: peracetylated operculinic acid A (**16**,  $t_R$  16.9 min):  $m/z$  149, 265, 281, 1243, 1269, 1294, 1545.6  $[M+Na]^+$ , 1581.2  $[M+Na+H_2O]^+$ ; peracetylated operculinic acid B (**17**,  $t_R$  15.8 min):  $m/z$  149, 253, 277, 1316, 1351, 1393, 1503, 1603  $[M+Na]^+$ , 1639  $[M+Na+H_2O]^+$ ; peracetylated turpethic acid C (**18**,  $t_R$  17.6 min):  $m/z$  149, 255, 1329, 1533, 1559, 1617  $[M+Na]^+$ ; peracetylated operculinic acid M (**20**,  $t_R$  18.1 min):  $m/z$  149, 281, 1271, 1517, 1545, 1559  $[M+Na]^+$ ; peracetylated operculinic acid N (**21**,  $t_R$  19.2 min):  $m/z$  123, 425, 485, 1271, 1285, 1371, 1485, 1559, 1573  $[M+Na]^+$ . The BRM-OM1 sample (Fig. S9) was used as a reference for the peracetylated derivative of operculinic acid H (**23**,  $t_R$  14.3 min):  $m/z$  149, 301, 331, 561, 1011, 1137, 1655, 2007  $[M+Na]^+$ .

## Results and Discussion

### Isolation and Structure Elucidation

The EtOH extract from the pulverized commercial jalap roots (Fig. S13) was subjected to a saponification procedure. GC–MS analysis of the lipophilic fraction allowed the identification of isobutyric, 2-methylbutyric, cinnamic, *n*-hexanoic, *n*-octanoic, *n*-decanoic, *n*-dodecanoic and *n*-hexadecanoic acids. Exogonic acid, a chemical marker for the resin of *O. macrocarpa* (Lawson et al. 1992; Lira-Ricárdez et al. 2019), was not detected. Acid hydrolysis of the saponification product provided three monosaccharides, identified as L-rhamnose, D-fucose and D-glucose. Acidic hydrolysis of the saponified resin glycosides gave, after methylation, the aglycones which were separated by HPLC. Three major fatty acid methyl esters were purified and identified by NMR and MS, which were further derivatized as trimethylsilyl ethers. GC–MS analyses allowed their identification as methyl (11)-hydroxyhexadecanoate, methyl (12)-hydroxyheptadecanoate, and methyl (12)-hydroxyoctadecanoate. The aqueous layer obtained from the saponification of the resin glycosides was partitioned with *n*-BuOH, further acetylated, and separated by preparative HPLC (Fig. S22). Along with known compounds **16**–**18**, three new components were isolated and identified (**19**–**21**).



- 13**  $n=4$ ;  $R_1=R_2=H$   
**14**  $n=4$ ;  $R_1=Glc$ ;  $R_2=H$   
**15**  $n=5$ ;  $R_1=Glc$ ;  $R_2=H$   
**19**  $n=4$ ;  $R_1=R_2=Ac$   
**20**  $n=4$ ;  $R_1=PerAcGlc$ ;  $R_2=Ac$   
**21**  $n=5$ ;  $R_1=PerAcGlc$ ;  $R_2=Ac$

Compound **19** gave a HRESIMS  $[M+Na]^+$  ion at  $m/z$  1271.56649 (calcd. for  $C_{59}H_{92}O_{28}Na$  requires 1271.56673) with a difference of 14 mass units from peracetylated derivative **22**. Analysis of NMR spectra, including  $^1H$ ,  $^{13}C$ , COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC data, allowed the identification of a tetrasaccharide core. In the TOCSY experiment (Fig. S45), key correlations were observed for the  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-(1  $\rightarrow$  2)- $O$ - $\beta$ -D-fucopyranoside unit: Fuc-1/Fuc-2 ( $\delta$  4.99/4.38), Fuc-1/Fuc-3 ( $\delta$  4.99/5.53), Fuc-1/Fuc-4 ( $\delta$  4.99/5.60), Fuc-6/Fuc-5 ( $\delta$  1.26/4.08), Rha-6/Rha-3 ( $\delta$  1.74/5.75), Rha-6/Rha-4 ( $\delta$  1.74/4.29), Rha-6/Rha-5 ( $\delta$  1.74/4.98), Rha-5/Rha-3 ( $\delta$  4.98/5.75), Rha-5/Rha-4 ( $\delta$  4.98/4.29), and Rha-1/Rha-2 ( $\delta$  5.56/5.61). Identification of  $^1H$  NMR signals for the terminal L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)- $O$ - $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl disaccharide moiety (Fig. S46) was also achieved through Rha'-6/Rha'-2 ( $\delta$  1.64/5.61), Rha'-6/Rha'-4 ( $\delta$  1.64/4.28), Rha'-6/Rha'-5 ( $\delta$  1.64/4.39), Rha''-1/Rha''-2 ( $\delta$  5.48/5.72), and Rha''-6/Rha''-5 ( $\delta$  1.37/4.29). Key connectivities for the inter-glycosidic linkages were observed in the HMBC experiment (Fig. S51):  $\delta_H$  4.99 (H-1, Fuc) with  $\delta_C$  78.8 (C-12, Ag),  $\delta_H$  5.56 (H-1, Rha) with  $\delta_C$  73.2 (C-2, Fuc),  $\delta_H$  5.46 (H-1, Rha') with  $\delta_C$  80.6 (C-4, Rha), and  $\delta_H$  5.48 (H-1, Rha'') with  $\delta_C$  79.6 (C-4, Rha'). Comparison of the  $^{13}C$  NMR spectra for the tetrasaccharide **19** with operculinic acid A (**20**) indicated major differences imposed by the ramification with the glucose unit in compound **20**. The difference for the aglycone with

**Table 2**  $^{13}C$  NMR data for the aglycones of compounds **18**–**21** in  $C_5D_5N$

Position	18 <sup>a</sup>	19 <sup>a</sup>	20 <sup>a</sup>	21 <sup>b</sup>
1	174.4	174.4	174.3	175.0
2	34.4	34.4	34.4	34.6
3	25.3	25.3	25.5	25.5
4	29.7	29.7	29.8	29.9
5	29.7	29.7	29.8	30.1
6	29.9	29.9	30.0	30.3
7	30.1	30.1	30.1	30.3
8	30.3	30.3	30.2	30.4
9	30.5	30.5	30.3	30.4
10	26.0	26.0	26.0	26.1
11	34.5	34.5	34.4	34.8
12	79.6	78.8	78.6	78.7
13	35.6	35.6	35.7	35.7
14	25.5	25.5	25.6	25.7
15	32.5	32.5	32.6	29.8
16	23.2	23.2	23.3	32.7
17	14.5	14.5	14.6	23.3
18				14.7

<sup>a</sup>Data measured at 100 MHz. <sup>b</sup>Data measured at 175 MHz

a C<sub>17</sub> fatty acid instead of a C<sub>16</sub> was evident in **19** (Fig. S50; Table 2) and showed its similitude with the aglycone of model compound **18** (Fig. S40).

The positive specific rotation value for the methylated aglycone, (12)-hydroxyhexadecanoic acid methyl ester [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>20</sup> + 1.9, confirmed its (*S*)-absolute configuration (Ding et al. 2012; Lira-Ricárdez et al. 2019). This optical activity correlation was previously confirmed by Mosher esters for the dextrorotatory 11-(*S*) and 12-(*S*) hydroxylated fatty acids (Chérigo and Pereda-Miranda 2006; Ono 2017). Therefore, **19** corresponded to the peracetylated (12*S*)-hydroxyheptadecanoic acid 12-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-(1  $\rightarrow$  2)-*O*- $\beta$ -D-fucopyranoside.

Peracetylated **20** gave a HRESIMS [M + Na]<sup>+</sup> ion at *m/z* 1559.64502 (calcd. for C<sub>71</sub>H<sub>108</sub>O<sub>36</sub>Na requires 1559.65125), corresponding to 14 mass units above peracetylated operculinic acid A (**16**). Compound **21** provided a [M + Na]<sup>+</sup> ion at *m/z* 1573.66748 (calcd. for C<sub>72</sub>H<sub>110</sub>O<sub>36</sub>Na requires 1573.66690), with a difference of 28 mass units from **16**. Comparison of the <sup>13</sup>C NMR signals for the oligosaccharide portion (Table 1) of the three isolates (**16**, **20**, and **21**) indicated the same oligosaccharide core (Fig. S55). Differences in the <sup>13</sup>C NMR spectra were also assigned to their fatty acid moieties (Fig. S56; Table 2). Compound **20** presented a C<sub>17</sub> fatty acid (12-heptadecanoic acid), identical to **19**, while compound **21** a C<sub>18</sub> fatty acid (12-octadecanoic acid). Analysis of COSY, TOCSY, HSQC, and HMBC spectra for derivatives **16**, **20**, and **21** indicated that they had the same oligosaccharide portion (Table 1). For example, in the TOCSY experiment for compound **20** (Fig. S61), the  $\alpha$ -L-rhamnopyranoside-(1  $\rightarrow$  2)-*O*- $\beta$ -D-fucopyranoside was identified through the following contour-plots: for H-2 of fucose (Fuc-2), Fuc-2/Fuc-4 ( $\delta$  4.34/5.57), Fuc-2/Fuc-3 ( $\delta$  4.34/5.52), and Fuc-2/Fuc-1 ( $\delta$  4.34/4.99); for H-4 of rhamnose (Rha-4), Rha-4/Rha-3 ( $\delta$  4.18/5.77), Rha-4/Rha-2 ( $\delta$  4.18/5.62), and Rha-4/Rha-5 ( $\delta$  4.18/4.85); for the L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl disaccharide moiety, the contour-plots for two signals were selected: for H-3 of Rha', Rha'-3/Rha'-4 and -5 ( $\delta$  4.56/4.28), and Rha''-3/Rha''-2 ( $\delta$  5.67/5.77); and finally, for H-6 of Rha'', Rha''-6/Rha''-2 ( $\delta$  1.35/5.77), Rha''-6/Rha''-3 ( $\delta$  1.35/5.67), Rha''-6/Rha''-4 ( $\delta$  1.35/5.57), and Rha''-6/Rha''-5 ( $\delta$  1.35/4.30). The ramification by glucose was identified by the following cross-peaks for Glc-1/Glc-3 ( $\delta$  5.21/5.73), Glc-1/Glc-4 ( $\delta$  5.21/5.54), Glc-1/Glc-2 ( $\delta$  5.21/5.36), and Glc-1/Glc-5 ( $\delta$  5.21/4.09). The connectivity between the aglycone (Ag) and the sugar chain, as well as the sequence of glycosylation among the monosaccharides in **20** (Fig. S65) and **21** (Fig. S73), were supported by their HMBC spectra, in which, also by

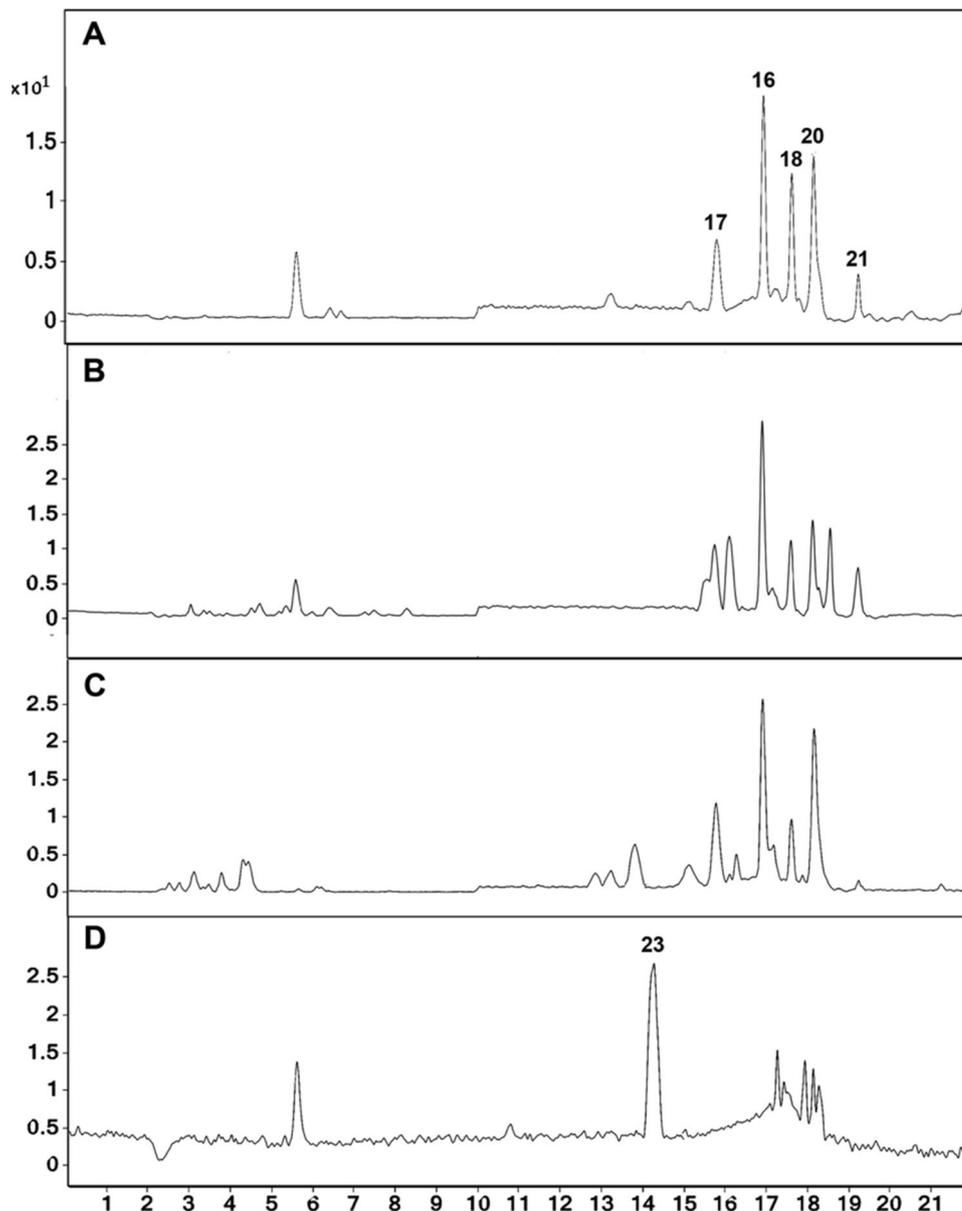
using derivative **16** as a model example for comparison (Fig. S32), the same long-range correlations (<sup>3</sup>J<sub>CH</sub>) were observed for both derivatives; for example, the following contour-plots were registered in compound **20**:  $\delta$ <sub>H</sub> 4.99 (Fuc-1) with  $\delta$ <sub>C</sub> 78.7 (C-12, Ag),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.34 (Fuc-2) with  $\delta$ <sub>C</sub> 98.4 (Rha-1),  $\delta$ <sub>H</sub> 5.51 (Rha-1) with  $\delta$ <sub>C</sub> 74.4 (Fuc-2),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.18 (Rha-4) with  $\delta$ <sub>C</sub> 100.7 (Rha'-1),  $\delta$ <sub>H</sub> 5.35 (Rha'-1) with  $\delta$ <sub>C</sub> 81.9 (Rha-4),  $\delta$ <sub>H</sub> 4.28 (Rha'-4) with  $\delta$ <sub>C</sub> 98.5 (Rha''-1), and  $\delta$ <sub>H</sub> 5.21 (Glc-1) with  $\delta$ <sub>C</sub> 77.7 (Rha'-3). Analysis of NOESY experiments provided evidence for the glycosidic linkage and anomeric configuration (Fig. S63).

The (*S*)-absolute configuration at C-12 was determined by the positive specific rotations for the free methyl ester aglycones of compounds **20** and **21** (Chérigo and Pereda-Miranda 2006; Lira-Ricárdez et al. 2019). Therefore, the structures for the isolated derivatives of operculinic acids L and M were established as peracetylated (12*S*)-hydroxyheptadecanoic acid 12-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-*O*- $\beta$ -D-fucopyranoside (**20**) and peracetylated (12*S*)-hydroxyoctadecanoic acid 12-*O*- $\beta$ -D-glucopyranosyl-(1  $\rightarrow$  3)-*O*-[ $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)]-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  4)-*O*- $\alpha$ -L-rhamnopyranosyl-(1  $\rightarrow$  2)-*O*- $\beta$ -D-fucopyranoside (**21**), respectively.

### Qualitative HPLC-ESIMS Profiling

All phytopharmaceuticals were analyzed by HPLC-ESIMS (Fig. 1). The chromatograms showed a close similarity to that obtained by preparative HPLC with refractive index detection (Fig. S22). The comparison allowed to identify peracetylated operculinic acids A (**16**; *t*<sub>R</sub> = 16.9 min) and B (**17**; *t*<sub>R</sub> = 15.8 min), in addition to turpethic acid C (**18**; *t*<sub>R</sub> = 17.6 min) and undescribed glycosidic acids **20** (*t*<sub>R</sub> = 18.1 min) and **21** (*t*<sub>R</sub> = 19.2 min), which could be considered as chemical markers since they represent the oligosaccharide cores for the therapeutic components (Fig. 1A). All samples derived from the raw plant material (Fig. 1B) and phytopharmaceuticals, as the jalap tincture (Fig. 1C), presented a greater complexity in terms of the glycosidic acid content (Fig. 1B). Authentic botanical material corresponding to *O. macrocarpa* (Fig. S9) presented a dissimilar chromatographic profile (14–16 min; Fig. 1D) to that obtained for the authentic plant material (Fig. S6) and other analyzed crude drugs, with a major peak for peracetylated operculinic acid H (**23**; *t*<sub>R</sub> = 14.3 min), not observed in any of the herbal products containing *O. hamiltonii*. This result reflects the difference in the chemical content between the two Brazilian jalaps. All phytopharmaceutical samples contain operculinic acid A (**2**) as the major glycosidic acid. The rest of the chemical markers were also easily identified in all samples, through retention

**Fig. 1** Chromatograms for the jalap root samples registered by HPLC–MS. **A** Sample 4: commercial pulverized crude drug. **B** Sample BRM-OH-1: authentic plant material for *Operculina hamiltonii* collected at Varre-Vento Quilombo, Oriximiná, Pará, Brazil. **C** Sample 7: jalap tincture Sobral. **D** Sample BRM-OM-1: *Operculina macrocarpa* resins



times and mass values by selected ion monitoring mode using target ions at  $[M + Na]^+$  and selected fragment ions.

## Conclusions

HPLC-ESIMS conditions were optimized for the qualitative determination of six chemical markers for “fingerprinting” of several herbal crude drugs and phytopharmaceuticals based on jalap root. This analytical method was fast and allowed to generate chromatographic profiles for dereplication of the major glycosidic acid derivatives **16–21**. Exogonic acid and operculinic acid H, chemical markers for *O. macrocarpa*, were not detected in any of the analyzed samples. Therefore,

all phytopharmaceuticals acquired in different commercial premises of northern Brazil were only manufactured with the Brazilian jalap of yellow flowers, *O. hamiltonii*. For that reason, it seems that the traditional use of *O. macrocarpa* appears to be discontinued. The combination of HPLC through the generation of chromatographic profiles and detection of chemical markers by coupling with ESIMS adds a value to the conventional pharmacobotanical methods used in quality control of medicinal herbs to produce commercial medicines.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00190-1>.

**Acknowledgements** Mr. R. Agripino (Financial Administrative Director, Laboratório Industrial Farmacêutico Sobral, Floriano, Piauí, Brazil) kindly supplied samples of the jalap root. Prof. Dr. L.C. Baratto (UFRJ) provided raw material from Óbidos, Pará, Brazil. We are indebted to the technical personnel of Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria, Facultad de Química (UNAM), especially to N. López Balthaux, R.I. del Villar Morales, and M. Guzmán Villanueva for the recording of NMR and ESIMS spectra. We also thank CNRMN Jiri Jonas (UFRJ) for access to its 600- and 700-MHz NMR spectrometers. Thanks are due to Prof. Dr. Danilo R. Oliveira (UFRJ) for his guidance during the field trip to the “quilombola” community. The authors are grateful to the matriarch of the Varre-Vento Quilombo (Mrs. Ana Maria Santos Souza) for providing shelter and help during the plant material collection in the forest surrounding her community on the banks of the Trombetas River, Oriximiná, Pará, Brazil. R.P.-M. was a Visiting Research Scientist at UFRJ with partial financial support from DGAPA (UNAM).

**Authors' Contributions** Based on the Ph.D. and M.Sc. theses of MEMA and NRJB, respectively. MEMA: HPLC-ESIMS profiling and writing of the first draft; MEMA, NRJB, JCG, and AMV: chemical analysis; JLR: preparation of resin glycosides from the Brazilian jalap with white flowers. MFS: HPLC technical supervision. SGL and RPM: recording of NMR (600 and 700 MHz), collection of plant material, and acquisition of phytopharmaceuticals. SGL was responsible for obtaining the authorization for plant collection, bioprospecting, and accessing traditional knowledge from the Brazilian Directing Council of Genetic Heritage (CGEN). RPM: conceptualization of the project and identification of plant material. JCG and RPM: structural elucidation and critical revision of the manuscript. All authors have read the final manuscript and approved its submission.

**Funding** Financial support was provided by Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA: IN208019), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (406905/2018–5 and E-23/203.026/2017, Brazil).

## Declarations

**Competing Interests** The authors declare no competing interests.

## References

- Ahmad T, Husain MK, Tariq M, Siddiqui JI, Khalid M, Ahmed MW, Kazmi MH (2017) A review on *Operculina turpethum*: a potent herb of Unani system of medicine. *J Pharmacog Phytochem* 6:23–26
- Akbar S (2020) *Operculina turpethum* (L.) Silva Manso (Convolvulaceae). In: Handbook of 200 medicinal plants. Springer, Cham, pp 1359–1363. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-16807-0\\_139](https://doi.org/10.1007/978-3-030-16807-0_139)
- Arslan I, Cenzano AM (2021) Characterization of triterpene saponins from *Gypsophila arrostii* by electrospray ionization ion trap multiple-stage mass spectrometry. *Rev Bras Farmacogn* 31:107–111. <https://doi.org/10.1007/s43450-021-00125-w>
- Brandão MG, Cosenza GP, Grael CF, Netto Junior NL, Monte-Mór RL (2009) Traditional uses of American plant species from the 1<sup>st</sup> edition of Brazilian Official Pharmacopoeia. *Rev Bras Farmacogn* 19:478–487. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300023>
- Castañeda-Gómez J, Laviás-Hernández P, Fragoso-Serrano M, Lorraine A, Pereda-Miranda R (2019) Acylsugar diversity in the resin glycosides from *Ipomoea tricolor* seeds as chemosensitizers in breast cancer cells. *Phytochem Lett* 32:77–82. <https://doi.org/10.1016/j.phytol.2019.05.004>
- Castañeda-Gómez J, Pereda-Miranda R (2011) Resin glycosides from the herbal drug jalap (*Ipomoea purga*). *J Nat Prod* 74:1148–1153. <https://doi.org/10.1021/np200080k>
- Castañeda-Gómez J, Rosas-Ramírez D, Cruz-Morales S, Fragoso-Serrano M, Pereda-Miranda R (2017) HPLC-MS profiling of the multidrug-resistance modifying resin glycoside content of *Ipomoea alba* seeds. *Rev Bras Farmacogn* 27:434–439. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2017.05.003>
- Chérigo L, Pereda-Miranda R (2006) Resin glycosides from the flowers of *Ipomoea murucoides*. *J Nat Prod* 69:595–599. <https://doi.org/10.1021/np0504457>
- Ciesla L (2012) Biological fingerprinting of herbal samples by means of liquid chromatography. *Chromatogr Res Int* 2012:532418. <https://doi.org/10.1155/2012/532418>
- Cunha GH, Fechine FV, Santos LK, Pontes AV, Oliveira JC, Moraes MO, Moraes ME (2011) Efficacy of the tincture of jalap in the treatment of functional constipation: a double-blind, randomized, placebo-controlled study. *Contemp Clin Trials* 32:153–159. <https://doi.org/10.1016/j.cct.2010.10.011>
- Ding W, Jiang ZH, Wu P, Xu L, Wei X (2012) Resin glycosides from the aerial parts of *Operculina turpethum*. *Phytochemistry* 81:165–174. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2012.05.010>
- Fan BY, Gu YC, He Y, Li ZR, Luo JG, Kong LY (2014) Cytotoxic resin glycosides from *Ipomoea aquatica* and their effects on intracellular Ca<sup>2+</sup> concentrations. *J Nat Prod* 77:2264–2272. <https://doi.org/10.1021/np5005246>
- Galvão MA, Ferreira MR, Nunes BM, Santana AS, Randau KP, Soares LA (2014) Validation of a spectrophotometric methodology for the quantification of polysaccharides from roots of *Operculina macrocarpa* (jalapa). *Rev Bras Farmacogn* 24:683–690. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2014.10.008>
- Gonçalves ES, Silva EJR, Aguiar FJS, Dimech GS, Rolim-Neto PJ, Fraga MCC (2007) Chronic toxicological evaluation of the hydroalcoholic extract of *Operculina alata* (Ham.) Urban on biochemical and hematological parameters in female Wistar rats. *Lat Am J Pharm* 26:369–374
- Lawson EN, Jamie JF, Kitching W (1990) Absolute stereochemistry of exogonic acid. *J Org Chem* 57:353–358. <https://doi.org/10.1021/jo00027a060>
- Lira-Ricárdez J, Pereda-Miranda R (2020) Reversal of multidrug resistance by amphiphilic morning glory resin glycosides in bacterial pathogens and human cancer cells. *Phytochem Rev* 19:1211–1229. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09631-1>
- Lira-Ricárdez J, Pereda-Miranda R, Castañeda-Gómez J, Fragoso-Serrano M, Simas RC, Leitão SG (2019) Resin glycosides from the roots of *Operculina macrocarpa* (Brazilian Jalap) with purgative activity. *J Nat Prod* 82:1664–1677. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.9b00222>
- Michelin DC, Salgado HR (2004) Evaluation of the laxative activity of *Operculina macrocarpa* L. Urban (Convolvulaceae). *Rev Bras Farmacogn* 14:105–109. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2004000200003>
- Ono M (2017) Resin glycosides from Convolvulaceae plants. *J Nat Med* 71:591–604. <https://doi.org/10.1007/s11418-017-1114-5>
- Ono M, Fukunaga T, Kawasaki T, Miyahara K (1990) Resin glycosides VIII: four new glycosidic acids, operculinic acids D, E, F and G, of the ether-soluble crude resin glycosides (“jalapin”) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem Pharm Bull* 38:2650–2655. <https://doi.org/10.1248/cpb.38.2650>
- Ono M, Kawasaki T, Miyahara K (1989) Resin glycosides V: identification and characterization of the component organic and glycosidic acids of the ether-soluble crude resin glycosides (“jalapin”) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis* (roots of *Ipomoea operculata*). *Chem Pharm Bull* 37:3209–3213. <https://doi.org/10.1248/cpb.37.3209>

- Ono M, Nishioka H, Fukushima T, Kunimatsu H, Mine A, Kubo H, Miyahara K (2009) Components of ether-insoluble resin glycoside (Rhamnoconvulvin) from *Rhizoma Jalapae Braziliensis*. *Chem Pharm Bull* 57:262–268. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.262>
- Pereda-Miranda R, Fragoso-Serrano M, Escalante-Sánchez E, Hernández-Carlos B, Linares E, Bye R (2006) Profiling of the resin glycoside content of Mexican jalap roots with purgative activity. *J Nat Prod* 69:1460–1466. <https://doi.org/10.1021/np060295f>
- Pereda-Miranda R, Rosas-Ramírez D, Castañeda-Gómez J (2010) Resin glycosides from the morning glory family. In: Kinghorn A, Falk H, Kobayashi J (eds) *Progress in the chemistry of organic natural products*; Springer-Verlag: New York, Vol. 92, Chapter 2, pp 77–152. [https://doi.org/10.1007/978-3-211-99661-4\\_2](https://doi.org/10.1007/978-3-211-99661-4_2)
- Rosas-Ramírez D, Pereda-Miranda R, Escandón-Rivera S, Arreguín-Espinosa E (2020) Identification of  $\alpha$ -glucosidase inhibitors from *Ipomoea alba* by affinity-directed fractionation-mass spectrometry. *Rev Bras Farmacogn* 30:336–345. <https://doi.org/10.1007/s43450-020-00068-8>
- Santos LKXD, Cunha GHD, Fachine FV, Pontes AV, Oliveira JCD, Bezerra FAF, Moraes MOD, Moraes MEAD (2012) Toxicology and safety of the tincture of *Operculina alata* in patients with functional constipation. *Braz J Pharm Sci* 48:469–476. <https://doi.org/10.1590/S1984-82502012000300014>
- Staples GW, Simões AR, Austin DF (2020) A monograph of *Operculina* (Convolvulaceae). *Ann Missouri Bot Gard* 105:64–138. <https://doi.org/10.3417/2020435>
- Wagner H, Wenzel G, Chari V (1978) The turpethinic acids of *Ipomoea turpethum* L. Chemical constituents of the Convolvulaceae resins III. *Planta Med* 33:144–151. <https://doi.org/10.1055/s-0028-1097368>
- Zhu D, Chen C, Bai L, Kong L, Luo J (2019a) Downregulation of aquaporin 3 mediated the laxative effect in the rat colon by a purified resin glycoside fraction from *pharbitis semen*. *Evid Based Compl Alt Med* 2019:9406342. <https://doi.org/10.1155/2019/9406342>
- Zhu D, Chen C, Xia Y, Kong L, Luo J (2019b) A purified resin glycoside fraction from *Pharbitidis semen* induces paraptosis by activating chloride intracellular channel-1 in human colon cancer cells. *Integr Cancer Ther* 18:1–13. <https://doi.org/10.1177/1534735418822120>