



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**  
**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINOCICEPTIVA DE LOS  
EXTRACTOS ACUOSO, ETANÓLICO Y MEZCLA DE  
VALEPOTRIATOS DE *Valeriana edulis* ssp. *procera* EN EL  
MODELO DE CONTRACCIONES INDUCIDAS CON ÁCIDO  
ACÉTICO EN RATONES.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ABIGAIL HIDALGO RAMÍREZ



DIRECTOR

DR. ANDRÉS NAVARRETE  
CASTRO

ASESOR

M en F. MARTHA UGALDE  
HERNÁNDEZ

México, D. F. 2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## **AGRADECIMIENTOS**

Este proyecto fue financiado por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico a través del proyecto PAPIIT 203614 y del Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado a través del proyecto PAIP 5000-9143.

## DEDICATORIA

A mamá y papá.... Los primeros Maestros que tuve ¡Los que tendré toda la vida!

Simple y sencillamente por su inmenso amor y cariño, por su apoyo y por su confianza, por los regaños y por las risas. Porque sin ellos esta historia nunca hubiera comenzado.... ¡LOS AMO!

A Susana e Itzel por todos los maravillosos momentos de risas interminables, por las horas de plática sin fin, por sus regaños y por sus palabras de aliento... ¡LAS AMO!

A las familias Hidalgo Albino y Ramírez Pérez: abuel@s, ti@s y prim@s por enseñarme el valor de la unión familiar.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	1
NOTACIÓN EMPLEADA.....	3
1.- RESUMEN.....	4
2.- INTRODUCCIÓN.....	5
3.- MARCO TEÓRICO	
3.1.- Generalidades de <i>Valeriana sp.</i> .....	6
3.2.- Composición química.....	7
3.2.1- Valepotriatos.....	7
3.2.2.- Terpenos.....	9
3.3.- Actividades farmacológicas de la valeriana.....	10
3.4.- Especies de Valeriana.....	11
3.5.- <i>Valeriana edulis ssp. procera</i> .....	12
3.6.- Definición de dolor.....	14
3.7.- Nocicepción.....	14
3.7.1.- Nociceptores.....	15
3.8.- Modelos animales para el estudio del dolor.....	15
3.9.- Cromatografía de líquidos/gases acoplado a espectroscopia de masas .....	19

4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	20
5.- HIPÓTESIS.....	21
6. OBJETIVO.....	22
6.1 Objetivos particulares.....	22
7.- MATERIAL Y MÉTODOS	
7.1.- Material vegetal.....	23
7.2.- Preparación de extractos.....	23
7.3.- Obtención de valepotriatos.....	23
7.4.- Identificación de valepotriatos por CL/EM y CG/EM.....	26
7.5.- Animales.....	27
7.6.- Fármaco y dosis.....	27
7.7.- Prueba de estiramiento abdominal inducida con ácido acético.....	28
7.8.- Análisis estadístico.....	28
8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
8.1.-Extractos obtenidos.....	29
8.2.-Análisis químico.....	30
8.3.-Evaluación farmacológica.....	41
9.- CONCLUSIONES.....	45
10.- PERSPECTIVAS.....	46

11.- REFERENCIAS.....	47
ANEXO 1. Espectros de masas.....	53

## ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS

Cuadro 1. Modelos animales de nocicepción.....	16
Cuadro 2. Gradiente cromatográfico del análisis CL/EM.....	26
Cuadro 3. Extractos obtenidos de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> .....	29
Cuadro 4. Componentes de la mezcla de valepotriatos.....	30
Figura 1. Clasificación de valepotriatos.....	8
Figura 2. Sustituyentes más comunes.....	9
Figura 3. Productos de degradación.....	9
Figura 4. Terpenos del aceite esencial.....	10
Figura 5.- Fotografía de <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i> .....	12
Figura 6.- Raíz de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> .....	13
Figura 7. Mediadores inflamatorios.....	16
Figura 8. Diagrama de obtención de valepotriatos.....	25
Figura 9. Cromatograma de la mezcla de valepotriatos.....	30
Figura 10. Patrón de fragmentación del valtrato.....	32
Figura 11. Patrón de fragmentación del acevaltrato.....	34
Figura 12. Patrón de fragmentación del isohomoacevaltrato.....	35
Figura 13. Patrón de fragmentación del isovaltrato.....	36



Figura 14. Patrón de fragmentación del 1-homovaltrato.....	37
Figura 15. Patrón de fragmentación del IVHD-valtrato.....	39
Figura 16. Patrón de fragmentación del isodihidrovaltrato.....	40
Figura 17. Curso temporal de las contracciones.....	41
Figura 18. Actividad antinociceptiva de la mezcla de valepotriatos y de los extractos acuoso y etanólico.....	43
Figura 19. Espectro de masas por IE del valtrato.....	53
Figura 20. Espectro de masas por IE del acevaltrato.....	53
Figura 21. Espectro de masas por IE del isohomoacevaltrato.....	53
Figura 22. Espectro de masas por ESI del isovaltrato.....	54
Figura 23. Espectro de masas por ESI del 1-homovaltrato.....	54
Figura 24. Espectro de masas por ESI del IVHD-valtrato.....	55
Figura 25. Espectros de masas por ESI del isodihidrovaltrato.....	55

## **NOTACIÓN EMPLEADA**

**5-HT:** Serotonina (5-hidroxitriptamina)

**ANOVA:** Análisis de varianza (Analysis of variance)

**ASIC:** Canales de sodio sensible a ácido (Acid-sensing sodium ion channels)

**ATP:** Trifosfato de adenosina (Adenosine triphosphate)

**BK<sub>2</sub>:** Receptor 2 de bradicidina

**CB1:** Receptor canabinoide tipo 1

**CGRP:** Péptido relacionado con la expresión del gen de la calcitonina

**ENaC:** Canales epiteliales de sodio sensibles a amilorida (Amiloride-sensitive epithelial sodium channels)

**IVHD:** Isovaleroxiisovalerilhidroxidihidro

**NGF:** Factor de crecimiento nervioso

**P2X<sub>3</sub>:** Receptor ionotrópico tipo 3 de purina

**PGE<sub>2</sub>:** Prostaglandina E<sub>2</sub>

**TrkA:** Tirosina cinasa

**VR1:** Receptor vaniloide tipo 1

## 1.- RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue aislar e identificar los valepotriatos más comunes en los extractos clorofórmico y etanólico de *Valeriana edulis* ssp. *procera* y evaluar la actividad antinociceptiva de una mezcla de valepotriatos y de los extractos acuoso y etanólico de esta planta. Los extractos se obtuvieron por maceración de la raíz de la planta. Para evaluar la actividad antinociceptiva se empleó el modelo de contracciones inducidas con ácido acético. Se identificaron los valepotriatos valtrato, acevaltrato e isohomoacevaltrato en el extracto de etanol y los valepotriatos isovaltrato, 1-homovaltrato, isovaleroxiisovalerilhidroxidihidro-valtrato (IVHD-valtrato) e isodihidrovaltrato en el extracto de cloroformo. Respecto a la evaluación biológica, ambos extractos y la mezcla de valepotriatos mostraron actividad antinociceptiva; sobresale la actividad de la mezcla de valepotriatos con mayor eficacia que el fármaco de referencia (diclofenaco). Los resultados de este trabajo sustentan el uso de *V. edulis* ssp. *procera* en el tratamiento de dolor de tipo visceral y sugieren que los valepotriatos son los responsables de dicho efecto.

## 2.- INTRODUCCIÓN

Existen diversos trabajos que han demostrado actividad sedante, ansiolítica, hipnótica, citotóxica, antiespasmódica, vasorrelajante, antifúngica y miorrelajante de varias especies de Valeriana; sin embargo, la mayor parte de tales investigaciones han empleado extractos de la planta. Se asume que los valepotriatos, debido a que son los componentes representativos de las valerianas, son los responsables de las actividades atribuidas y/o demostradas. Aún existe controversia respecto a la relevancia de estos compuestos como responsables de los efectos reportados, por lo cual se requieren más estudios para concluir y/o refutar dichas atribuciones.

Por otra parte, además de la actividad sedante y ansiolítica se debe de explorar el resto de las actividades que la medicina tradicional atribuye a las valerianas para generar información que soporte o desmienta los usos tradicionales. *Valeriana edulis* ssp. *procera*, también conocida como “valeriana mexicana”, es empleada en la medicina tradicional como analgésico, sin embargo, no existen estudios científicos que respalden dicho uso. Por lo que el propósito principal de esta investigación fue aislar los valepotriatos más comunes de *V. edulis* ssp. *procera* y evaluar la actividad antinociceptiva de éstos, así como los extractos acuoso y etanólico, a través del modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético en ratones.

### 3.- MARCO TEÓRICO

#### 3.1 Generalidades de *Valeriana sp.*

La valeriana se utiliza como medicinal desde antes de nuestra era, médicos como Dioscórides y Galeno trabajaron con esta planta<sup>1</sup>. Popularmente se conoce como “valeriana” al extracto crudo de los órganos subterráneos de especies del género *Valeriana*<sup>2</sup>. Los extractos de estas plantas son usados en la medicina tradicional de Europa, Asia y Norteamérica, principalmente como sedante suave e hipnótico<sup>3</sup>; en menor medida se emplea en el tratamiento de espasmos gastrointestinales, en el tratamiento de cólicos menstruales, hipertensión, angina, palpitaciones, asma bronquial y dolor hepático<sup>4</sup>.

El género *Valeriana* comprende alrededor de 200 especies que presentan distribución mundial<sup>5</sup>. Las tres especies más importantes en la medicina herbal son *V. officinalis*, *V. wallichii* (sinónimo *V. jatamansi* Jones) y *V. edulis* ssp. *procera*<sup>6</sup> (También conocida como “valeriana mexicana<sup>7</sup>); las tres especies son usadas para la producción de fitomedicamentos de administración oral, mientras que *V. officinalis* también se emplea en la producción de tinturas y tés<sup>8</sup>.

*V. officinalis* es la especie de mayor uso<sup>9</sup>, para 1999 existían al menos 25 productos con esta planta en Reino Unido y más de 400 en Alemania<sup>2</sup>; su empleo es tan extendido que en la 4ª edición de la Farmacopea Europea se encuentra su monografía<sup>6</sup> y para el 2005 se situó en la 13ª posición de las plantas medicinales más vendidas en EU<sup>10</sup>.

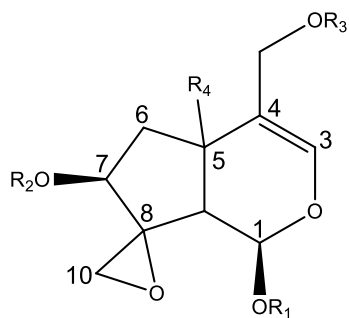
## 3.2 Composición química

En *Valeriana sp.* se han identificado más de 150 componentes de tipo alcaloides, terpenos y flavonas<sup>11</sup>, sin embargo, los componentes representativos son valepotriatos y ácido valerénico, los cuales pertenecen a la familia de mono- y sesquiterpenos, respectivamente. En *Valeriana edulis ssp. procera* se han identificado por cromatografía de líquidos ácido clorogénico, 5 lignanos: 4-O-D-glucósido de masorresinol, 4-O-D-glucósido de berchemol, 4,4-O-D-diglucoído de pinorresinol, 4-O-D-glucósido de 8-hidroxi-pinorresinol, 4-O-D-glucósido de pinorresinol y los flavonoides hesperidina y linarina<sup>12</sup>.

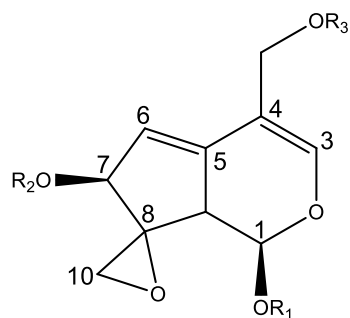
### 3.2.1 Valepotriatos

Los valepotriatos son iridoides con esqueleto ciclopentano-C-piranoide que contiene un anillo epóxido, tres grupos éster, uno o dos dobles enlaces y no presentan enlaces glicosídicos<sup>13</sup>; se producen principalmente en las partes subterráneas de la planta<sup>2</sup> y son exclusivos de la familia *Valerianaceae*<sup>14</sup>.

Los valepotriatos pueden ser clasificados basándose en el número de dobles enlaces, se tienen dos grupos: monoenos y dienos (Figura 1); podemos encontrar diversos sustituyentes enlazados al esqueleto central, sin embargo, isovalerilo y acetilo son los más comunes (Figura 2). Los valepotriatos más comunes son valtrato, isovaltrato, acevaltrato, dihidrovaltrato y sus homólogos<sup>15</sup>.



Valepotriatos tipo monoeno

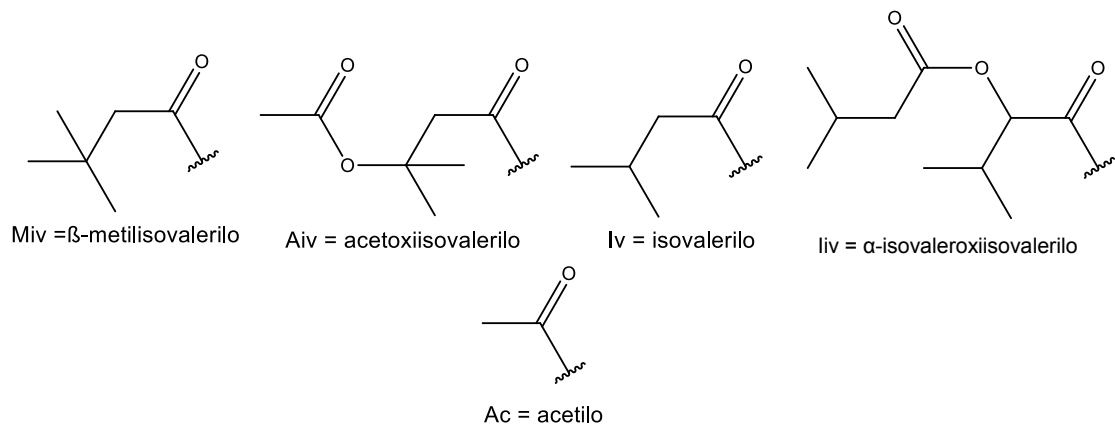


Valepotriatos tipo dieno

Valepotriatos tipo monoeno					Valepotriatos tipo dieno					
	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>		R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>		
1	lv	Ac	lv	H	Dihidrovaltrato	5	lv	lv	Ac	Valtrato
2	lv	lv	Ac	H	Isodihidrovaltrato	6	lv	Ac	lv	Isovaltrato
3	lv	Ac	liv	OH	IVHD-valtrato	7	Aiv	lv	Ac	Acevaltrato
4	Miv	Ac	liv	H	Homodihidrovaltrato	8	lv	Ac	Ac	Diavaltrato
						9	lv	Aiv	Ac	Homoacevaltrato

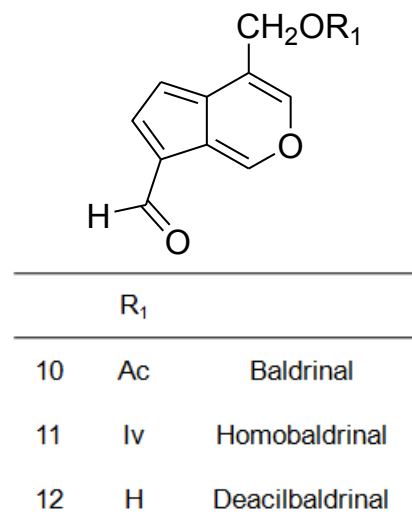
**Figura 1.** Clasificación de valepotriatos

Los valepotriatos son compuestos inestables: son termolábiles, se descomponen rápidamente en soluciones acuosas y alcohólicas o bajo condiciones ácidas o alcalinas, sin embargo, en metanol anhidro y almacenados a 20°C los valepotriatos tipo dieno son relativamente estables<sup>6</sup>.



**Figura 2.** Sustituyentes más comunes

Sus productos de degradación, los baldrinales, se forman a partir de la pérdida de los sustituyentes y de la formación de un grupo aldehído a partir del epóxido<sup>16</sup> (Figura 3).



**Figura 3.** Productos de degradación

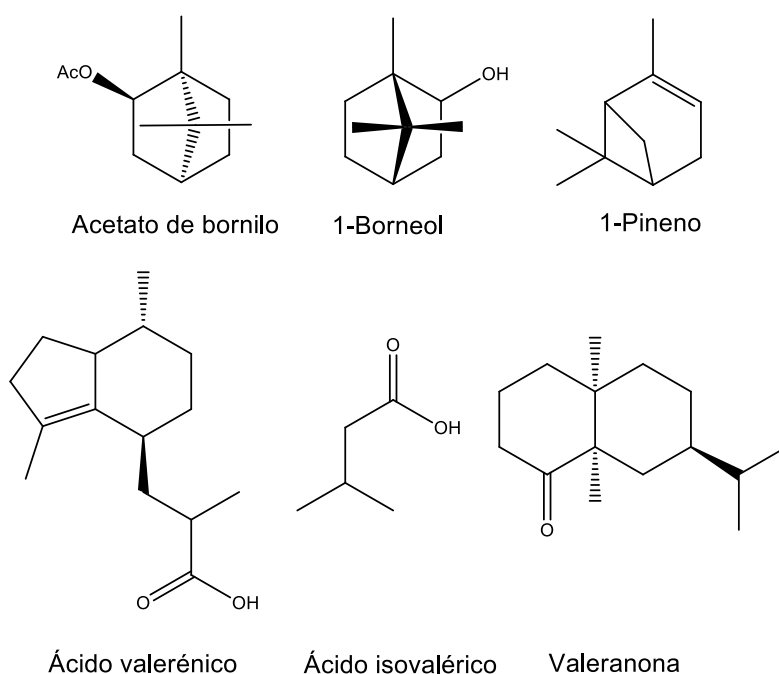
### 3.2.2 Terpenos

Los terpenos que encontramos en el aceite esencial son de tipo mono- y sesquiterpenos. Entre los monoterpenos podemos encontrar 1-borneol, acetato e isovalerato de bornilo, 1-pineno, 1-confeno y terpineol, entre los



sesquiterpenos encontramos ácido valerénico, valeranona y criptofauronol<sup>11</sup>. La Figura 4 muestra las estructuras de algunas de estas sustancias. El ácido valerénico y sus derivados se presentan exclusivamente en *V.officinalis*<sup>17</sup>.

Otro terpeno, formalmente un hemiterpenoide, característico de la valeriana es el ácido isovalérico, éste se encuentra unido al núcleo de los valepotriatos mediante un enlace tipo éster, este ácido es el responsable del aroma característico de la valeriana cuando se libera por el rompimiento del enlace fácilmente hidrolizable<sup>11</sup>.



**Figura 4.** Terpenos del aceite esencial

### 3.3 Actividades farmacológicas de la valeriana

El efecto depresor sobre el SNC que posee esta planta ha sido demostrado en ratones<sup>18, 19</sup> y en estudios clínicos<sup>20, 21</sup>, sin embargo el mecanismo molecular no ha sido elucidado; no obstante, se asume que el ácido valerénico y los valepotriatos son responsables de dicho efecto<sup>13, 16</sup> pero se requieren estudios concluyentes que sustenten dicha actividad.

Adicionalmente, los valepotriatos poseen otras actividades farmacológicas que han sido plenamente demostradas: Fuzzati y colaboradores<sup>14</sup> demostraron la actividad antifúngica de un grupo de valepotriatos mientras que el trabajo de Bos y su equipo<sup>17</sup> sustentan la actividad citotóxica de otro conjunto de valepotriatos.

También se ha demostrado actividad miorrelajante de los valepotriatos: Occhiuto y colaboradores<sup>4</sup> demostraron la actividad relajante de una mezcla de valepotriatos y de los extractos etanólico y acuoso en útero de seres humanos Hazelhoff y colaboradores<sup>22</sup> encontraron actividad espasmolítica de los valepotriatos, el ácido valerénico y la valeranona en el modelo de íleon de cobayo. Mientras que Estrada-Soto y colaboradores<sup>23</sup> encontraron actividad relajante de extractos de *V. edulis* ssp. *procera* sobre anillos de aorta de rata y sugieren que los valepotriatos son responsables de dicha actividad.

### **3.4 Especies de *Valeriana***

Además de las especies de *Valeriana* que se han mencionado, alrededor del mundo se emplean, en menor medida, otras especies. En China y Japón *V. angustifolia* Tausch y *V. fauriei* Briq. son las más utilizadas<sup>11</sup>, en Brasil la valeriana de mayor uso es *V. glechomifolia* Meyer<sup>5, 15</sup>, mientras que *V. cápense* es la más empleada en Sureste de África<sup>14</sup>.

*V. officinalis*, *V. wallichii* y *V. edulis* ssp. *procera* son las especies de valeriana más empleadas en Europa, India-Pakistán y México, respectivamente<sup>6</sup>.

El uso de *V. edulis* ssp. *procera* se encuentra ampliamente difundido en la medicina tradicional mexicana y en la industria fitofarmacéutica por lo que es la especie de valeriana de mayor importancia comercial en México<sup>24</sup>. Es por esto, y por razones que se mencionan más adelante; que en el presente trabajo se empleó Valeriana Mexicana.

### **3.5 *Valeriana edulis* ssp. *procera***

Esta subespecie es endémica de México, es una planta herbácea perenne, dioica, hasta de 1.5 m de alto, raíz cilíndrica, de 1 a 3 cm de diámetro, dando origen a uno o dos tallos de hasta de 15 mm de diámetro en la base; hojas basales varias a numerosas con peciolo hasta de 10 cm de largo; fruto ovado, de 2 a 3.5 mm de largo, café-verdoso<sup>25</sup> (Figura 5).



**Figura 5.** Fotografía de *V. edulis* ssp. *procera*

Esta planta se encuentra en clima templado desde los 2240 hasta los 2750 msnm; se halla asociada a bosque de juníperos y bosque mixto de pino-encino<sup>26</sup>, se distribuye principalmente en la zona central del país<sup>27</sup>. Además de “valeriana mexicana”<sup>7</sup>, también se le conoce como “hierba de gato”, “plateada” o simplemente “valeriana”<sup>25</sup>.

*Valeriana edulis* ssp. *procera* se distingue por ser la especie con la raíz más grande de todo el género (hasta 3 cm de diámetro) (Figura 6) y por producir la mayor cantidad de valepotriatos: esta especie contiene de 8-12% de valepotriatos contra 0.8-1.7% y 2.8-3.5% para *V. officinalis* y *V. wallichii*, respectivamente<sup>8</sup>. El alto contenido de valepotriatos es otra razón por la que se trabajó con *V. edulis* ssp. *procera*.



**Figura 6.** Raíz de *V. edulis* ssp. *procera*

Esta planta se utiliza principalmente como sedante y en el tratamiento de problemas de insomnio; en segundo plano se utiliza para tratar dolor de pecho, espalda y cabeza<sup>26</sup>.

No existen trabajos que respalden la actividad analgésica de la *V. edulis* ssp. *procera*; sin embargo, la actividad espasmolítica demostrada por los trabajos de Occhiuto<sup>4</sup> y Hazelhoff<sup>22</sup> sugiere que esta planta podría ser útil en el tratamiento de dolor de tipo visceral.

### **3.6 Definición del dolor**

Dolor es un fenómeno complejo biopsicosocial producto de la interacción de múltiples sistemas neuroanatómicos y neuroquímicos con varios procesos afectivos y cognitivos<sup>28</sup>.

La Asociación Internacional para el Estudio del Dolor (IASP) define al dolor como “experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con daño tisular real o potencial descrita en términos de dicho daño”<sup>29</sup>.

El concepto de dolor debe distinguirse de nocicepción, el cual es un término neurofisiológico.

### **3.7 Nocicepción**

Es la capacidad para detectar estímulos nocivos o dañinos para los tejidos<sup>30</sup>. Comprende dos etapas: traducción y transmisión. En la primera el estímulo

nocivo es convertido, por medio de nociceptores, en señales eléctricas que, en la segunda etapa, son conducidas hacia el cerebro<sup>31</sup>.

### **3.7.1 Nociceptores**

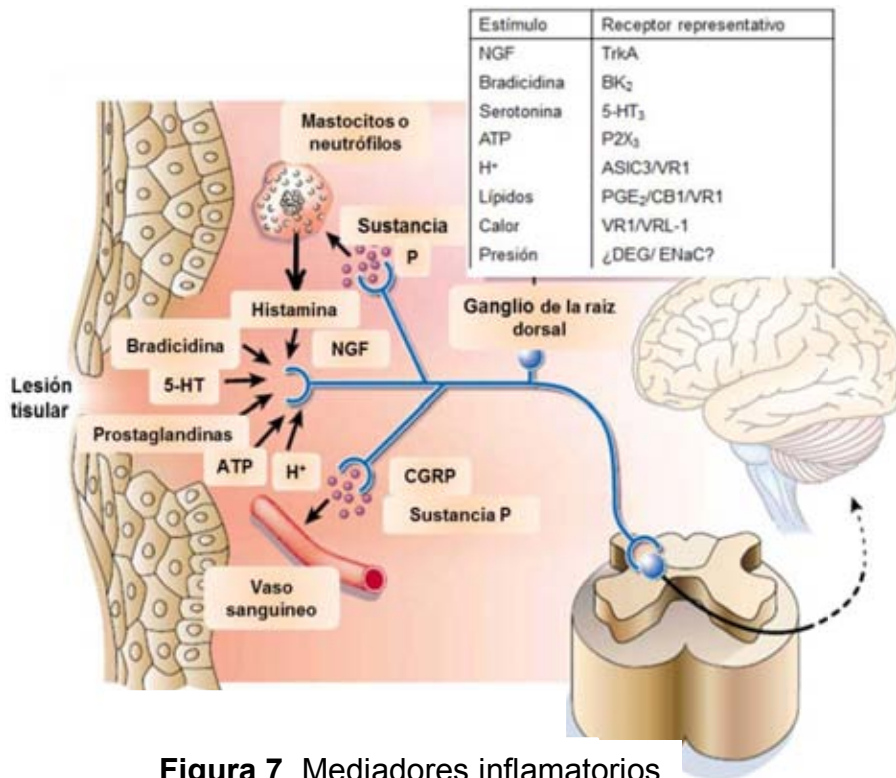
Los nociceptores son receptores especializados encargados de la traducción de información mecánica, química y térmica en actividad eléctrica, se encuentran en las neuronas sensoriales primarias<sup>32</sup>. La notable capacidad que poseen estas neuronas para detectar un amplio rango de estímulos se debe a la extensa gama de nociceptores que poseen<sup>33</sup>.

Durante la lesión, células no neuronales liberan mediadores inflamatorios que aumentan la sensibilidad de los nociceptores y potencian la percepción del dolor. Algunos de los principales componentes de esta “mezcla inflamatoria” son bradicinina, protones ( $H^+$ ), serotonina, ATP, neurotrofinas, leucotrienos (LT) y prostaglandinas (PG)<sup>34</sup>(Figura 7).

### **3.8 Modelos animales para el estudio del dolor**

Para el estudio del dolor se han desarrollado diversos modelos animales. La parte fundamental de todos los modelos es el estímulo que se debe aplicar para desencadenar el dolor. El estímulo debe ser cuantificable, reproducible y no invasivo<sup>35</sup>.

Los modelos animales de dolor pueden ser clasificados de acuerdo a la naturaleza del estímulo (Cuadro1).



**Figura 7.** Mediadores inflamatorios

**Cuadro 1. Modelos animales de nocicepción<sup>35, 36</sup>.**

Naturaleza del estímulo	Nombre del modelo	Descripción
Térmico	Prueba de retiro de la cola	Se aplica radiación térmica a la cola del animal, este la retira bruscamente; se registra el tiempo que el animal tarda en retirar la cola. El calor puede ser aplicado mediante una lámpara infrarroja o sumergiendo la cola del animal en agua caliente a 55 °C.

**Cuadro 1. Modelos animales de nocicepción<sup>35, 36</sup> (Continuación).**

Naturaleza del estímulo	Nombre del modelo	Descripción
Térmico	Prueba de placa caliente	El animal se introduce en un cilindro cuyo piso es una placa caliente (55-56 °C). Se mide el tiempo que el animal tarda en lamer sus patas y/o saltar.
Mecánico	Prueba de Randall y Selitto	Aplica presión, que va incrementándose, a la pata trasera o a la cola. El parámetro que se mide es el umbral (peso en gramos) en el que el animal intenta retirar la pata y/o cola.
Eléctrico	Estimulación de larga y corta duración	El estímulo se va incrementando gradualmente. Puede ser aplicado en la cola y/o en las patas del animal. La duración más larga del estímulo comprende hasta los 600 ms, mientras que la corta va de los 10 a 20 ms.
Químico	Inyecciones intradérmicas de formalina	Se administra una solución de formalina, el agente más común, en la superficie dorsal de la pata, provoca comportamiento doloroso que es evaluado en una escala de cuatro niveles.



**Cuadro 1. Modelos animales de nocicepción<sup>35,36</sup> (Continuación).**

Naturaleza del estímulo	Nombre del modelo	Descripción
Químico	Estiramiento abdominal inducido con ácido acético	Se administra vía IP un agente irritante, comúnmente una solución de ácido acético, que provoca comportamiento estereotipado caracterizado por contracciones abdominales.
	Estimulación de los órganos internos	El agente irritante se administra directamente en los órganos internos, por ejemplo formalina en el colon.
	Alteración funcional inducida por dolor	La rata es anestesiada con éter, se le inyecta una solución de ácido úrico en la rodilla de la pata trasera y se coloca un electrodo en la superficie plantar de dicha pata. Se permite a los animales recuperarse de la anestesia y se colocan en un cilindro de acero de 30 cm de diámetro. Las ratas son forzadas a caminar rotando el cilindro a 4 rpm, cuando el electrodo hace contacto con el piso del cilindro se cierra un circuito. Se registra el tiempo que el circuito permanece cerrado.

### **3.9 Cromatografía de líquidos/ gases acoplada a espectroscopia de masas**

El desarrollo de la cromatografía de líquidos (CL) y de gases (CG) ha permitido la creación de instrumentos muy poderosos para la determinación selectiva y sensitiva de diversos tipos de moléculas; además, el estado actual de la técnica permite separaciones rápidas y eficientes<sup>37</sup>.

La unión de esta técnica a la espectroscopia de masas (EM) ha creado una herramienta eficaz para la identificación de compuestos. Con esta técnica se elimina la necesidad de un estándar de referencia y también permite la identificación de compuestos sin necesidad de su aislamiento<sup>38</sup>; características valoradas especialmente en el campo de los productos naturales.

Las diferencias en la estructura de los diversos isómeros que existen entre los valepotriatos se deben principalmente a la localización de los sustituyentes en los carbonos 1, 7 y 11. Usualmente estos isómeros son identificados a través de resonancia magnética nuclear; sin embargo, Fuzzati y colaboradores<sup>14</sup> le han dado un enfoque alternativo a la EM empleando los patrones de fragmentación para identificar distintos valepotriatos, demostrando la utilidad de a EM en la identificación de isómeros.

#### 4.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La mayor parte de los trabajos que han demostrado las distintas actividades biológicas de la valeriana han empleado extractos de la planta, pocas investigaciones han utilizado valepotriatos puros, inclusive la actividad de estas moléculas sobre el Sistema Nervioso Central fue demostrada con una mezcla de dihidrovaltrato, valtrato y acevaltrato<sup>13</sup>, no obstante, aún existe controversia respecto a la relevancia de estos compuestos como responsables de los efectos biológicos de la valeriana, por lo cual se requieren más estudios para concluir y/o refutar dichas actividades.

Por otra parte, la medicina tradicional atribuye propiedades analgésicas a *V. edulis* ssp. *procera*, sin embargo, no existe información acreditada que soporte dicha actividad, por lo que se requiere generar información para respaldar y/o desmentir su uso como analgésico.

Con base en lo anterior, esta investigación se enfocó en:

- Aislar a los valepotriatos más comunes de *V. edulis* ssp. *procera*.
- Evaluar la actividad antinociceptiva de dichos valepotriatos y de los extractos acuoso y etanólico a través del modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético.

## **5.- HIPÓTESIS**

Los extractos acuoso, etanólico y la mezcla de valepotriatos de *Valeriana edulis* ssp. *procera* presentarán actividad antinociceptiva en el modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético. Se espera que la mezcla de valepotriatos presente el mayor efecto antinociceptivo.

## 6.- OBJETIVO

Evaluar la actividad antinociceptiva de los extractos acuoso, etanólico y de los valepotriatos más comunes de *V. edulis* ssp. *procera* utilizando el modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético en ratones.

### 6.1 Objetivos particulares

- Aislar a los valepotriatos mayoritarios de los extractos acuoso, etanólico y clorofórmico de *Valeriana edulis* ssp. *procera* e identificarlos mediante cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas (CL/EM) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM).
- Obtener las curvas dosis-respuesta antinociceptiva de los valepotriatos y de los extractos de *V. edulis* ssp. *procera* en el modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético en ratones.

## **7.- MATERIAL Y MÉTODOS**

### **7.1 Material Vegetal**

La raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera* se obtuvo de los Laboratorios Mixim S.A. de C.V., esta se conservó a temperatura ambiente, en un lugar seco hasta el momento de su uso.

### **7.2 Preparación de los extractos**

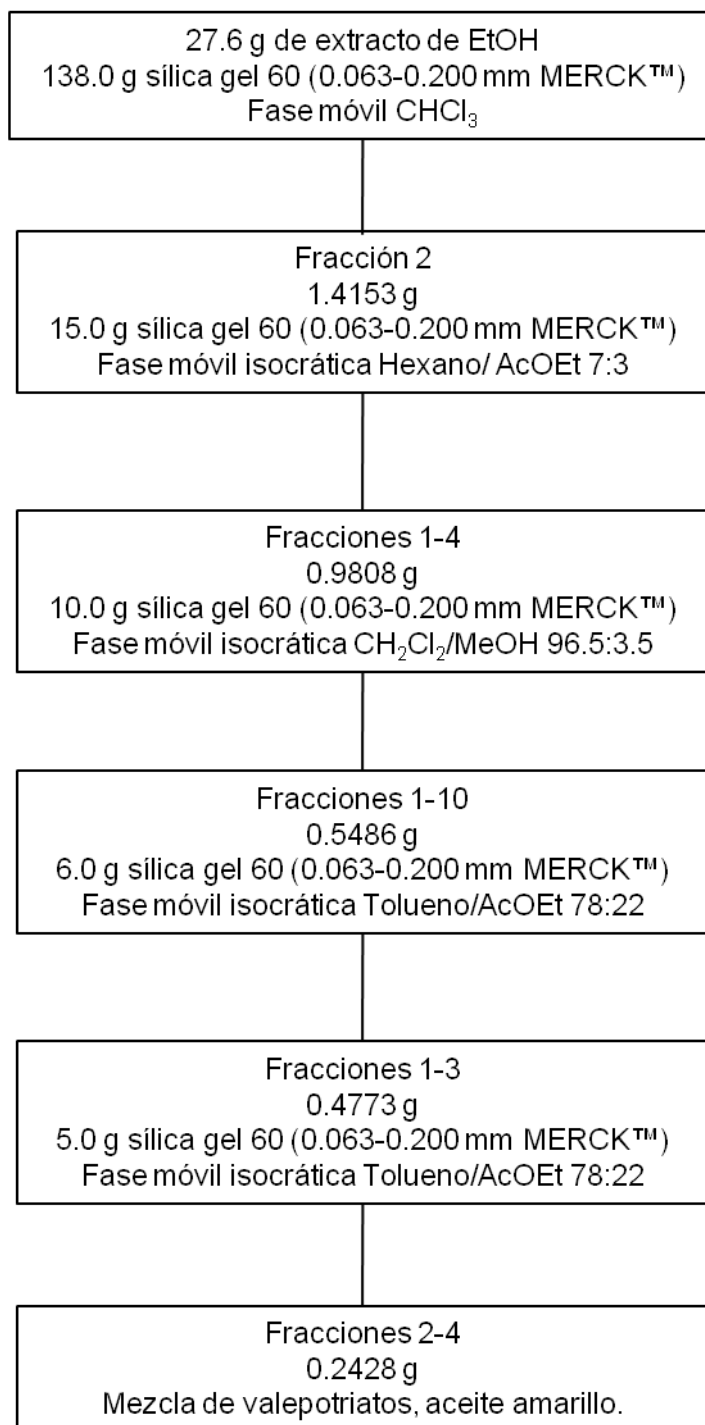
El extracto acuoso se obtuvo de la decocción de 10 g de raíz seca con 90 mL de agua destilada; mientras que los extractos etanólico y clorofórmico se obtuvieron por la maceración a temperatura ambiente de 5.2486 kg y 4.9276 kg de raíz seca y molida con 7.5 L de EtOH y 6.9 L de CHCl<sub>3</sub>, respectivamente; la maceración se realizó por triplicado. Los extractos se filtraron por gravedad y se concentraron en un rotavapor, posteriormente se colocaron en viales y se eliminó el disolvente residual por medio de una corriente de aire a temperatura ambiente de aproximadamente 22 °C.

### **7.3 Obtención de valepotriatos**

Se realizó una percolación de 27.6 g del extracto de etanol empleando mezcla de CHCl<sub>3</sub>-MeOH. Se utilizó cromatografía en capa fina y el revelador ácido acético/HCl (1:1 v/v) para identificar las fracciones ricas en valepotriatos observadas como manchas de color azul<sup>39</sup>.

De la primera separación se encontró que la fracción 2 (F2), eluida con CHCl<sub>3</sub> (100%), fue la más rica en valepotriatos, por lo que se fraccionó empleando

una fase móvil isocrática de hexano-AcOEt (7:3). Las primeras 4 fracciones (F1-F4) presentaron el mayor contenido de valepotriatos, por lo que se reunieron y se sometieron a una separación posterior empleando como fase móvil CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-MeOH 96.5:3.5; debido a su similitud las fracciones 1 a 10 (F1-F10) se unieron y fueron nuevamente fraccionadas en una columna con fase móvil de Tolueno-AcOEt (78:22 v/v); las fracciones 1 a 3 de esta columna (F1-F3) se sometieron a otra separación empleando la misma fase móvil (Tolueno-AcOEt 78:22 v/v). En las fracciones 2 a 4 (F2-F4) se obtuvo la mezcla valepotriatos con la que se trabajó. La Figura 8 resume el método de obtención de la mezcla de valepotriatos.



**Figura 8.** Diagrama de obtención de la mezcla de valepotriatos



#### 7.4 Identificación de valepotriatos por CL/EM y CG/EM

La CL/EM se realizó en un cromatógrafo de líquidos Waters modelo Acquity acoplado a un espectrómetro de masas Waters modelo Synapt GS-2. Se utilizó una columna Acquity UPLC BEH C<sub>18</sub> (100mm de longitud x 2.1mm de diámetro interno y 1.7µm de tamaño de partícula) a 25°C. La fase móvil fue agua grado HPLC (A) y acetonitrilo (B), ambas con 0.1% de ácido fórmico. El gradiente cromatográfico se muestra en el Cuadro 2. El flujo fue de 0.3 mL/min. Se empleó ionización por electrospray (ESI). La temperatura de la cámara de ionización fue de 100°C y el voltaje del capilar fue de 3.00 kV. Se empleó un detector de tiempo de vuelo, las masas se escanearon en un intervalo de 50-1500 uma.

**Cuadro 2. Gradiente cromatográfico del análisis CL/EM**

Gradiente	Tiempo (min)	A (%)	B (%)
1	0	90	10
2	18	10	90
3	20	10	90

Para la CG/EM se empleó un cromatógrafo de gases Thermo Trace GC Ultra acoplado a un espectrómetro de masas Thermo DFS. Se utilizó una columna capilar Agilent HP-5ms (30m de longitud x 0.25mm de diámetro interno x 0.25µm de espesor de película) a 300°C. La temperatura inicial fue de 100°C (4 min) y se fue incrementando a razón de 10°C/min hasta 300°C. El inyector se mantuvo a 300°C. Se empleo helio de alta pureza a un flujo de 0.8 mL/min. El

método de ionización fue impacto electrónico (IE) con energía de 70 eV. Las masas se escanearon en intervalo de 33-600 uma.

## **7.5 Animales**

Se utilizaron ratones macho ICR con un peso de 25 a 30 g. Se mantuvieron a temperatura constante de  $22 \pm 1$  °C con libre acceso a alimento y agua, bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h. Los animales fueron tratados conforme a la NOM-062-ZOO-1999. Además se obtuvo la aprobación del protocolo por parte del Comité interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química (Oficio CICUAL 021/11).

## **7.6 Fármaco y dosis**

El diclofenaco sódico (COSUFAR) fue preparado a una concentración de 1.0 mg/mL en solución salina. Los extractos y la mezcla de valepotriatos se prepararon con solución salina y dos gotas de tween 80 a una concentración de 30 mg/mL y se diluyeron para alcanzar una concentración final correspondiente a las dosis de 300, 100, 10, 5.62 y 3.16 y 1.77 mg/kg, que fueron administrados en un volumen de 0.1 mL/10 g de peso corporal. El vehículo consistió en solución salina isotónica con dos gotas de tween 80.

### **7.7 Prueba de estiramiento abdominal inducida con ácido acético**

El tratamiento (vehículo, fármaco, extractos o mezcla de valepotriatos) se administró vía intraperitoneal, después de 30 minutos se administró una solución de ácido acético 1% (0.1 mL/10 g), se observó y se registró el número de contorsiones por periodos de 5 minutos hasta completar 20 minutos. Una contorsión fue definida como la contracción de la musculatura abdominal seguida de la extensión de las extremidades anteriores y el alargamiento del cuerpo del ratón. Al término de cada evaluación los ratones fueron sacrificados por sobredosis de CO<sub>2</sub>. Las curvas dosis-respuesta se construyeron con las áreas bajo la curva obtenidas por el método de los trapecios.

### **7.8 Análisis estadístico**

Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  EEM de al menos 6 animales por grupo. Para comparar la diferencia entre el tratamiento y el control se utilizó el análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido por la prueba de Dunnett. Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas con una  $p < 0.05$ .

## 8.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 8.1 Extractos obtenidos

El rendimiento de cada uno de los extractos y de la mezcla de valepotriatos se muestra en el Cuadro 3.

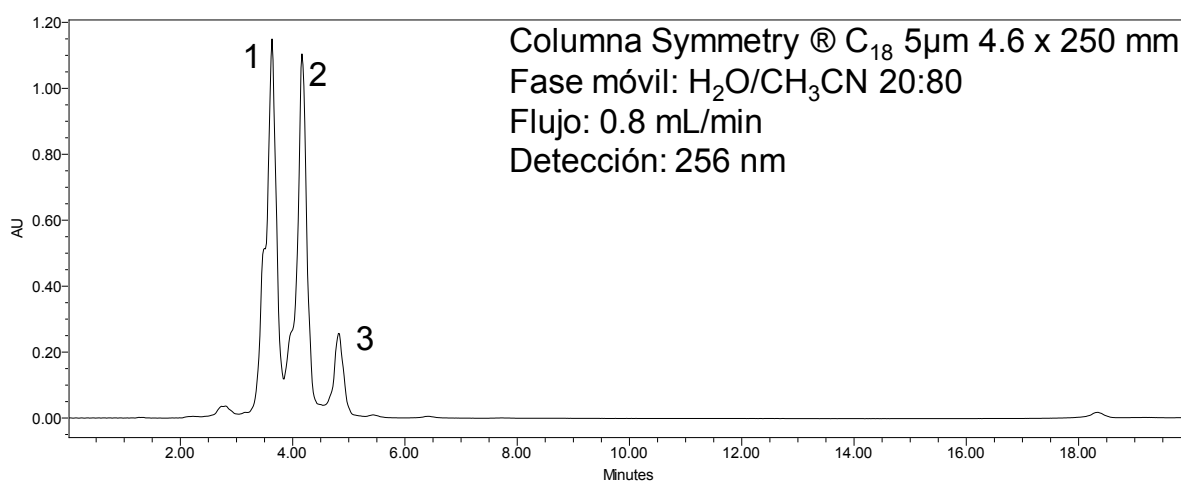
**Cuadro 3. Extractos obtenidos de *V. edulis* ssp. *procera***

Extracto	Cantidad (g)	Rendimiento (%)
Cloroformo	436.100	8.85
Etanol	255.300	4.86
Acuoso	2.366	2.36
Mezcla de valepotriatos	0.242	0.88

La mezcla de valepotriatos posee una consistencia aceitosa, presenta coloración amarilla y aroma *sui generis*.

## 8.2 Análisis químico

La mezcla de valepotriatos está conformada por tres sustancias identificadas por medio de CG/EM como valtrato, acevaltrato e isohomoacevaltrato. A través de CL se determinaron las proporciones relativas de los componentes de la mezcla (Cuadro 4).



**Figura 9.** Cromatograma de la mezcla de valepotriatos

**Cuadro 4. Componentes de la mezcla de valepotriatos**

Pico	Tiempo de retención (minutos)	Proporción (%)	
1	3.631	45.53	valtrato
2	4.171	44.34	acevaltrato
3	4.820	10.13	isohomoacevaltrato

La proporción de valtrato que encontramos en la mezcla de valepotriatos es consistente con los trabajos de Bos y colaboradores<sup>17</sup> y Occhiuto y colaboradores<sup>4</sup>, que encontraron mayor cantidad de valtrato en el extracto etanólico de *V. edulis ssp. procera* y *V. officinalis*, respectivamente. Incluso con Fuzzati y colaboradores<sup>14</sup> quienes trabajaron con *V. capense* y encontraron que el valtrato representa el 45% de los valepotriatos presentes en el extracto crudo de la raíz.

En la Figura 10 se muestra el patrón de fragmentación que se propone para el valtrato. El fragmento m/z 405 que se observa en el espectro de masas por impacto electrónico (Anexo 1, Figura 19) se forma cuando el isovalerilo de la posición 1 pierde un metilo terminal, convirtiendo al isovalerato en 2-butenoato. A su vez, el fragmento m/z 405 se divide en tres maneras distintas, en una de ellas resulta en el fragmento m/z 162. Para que esta estructura se forme, el fragmento m/z 405 pierde el isovalerato de la posición 7, lo cual genera un doble enlace endocíclico que causa la apertura del epóxido y la formación de un grupo aldehído a partir de este. El 2-butenoato de la posición 1 se pierde como 2-butenoilo, generándose un grupo hidroxilo en la posición 1. Por último, se pierde el acetato de metilo de la posición 4. Otra manera en que se puede dividir el fragmento m/z 405 es a través de la pérdida del 2-butenoato de la posición 1, en este caso se pierde como ácido 2-butenóico, y del epóxido de la posición 8, la pérdida del epóxido genera un doble enlace endocíclico entre los carbonos 7 y 8; también se pierde el isovalerilo de la posición 7, quedando un grupo hidroxilo en esta posición y un radical libre en el carbono 6, de esta manera se forma el fragmento m/z 205

La última forma en que se puede dividir el fragmento m/z 405 es a través de la pérdida de todos los sustituyentes, se pierde el isovalerato de la posición 7 y el 2-butenoato de la posición 1, se genera un doble enlace y un grupo aldehído como se explicó anteriormente y también se pierde acetilo de la posición 11; estas pérdidas generan el fragmento m/z 177.

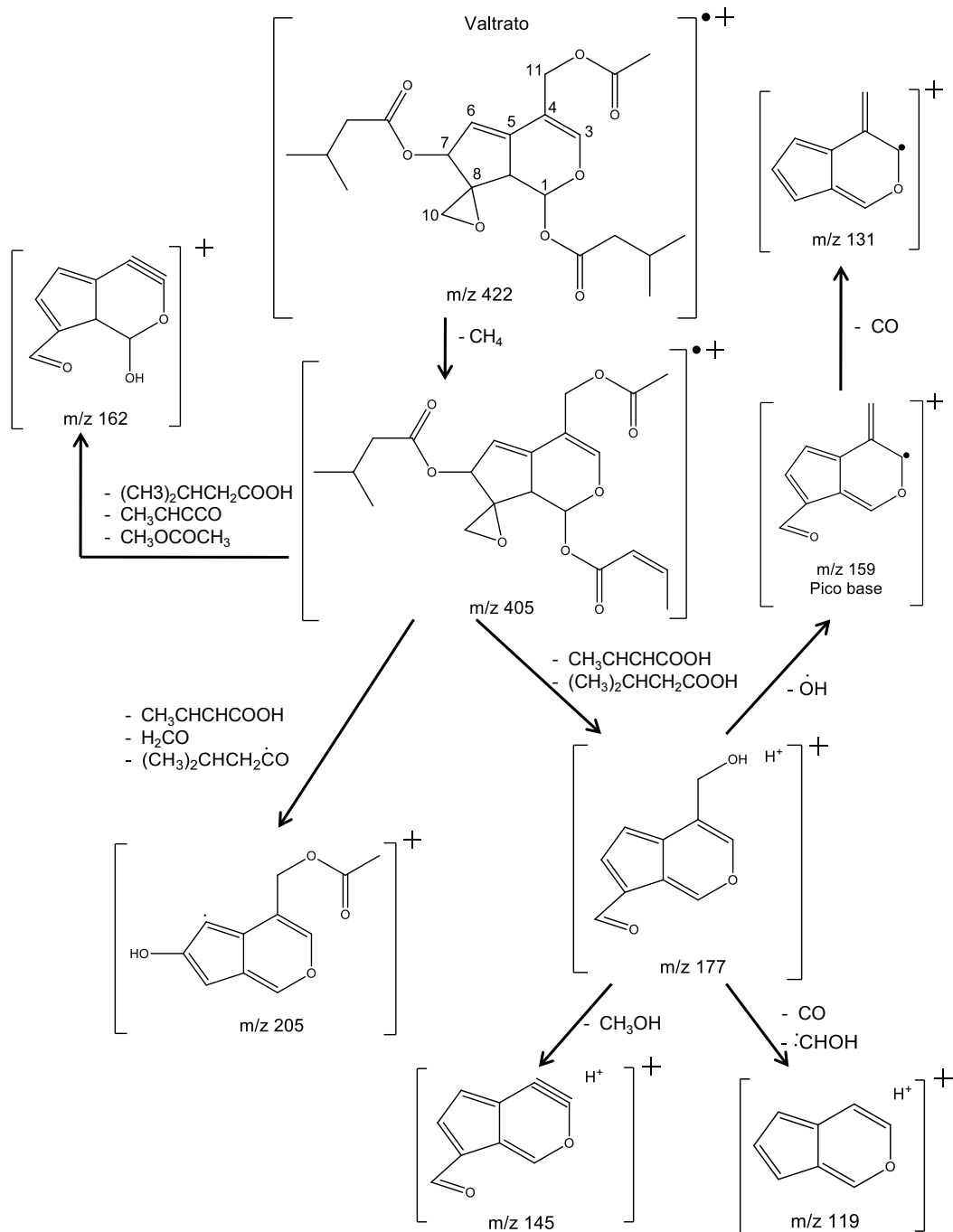
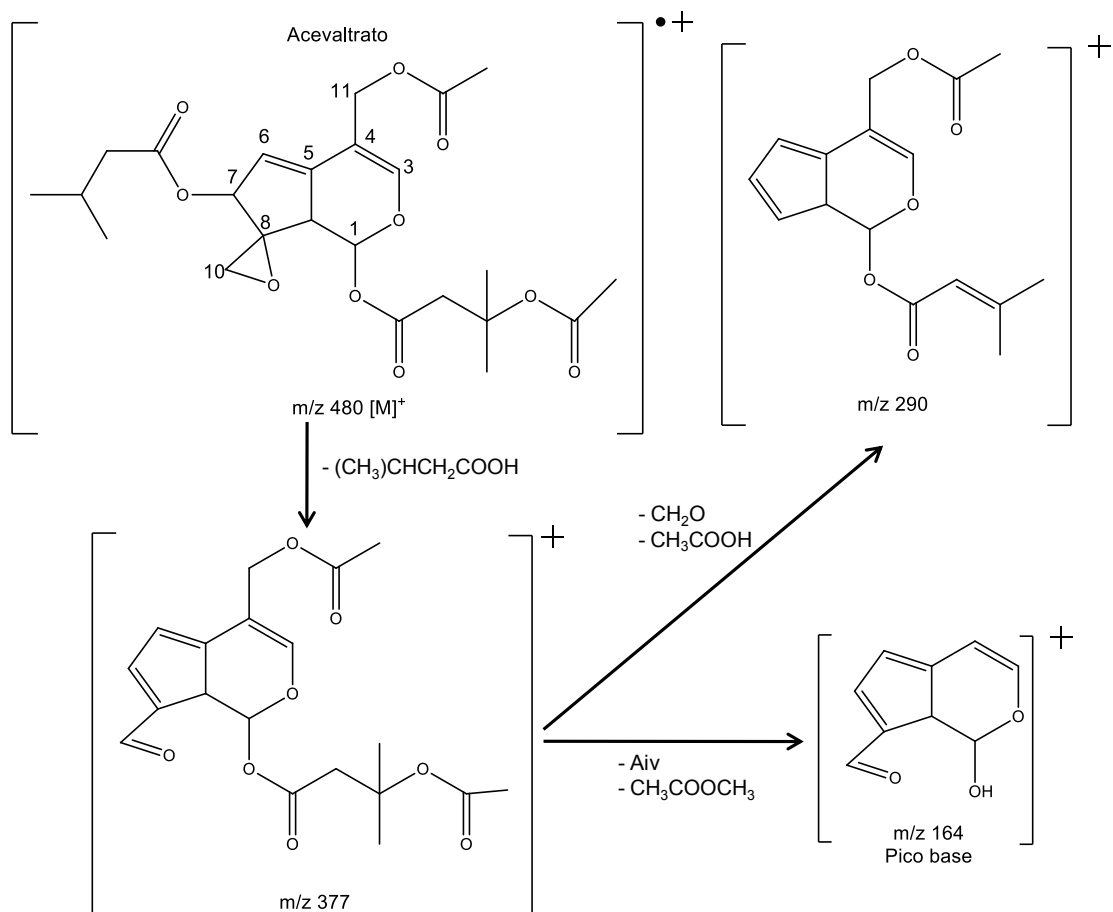


Figura 10. Patrón de fragmentación del valtrato

El fragmento  $m/z$  177 también puede dividirse de tres maneras distintas. La primera de ellas involucra la pérdida de metanol desde la posición 4, lo cual origina un triple enlace entre los carbonos 3 y 4; de esta manera se forma el fragmento  $m/z$  145. Otra vía que puede seguir la partición del fragmento  $m/z$  177 es a través de la pérdida del metanol desde la posición 4 y del aldehído de la posición 8, esto genera el fragmento  $m/z$  119. La tercera forma en que puede romperse el fragmento  $m/z$  177 es perdiendo el radical hidroxilo de la posición 11, esto forma un doble enlace entre los carbonos 4 y 11 y un radical sobre el carbono 3, resultando un fragmento  $m/z$  159, el cual es también, el pico base. La pérdida del aldehído de este fragmento origina el fragmento  $m/z$  131.

En el patrón de fragmentación del acevaltrato se propone que el fragmento  $m/z$  377, que se observa en el espectro de masas por impacto electrónico (Anexo 1, Figura 20), se forma por la pérdida del isovalerato de la posición 7, esta pérdida genera un doble enlace entre los carbonos 7 y 8 y la formación de un grupo aldehído como se explicó anteriormente. El fragmento  $m/z$  290 proviene del fragmento  $m/z$  377, se forma a partir de dos eventos: la pérdida del aldehído de la posición 8 y la pérdida del acetato que se encuentra en el sustituyente acetoxiisovalerilo de la posición 1, se forma un doble enlace y el acetoxiisovalerilo se convierte en 2-isovalerenilo. El fragmento  $m/z$  164, que es el pico base, también se genera a partir del fragmento  $m/z$  377, se forma a partir de la pérdida del acetoxiisovalerilo y del acetato de metilo de las posiciones 1 y 4, respectivamente (Figura 11).

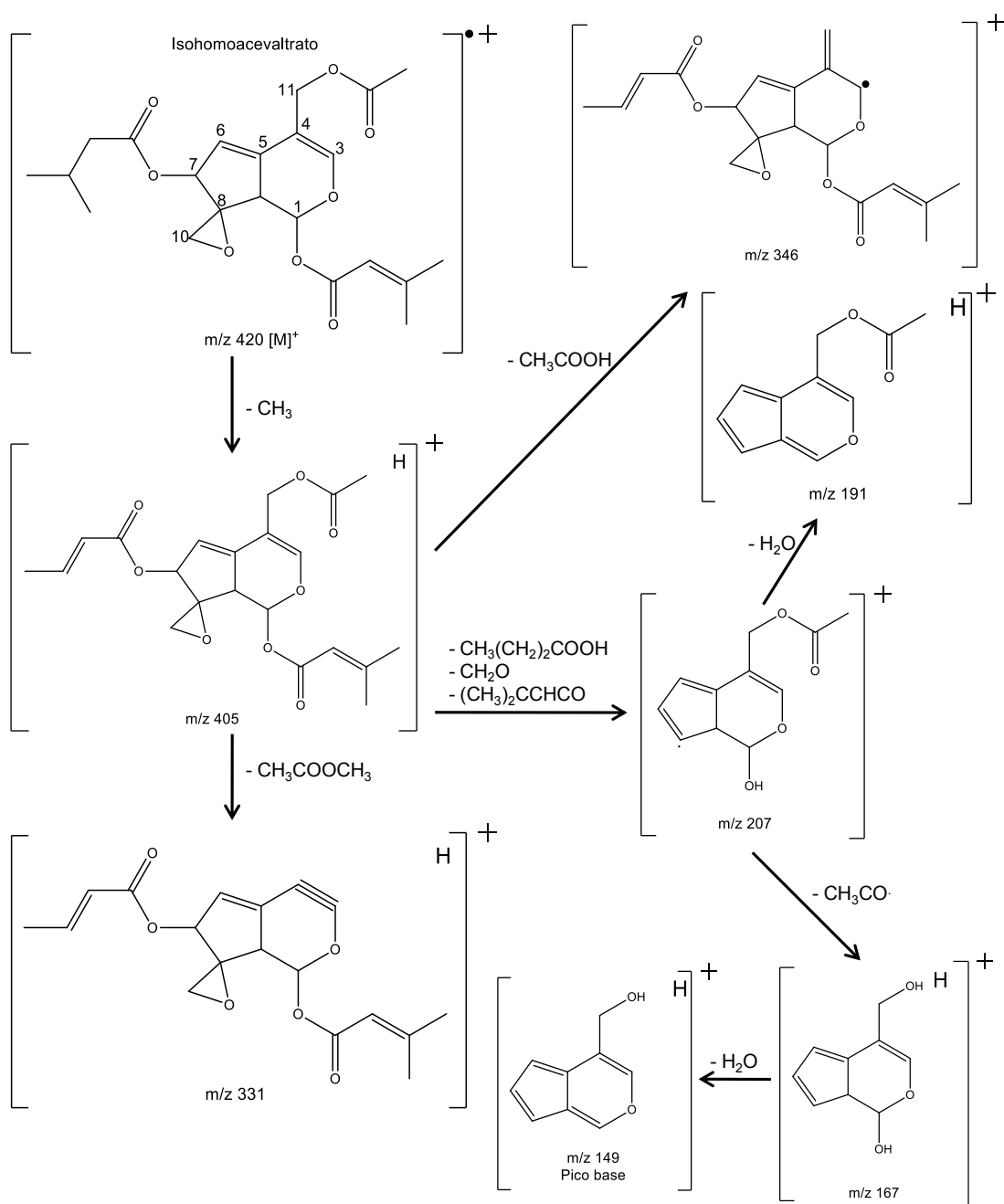




**Figura 11.** Patrón de fragmentación del acevaltrato. Aiv = acetoxivaleril

Para el isohomoacevaltrato (Su espectro de masas por impacto electrónico se encuentra en el Anexo 1, Figura 21) proponemos que el fragmento m/z 405 se origina cuando se forma un doble enlace en el isovalerilo de la posición 7 debido a la pérdida de un metilo. El fragmento m/z 405 da lugar a tres fragmentos: m/z 346, m/z 331 y m/z 207. El fragmento m/z 346 se forma cuando el fragmento m/z 405 pierde acetato mientras que el fragmento m/z 331 se origina por la pérdida del acetato de metilo desde la posición 4. Para formar el fragmento m/z 207 se requieren tres eventos en el fragmento m/z 405: Se debe perder el 3-metil-2-butenilo de la posición 1, el 2-butenilo y el epóxido de las posiciones 7 y 8, quedando un doble enlace endocíclico. A su vez, el

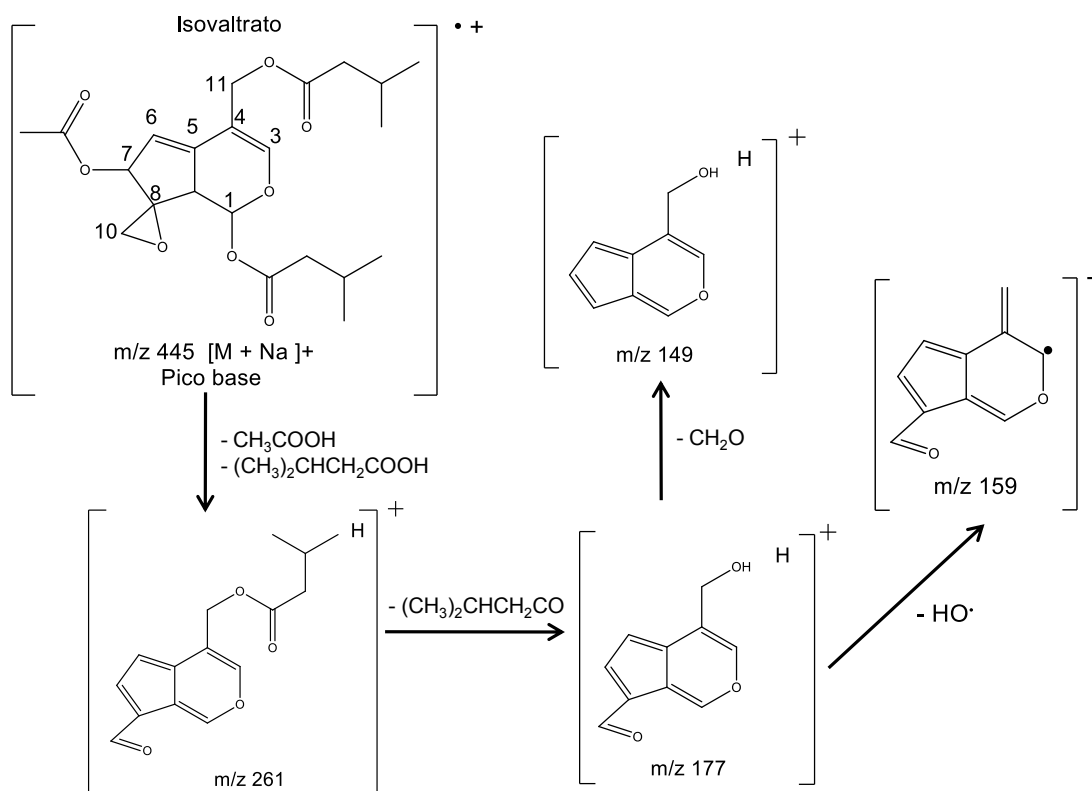
fragmento m/z 207 se divide de dos formas. En la primera, la pérdida del hidroxilo de la posición 1 genera un doble enlace y de esta manera se forma el fragmento m/z 191; en la segunda vía el fragmento m/z 207 pierde acetilo y se forma el fragmento m/z 167 y cuando este fragmento pierde el hidroxilo de la posición 1 se forma el fragmento m/z 149, fragmento que es el pico base (Figura 12).



**Figura 12.** Patrón de fragmentación del isohomoacevaltrato

Por otra parte, en el extracto de cloroformo se identificaron los valepotriatos: isoaltrato, 1-homovaltrato, isoaleroxiisovalerilhidroxidihidro-valtrato (IVHD-valtrato) e isodihidrovaltrato por CL/EM.

En el espectro de masas por electrospray del isoaltrato (Anexo 1, Figura 22) se observa el ión molecular formando un aducto con sodio en  $m/z$  445, para una fórmula molecular de  $C_{22}H_{30}O_8Na^+$ .

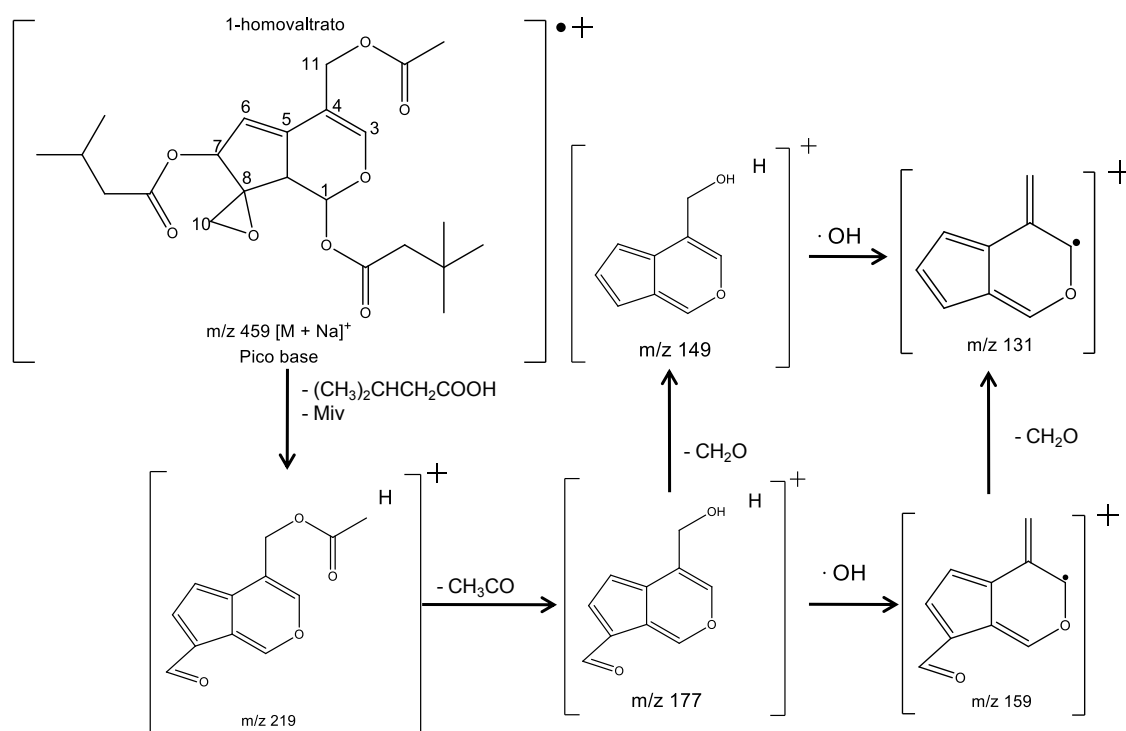


**Figura 13.** Patrón de fragmentación del isoaltrato

En el patrón de fragmentación que proponemos el fragmento  $m/z$  261 se forma cuando el ión molecular pierde isoaltrato y acetato de las posiciones 1 y 7; la pérdida de acetato genera un doble enlace entre los carbonos 7 y 8 que causa la apertura del epóxido y genera un grupo aldehído en la posición 8. Por otra parte, el fragmento  $m/z$  177 se forma a partir del fragmento  $m/z$  261, resulta de

la pérdida de isovalerilo; cuando el fragmento  $m/z$  177 pierde hidroxilo del carbono 11 y formaldehído del carbono 8 se obtienen, respectivamente, los fragmentos  $m/z$  159 y  $m/z$  149 (Figura 13).

De igual forma, en el espectro de masas por electrospray del 1-homovaltrato (Anexo 1, Figura 23) se observa el ión molecular formando un aducto con sodio en  $m/z$  459, para una fórmula molecular de  $C_{23}H_{32}O_8Na^+$ .

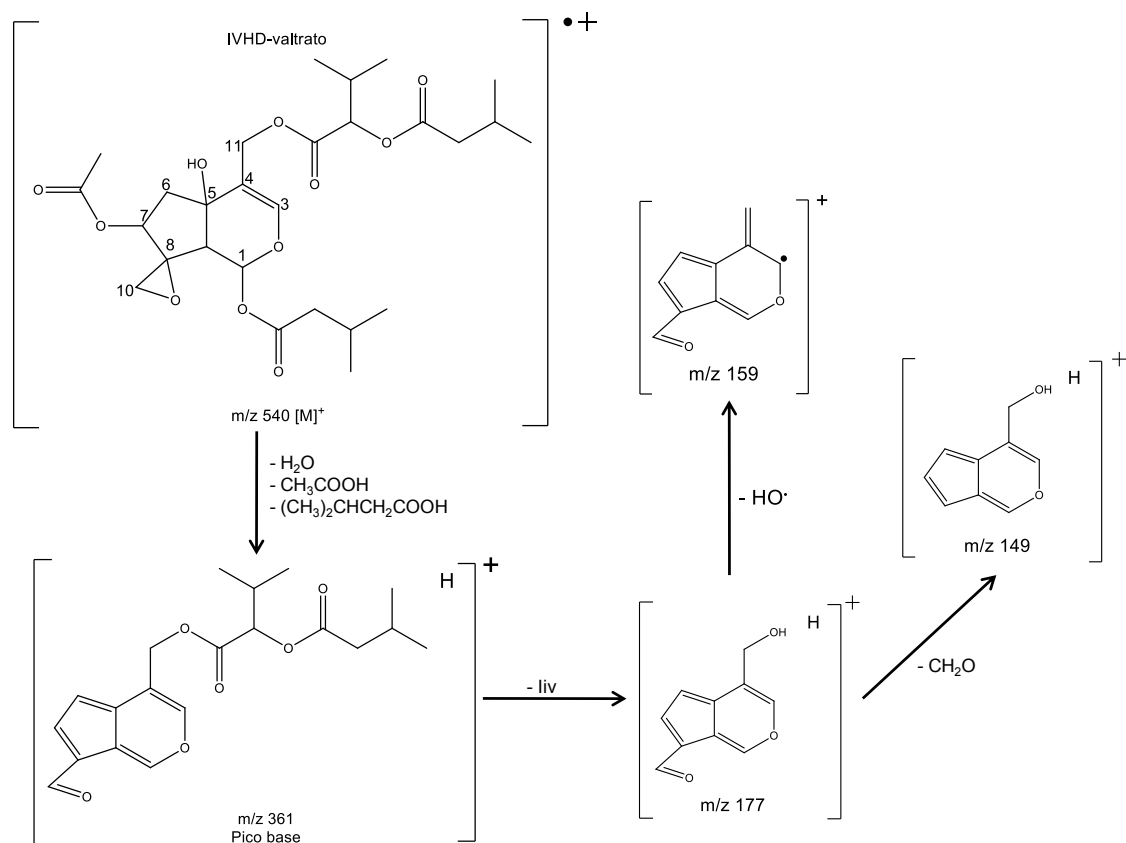


**Figura 14.** Patrón de fragmentación del 1-homovaltrato. Miv = metilisovalerato

El fragmento  $m/z$  219 sugiere que el ión molecular ha perdido metilisovalerato e isovalerato de las posiciones 1 y 7, respectivamente; la pérdida del isovalerato da lugar a la formación de un doble enlace entre los carbonos 7 y 8 y de un grupo aldehído en el carbono 8 de la manera en que se propuso anteriormente. El fragmento  $m/z$  177 proviene de la pérdida de acetilo en el fragmento  $m/z$  219. Cuando el fragmento  $m/z$  177 pierde el hidroxilo de la posición 11 y

formaldehído de la posición 8 se producen, respectivamente, los fragmentos  $m/z$  159 y  $m/z$  149. El fragmento  $m/z$  131 se puede formar a partir de los fragmentos  $m/z$  159 y  $m/z$  149 por la pérdida respectiva de formaldehído y de hidroxilo (Figura 14).

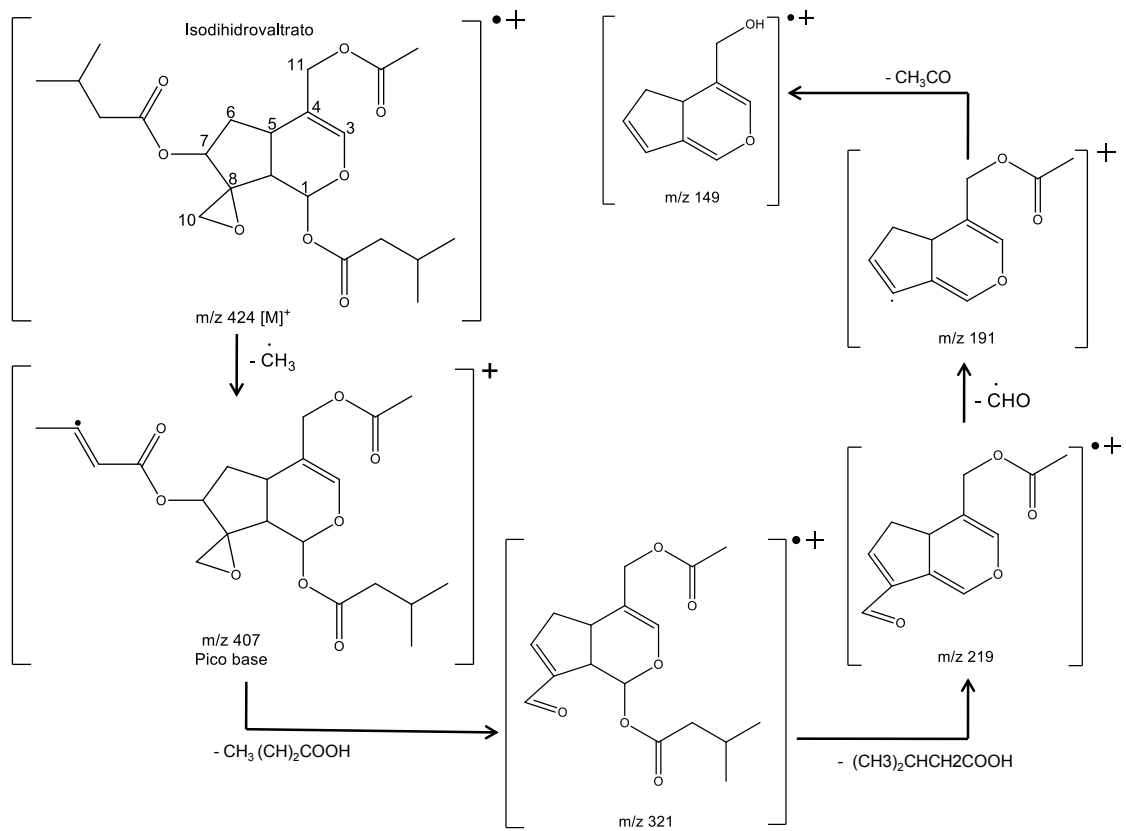
El patrón de fragmentación que se propone para el IVHD-valtrato se muestra en la Figura 15. En su espectro de masas por electrospray (Anexo 1, Figura 24) observamos el pico base en  $m/z$  361. Este fragmento se origina por la formación de un par de dobles enlaces alternados entre los carbonos 5 y 6 debido a la pérdida de hidroxilo y entre los carbonos 7 y 8 debido a la pérdida de acetato; la pérdida de acetato también provoca la apertura del epóxido y la formación de un grupo aldehído en el carbono 8 como se propuso anteriormente; a su vez, se pierde isovalerato de la posición 1 y se forma un doble enlace convirtiendo al dihidropirano en pirano, de esta manera se forma el fragmento que observamos en  $m/z$  361. El fragmento  $m/z$  177 proviene del fragmento  $m/z$  361, se forma por la pérdida de isovaleroxiisovaleril; por otra parte, los fragmentos  $m/z$  159 y  $m/z$  149 se forman cuando el fragmento  $m/z$  177 pierde, respectivamente, hidroxilo y formaldehído.



**Figura 15.** Patrón de fragmentación del IVHD-valtrato. liv = Isovaleroxiisovaleril

En el espectro de masas por electrospray del isodihidrovaltrato (Anexo 1, Figura 25) se observa el pico base en  $m/z$  407, se propone que este fragmento se forma cuando el isovalerato de la posición 7 pierde un grupo metilo terminal formándose un doble enlace en dicho isovalerato. El fragmento  $m/z$  321 se forma a partir del fragmento  $m/z$  407: se forma un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 debido a la pérdida del 2-butenoato, la formación de este doble enlace también causa la apertura del epóxido y la formación de un grupo aldehído a partir del epóxido. Cuando el fragmento  $m/z$  321 pierde el isovalerato del carbono 1 se forma un doble enlace en el dihidropirano, generando así el fragmento  $m/z$  219, cuando este fragmento pierde

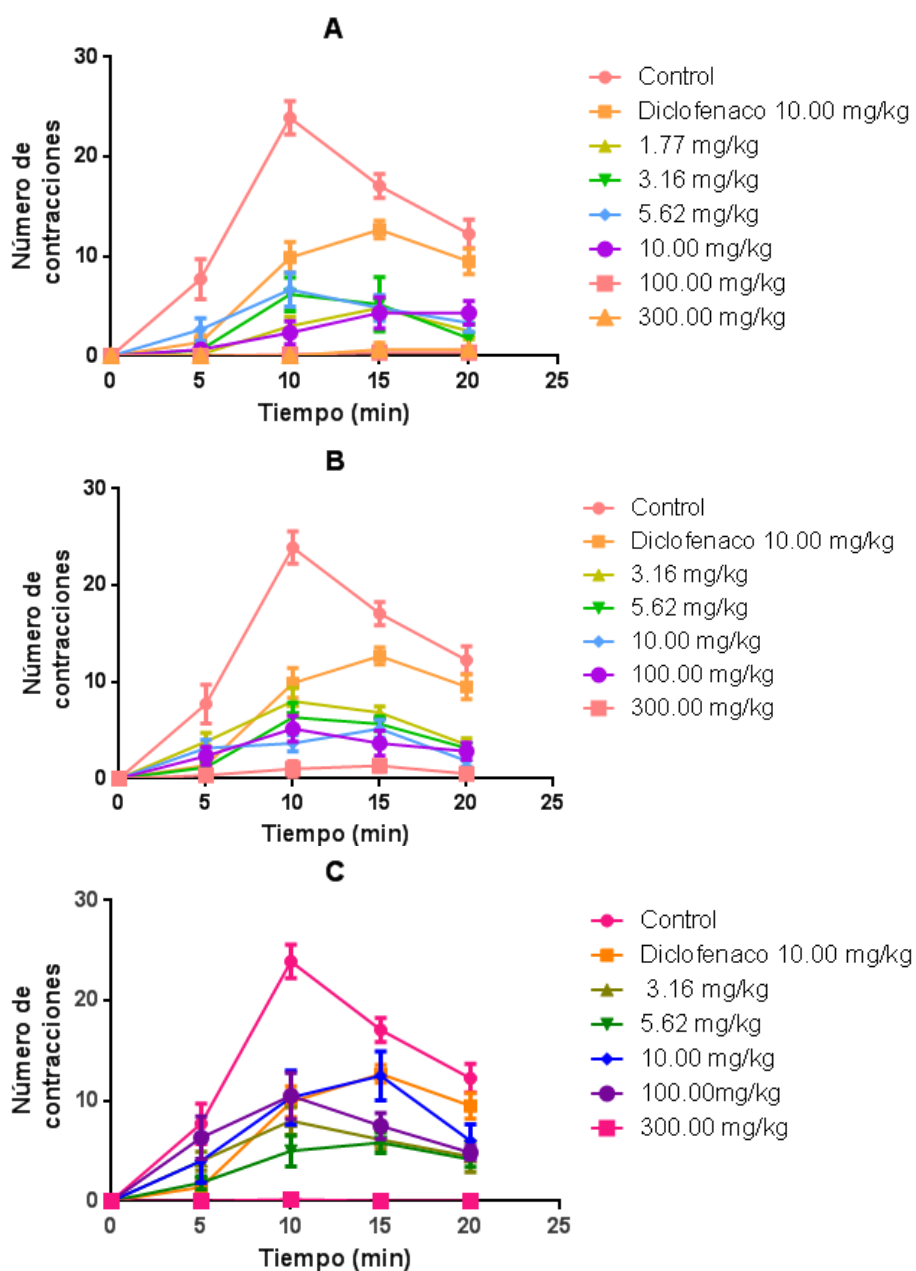
formaldehído se genera el fragmento m/z 191. El fragmento m/z 149 proviene de la pérdida de acetilo en el fragmento m/z 191 (Figura 16).



**Figura 16.** Patrón de fragmentación del Isodihidrovaltrato

### 8.3 Evaluación farmacológica

El curso temporal de las contracciones muestra el incremento de las contracciones tras la administración de ácido acético; entre los 10 y 15 minutos se observa el mayor número de contracciones y en el último periodo se observa la disminución de las mismas (Figura 17).



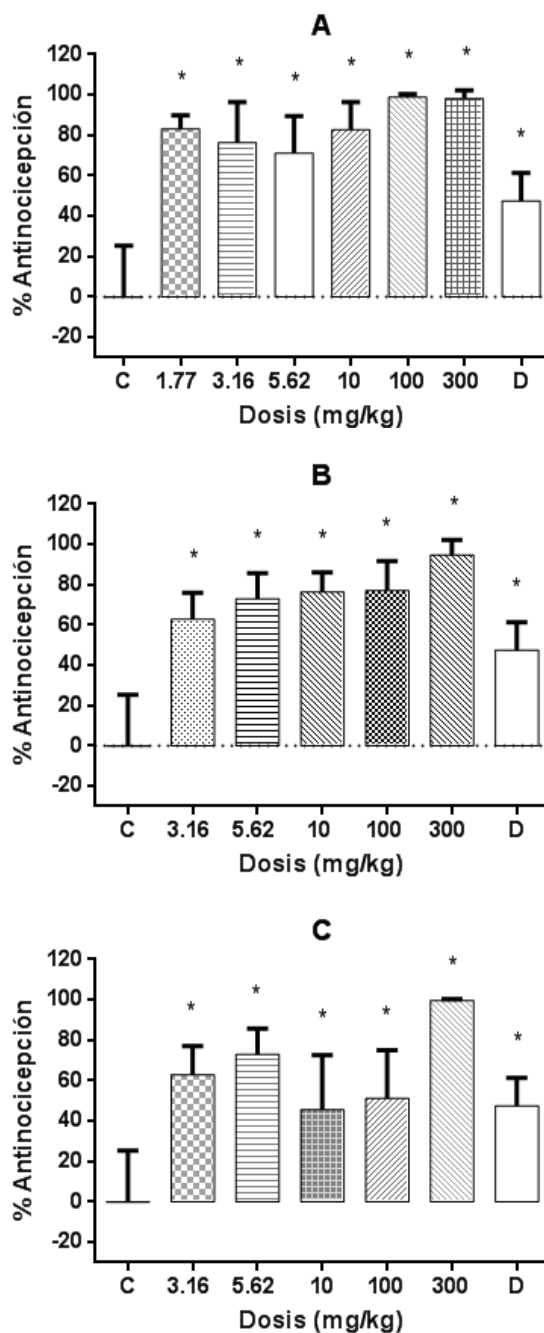
**Figura 17.** Curso temporal de las contracciones inducidas con ácido acético. Mezcla de valepotriatos (A). Extracto acuoso (B). Extracto etanólico (C). Los valores se reportan como la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo.



Con los datos del curso temporal se construyó la curva dosis-respuesta de la actividad antinociceptiva. Todos los tratamientos presentaron efecto antinociceptivo (Figura 18). Sobresale la actividad de la mezcla de valepotriatos (Figura 18 A) ya que todas las dosis evaluadas presentaron efecto antinociceptivo superior al 70% mientras que el fármaco de referencia (evaluado a una dosis de 10 mg/kg) presentó 47.6% de efecto antinociceptivo. Incluso la dosis más baja de la mezcla de valepotriatos (1.77 mg/kg) tuvo un porcentaje de antinocicepción superior al 80%.

En el extracto acuoso (Figura 18 B), la dosis de 3.16 mg/Kg presentó efecto antinociceptivo similar al fármaco de referencia mientras que el resto de las dosis alcanzaron una eficacia mayor que dicho fármaco, presentando porcentajes de antinocicepción superiores al 70%. Por otra parte, en el extracto etanólico (Figura 18 C), las dosis de 5.62 y 300 mg/Kg presentaron mayor eficacia que el diclofenaco mientras que el resto de las dosis presentaron actividad similar al fármaco de referencia. No se encontró relación dosis-efecto en ninguno de los tratamientos evaluados, al menos, en el rango de dosis que se probaron.

La actividad analgésica que se demostró para *V. edulis* ssp. *procera* concuerda con Sah y colaboradores<sup>40</sup>, que demostraron el efecto antinociceptivo del extracto de diclorometano de *V. waliichii*. Adicionalmente, el trabajo que se presenta aporta evidencia que señala a los valepotriatos como los compuestos responsables del efecto antinociceptivo de *V. edulis* ssp. *procera* y posiblemente de las otras valerianas.



**Figura 18.** Actividad antinociceptiva de la mezcla de valepotriatos (A), extracto acuoso (B) y extracto etanólico (C). Los valores se reportan como la media  $\pm$  EEM de al menos seis animales por grupo. Los datos fueron analizados por medio de una ANOVA seguido de una prueba de Dunnett. Los asteriscos indican valores estadísticamente significativos respecto al control. \* $p < 0.05$ . C= control. D = diclofenaco.

La prueba de contracciones inducidas con ácido acético es un modelo típico de dolor inflamatorio, este ha sido usado ampliamente para detectar actividad analgésica y/o antiinflamatoria<sup>40</sup>, la actividad analgésica que se detecta es de

tipo periférica<sup>41</sup>. Este modelo presenta una buena sensibilidad, sin embargo, presenta poca especificidad; no obstante, se puede sortear este inconveniente corroborando la actividad analgésica detectada con otros modelos de nocicepción<sup>35</sup>. El dolor generado por este modelo se debe al incremento de diversos mediadores endógenos, como prostaglandinas, serotonina e histamina en los fluidos peritoneales<sup>41</sup>, encargados de sensibilizar las terminaciones nerviosas.

La actividad analgésica de *V. edulis* ssp. *procera* encontrada en el presente trabajo probablemente se deba a la inhibición de la liberación de mediadores inflamatorios o, con base el trabajo de Gilani y colaboradores<sup>42</sup>, posiblemente que involucre la apertura de canales  $K_{ATP}$ .

Los resultados de este trabajo sustentan la utilidad de la *V.edulis* ssp. *procera* en el tratamiento de dolor de tipo visceral.

## 9.- CONCLUSIONES

- Se obtuvo una mezcla de valepotriatos conformada por valtrato, acevaltrato e isohomoacevaltrato. A su vez, en el extracto de cloroformo se identificaron isovaltrato, 1-homovaltrato, IVHD-valtrato e isodihidrovaltrato.
- Los extractos acuoso, etanólico y la mezcla de valepotriatos poseen actividad antinociceptiva. Sobresale la actividad de la mezcla de valepotriatos ya que todas las dosis evaluadas fueron inclusive más eficaces que el diclofenaco utilizado como fármaco de referencia.
- Los resultados indican que los valepotriatos son los compuestos responsables de la actividad analgésica de *V. edulis ssp. procera*.
- La técnica de cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas por ionización electrospray (ESI) o la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas por ionización de impacto electrónico (IE) son técnicas adecuadas para caracterizar a los valepotriatos.

## **10.- PERSPECTIVAS**

- Optimizar el método de obtención de la mezcla de valepotriatos.
- Separar los componentes de la mezcla de valepotriatos.
- Verificar la actividad antinociceptiva de los valepotriatos y/o la mezcla de estos a través de otros modelos de dolor de tipo visceral.
- Evaluar toxicidad aguda y crónica de valepotriatos y/o mezcla de valepotriatos.

## 11.-REFERENCIAS

1. Upton R. editor. Valerian root. *Valeriana officinalis* Analytical, Quality Control, and Therapeutic Monograph. En: American Herbal Pharmacopoeia™ and Therapeutic Compendium. USA. AHP. 1999.
2. Houghton PJ. The scientific basis for the reputed activity of Valerian. *Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics*. 1999; 51: 505-512.
3. Peng-Cheng W, Xin-Hui R, Chen R, Huai-Rong L, Quing-Yung M, Yu-Qing L, et al. Sesquiterpenoids and lignans from the roots of *Valeriana officinalis* L. *Chemistry & Biodiversity*. 2011; 8: 1908-1913.
4. Occhiuto F, Pino A, Palumbo DR, Samperi S, De Pasquale R, Sturlese E, et al. Relaxing effects of *Valeriana officinalis* extracts on isolated human non-pregnant uterine muscle. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2009; 61: 251-256.
5. Bettero GM, Salles L, Figueira RRM, Von Poser G, Rates SMK, Noël F, et al. *In vitro* effect of valepotriatos isolated from *Valeriana glechomifolia* on rat P-type ATPases. *Planta Medica*. 2011; 77: 1702-1706.
6. Bos R, Woerdenbang HJ, Pras N. Determination of valepotriatos. *Journal of Chromatography A*. 2002; 967: 131-146.
7. Castillo P, Zamilpa A, Márquez J, Hernández G, Lara M, Álvarez L. Comparative study of differentiation levels and valepotriate content of *in vitro* cultures and regenerated and wild plants of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *Journal of Natural Products*. 2002; 65: 573-575.
8. Bos R, Woerdenbag HJ, Hendriks H, Zwaving JH, De Smet PAGM, Tittel G, et al. Analytical aspects of phytotherapeutical valerian preparations. *Phytochemical analysis*. 1996; 7: 143-151.

9. Taibi D, Landis A, Petry H, Vitiello M. A systematic review of valerian as a sleep aid: safe but not effective. *Sleep Medicine Reviews*. 2007; 11: 209-203.
10. Blumenthal M, Ferrier GK, Cavaliere C. Total of herbal supplements in United States show steady growth. *HerbalGram*. 2006; 71: 64-66.
11. Patocka J, Jakl J. Biomedically relevant chemical constituents of *Valeriana officinalis*. *Journal of Applied Biomedicine*. 2010; 8: 11-18
12. Navarrete A, Avula B, Young-Whan C. Chemical fingerprinting of *Valeriana* species: simultaneous determination of valerénico acids, flavonoids and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *Journal of Association of Official Analytical Chemist*. 2006; 89: 8-15.
13. Maurmann N, Reolon GK, Rech SB, Fett-Neto AG, Roesler R. A valepotriate fraction of *Valeriana glechomifolia* shows sedative and anxiolytic properties and impairs recognition but not aversive memory in mice. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2011; 2011: 1-7.
14. Fuzzati N, Msonthi JD, Mavi S, Molleyres LP. Isolation of antifungal valepotriates from *Valeriana capense* and the search for valepotriatos in crude *Valeriana* extracts. *Phytochemical Analysis*. 1996; 7: 76-85.
15. Salles LA, Silva AL, Rech SB, Zanatta N, von Poser GL. Constituents of *Valeriana glechomifolia* Meyer. *Biochemical systematics and Ecology*. 2000; 28: 907-910.
16. Müller LG, Salles LA, Sakamoto S, Stein AC, Cargnin ST, Cassel E, et al. Effect of storage time and conditions on the diene valepotriates

- content of the extract of *Valeriana glechomifolia* obtained by supercritical carbon dioxide. *Phytochemical Analysis*. 2012; 23: 222-227.
17. Bos R, Hendriks H, Scheffer JJC, Woerdenbag HJ. Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine*. 1998; 5: 219-225.
  18. Oliva I, González-Trujano ME, Arrieta J, Enciso-Rodríguez R, Navarrete A. Neuropharmacological profile of hydroalcohol extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research*. 2004; 18: 290-296.
  19. Leuschner J, Mueller J, Rudmann M. Characterization of the central nervous depressant activity of a commercially available valerian root extract. *Arzneimittel-Forschung*. 1993; 43: 638-641.
  20. Herrera-Arellano A, Luna-Vilegas G, Cuevas-Uriostegui ML, Álvarez L, Vargas-Pineda G, Zamilpa-Álvarez A, et al. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized extract in patients suffering from insomnia. *Planta Medica*. 2001; 67: 695-699.
  21. Fugh-Berman A, Cott JM. Dietary supplements and natural products as psychotherapeutic agents. *Psychosomatic Medicine*. 1999; 61: 712-728.
  22. Hazelhoff B, et al. Antispasmodic effects of valeriana compounds: an *in vivo* and *in vitro* study on the guinea-pig ileum. *Archives Internationales De Pharmacodynamie Et De Therapie*. 1982; 257: 274-287.
  23. Estrada-Soto S, Rivera-Leyva J, Ramírez-Espinosa JJ, Castillo-España P, Aguirre-Crespo F, Hernández-Abreu O. Vasorelaxant effect of *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Valerianaceae) and its mode of action as



- calcium channel blocker. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2010; 62: 1167-1174
24. Enciso-Rodríguez R. Micropropagation of *Valeriana edulis* ssp. *procera*. *Planta Medica*. 1997; 63: 274-275.
25. Rzedowski J, Rzedowski GC. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Valerianaceae. Instituto de Ecología A.C. Fas. 112. 2003. 1-65
26. *Valeriana edulis* Nutt subsp. *procera* [Monografía en internet] México: Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana; 2009. [Consultado 11 de abril de 2014]. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Valeriana&id=7506>
27. Castillo P, Márquez J, Rubluo A, Hernández M, Lara M. Plant regeneration from callus and suspension cultures of *Valeriana edulis* ssp. *procera* via simultaneous organogenesis and somatic embryogenesis. *Plant Science*. 2000; 151: 115-119.
28. Garland E. Pain processing in the human nervous system: A selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. *Primary Care: Clinics in Office Practice*. 2012; 39: 561-571.
29. Merskey H, Albe-Fessard D.G, Bonica JJ, Carmon A, Dubner R, Kerr FWJ, Lindblom U, et al. Pain terms: a list with definitions and notes on usage. *Pain*. 1979; 6: 249-252.
30. Woolf CJ, Costigan M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1999; 96: 7723-7730.

31. Steeds CE. The anatomy and physiology of pain. *Surgery (Oxford)*. 2013; 31: 49-53.
32. Costigan M, Woolf CJ. Pain: molecular mechanisms. *The Journal of Pain*. 2000; 1: 35-44.
33. Gold M, Gebhart G. Nociceptor sensitization in pain pathogenesis. *Nature Medicine*. 2010; 11: 1248-1257.
34. Grosser T, Smyth E, FitzGerald A. Antiinflamatorios, antipiréticos y analgésicos; farmacoterapia de la gota. En: Brunton LL. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 12<sup>a</sup> ed. México: McGraw Hill; 2012. p. 958-1004.
35. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. Animal models of nociception. *Pharmacological reviews*. 2001; 53: 597-652.
36. Carballo-Villalobos AI, González-Trujano ME, López-Muñoz FJ. Evidence of mechanism of action of anti-inflammatory/antinociceptive activities of acacetin. *European Journal of Pain*. 2014; 18: 396-405.
37. Hird SJ, Lau BPY, Schuhmacher R, Krska R. Liquid chromatography-mass spectrometry for the determination of chemical contaminants in food. *Trends in Analytical Chemistry*. 2014; 59: 59-72.
38. Cech NB. Mass spectrometry for natural products research: challenges, pitfalls and opportunities. *LC-MS North America*. 2013; 31: 938-947.
39. Backlund A, Moritz T. Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. *Biochemical systematics and ecology*. 1998; 26: 309-335.
40. Sah SP, Mathela SC, Chopra K. Elucidation of possible mechanism of analgesic action of *Valeriana wallichiii* DC chemotype (patchouli alcohol)

- in experimental animal models. *Indian Journal of Experimental Biology*. 2010; 48: 289-293.
41. Maham M, Moslemzadeh H, Jaliladeh-Amin G. Antinociceptive effect of the essential oil of tarragon (*Artemisia dracunculus*). *Pharmaceutical Biology*. 2014; 52: 208-212.
42. Gilani AH, Khan A, Jabeen Q. Antiespasmodic and blood pressure lowering effects of *Valeriana wallichii* are mediated through K<sup>+</sup> channel activation. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100: 347-352.

# ANEXO 1. ESPECTROS DE MASAS

AHAN29-3 #540 RT: 12.46 AV: 1 SB: 40 13.04-13.94 NL: 1.52E6  
T: + c EI Full ms [ 32.50-600.50]

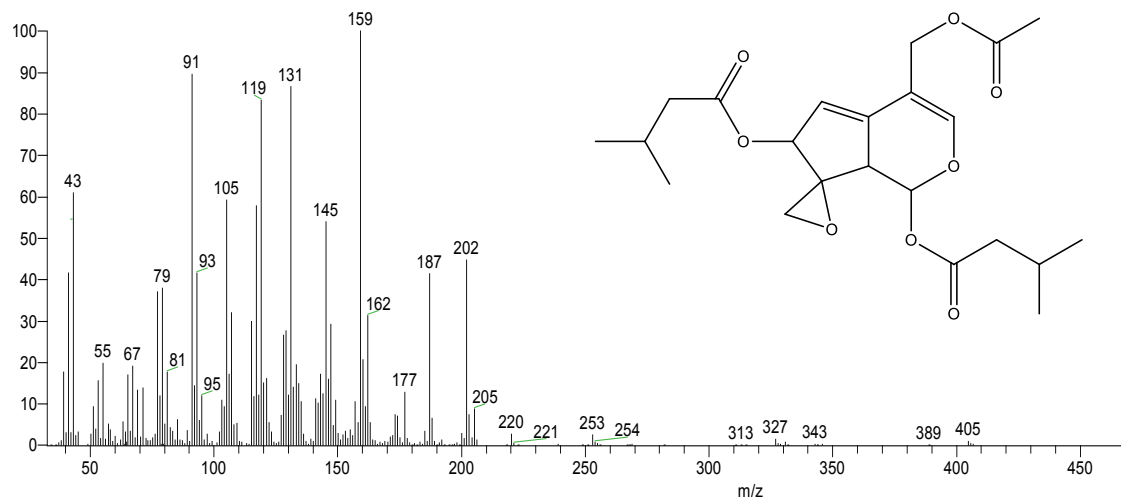


Figura 19. Espectro de masas por IE del valtrato

AHAN29-3 #789 RT: 18.21 AV: 1 SB: 40 18.20-19.16 NL: 1.26E6  
T: + c EI Full ms [ 32.50-600.50]

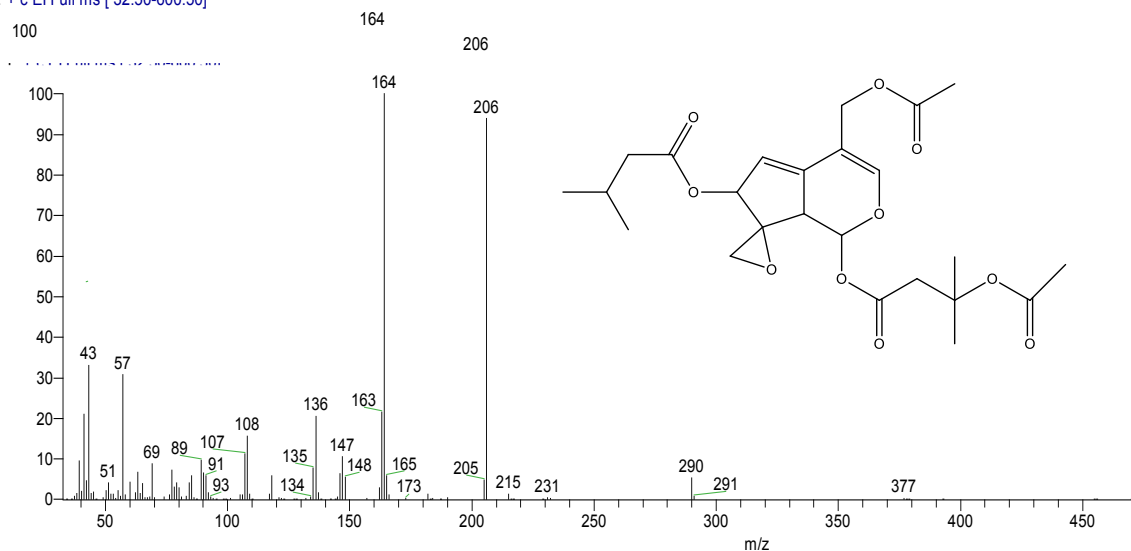


Figura 20. Espectro de masas por IE del acevaltrato

AHAN29-3 #917 RT: 21.16 AV: 1 SB: 39 19.87-20.75 NL: 1.27E7  
T: + c EI Full ms [ 32.50-600.50]

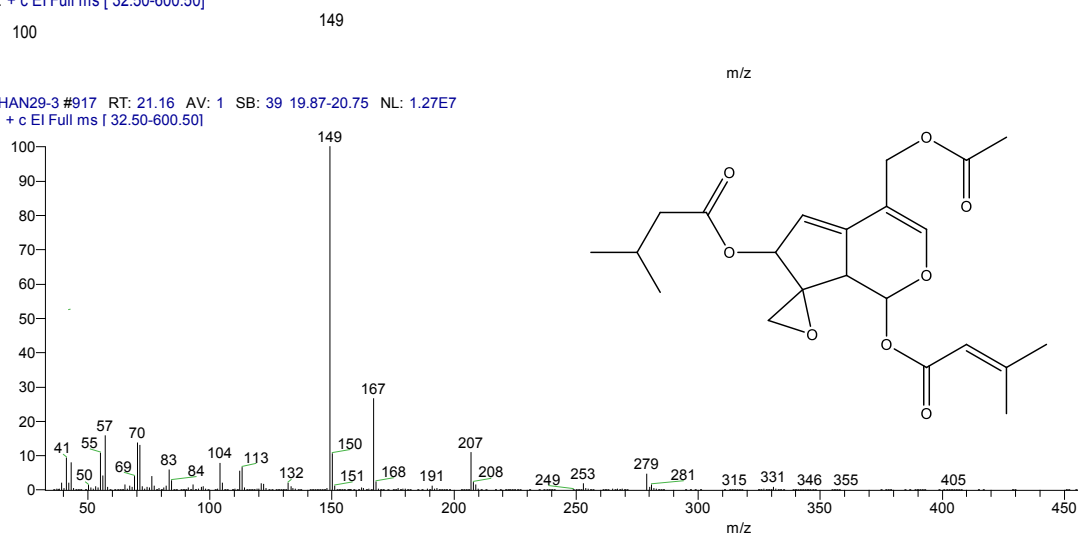


Figura 21. Espectro de masas por IE del isohomoacevaltrato



Figura 22. Espectro de masas por ESI del isovaltrato

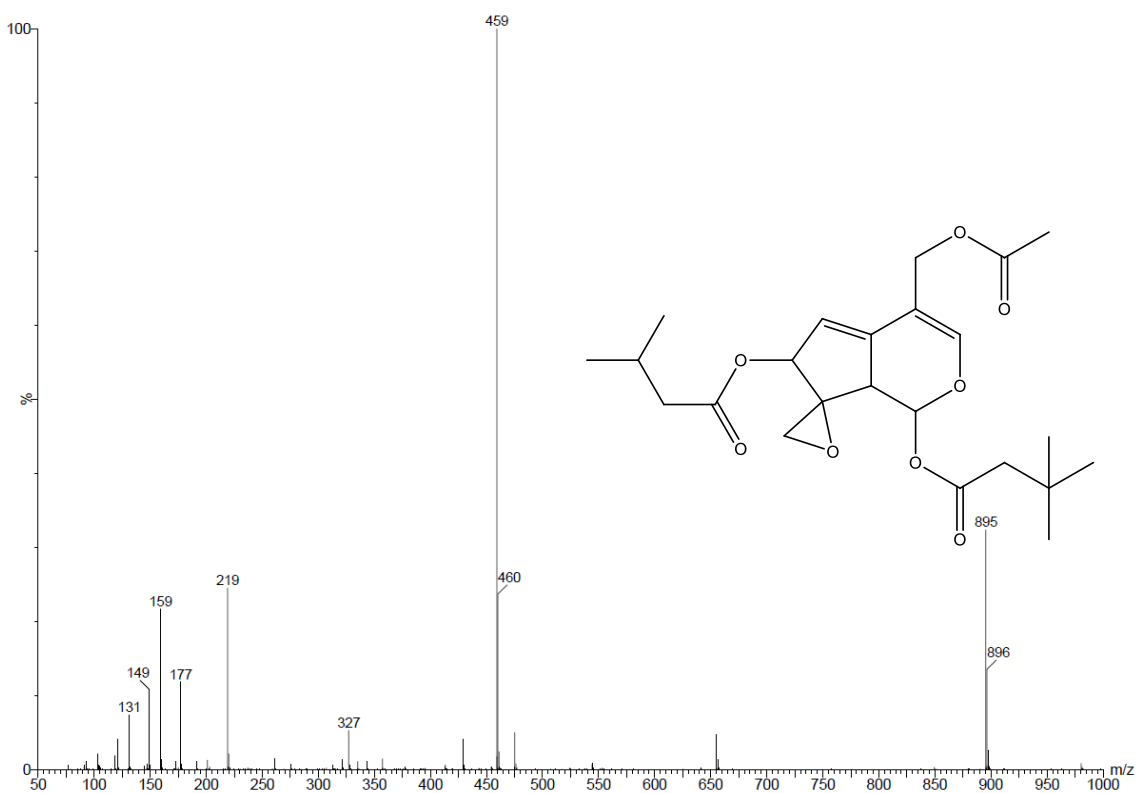
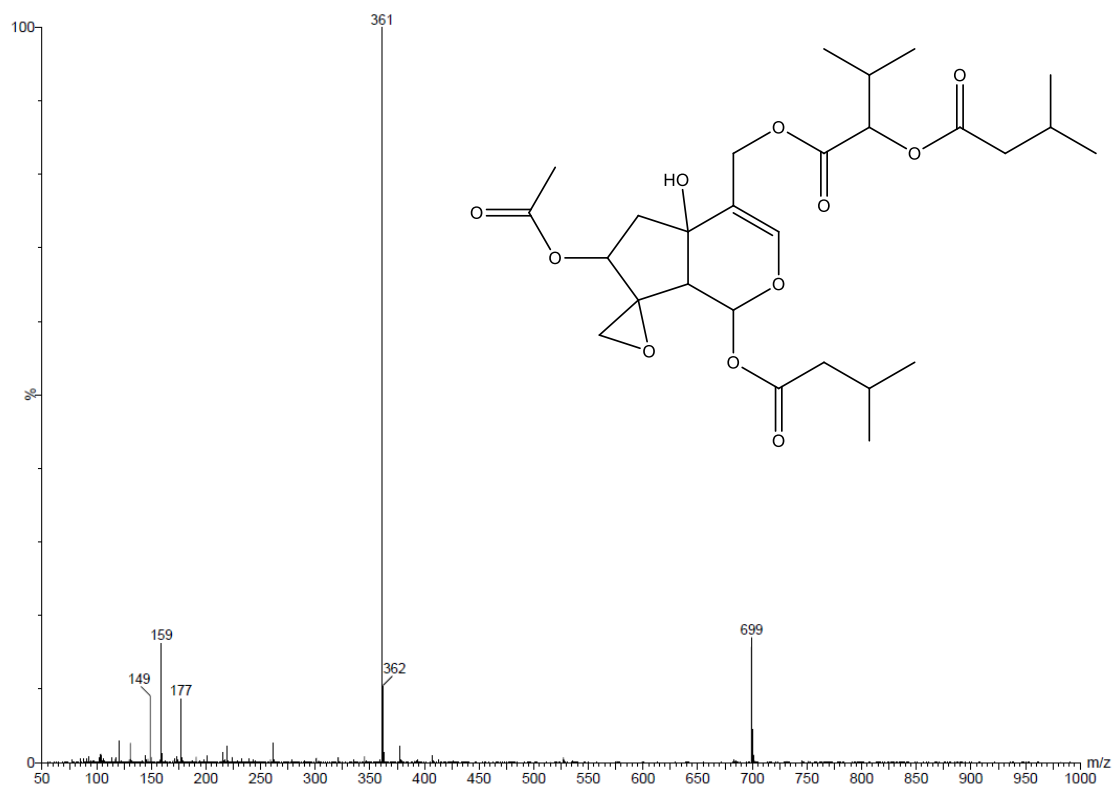
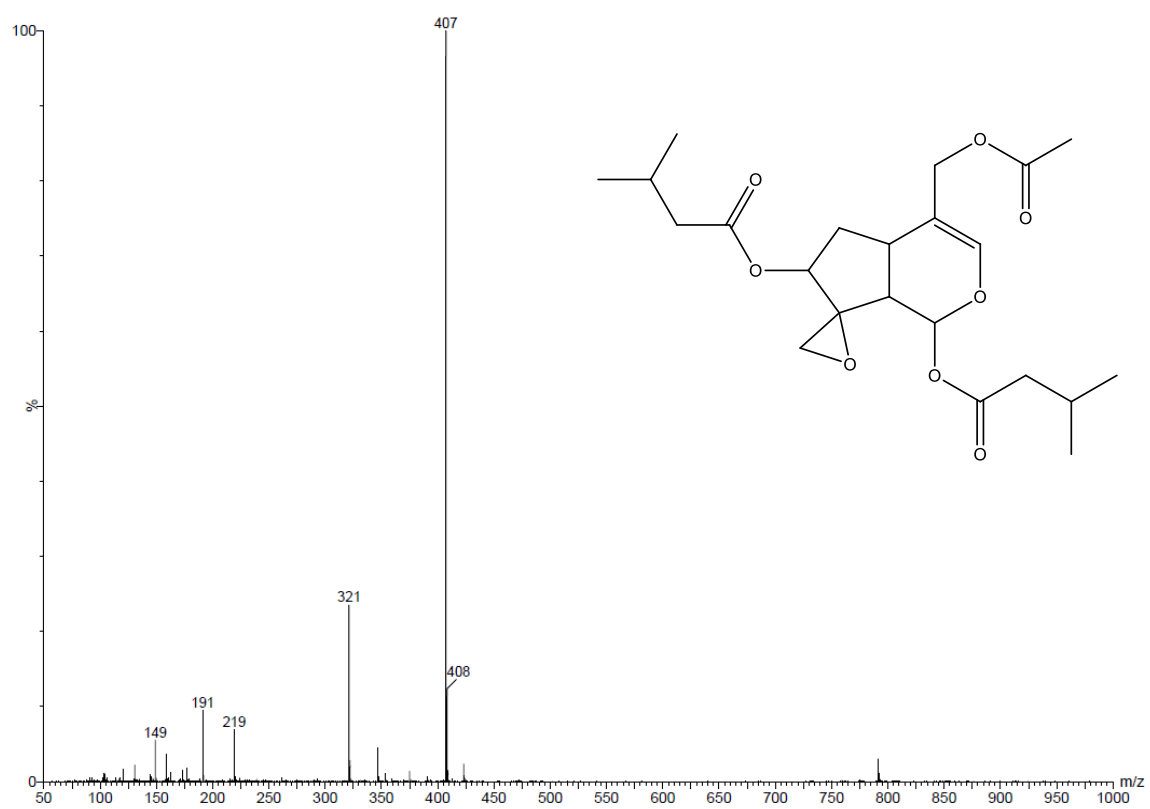


Figura 23. Espectro de masas por ESI del 1-homovaltrato



**Figura 24.** Espectro de masas por ESI del IVHD valtrato



**Figura 25.** Espectro de masas por ESI del isodihidrovaltrato