



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Aislamiento e identificación de un compuesto marcador para el control de calidad, seguridad y eficacia de *Valeriana edulis ssp procera*

TESIS

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA

M. en C. Alejandro Alfaro Romero

Dr. Andrés Navarrete Castro
Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México, 2020
Cd. Mx. Octubre



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“Aislamiento e identificación de un compuesto marcador para el control de calidad, seguridad y eficacia de *Valeriana edulis* ssp *procera*”

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

M. en C. Alejandro Alfaro Romero

Dr. Andrés Navarrete Castro
Facultad de Química, UNAM



Ciudad de México, 2020

Jurado asignado

Presidente:	Dr. Manuel Jiménez Estrada
Primer Vocal:	Dra. Rachel Mata Essayag
Segundo vocal:	Dr. Ricardo Reyes Chilpa
Tercer vocal:	Dra. Araceli Evangelina Chávez Piña
Secretario:	Dra. María Isabel Aguilar Laurents
Asesor:	Dr. Andrés Navarrete Castro
Sustentante:	M. en C. Alejandro Alfaro Romero

Lugar donde se realizó el presente trabajo de investigación:

Laboratorio 126, Conjunto E, Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero otorgado durante la realización de este trabajo, y por la beca otorgada para la realización de mis estudios de doctorado (número de becario 227099).

Este trabajo fue financiado por los proyectos PAIP 500-9143, DGAPA PAPIIT IN 218320 y CONACYT A1-S-9698.

A la Facultad de Química y al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Químicas de la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación académica y profesional.

Al Dr. Andrés Navarrete, y a mi comité tutor, el Dr. Mariano Martínez Vázquez y al Dr. Eduardo Rodríguez de San Miguel, por su valioso asesoramiento durante la realización de este proyecto.

A mi jurado, Dra. Rachel Mata Essayag, Dra. Isabel Aguilar Laurents, Dra. Araceli E. Chávez Piña, Dr. Manuel Jiménez Estrada y Dr. Ricardo Reyes Chilpa, por las valiosas aportaciones que hicieron al revisar este trabajo.

A los Dr. José Luis Balderas López y Dr. José Fausto Rivera Cruz por el apoyo técnico otorgado.

Al personal de la USAI, que me apoyo en la realización de las técnicas espectrométricas y espectroscópicas.

A mis compañeros del Laboratorio L-126, por sus consejos, observaciones y amistad.

Índice

	Página
1.Introducción	1
2.Antecedentes	2
2.1 Medicina herbolaria.	2
2.2 Generalidades sobre <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i> (<i>Caprifoliaceae</i>).	7
2.2.1 Aspectos taxonómicos y distribución geográfica.	7
2.2.2 Aspectos etnofarmacológicos.	9
2.2.3 Constituyentes químicos y actividad biológica.	10
3.Hipótesis y Objetivos	15
3.1 Hipótesis	15
3.2 Objetivos	15
4. Materiales y métodos.	16
4.1 Material vegetal.	16
4.2 Pruebas Farmacopéicas para la raíz de <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i> .	17
4.2.1 Control fisicoquímico de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i> .	18
4.2.1.1 Caracterización macroscópica y microscópica	18
4.2.1.2 Pruebas de identidad cromatográfica.	18
4.2.1.2.1 Identidad en capa fina.	18
4.2.1.2.2 Identidad en cromatografía de líquidos de alta resolución.	19
4.2.1.2.3 Identidad en cromatografía de gases.	20

4.2.1.3 Determinación de materia extraña.	20
4.2.1.4 Determinación de cenizas.	21
4.2.1.4.1 Contenido total de cenizas	21
4.2.1.4.2 Contenido de cenizas insolubles en ácido.	22
4.2.1.4.3 Contenido de cenizas solubles en agua.	22
4.2.1.5 Determinación de material extraíble.	22
4.2.1.5.1 Método I (Extracto acuoso)	22
4.2.1.5.2 Método I (Extracto hidroalcohólico).	23
4.2.1.6 Determinación de agua y material volátil	23
4.2.1.6.1 Método I (Agua y material volátil)	23
4.2.1.6.2 Método II (Humedad)	24
4.2.1.7 Determinación de metales pesados	24
4.2.1.8 Determinación de microorganismos	25
4.3 Obtención del extracto hidroalcohólico de la raíz de <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i>	26
4.4 Control de calidad del extracto hidroalcohólico de la raíz de <i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i>	26
4.4.1 Determinación de características organolépticas	27
4.4.2 Determinación de pH	27
4.4.3 Determinación de sólidos totales	28
4.4.4. Determinación de densidad relativa	28
4.4.5 Determinación de alcohol	29
4.4.6 Determinación de microorganismos	29
4.4.7 Determinación del contenido de principios activos	30
4.4.7.1 Condiciones cromatográficas para el análisis de linarina	30

4.4.7.2 Condiciones cromatográficas del método analítico para la detección y cuantificación de linarina	30
4.4.7.3 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de linarina	30
4.4.7.3.1 Preparación de la matriz de trabajo	31
4.4.7.3.2 Validación del sistema de análisis	32
4.4.7.3.2.1 Adecuabilidad	32
4.4.7.3.2.2 Linealidad	32
4.4.7.3.2.3 Precisión	32
4.4.7.3.3 Validación del método de análisis	33
4.4.7.3.3.1 Especificidad	33
4.4.7.3.3.2 Linealidad	33
4.4.7.3.3.3 Exactitud y repetibilidad	34
4.4.7.3.3.4 Precisión (Precisión intermedia)	34
4.4.7.3.3.5 Robustez	35
4.4.7.3.3.6 Tolerancia	35
4.4.7.3.3.7 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)	35
4.5 Pruebas de toxicidad	36
4.5.1 Toxicidad aguda en ratones	36
4.5.2 Toxicidad en ratas	37
4.5.3 Toxicidad aguda en ratas	37
4.5.4 Toxicidad subcrónica en ratas	38
4.6 Ensayos de eficacia	38
4.6.1 Actividad ansiolítica	39
4.6.1.1 Prueba de cilindro de exploración	39

4.6.1.2 Prueba de enterramiento de esferas	39
4.6.2 Actividad motriz exploratoria	40
4.6.2.1 Prueba de campo abierto	40
4.6.2.2 Prueba de tablero de hoyos	41
4.6.2.3 Prueba de miorreajación	41
4.6.2.4 Prueba en Rota-Rod	42
4.6.3 Percepción sensorial	43
4.6.3.1 Prueba de estiramiento abdominal	43
4.6.3.2 Prueba de Randall-Selitto	43
4.6.3.3 Prueba de retirada de cola por inmersión en agua caliente y fría	44
4.6.3.4 Prueba de la formalina	44
4.6.3.5 Inflamación inducida por carragenina	44
4.7 Análisis estadístico	45
4.8 Caracterización y elucidación estructural de compuestos naturales	46
4.8.1 Estudio químico de <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i>	47
4.8.1.1 Fraccionamiento del extracto de etanol	47
4.8.1.2 Aislamiento, purificación e identificación de valepotriatos	47
4.8.1.3 Aislamiento, purificación e identificación de valeiridósido A.	47
4.8.1.4 Aislamiento, purificación e identificación de linarina.	47
5. Resultados	48
5.1 Pruebas Farmacopéicas para la raíz de <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i>	48
5.1.1 Caracterización macroscópica y microscópica	48

5.1.1.1 Descripción macroscópica	48
5.1.1.2 Descripción microscópica	49
5.1.2 Pruebas de identidad cromatográfica	52
5.1.2.1 Identidad en cromatografía en capa fina	52
5.1.2.2 Identidad en cromatografía en CLAR	53
5.1.2.3 Identidad en cromatografía en CG	54
5.1.3 Materia extraña	58
5.1.4 Determinación de cenizas	58
5.1.4.1 Cenizas solubles en agua	59
5.1.4.2 Cenizas insolubles en ácido	59
5.1.5 Material extraíble	60
5.1.6 Agua y material volátil	61
5.1.7 Determinación de metales pesados	63
5.1.8 Determinación de microorganismos	63
5.2 Pruebas de calidad para extracto hidroalcohólico	64
5.2.1 Determinación de sólidos	65
5.2.2 Densidad relativa	65
5.2.3 Determinación del contenido de alcohol	66
5.2.4 Determinación de pH	67
5.2.5 Microorganismos	67
5.2.6 Determinación de contenido	68
5.2.6.1 Identificación y cuantificación del compuesto marcador químico	68
5.2.6.2 Validación del método analítico de linarina por CLAR	69
5.2.6.3 Validación del sistema	70

5.2.6.3.1 Linealidad	70
5.2.6.3.2 Precisión	71
5.2.6.3.3 Adecuabilidad	72
5.2.6.4 Validación del método	73
5.2.6.4.1 Especificidad	73
5.2.6.4.2 Linealidad y exactitud	74
5.2.6.4.3 Repetibilidad	75
5.2.6.4.4 Precisión intermedia	76
5.2.6.4.5 Robustez y tolerancia	77
5.2.6.4.6 Límite de detección	78
5.2.6.4.7 Límite de cuantificación	78
5.3 Pruebas de seguridad	79
5.4 Pruebas de eficacia	80
5.4.1 Evaluación sobre la conducta	80
5.4.1.1 Cilindro de exploración	80
5.4.1.2 Prueba de enterramiento de esferas	81
5.4.2 Evaluación sobre la función motora	82
5.4.2.1 Prueba de función neuromuscular	82
5.4.2.2 Prueba de Rota-Rod	82
5.4.3 Actividad antinociceptiva	83
5.5 Estudio químico de <i>Valeriana edulis</i> ssp. <i>procera</i>	85
5.5.1 Mezcla de valepotriatos	85
5.5.1.1 Valtrato	88
5.5.1.2 Acevaltrato	90
5.5.1.3 Isohomoacevaltrato	91

5.5.1.4 Mecanismo de acción del efecto antinociceptivo de los valepotriatos	92
5.5.1.4.1 Prueba de Randall-Selitto	93
5.5.1.4.2 Prueba de retirada de cola	94
5.5.1.4.3 Pruebas de formalina	94
5.5.1.4.4 Prueba de edema plantar inducido por carragenina	96
5.5.2 Linarina	97
5.5.3 Valeiridósido A	101
5.5.4 Prueba de eficacia	103
5.5.4.1 Prueba de Rota-Rod	103
5.5.4.2 Prueba sobre la función neuromuscular	104
5.5.4.3 Pruebas de cilindro de exploración	105
5.5.4.4 Prueba de tablero de hoyos	106
5.5.4.5 Pruebas para elucidar el mecanismo de acción de Valeiridósido A	107
6. Conclusiones	110

Lista de cuadros

Cuadro 1. Especies del género *Valeriana* en México.

Cuadro 2. Pruebas de ensayo para *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

Cuadro 3. Gradiente de elución de la fase móvil prueba de identidad.

Cuadro 4. Pruebas de control de calidad del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

Cuadro 5. Gradiente de elución de la fase móvil prueba de contenido.

Cuadro 6. Compuestos volátiles identificados por GC-EM a partir de la raíz de *V. edulis* y *V. officinalis*.

Cuadro 7. Cantidad y porcentaje de materia extraña obtenida al examinar muestras individuales de 500 g.

Cuadro 8. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas totales que representan la materia inorgánica después de incinerar la muestra.

Cuadro 9. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas insolubles en ácido que representan la cantidad de sílice, arenas y tierra silíceas presentes en la muestra.

Cuadro 10. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas solubles en agua que representan las sales solubles en agua contenidas en la muestra después de su incineración.

Cuadro 11. Porcentaje en peso de material extraíble obtenido por el Método I, con etanol.

Cuadro 12. Porcentaje en peso de material extraíble obtenido por el Método II, con agua.

Cuadro 13. Cantidad en gramos y porcentaje de pérdida por secado en estufa de muestras de 2 g.

Cuadro 14. Cantidad en gramos y porcentaje de pérdida por secado en Termobalanza de muestras de 2 g.

Cuadro 15. Análisis microbiológico de *Valeriana edulis* ssp. *procera*, cuenta de microorganismos totales y presencia de principales patógenos.

Cuadro 16. Porcentaje de sólidos totales del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*

Cuadro 17. Densidad relativa del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*

Cuadro 18. Contenido de alcohol del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp *procera*

Cuadro 19. pH del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp *procera*

Cuadro 20. Análisis microbiológico del extracto de *Valeriana edulis* ssp *procera*, cuenta de microorganismos totales y presencia de principales patógenos.

Cuadro 21. Concentración de linarina en metanol para la curva estándar, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación por concentración y promedio.

Cuadro 22. Concentración de linarina en metanol para determinar precisión del sistema.

Cuadro 23. Parámetros de desempeño de Adecuabilidad Factor de capacidad y factor de asimetría.

Cuadro 24. Porcentaje de recobro a partir de las cantidades adicionadas y recuperadas.

Cuadro 25. Concentración de linarina para determinar exactitud y repetibilidad del método, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación.

Cuadro 26. Concentración de linarina en metanol para determinar precisión intermedia, con sus áreas correspondientes, porcentaje de recobro, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación.

Cuadro 27. Concentración de linarina en metanol para determinar robustez; para este parámetro se aumentó la temperatura de la columna y se calculó la diferencia absoluta (di).

Cuadro 28. Concentración de linarina en metanol para determinar tolerancia; para este parámetro se cambió la columna por una de 150 mm y 250 mm.

Cuadro 29. Señales de los espectros de RMN ¹H para linarina.

Cuadro 30. Señales de los espectros de RMN ¹³C para linarina.

Lista de figuras

Figura 1. Monografías ESCOP (European Scientific Cooperative On Phytotherapy) de plantas medicinales.

Figura 2. Documentos y referencias botánicas y químicas que proporciona la AHP para el control de calidad de las materias primas vegetales.

Figura 3. Documentos oficiales de México para el análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios.

Figura 4. *Valeriana officinalis* (izquierda), *Valeriana jatamansi* (centro) y *Valeriana edulis* ssp. *procera* (derecha).

Figura 5. Monografía de Valeriana de México en la Farmacopea de 1896.

Figura 6. Isovalerosidato (Iridoide C₁₀) exclusivo del género *Valeriana*.

Figura 7. Clasificación de valepotriatos basado en el número de dobles enlaces. Acetil (**Ac**), Acetoxiisovaleril (**Aiv**), β-metilisovaleril (**Miv**), Isovaleril (**Iv**) y α-isovaleroxiisovaleril (**Iiv**).

Figura 8. Clasificación de baldrinales basado en el sustituyente de C₁₁. Acetil (**Ac**) e Isovaleril (**Iv**).

Figura 9. Compuestos aislados de *V. edulis* ssp. *procera*.

Figura 10. Hierba (A), rizoma cónico (B), Raquis (C), Corola (D y E) de *V. edulis* ssp. *procera*.

Figura 11. Rizoma, raíces y estolones de *Valeriana edulis* ssp. *procera*

Figura 12. Raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera*

Figura 13. Sección transversal de raíz de *Valeria edulis* (Aumento 4X).

Figura 14. Cromatoplaqueta de muestras de extracto metanólico de 1: *V. officinalis*, 2: *V. urticifolia*, 3: *V. edulis*, 4: *V. robertianifolia*, 5: *V. seledorum*, 6: *V. sorbitolia*, 7: mezcla de valepotriatos.

Figura 15. Perfil cromatográfico de *V. officinalis* y *V. edulis* ssp. *procera* por CLAR. Fase móvil: sistema binario en gradiente constituido por agua (A) y acetonitrilo-metanol (1:1), velocidad de flujo 0.8 mL/min. Fase estacionaria: columnas Luna C18

(2) (Phenomenex), tamaño de partícula de 5 μm), de 3.0 mm de diámetro interno y 150 mm de longitud. Detección UV: 224 nm.

Figura 16. Cromatograma de gases correspondiente a las raíces de *V. edulis* ssp. *procera* analizado en una columna capilar DB-5.

Figura 17. Cromatograma de gases correspondiente a las raíces de *V. officinalis* analizado en una columna capilar DB-5.

Figura 18. Cromatograma correspondiente al placebo adicionado con linarina (1), *Valeriana officinalis* (2), *Valeriana edulis* muestra 1 (3), *Valeriana edulis* muestra 2 (4), y extracto de Valeriana (5). Se encuadra la señal correspondiente al pico de linarina.

Figura 19. Curva de calibración para la linealidad del sistema; se realizó ANOVA de la regresión lineal obteniendo una $P < 0.001$. Cada punto representa la media de tres determinaciones \pm EEM.

Figura 20. Cromatogramas correspondientes a las señales de los picos correspondientes al blanco de metanol (A), linarina (B), hesperidina (C) y linarina + hesperidina (D).

Figura 21. Estructura de linarina y hesperidina.

Figura 22. Curva de calibración para determinar la linealidad del método; se realizó ANOVA de la regresión lineal obteniendo una $P < 0.001$. Cada punto representa la media de tres determinaciones \pm EEM.

Figura 23. Gráfica de seguimiento de peso a través del tiempo de ratas administradas con dosis repetidas del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*.

Figura 24. Efecto sobre la actividad exploratoria por vía *i.p.* del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*. DZ – diacepam (2.5 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVIA de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica significativa con el control.

Figura 25. Número de esferas enterradas en la prueba de marble-burying. Los valores se representan como media \pm SEM para una prueba de 30 minutos con 20 canicas. * $p < 0.05$ en comparación con el grupo de control (vehículo), (ANOVA

seguido de la prueba *post hoc* de Dunnett). Ser: sertralina, DZ: diacepam, VE: *Valeriana edulis*.

Figura 26. Efecto sobre la miorelajación de *V. edulis* ssp *procera* ip. Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$).

Figura 27. Efecto sobre la coordinación motora en Rota–Rod de *V. edulis* ssp *procera* ip. Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$).

Figura 28. Actividad antinociceptiva de (A) extracto acuoso, (B) extracto hidroalcohólico y (C) mezcla de valepotriatos. D = diclofenaco.). Cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVIA de 1 vía, *post hoc* Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Figura 29. Espectro de RMN¹H (400 MHz, CDCl₃) mezcla de valepotriatos.

Figura 30. Espectro de RMN¹³ C (100MHz, CDCl₃) mezcla de valepotriatos

Figura 31. Cromatograma CG-EM de valepotriatos

Figura 32. Patrón de fragmentación del valtrato.

Figura 33. Patrón de fragmentación del acevaltrato.

Figura 34. Patrón de fragmentación del isohomoacevaltrato.

Figura 35. Espectro de IR de linarina.

Figura 36. Espectro de masas por impacto electrónico de linarina.

Figura 37. Espectro FAB-MS de linarina.

Figura 38. Efecto antinociceptivo analgésico de la mezcla de valepotriatos en la prueba de Randall-Sellito. Latencia de retiro de la pata antes y 30 minutos después de la administración del tratamiento. Se representa el promedio \pm E.E.M. ($n \geq 6$ en cada grupo). Las dosis de tratamiento (mg/kg) se administraron (i.p.) 30 minutos antes que la formalina. V= mezcla de valepotriatos, T= Tramadol (10 mg/kg), N= Naproxeno (10 mg/kg). Diferencia significativa * $p < 0.05$ en una prueba estadística t pareada.

Figura 39. Efecto analgésico de la mezcla de valepotriatos en la prueba de retiro de cola en (A) agua fría (4°C) y (B) agua caliente (55°C).

Figura 40. Curso temporal del comportamiento nociceptivo inducido por una inyección s.c. de formalina a ratas (0.5 %). Cada punto es el promedio del número de lamida \pm EEM de $n \geq 6$ ratones.

Figura 41. Efecto analgésico de la mezcla de valepotriatos en la (A) fase aguda (0-10 min) y (B) la fase tónica (10-60 min) de dolor inflamatorio inducido por formalina. El comportamiento nociceptivo se cuantificó contando el número de sacudidas de la pata inyectada con formalina en periodos de 1 min cada 5 minutos. Se representa el promedio \pm E.E.M. ($n \geq 6$ en cada grupo). Las dosis de tratamiento (mg/kg) se administraron (i.p.) 30 minutos antes que la formalina. T= Tramadol (10 mg/kg). ANADEVa de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Figura 42. Curso temporal del comportamiento nociceptivo inducido por una inyección s.c. de carragenina a ratas (1 %). Cada punto es el promedio de la diferencia de volumen de edema inducido por carragenina \pm EEM de $n \geq 6$ ratones.

Figura 44. Efecto antiinflamatorio de la mezcla de valepotriatos en la prueba de edema inducido por carragenina. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva (ABC, mL*h) \pm E.E.M. ($n \geq 6$ en cada grupo). Las dosis de tratamiento (mg/kg) se administraron (i.p.) 30 minutos antes que la carragenina. N= Naproxeno (10 mg/kg). ANADEVa de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Figura 45. Valeiridósido A aislado de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

Figura 46. Efecto sobre la coordinación motora en Rota–Rod por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido A (B). Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVa de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Figura 47. Efecto sobre la miorrelajación por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido A (B). Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVa de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Figura 48. Efecto sobre la actividad exploratoria por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido A (B). Cada barra representa el promedio \pm EEM de los

animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVa de 1 vía, post hoc Dunnett. $*p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Figura 49. Efecto sobre la actividad ansiolítica por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido A (B).

Lista de abreviaturas

°C	grados Celsius
5-HT	serotonina (5-hidroxitriptamina)
ABC	área bajo la curva
AChE	acetilcolina (Acetylcholinesterase)
AcOEt	acetato de etilo
AHP	American Herbal Pharmacopoeia
AKT	serina/treonina quinasa
ANADEVa	análisis de varianza
ASIC	canales de sodio sensible a ácido
ATP	Adenosiltrifosfato
b	ordenada al origen
BK₂	receptor 2 de bradicinina
BP	British Pharmacopoeia
CB1	receptor canabinoide tipo 1
CCA	cromatografía en columna abierta
CCF	cromatografía en capa fina
CDCl₃	cloroformo deuterado
CG-EM	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
CGRP	péptido relacionado con la expresión del gen de la calcitonina
CH₂Cl₂	Diclorometano
CH₃CN	Acetonitrilo
CH₃COOH	ácido acético
CHCl₃	Cloroformo
CLAR	cromatografía de líquidos de alta resolución
cm	Centímetro
CV	coeficiente de variación
DAD	detector de arreglo de diodos
di	diferencia de la media aritmética de cada condición con respecto a la condición normal
DL50	dosis letal media

DMSO	Dimetilsulfóxido
DZ	Diacepam
EDQM	European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care
EEM	error estándar de la media
Emax	efecto máximo
EMA	European Medicine Agency
ENaC	canales epiteliales de sodio sensibles a amilorida
ESCOP	Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia
EtOH	Etanol
FAB	bombardero de átomos rápidos
FEUM	Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos
FHEUM	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
G	fuerza G
g	Gramos
GABA	ácido γ -aminobutírico
h	Hora
H₃PO₄	ácido ortofosfórico
HCl	ácido clorhídrico
Hex	Hexano
HS-SPME	microextracción en fase sólida
ICH	International Council for Harmonisation
IC_{μ}	intervalo de confianza para la media poblacional
IK	índice de Kovats
IP	Intraperitoneal
IR	espectroscopía en el infrarrojo
IVHD	Isovaleroxiisovalerilhidroxidihidro
K'	factor de capacidad
kg	Kilogramo
L	Litro
m	Pendiente
m/z	relación masa-carga
MeOH	Metanol
mg	Miligramos
MGA	método general de análisis
min	Minuto
mL	Mililitros
MS	espectrometría de masas
N	Normalidad
n	número de muestras
NaCl	cloruro de sodio
NGF	factor de crecimiento nervioso
nm	nanómetros

OMS	Organización Mundial de la Salud
p/v	relación peso volumen
P2X₃	receptor ionotrópico tipo 3 de purina
PGE₂	prostaglandina E2
PI3K	fosfoinositol 3-quinasa
RMN	Resonancia magnética nuclear
s	desviación estándar
s	Segundos
SNC	sistema nervioso central
SR	solución de referencia
ssp	Subespecie
T	factor de asimetría
t	Tiempo
TMS	Tetrametilsilano
tR	tiempo de retención
TrkA	tirosina cinasa
USP	United States Pharmacopeia
UV	espectroscopía en el Ultravioleta
VR1:	receptor vaniloide tipo 1
λ	longitud de onda
μg	Microgramos
μV*s	microvolt por segundo
ȳ	Promedio
ȳ₀	media aritmética de las muestras analizadas a condiciones normales
ȳ_i	media aritmética de las muestras analizadas a condiciones diferente a la normal

Resumen

Valeriana edulis ssp *procera* es una planta ampliamente utilizada en la medicina herbolaria mexicana debido a sus efectos ansiolítico y sedante. Sin embargo, no existe un método para realizar el control de calidad de los productos elaborados con ella.

Por este motivo el proyecto se enfocó en el estudio de la raíz y del extracto hidroalcohólico fabricado a partir de esta especie con la finalidad de establecer los parámetros de calidad de la droga para la elaboración de la monografía farmacopéica.

El estudio comenzó con la identificación taxonómica y la determinación de los parámetros de calidad de la droga, se establecieron los perfiles cromatográficos por CCF, CLAR y GC, asimismo derivado de estos resultados se propuso como compuesto marcador a linarina por análisis de cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Se realizó la estandarización del extracto hidroalcohólico de *Valeriana edulis* ssp. *procera* mediante la determinación del contenido de linarina. El método analítico propuesto fue validado y cumplió con todos los parámetros de desempeño en el rango de concentraciones ensayadas.

Por otra parte, se determinó la inocuidad preclínica para la raíz de esta planta con las pruebas de toxicidad aguda y subcrónica en ratones y ratas, de acuerdo con los procedimientos descritos por Lorke y la OECD. El estudio de la toxicidad permitió establecer que el extracto hidroalcohólico no es tóxico, reportando una dosis letal media mayor a 2000 mg/kg en ambos casos. Esto clasifica al extracto dentro de la categoría 5 del Sistema Mundialmente Armonizado indicando que no es riesgoso para la salud.

La eficacia preclínica de la droga se evaluó mediante la aplicación de un perfil neurofarmacológico con pruebas exploratorias para determinar su efecto sobre el SNC, considerando pruebas de conducta, actividad motriz y de percepción sensorial. El extracto hidroalcohólico mostró potencial ansiolítico en la prueba del

cilindro de exploración ($DE_{50} = 83.4$ mg/kg) y actividad antinociceptiva dosis no dependiente en el modelo de estiramiento abdominal. El extracto también mostró efecto sobre la coordinación motora y la miorrelajación a la dosis de 1000 mg/kg.

El estudio químico del extracto hidroalcohólico preparado a partir de la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* permitió el aislamiento y la caracterización de una mezcla de valepotriatos, linarina y valeiridósido A. Este último, un compuesto no reportado en la literatura.

La evaluación de la mezcla de valepotriatos mostró una actividad antinociceptiva en la prueba de retiro de cola por inmersión en agua caliente y en agua fría (10 y 31 mg/kg); en la prueba de formalina, en la fase 1 (10 y 31 mg/kg) y en la fase 2 (10 mg/kg), así como en la prueba de Randall-Selitto (31 y 100 mg/kg). La actividad antiinflamatoria también se observó para estos compuestos en el modelo de inflamación inducida por carragenina (1 - 100 mg/kg).

Se realizó la evaluación del valeiridósido A y la linarina por medio de un perfil neurofarmacológico, donde linarina sólo alteró la coordinación motora a la dosis de 10 mg/Kg. Por otra parte, para el valeiridósido A se observó un efecto ansiogénico en la prueba del cilindro de exploración a la dosis de 10 mg/kg; por lo que se decidió explorar el mecanismo de acción, el cual sugiere que el compuesto es un modulador de los receptores 5-HT₁ el cual disminuye la liberación de GABA provocando un aumento en la ansiedad.

Abstract

Valeriana edulis ssp *procera* is a plant widely used in Mexican herbal medicine due to its anxiolytic and sedative effect. However, there is no method for quality control of the products made with it.

For this reason, the project focused on the study of the root and the hydroalcoholic extract manufactured from this species to establish the quality parameters of the drug for the preparation of the pharmacopoeic monograph.

The study began with the taxonomic identification and determination of the drug quality parameters, established chromatographic profiles by TLC, HPLC and GC, also of these results, linarine was proposed as a marker compound by high-performance liquid chromatography analysis (HPLC).

The hydroalcoholic extract of *Valeriana edulis* ssp *procera* was standardized, through by determining the linarine content. The proposed analytical method was validated and met all the performance parameters in the range of concentrations tested.

Preclinical safety was determined for *V. edulis* ssp. *procera* with the acute and subchronic toxicity tests in mice and rats, according to the procedures described by Lorke and the OECD. The toxicity study allowed establishing that the hydroalcoholic extract is not toxic, reporting a mean lethal dose (LD₅₀) greater than 2000 mg / kg in both cases. This classifies the extract into category 5 of the Globally Harmonized System indicating that it is not risky for health.

The preclinical efficacy of the drug was evaluated by applying a neuropharmacological profile with exploratory tests to determine its effect on the CNS, considering tests of behavior, motor activity, and sensory perception.

The hydroalcoholic extract was shown to have an anxiolytic potential in the exploration cylinder test (ED₅₀ = 83.4 mg / kg) and a dose-dependent antinociceptive activity in the abdominal stretch model. The extract also showed an effect on motor coordination and muscle relaxation at the dose of 1000 mg / kg.

The chemical study of the hydroalcoholic extract prepared from the root of *V. edulis* ssp. *procera* allowed the isolation and characterization of a mixture of valepotriates, linarine and valeiridoside A. The latter, a compound not reported in the literature.

Evaluation of the valepotriate mixture showed antinociceptive activity in the tail flick test by immersion in hot and in cold water (10 and 31 mg / kg). Also, in the formalin test, both in phase 1 (10 and 31 mg / kg) and in phase 2 (10 mg / kg) and in the Randall-Selitto test (31 and 100 mg / kg) showed antinociceptive activity. Anti-inflammatory activity was also observed for these compounds in the model of carrageenan-induced inflammation (1-100 mg / kg).

An evaluation of valeiridoside A and linarine was carried out by means of a neuropharmacological profile, where linarine only altered motor coordination at the dose of 10 mg / Kg. On the other hand, valeiridoside A induced an anxiety-causing effect was observed in the exploration cylinder test at the dose of 10 mg / kg; This is why it was decided to explore the mechanism of action, suggesting that this compound is a modulator of 5-HT₁ receptors that decreases the release of GABA causing an increase in anxiety.

1. INTRODUCCIÓN

El género *Valeriana* está compuesto por más de 200 especies provenientes de Europa, Asia y América; de las cuales se ha demostrado mediante estudios en animales un efecto depresor del sistema nervioso central (Francis y Dempster, 2002; Arellano et al., 2001). Las especies de *Valeriana* de mayor importancia comercial en la medicina herbolaria son *Valeriana officinalis*, *Valeriana edulis* ssp *procera*, *Valeriana jatamansi*, y la *Valeriana wallichii* (Joshi et al., 2005).

Estas especies muestran grandes diferencias con respecto a los constituyentes químicos, así como en su morfología. En consecuencia, los fitomedicamentos preparados a partir de estas especies se caracterizan por la composición química diferente (Rzedowski y Calderón de Rzedowski, 2003).

En México, una de las plantas más importantes por su amplio uso y su valor comercial es la Valeriana mexicana, cuyo nombre científico es *Valeriana edulis* ssp *procera* la cual es utilizada entre la población para el tratamiento de la ansiedad, el insomnio y como antiespasmódico (Navarrete et al., 2006).

Debido a su uso, es importante establecer parámetros de identidad, seguridad y calidad de las especies endémicas y más utilizadas en nuestro país para integrarlas como monografías en la FHEUM que permitan su control de calidad.

En este trabajo se establecieron las pruebas y las especificaciones de calidad de la droga cruda correspondiente a la raíz molida de *Valeriana edulis* ssp. *procera*, de acuerdo con los métodos generales de análisis de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos (FEUM) para su inclusión como monografía en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM).

De tal manera que la presente investigación se realizó con el propósito de generar información para establecer las especificaciones de calidad de la droga cruda y del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera*. También se busca evaluar la seguridad y eficacia de esta especie utilizando modelos animales, además de establecer un compuesto marcador que permita la estandarización del extracto de esta planta medicinal.

2. ANTECEDENTES

2.1. Medicina herbolaria.

En la medicina tradicional basada en la herbolaria se estima el uso de aproximadamente 10,000 especies vegetales (Cañigueral et al., 2003). Para el 80% de la población de nuestro planeta, la medicina tradicional sigue siendo el único recurso como tratamiento a sus problemas de salud, a pesar de las limitaciones y riesgos que ésta conlleva. El uso de terapias alternativas por la población es una respuesta al elevado costo de los sistemas de salud convencionales. En regiones donde la fitoterapia no se encuentra integrada en los sistemas de salud, como si ocurre en Europa, se ha incrementado significativamente el interés de la población en la medicina tradicional China y Ayurvédica en las últimas dos décadas (Liping et al.; 2014).

La masificación a nivel mundial del uso de los productos herbolarios ha llevado a las autoridades regulatorias a la búsqueda de información sobre los métodos de control de calidad o estandarización que permitan garantizar la seguridad y eficacia de las drogas crudas y sus preparados fitofarmacéuticos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) y otras organizaciones relacionadas con la salud consideran que el retorno progresivo de la sociedad hacia el uso de productos de origen natural en la terapéutica es consecuencia de: 1) el descubrimiento de efectos adversos, cada vez más frecuentes, de los medicamentos alopáticos; 2) mayor conocimiento químico, farmacológico y clínico de las drogas vegetales y sus derivados; 3) el desarrollo de nuevos métodos analíticos para el control de calidad; 4) la transición de preparados naturales a farmacéuticos y 5) la búsqueda de opciones terapéuticas alternativas para el tratamiento de enfermedades como el cáncer, la diabetes o el SIDA (OMS, 1999).

La evaluación de las prácticas médicas alternativas y/o complementarias se realizó en algunos países por recomendación de la OMS como resultado de la Reunión de

Alma Ata en 1978. En el documento publicado por la OMS se incluían los siguientes puntos: a) un inventario sistemático de la flora y fauna utilizada como remedio tradicional; b) una revisión del conocimiento científico disponible de estos recursos (botánicos, químicos, toxicológicos y farmacológicos); c) reglamentar y controlar los productos elaborados con plantas medicinales; d) establecer los parámetros de calidad de los productos; e) establecer la relación riesgo/beneficio de las plantas medicinales o medicamentos derivados de éstas y f) realizar estudios clínicos y preclínicos.

El objetivo de la OMS era utilizar toda la información recopilada para elaborar documentos oficiales y monografías para cada droga vegetal para validar su uso el uso popular de estos productos. (OMS, 2000a; OMS, 2000b).

En la tarea de integrar las monografías de plantas medicinales, la OMS estableció la información científica que debe incluir cada documento (OMS, 1999). Lo más relevante se lista a continuación:

a) Definición de la droga, especificando los nombres nativos y sinonimias de la planta.

b) Descripción botánica detallada, de interés para asegurar la calidad de las drogas crudas en las etapas de recolección, fabricación y/o comercio.

c) Pruebas generales de control de calidad, que permitan establecer la identidad, pureza y composición de cada planta medicinal.

d) Por último, se debe de incluir la información necesaria para establecer los parámetros de eficacia y seguridad, incluyendo formas de dosificación, contraindicaciones, advertencias, carcinogenicidad, teratogenicidad, reacciones adversas y posología.

La función de las monografías de plantas medicinales es ofrecer a las autoridades información veraz y actualizada sobre los más diversos aspectos de las drogas

vegetales, así como auxiliar en el proceso de regulación de los productos herbolarios.

La fundación de la Cooperativa Científica Europea de Fitoterapia (ESCOP; European Scientific Cooperative On Phytotherapy), en 1989, logró establecer criterios armonizados para la regulación de los productos herbolarios, apoyar la investigación científica y contribuir a la aceptación de esta práctica en la comunidad europea. En la década de los noventa, esta organización publicó 60 monografías de plantas medicinales; en la siguiente edición de 2003 incluyó 20 nuevas monografías, así como una revisión actualizada de la información científica de los medicamentos a base de plantas; todo esto con el fin de establecer los más altos estándares y las bases para el uso clínico de los medicamentos a partir de plantas (Figura 1).



Figura 1. Monografías ESCOP (European Scientific Cooperative On Phytotherapy) de plantas medicinales.

En el continente americano, los Estados Unidos han participado activamente en la investigación encaminada al establecimiento de los métodos de análisis para determinar la identidad, pureza, calidad y eficacia de las drogas crudas y productos derivados de ellas; el principal órgano encargado de difundir esta información es la Farmacopea Herbolaria Americana (American Herbal Pharmacopoeia, AHP) por

medio de la publicación de folletos, textos y monografías científicas. Todo ello con el fin de promover el uso responsable de los medicamentos herbolarios, así como generar las referencias (botánicas y químicas) para realizar los ensayos de control de calidad de las plantas medicinales (Figura 2).

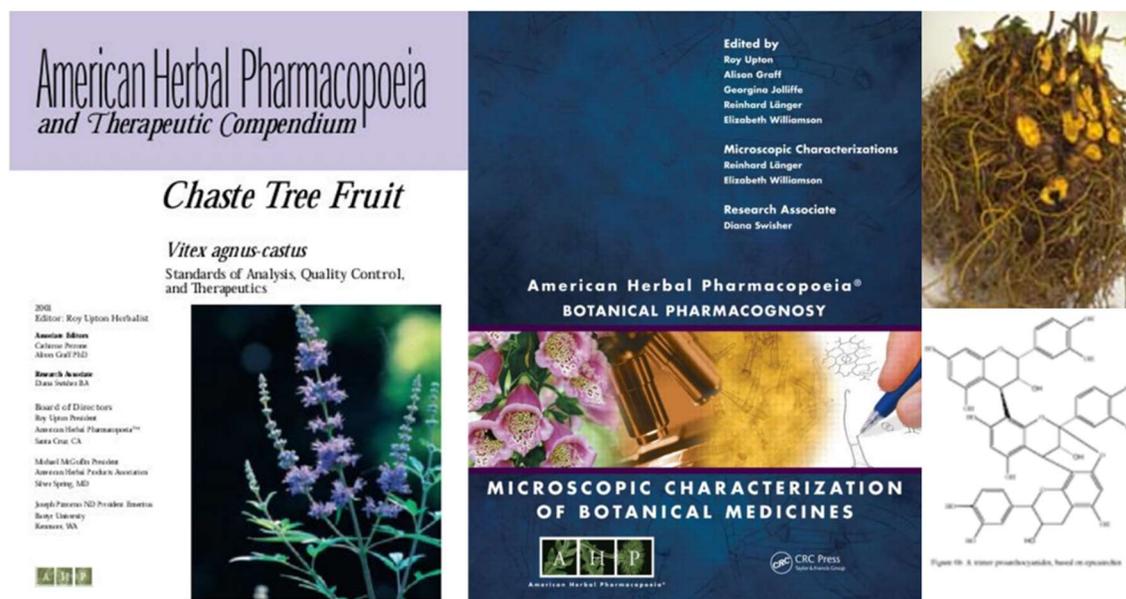


Figura 2. Documentos y referencias botánicas y químicas que proporciona la AHP para el control de calidad de las materias primas vegetales.

Cada monografía publicada por la AHP contiene información crítica y detallada sobre los usos populares de las especies medicinales de mayor uso. También incluyen los estudios toxicológicos y farmacológicos, y en lo posible clínicos, que sustentan la eficacia y la seguridad de esas plantas; así como, sus principios activos y pruebas de pureza, composición e identidad (Bone, 2001; OMS, 2000b; Flaster y Lassiter, 2004; Reif et al., 2004; Betz et al., 2004).

En México también se han publicado tres monografías científicas de plantas medicinales de amplio uso: Cuachalalate (*Amphipterigium adstringens*); Copalchi (*Hintonia latiflora*) y Hierba del manso (*Isoetephane heterophylla*).

En nuestro país, los productos elaborados con plantas medicinales tienen una amplia aceptación en la población general, incrementándose el comercio de manera importante en las tres últimas décadas. Lamentablemente, la deficiente regulación, la falta de criterios de calidad y la carencia de personal capacitado para evaluar esta medicina, han conllevado a que los productos comerciales presenten diferentes niveles de seguridad y calidad. Sumado esto al conocimiento científico insuficiente de los mismos, debido al escaso número de plantas medicinales que se han sometido a un proceso de investigación que siga los lineamientos internacionales.

La Secretaría de Salud publicó en el año 2001 la primera edición de la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos (FHEUM) como respuesta a la problemática nacional y en 2013 publicó la segunda edición (Figura 3). Sin embargo, la inclusión de monografías de especies autóctonas resultó limitada, por la poca información científica y calidad de ésta.



Figura 3. Documentos oficiales de México para el análisis y especificaciones técnicas que deberán cumplir las plantas y los derivados de ellas que se utilicen en la elaboración de medicamentos y remedios herbolarios.

La FHEUM incluye 94 monografías de drogas vegetales, 24 de aceites esenciales y 9 de aceites fijos, contiene una sección de Métodos Generales de Análisis (MGA) para el control de calidad de plantas y materiales proveniente de éstas; contiene una sección denominada extrafarmacopea; en donde se presentan monografías de especies medicinales de México que no cuentan con suficientes estudios químicos, toxicológicos, farmacológicos o clínicos que validen su uso terapéutico y por último una sección de apéndices.

El contenido de monografías de especies endémicas es escaso e insuficiente considerando la biodiversidad de la flora medicinal de México. De tal forma, que es indispensable realizar investigación para elaborar y/o actualizar las monografías de especies mexicanas, más utilizadas en las prácticas médicas alternativas.

Como consecuencia a estos hechos los grupos de investigación de la Facultad de Química de la UNAM decidieron colaborar con la creación de nuevas monografías que reúnan el conocimiento científico de sus investigaciones sobre plantas medicinales de nuestro país. Así fue como el grupo del Dr. Navarrete seleccionó a *V. edulis* ssp. *procera* planta de uso extendido a nivel mundial que aún no cuenta con una monografía oficial que cubra los criterios de control de la calidad de la especie.

2.2. Generalidades sobre *Valeriana edulis* ssp. *procera* (Caprifoliaceae).

2.2.1. Aspectos taxonómicos y distribución geográfica.

Las especies pertenecientes a la familia *Caprifoliaceae* son empleadas a nivel mundial tanto como condimento como medicina tradicional. Las caprifoliáceas son una familia circunscrita en base a sus datos moleculares debido a que exhiben una amplia diversidad morfológica y composición química. Por lo anterior, se han clasificado en siete subfamilias, a saber: *Diervilloideae*, *Caprifolioideae*, *Linnaeoidae*, *Morinoideae*, *Zabelia*, *Discacoideae* y *Valerianoideae*. A esta última familia pertenece el género *Valeriana*, cuyos miembros más representativos son:

valeriana europea (*V. officinalis*), valeriana india (*V. wallichii*) y valeriana mexicana (*V. edulis* ssp. *procera*) (Bos et al, 2002) (Figura 4).



Figura 4. *Valeriana officinalis* (izquierda), *Valeriana jatamansi* (centro) y *Valeriana edulis* ssp. *procera* (derecha).

En México, se encuentran cerca de 40 especies del género *Valeriana* (Cuadro 1) de entre ellas la de mayor relevancia es *V. edulis* ssp. *procera*, la cual es una planta herbácea de hasta 1.5 m de alto, que crece en altitudes de 205 hasta 2700 msnm, en las zonas de bosque de coníferas y de encino, distribuida desde el sur de Chihuahua hasta Puebla y Oaxaca. Dada su tendencia a ocupar ambientes perturbados, no se considera vulnerable a la extinción. Entre los habitantes de México es conocida como valeriana, pero en algunos sitios también se le nombra hierba del gato, plateada y *cuitlapatli*.

Cuadro 1. Especies del género *Valeriana* en México.

<i>V. arsenei</i>	<i>V. edulis</i> ssp. <i>procera</i>	<i>V. naidae</i>	<i>V. ramosissima</i>	<i>V. sorbifolia</i> var. <i>barbereifolia</i>
<i>V. barbareaifolia</i>	<i>V. emmanuei</i>	<i>V. officinalis</i>	<i>V. robertianifolia</i>	<i>V. subincisa</i>
<i>V. calcicola</i>	<i>V. galeottiana</i>	<i>V. otomiana</i>	<i>V. rzedowskiorum</i>	<i>V. toluccana</i>
<i>V. ceratophylla</i>	<i>V. knautioides</i>	<i>V. palmeri</i>	<i>V. scandens</i>	<i>V. urticifolia</i>

<i>V. clematitidis</i>	<i>V. laciniosa</i>	<i>V. pilosiuscula</i>	<i>V. scorpioides</i>	<i>V. urticifolia</i> var. <i>scorpioides</i>
<i>V. densiflora</i>	<i>V. macropoda</i>	<i>V. pratensis</i>	<i>V. selerorum</i>	<i>V. vaginata</i>
<i>V. denudata</i>	<i>V. moorei</i>	<i>V. procera</i>	<i>V. sorbifolia</i>	<i>V. zamoranensis</i>

2.2.2. Aspectos etnofarmacológicos.

Los primeros reportes de los usos medicinales de la raíz de valeriana se encuentran en la obra de Fray Bernardino de Sahagún, *Historia de las cosas de la nueva España* (1577), donde se describe el característico olor de la raíz, así como su actividad en infecciones bucales y en el tratamiento de almorranas:

CUATLAPATLI

“Tiene las ramas larguillas y aguxeradas por de dentro. De cada pie nacen dos o tres ramillas verdes. Las hojas tienen muchas, como las acelgas de Castilla; las flores blancas. No son de provecho sus ramas ni sus flores. La raíz de esta yerva es gruessa como rávanos. Por de fuera son blancas y de dentro amarillas claras. Tiene las corteças gruessas como las de los rávanos, y también lo de dentro. Seca esta raíz y molida es provechosa para los que tienen landrezillas en la garganta, y también para los que tienen lamparones. Estos polvos hanse de [r]jebulver con resina, y puesto en los lugares de la enfermedad, cúbrenlo con plumas. También es buena esta raíz para las mugeres que se les pudrece el miembro viril. También es buena contra la enfermedad que se llama xochiciuiztli (ó sean almorranas). Esta raíz no se bebe. Házese en los montes”.

También se menciona esta planta en la *historia de las Plantas de la Nueva España* de Francisco Hernández donde se menciona su fuerte olor y se relata su actividad antitumoral y analgésica (Hernández, 1959):

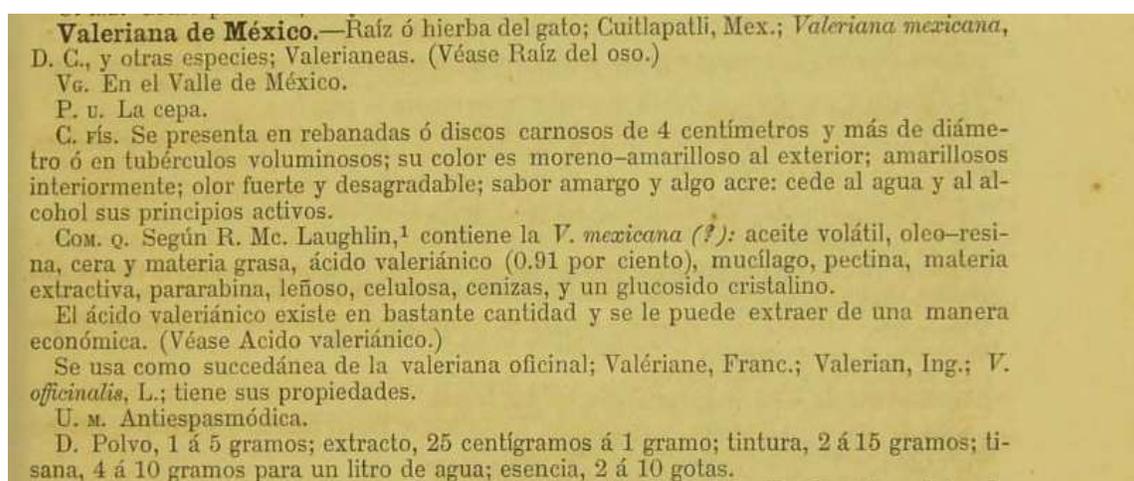
“CAPITULO XXII

Del CUITLAPATLI o medicina de estiércol

“Tiene el CUITLAPATLI raíz gruesa y larga, de donde echa hojas como de acelga con pedúnculos muy largos y algo anchos, tallo hueco, y flores pequeñas y blancas agrupadas en la punta. Es amargo y de naturaleza calorífica y secante en tercer grado. La raíz hecha harina, mezclada con resina y tepechianpitzahoac y aplicada al pecho, detiene los esputos de sangre; cura los tumores madurándolos, abriéndolos y limpiándolos, así como las pústulas del mal gálico, las úlceras y el cáncer, y alivia a los caquéticos; calma también el dolor de ojos”.

Cuitlapahltli: de cuitla (tl), estiércol, y pahltli, medicina. Medicina de estiércol, o mejor: medicina fecal.

En la Nueva Farmacopea Mexicana de la Sociedad Farmacéutica de México de 1896 se encuentra la monografía de Valeriana de México donde se menciona su actividad antiespasmódica y como sustituta de *Valeriana officinalis* (Figura 5). En la actualidad, las raíces de *V. edulis* ssp. *procera* se ingieren molidas, en extractos secos o en preparaciones orales (decocciones y tinturas) para aliviar trastornos de ansiedad y sueño. También se encuentran reportes actuales donde se le atribuye a los extractos de *V. edulis* ssp. *procera* actividades antidiabéticas, antiespasmódicas y vasorrelajantes (Marles y Farnsworth, 1995; Occhiuto et al, 2009, Estrada-Soto et al, 2010).



Valeriana de México.—Raíz ó hierba del gato; Cuitlapatli, Mex.; *Valeriana mexicana*, D. C., y otras especies; Valerianeas. (Véase Raíz del oso.)
Vg. En el Valle de México.
P. v. La cepa.
C. rís. Se presenta en rebanadas ó discos carnosos de 4 centímetros y más de diámetro ó en tubérculos voluminosos; su color es moreno-amarillo al exterior; amarillosos interiormente; olor fuerte y desagradable; sabor amargo y algo acre: cede al agua y al alcohol sus principios activos.
Com. q. Según R. Mc. Laughlin,¹ contiene la *V. mexicana* (?): aceite volátil, oleo-resina, cera y materia grasa, ácido valeriánico (0.91 por ciento), mucílago, pectina, materia extractiva, pararabina, leñoso, celulosa, cenizas, y un glucosido cristalino.
El ácido valeriánico existe en bastante cantidad y se le puede extraer de una manera económica. (Véase Acido valeriánico.)
Se usa como sucedánea de la valeriana oficial; Valériane, Franc.; Valerian, Ing.; *V. officinalis*, L.; tiene sus propiedades.
U. m. Antiespasmódica.
D. Polvo, 1 á 5 gramos; extracto, 25 centigramos á 1 gramo; tintura, 2 á 15 gramos; tisana, 4 á 10 gramos para un litro de agua; esencia, 2 á 10 gotas.

Figura 5. Monografía de Valeriana de México en la Farmacopea de 1896.

2.2.3. Constituyentes químicos y actividad biológica.

En el género *Valeriana* se han reportado la presencia de iridoideas (Wang et al, 2010), un grupo de compuestos ampliamente distribuido entre las plantas utilizadas en la medicina tradicional herbolaria de México y el mundo. Los iridoideas se encuentran en las plantas dicotiledóneas, principalmente en la subclase Asteridae que agrupa a 13 órdenes y a más de 100 familias (Jensen et al., 1975). Las valerianas pertenecen a la familia de la *Caprifoliaceae* y la subfamilia *Valerianoideae* donde el género *valeriana* y *valerianella* agrupan a más de la tercera parte de las especies (Byng J et al., 2016).

Los iridoideas presentes en las valerianas son exclusivos del género por lo que se consideran marcadores taxonómicos, la singularidad de estos compuestos consiste en presentar oxidadas las posiciones C₁, C₇, C₈ y C₁₁, siempre con un residuo de glucosa en C₁₁ y un residuo de isopreno en C₁ (Figura 6) (Ríos-Gómez, 2015).

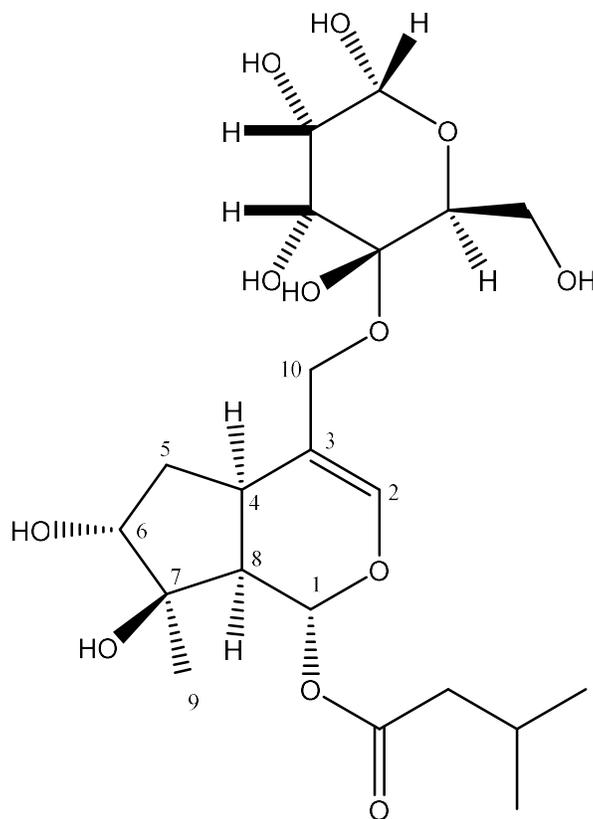
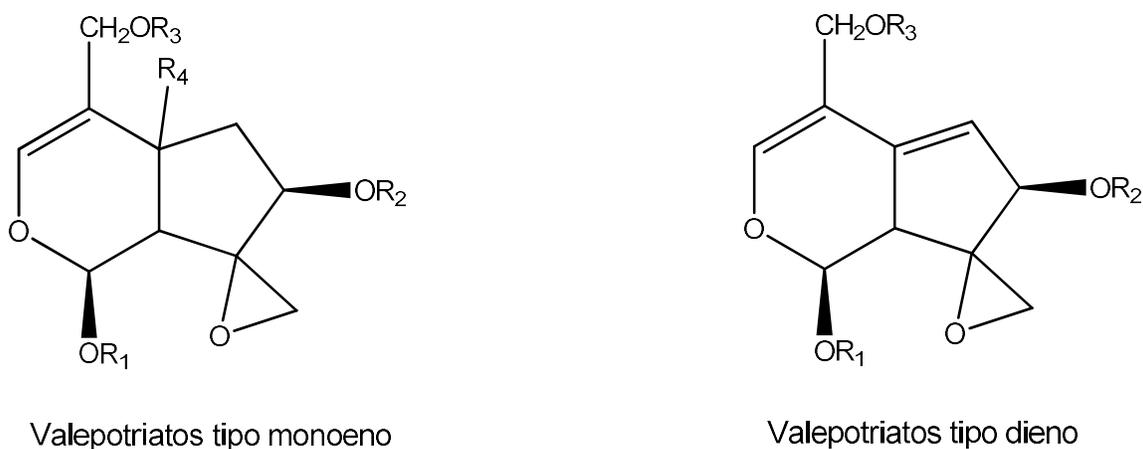


Figura 6. Isovalerosidato (Iridoide C₁₀) exclusivo del género *Valeriana*.

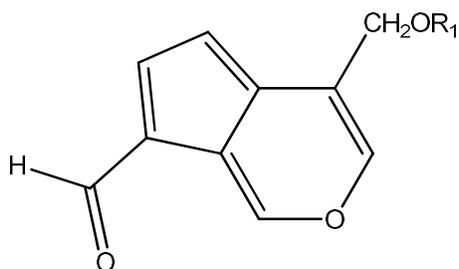
A partir de la raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera* se han aislado un grupo de iridoideas conocidos como valepotriatos entre los que se encuentran el dihidrovaltrato **(1)**, isodihidrovaltrato **(2)**, IVHD-valtrato **(3)**, homodihidrovaltrato **(4)**, valtrato **(5)**, isovaltrato **(6)**, acevaltrato **(7)**, diavaltrato **(8)** y homoacevaltrato **(9)** (Figura 7); y sus productos de degradación denominados baldriales (Bos et al, 1997).



	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄		R ₁	R ₂	R ₃
1	lv	Ac	lv	H	5	lv	lv	Ac
2	lv	lv	Ac	H	6	lv	lv	Ac
3	lv	Ac	liv	OH	7	Aiv	lv	Ac
4	Miv	Ac	liv	H	8	lv	Ac	Ac
					9	lv	Aiv	Ac

Figura 7. Clasificación de valepotriatos basado en el número de dobles enlaces. Acetil (**Ac**), Acetoxiisovaleril (**Aiv**), β-metilisovaleril (**Miv**), Isovaleril (**lv**) y α-isovaleroxiisovaleril (**liv**).

Los baldrinales (**10**), homobaldrinales (**11**) y deacilbaldrinal (**12**) se forman a partir de la degradación térmica o por hidrólisis en disoluciones ácida o básica de los valepatriatos, cuando éstos pierden sus sustituyentes alquílicos y transforman el epóxido en un aldehído (Figura 8) (Müller et al., 2012).



	R₁
10	Ac
11	lv
12	H

Figura 8. Clasificación de baldrinales basado en el sustituyente de C₁₁. Acetil (**Ac**) e Isovaleril (**lv**).

También se han reportado en *V. edulis* ssp. *procera* la presencia de Ácido clorogénico (1), los lignanos: masoniresinol-4'-O-β-D-glucósido (2), berchemol-4'-O-β-D-glucósido (3), pinioresinol-4,4'-di-O-β-D-glucósido (4), 8-hydroxypinioresinol-4'-O-β-D-glucósido (5), pinioresinol-4-O-β-D-glucosido (6); los flavonoides hesperidina (7) y linarina (8) (Navarrete et al, 2006) además de alcaloides (Salkar, 2009) (Figura 9).

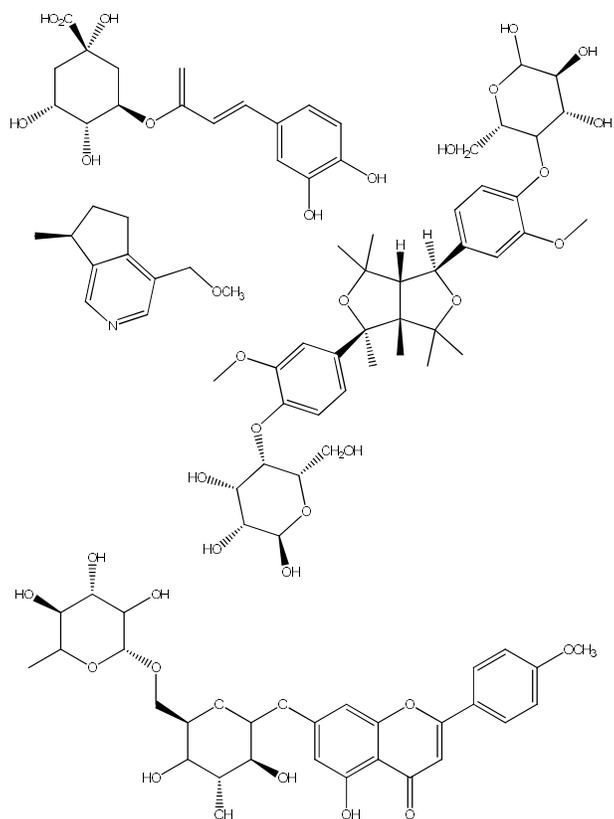


Figura 9. Compuestos identificados de *V. edulis* ssp. *procera*.

Los valepotriatos han sido evaluados farmacológicamente y han mostrado una actividad que se encuentra entre la sedación y la ansiólisis, este efecto es sumamente particular y por eso se acuñó el término "aequila" para describir esta actividad, lo que significa que los valepotriatos son poco útiles como inductores del sueño, pero efectivos como sedantes, debido a que presentan un efecto inhibitor específico sobre el SNC junto con una mejora de la coordinación motora (Banerjee et al., 1998).

Entre las actividades reportadas para los valepotriatos también se encuentran: la antioxidante (Wang et al, 2017), citotóxica (pulmón, próstata, colon e hígado) (Bos et al., 1998), antidepresiva (Müller et al, 2015), la inhibición de la ATPasa Na^+/K^+ del epitelio gástrico (Bettero et al, 2011) y antiespasmolítico (Hazelhoff et al, 1982).

3. Hipótesis y Objetivos

3.1. Hipótesis

El uso popular como ansiolítico e hipnótico del género *Valeriana* está documentado por todo el mundo, por lo que la especie *Valeriana edulis* ssp. *procera* presentará una diversidad de metabolitos con dichas actividades que serán útiles para definir uno o más compuestos marcadores para el desarrollo de métodos analíticos para establecer el control de calidad de ésta tanto como droga cruda como del extracto hidroalcohólico comercial.

3.2. Objetivos

Aislar e identificar un compuesto marcador o un grupo de compuestos marcadores para establecer los métodos de control de calidad, para *Valeriana edulis* ssp. *procera* a partir de los perfiles cromatográficos, asimismo, demostrar su eficacia y seguridad mediante estudios preclínicos.

Para la realización del objetivo principal, se propusieron los siguientes objetivos específicos:

1. Evaluar los efectos psicolépticos del extracto de hidroalcohólico de *V. edulis* en ratones.
2. Realizar el estudio químico y farmacológico del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* mediante la prueba del cilindro de exploración en busca de aislar, identificar y elucidar la estructura del o los metabolitos con actividad sedante presentes en esta especie vegetal.
3. Desarrollar y validar un método analítico para el control de calidad de *V. edulis* y la estandarización del extracto hidroalcohólico a partir de ella.
4. Realizar el análisis cromatográfico (CCF y CLAR) de *V. edulis* como prueba de identidad.

5. Identificar los componentes volátiles relacionados con el aroma de valeriana (*V. edulis* y *V. officinalis*) mediante la técnica de HS-SPME-GC-MS
6. Evaluar la toxicidad oral por administración aguda y subcrónica del extracto etanólico de *V. edulis* y determinar la dosis letal 50 (DL₅₀) en ratas.
7. Elaborar una propuesta de monografía farmacopéica para que sea integrada a la FHEUM.

4. Materiales y métodos.

La guía de elaboración de monografías de drogas y preparaciones vegetales, de la OMS, sugiere comenzar con la evaluación del material vegetal como primer eslabón de la cadena de preparación de extractos, preparados y medicamentos herbolarios.

Siguiendo estas recomendaciones, se comenzó con el análisis de la raíz de *V. edulis* ssp. *procera*, iniciándose con la definición de la parte utilizada de la planta y su identificación botánica, continuando con las pruebas de pureza y contenido.

Las pruebas de pureza y contenido se realizaron para el extracto hidroalcohólico de valeriana para asegurar la consistencia y calidad de la preparación. Se continuó con la evaluación de la eficacia, la toxicidad del extracto y el estudio químico del extracto hidroalcohólico.

Finalmente, se realizó la caracterización y evaluación biológica de los compuestos aislados del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*.

4.1 Material vegetal.

Las partes subterráneas de *V. edulis* ssp. *procera* fueron obtenidas de Laboratorios Mixim S. A. de C. V. La identificación taxonómica fue realizada por el Dr. Roberto Enciso Rodríguez. Una muestra fue depositada en el Herbario del IMSS con el número de *voucher* IMSSM11697.

La raíz es la única parte de interés de *Valeriana edulis* ssp. *procera* y el uso generalizado es para padecimientos del sistema nervioso (Manzanero–Medina et al., 2009). En función de lo descrito, la identificación física se realizó tomando raíces libres de plagas o signos de enfermedad o podredumbre.

El material vegetal se secó a la sombra y se fragmentó con un molino manual. Posteriormente se almacenó en un lugar fresco y seco hasta el momento de su uso.

4.2 Pruebas Farmacopéicas para la raíz de *Valeriana edulis ssp. procera*.

La European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care (EDQM) establece en “Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparations” las pruebas y métodos que deben incluirse en una monografía sobre medicamentos y preparaciones a base de hierbas. Teniendo en cuenta las directrices de la EDQM y del Comité de Productos Medicinales a base de plantas (HMPC) se establecieron las siguientes pruebas para evaluar el material vegetal (Cuadro 2).

Cuadro 2. Pruebas de ensayo para *Valeriana edulis ssp. procera*.

- Caracterización macroscópica y microscópica
- Identidad cromatográfica
- Determinación de materia extraña
- Determinación de cenizas
- Determinación de material extraíble
- Determinación de agua y material volátil
- Determinación de metales pesados
- Determinación de microorganismos
- Determinación de contenido de principio activo

En estas pruebas se busca que el material vegetal esté bien identificado a través de parámetros botánicos y químicos; además se debe probar la ausencia de contaminantes químicos y microbiológicos. Otro punto fundamental es la cuantificación de los componentes biológicamente activos en la droga vegetal, así como desarrollar métodos para la caracterización de la actividad biológica a través de ensayos biológicos y mediante un perfil químico.

4.2.1 Control fisicoquímico de *V. edulis* ssp. *procera*.

4.2.1.1 Caracterización macroscópica y microscópica

La monografía de una planta medicinal debe incluir la descripción de sus características organolépticas, macroscópicas y microscópicas. La descripción sensorial frecuentemente ayuda a establecer de manera práctica la identidad y pureza de la droga vegetal. Las características macroscópicas comprenden la forma, tamaño, color y textura, entre otras que deben compararse con muestras auténticas o farmacopéicas para evitar errores. Las características microscópicas son indispensables para la identificación de drogas pulverizadas y la determinación de adulterantes (Sharapin, 2000).

4.2.1.2 Pruebas de identidad cromatográfica.

Se propusieron 3 metodologías por cromatografía para distinguir la raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera* de otras especies de valeriana o especies adulterantes de estas. Se describen los procedimientos a continuación.

4.2.1.2.1 Identidad en cromatografía de capa fina.

La cromatografía en capa fina se realizó con un equipo Linomat 5 de CAMAG para una muestra de *V. edulis*, ésta se comparó contra *V. officinalis*, así como con otras especies de origen nacional. Las condiciones óptimas encontradas fueron: volumen de aplicación de 2 µL, como fase móvil una mezcla de hexano: acetato de etilo (7:3) y revelador de ácido acético: ácido clorhídrico (1:1).

La muestra se preparó colocando 200 mg de raíz, previamente secada y molida, en un tubo cónico para centrifuga BD-Falcon® con 2.5 mL de metanol, se extrajo mediante agitación ultrasónica por 15 minutos y después se centrifugó a 2070 G durante 10 minutos; este proceso se realizó por triplicado y el sobrenadante se

transfirió a un matraz volumétrico de 10.0 mL que se aforó con metanol. Como sustancia de referencia se utilizó una mezcla de valepotriatos en metanol.

4.2.1.2.2 Identidad en cromatografía de líquidos de alta resolución.

En el análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) se utilizó un cromatógrafo marca Waters® (Waters Corp., Milford, MA, USA) modelo 680 compuesto de: un inyector Waters modelo U6K, un sistema de bombas Waters modelo 6000A, detector de arreglo de diodos (PDA) Modelo 996 y un ordenador con el software Empower Millennium para adquisición y procesado de datos. Las separaciones se lograron con la columna Luna C18 (2) (Phenomenex® Inc., Torrance, CA) [150 x 3.0 mm d.i., 5 µm]. La columna estaba equipada con una precolumna LC-18 de 2 cm (Supelco, Bellefonte, PA). La fase móvil consistió en agua (A) y acetonitrilo-metanol (1:1) (B), ambos con ácido fosfórico al 0.05%, la secuencia de elución fue gradiente que se muestra en el Cuadro 3. Todas las corridas se realizaron a 30°C. La detección de los compuestos se realizó a 254 nm.

Cuadro 3. Gradiente de elución de la fase móvil.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	0.8	98	2
10	0.8	83	17
25	0.8	50	50
40	0.8	0	100
45	0.8	0	100

4.2.1.2.3 Identidad en cromatografía de gases.

La cromatografía de gases (CG) se realizó en un cromatógrafo Agilent 6890N (Agilent Technology, Palo Alto, CA, USA) acoplado con analizador TOF-EM; se empleó la columna capilar DB-5 (10 m × 0.18 mm × 0.18 µm, J & W Scientific). Las condiciones de operación fueron las siguientes: Temperatura inicial de horno, 40°C

por 2 min, aumentándola hasta 300°C a una velocidad de 20°C/min; la temperatura del inyector fue de 300°C; se usó como gas acarreador helio (1 mL/min). La asignación de los compuestos de cada muestra se realizó utilizando el cálculo de los índices de retención de Kovats y su patrón de fragmentación por comparación con los que se encuentran en la biblioteca digital NIST 2.0 y datos reportados en la literatura.

La microextracción en fase sólida (SPME) se realizó con una fibra (Supelco Technology, St. Louis, MO, USA) con un recubrimiento de DVB/Carboxen/PDMS. Cada fibra recibió un pretratamiento de dos horas a 250°C dentro del CG. El proceso de extracción se realizó por 10 minutos a temperatura ambiente, a partir de 200 mg de raíz molida y seca de *V. edulis* ssp. *procera* con 75 mg de NaCl y 15 mL de agua destilada. A continuación, la fibra de SPME se introdujo en el inyector del cromatógrafo de gases y los compuestos volátiles se desadsorbieron térmicamente en la columna de CG.

4.2.1.3 Determinación de materia extraña.

La materia extraña se considera al material orgánico o inorgánico, ligero o pesado, cuya presencia en la droga no es deseable y que por arriba de un límite máximo se estima contaminante, considerándose entre otros: excretas, pelos de cualquier especie, fragmentos de insectos, suelo, material plástico y otros objetos (NOM-247-SSA1-2008).

Obtener por cuarteo y pesar 500 g del material vegetal molido. Extender la muestra sobre una superficie plana formando una capa delgada. Buscar y separar la materia extraña de forma manual a simple vista. Separar, pesar y calcular el porcentaje de materia extraña a partir de la cantidad de droga empleada (MGA-FH-0030, FEUM, 2013).

4.2.1.4 Determinación de cenizas.

La prueba determina el residuo después de la calcinación del material vegetal. La prueba tiene tres variantes, a saber:

- Cenizas totales, prueba para cuantificar la totalidad de minerales después de la descomposición de la materia orgánica en la muestra (Rea-Páez, 2017).
- Cenizas solubles en agua, prueba para determinar la cantidad de sales inorgánicas a partir de las cenizas totales, disueltas en agua destilada bajo condiciones específicas (NMX-F-260-1978).
- Cenizas insolubles en ácido, prueba para determinar la cantidad de sílice a partir de las cenizas totales, hirviéndolas en ácido clorhídrico y calcinando el material resultante nuevamente (NMX-F-327-S-1979).

4.2.1.4.1 Contenido total de cenizas

Pesar con precisión entre 2-4 g del material vegetal molido en un crisol, previamente puesto a peso constante (105°C, 2 h). Incinerar la muestra con un mechero hasta que la muestra esté libre de carbono; enfriar y pesar. Calcular el porcentaje de cenizas totales con referencia a la sustancia en base seca (MGA-FH-0060, FHEUM, 2013).

4.2.1.4.2 Contenido de cenizas insolubles en ácido.

Hervir las cenizas totales durante 5 minutos con 25 mL de ácido clorhídrico al 10%, recoger la materia insoluble en un papel de filtro sin cenizas, lavar con agua caliente hasta que el filtrado sea neutro e incinerar a aproximadamente 600 °C por 2 horas. Calcular el porcentaje de cenizas insolubles en ácido con referencia a la sustancia en base seca (MGA-FH-0060, FHEUM, 2013).

4.2.1.4.3 Contenido de cenizas solubles en agua.

Se adicionaron a las cenizas totales 25 mL de agua, y se llevó a ebullición por 5 min. Se filtró y el residuo se lavó con agua caliente. El papel filtro con el material insoluble se colocó en el crisol y se incineró por 1 h con un mechero. El crisol se dejó enfriar en un desecador y se pesó. Simultáneamente, un papel filtro sin muestra, de las mismas medidas y del mismo poro que el utilizado para la muestra, se incineró, se secó y se pesó bajo las mismas condiciones. La prueba se realizó por duplicado. Se calculó el porcentaje de cenizas solubles en agua en el material seco, restando el peso del residuo y del papel incinerado sin muestra, al residuo de cenizas totales (MGA-FH-0060, FHEUM, 2013).

4.2.1.5 Determinación de material extraíble.

Este método determina la cantidad de constituyentes activos extraídos con solventes de una determinada cantidad de material vegetal. Es empleado para materiales para los cuales no existe un ensayo químico o biológico adecuado (Farmacopea MERCOSUR: Métodos Generales de Farmacognosia, 2014).

4.2.1.5.1 Método I (Extracto acuoso)

Se colocó en un matraz balón 4 g de raíz molida, se adicionaron 100 mL de agua destilada. El matraz se agitó, se tapó y se dejó macerar por 1 h, después se calentó a ebullición suave y en reflujo durante 1 h, se enfrió y se pesó reajustando el peso total original con agua. Posteriormente, se filtró y se transfirieron 25 mL del filtrado a una cápsula de porcelana puesta previamente a peso constante (105 °C, 2 h) y se evaporó a sequedad. El residuo se secó (105 °C, 6 h) y se dejó enfriar 30 min en un desecador antes de pesarlo. Se calculó el porcentaje de material extraíble en agua con referencia al material vegetal en base seca (MGA-FH-0070, FHEUM, 2013).

4.2.1.5.2 Método I (Extracto hidroalcohólico).

Se colocaron 4 g de raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera* en polvo y se maceraron con 100 mL de etanol en un matraz durante 1 hora, después se calentó a ebullición suave y en reflujo durante 1 h, se enfrió y se pesó reajustando el peso total original con etanol. Se filtró rápidamente, tomando precauciones para evitar la pérdida de etanol, se transfirieron 25 mL del filtrado a una cápsula de porcelana puesta previamente a peso constante (200 °C, 2 h) y se evaporó a sequedad en un baño de agua. El residuo se secó (105 °C, 6 h) y se dejó enfriar 30 min en un desecador antes de pesarlo. Se calculó el porcentaje de material extraíble en etanol con referencia al material vegetal en base seca (MGA-FH-0070, FHEUM, 2013).

4.2.1.6 Determinación de agua y material volátil

Un exceso de agua en el material vegetal puede fomentar el crecimiento de agentes biológicos contaminantes, como los hongos o agilizar el deterioro por exceso de humedad. El procedimiento descrito en dicha monografía determina tanta materia volátil como contenido de agua (MGA-FH-0080, FHEUM, 2013).

4.2.1.6.1 Método I (Agua y material volátil)

Se pesaron 2 g de raíz molida de *Valeriana edulis* ssp. *procera* y se colocaron en un pesafiltros, previamente seco y a peso constante (105 °C, 2 h). El pesafiltros con la muestra se colocó dentro de una estufa a 105°C durante 2 h. Transcurrido el tiempo se retiró el pesafiltros de la estufa y se dejó enfriar dentro de un desecador, posteriormente se pesó (hasta que la diferencia entre dos pesadas sucesivas no exceda de 0.25% del peso). Se calculó la pérdida de peso, en porcentaje, con relación al material vegetal en base seca (MGA-FH-0080, FHEUM, 2013).

4.2.1.6.2 Método II (Humedad)

Se pesaron 2 g de muestra y se colocaron en una charola de aluminio formando una capa homogénea. Se colocó la charola con muestra en el espacio destinado para ello en la termobalanza (A&D, AD4714A), se encendió el equipo y se introdujeron los valores de temperatura de secado (105°C), tiempo de secado (15 minutos) y peso de la muestra. Se registró el porcentaje de humedad una vez concluido el tiempo de secado (NMX-F-428-1982).

4.2.1.7 Determinación de metales pesados.

Este ensayo se emplea para establecer el contenido de impurezas metálicas que reaccionan con el ion sulfuro, el resultado se expresa como porcentaje (en peso) de plomo en la sustancia en ensayo, determinado mediante comparación visual con una disolución estándar de nitrato de plomo.

Se pesaron 2 g de raíz molida y se transfirieron a un crisol, se agregó suficiente ácido sulfúrico para impregnar la sustancia y se calentó hasta que toda la muestra se carbonizó por completo. Se agregó a la muestra carbonizada 2 mL de ácido nítrico y 5 gotas de ácido sulfúrico y se calentó hasta que dejó de desprender vapores blancos.

Se introdujo el crisol en una mufla a 600 °C por 2 horas. Se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 4 mL de ácido clorhídrico 6 N al crisol y se calentó en un baño de vapor durante 15 minutos. Se agregó al residuo 1 gota de ácido clorhídrico, 10 mL de agua caliente y se dejó reposar durante 2 minutos. Se agregó gota a gota hidróxido de amonio 6 N hasta que la solución fue alcalina frente al papel de tornasol, se diluyó a 25 mL con agua y se ajustó el pH entre 3,0 y 4,0 con ácido acético 1 N.

Se filtró la solución y se lavó el papel filtro con 10 mL de agua, se combinó el filtrado y el agua de lavado en un tubo de Nessler de 50 mL, se llevó a un volumen de 40 mL con agua y se mezcló.

Se comparó con una solución de referencia de nitrato de plomo con una concentración equivalente a 10 µg de plomo. A cada uno de los tubos que contenían la solución de referencia y la solución muestra, respectivamente, se les agregó 1.2 mL de tioacetamida-glicerina básica (SR) y 2 mL de solución reguladora de acetato pH 3.5, se diluyó a 50 mL con agua, se mezcló, se dejó reposar durante 5 minutos y se observaron (Domínguez, 2007).

4.2.1.8 Determinación de microorganismos.

El material vegetal posee generalmente un gran número de bacterias o moho provenientes del suelo o como parte de la microflora propia de cada planta, predominando las bacterias aerobias formadoras de esporas. La identificación de *Escherichia coli* y de mohos es un indicativo de la calidad en las técnicas de producción, cosecha y almacenamiento. El análisis de microorganismos específicos engloba la identificación de enterobacterias y otras bacterias gram-negativas (*Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*) (MGA-FH0170, FHEUM, 2013).

La evaluación se realizó por el Departamento de Control Analítico de la Facultad de Química, UNAM. El procedimiento empleado se encuentra descrito en el MGA 0571, Límites Microbianos, de la FEUM en su décima edición.

4.3 Obtención del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

La preparación del extracto se realizó por el método de maceración que consiste en poner en contacto prolongado durante un tiempo predeterminado el material vegetal

con el menstuo constituyendo un conjunto homogéneamente mezclado en el que el menstuo actúa simultáneamente sobre todas las proporciones de la droga, circulando a través en todas las direcciones y sentidos y disolviendo sus componentes hasta producirse una concentración en equilibrio con la del contenido celular. (Selles, 1992).

La preparación de los extractos se realizó con 5 kg de la raíz molida y seca de *Valeriana edulis* ssp. *procera* la cual se sometió a un proceso de extracción sólido – líquido a temperatura ambiente, utilizando etanol como disolvente. Cada lixiviación se mantuvo por 24 horas y se repitió dos ocasiones más el proceso.

Del proceso de maceración con etanol se obtuvo del extracto de etanol (**EE**) 255.3 g (4.86% de rendimiento).

4.4 Control de calidad del extracto hidroalcohólico de la raíz de *V. edulis* ssp. *procera*.

La Farmacopea Europea en su monografía general “Preparaciones de medicamentos a base de hierbas” establece los métodos de análisis que se aplican a todas las preparaciones a base de hierbas para uso medicinal. Por lo que se realizaron las siguientes pruebas:

Cuadro 4. Pruebas de control de calidad del extracto hidroalcohólico de la raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

Prueba:

- Determinación de características organolépticas
- Determinación de pH
- Determinación de sólidos totales
- Determinación de densidad relativa
- Determinación de grado alcohólico

- Determinación de microorganismos
- Determinación del contenido de principios activos

Para cumplir el objetivo de estandarización fitoquímica del extracto de *Valeriana edulis* ssp. *procera* el extracto se ajustó a la misma concentración (0.8:1 p/v) en todos los casos.

4.4.1 Determinación de características organolépticas

La evaluación sensorial se define como “la disciplina científica utilizada para evocar, medir analizar e interpretar las reacciones a aquellas características de alimentos y otras sustancias, que son percibidas por los sentidos de la vista, olfato, gusto, tacto y oído” (Stone y Sidel, 2004). En este contexto, el control de calidad del extracto se realiza considerando los atributos de color, olor y sabor (Piaña et al., 2004).

El sabor no se evalúa en los extractos provenientes de plantas a menos que se utilicen como saborizantes (EDQM, 2007), por lo que no es necesario realizar un análisis organoléptico de sabor.

4.4.2 Determinación de pH

La magnitud pH es considerada como una medida de la actividad de los iones hidrógeno en la disolución (NMX-AA-008-SCFI-2016). La determinación de pH se realizó siguiendo el instructivo del equipo (HANNA HI2210). Se calibró el electrodo dentro del rango de pH de 4 a 7. Después se lavó el electrodo con agua destilada y se secó con papel absorbente. Se introdujo el electrodo en el un vaso de precipitados de 100 mL que contenía 50 mL del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*, se mantuvo en agitación suave y se esperó el tiempo suficiente hasta que el valor se estabilizo. Se lavó el electrodo con agua destilada y se determinó nuevamente el pH para corroborar el valor. La determinación de pH se realizó con 10 muestras de extractos preparadas independientemente.

4.4.3 Determinación de sólidos totales

Los sólidos totales son el residuo resultante en un recipiente luego de la evaporación de una muestra y su subsecuente secado en un horno a temperatura definida y constante (INVEMAR, 2003).

Se midieron 5.0 mL del extracto hidroalcohólico de *Valeriana edulis* ssp. *procera* y se transfirieron a un pesafiltros, previamente seco y a peso constante (105 °C, 2 h). El pesafiltros con la muestra se colocó en baño María hasta sequedad y posteriormente se introdujo a una estufa a temperatura de 105±2°C por 2 h. Se dejó enfriar el crisol en un desecador para equilibrar la temperatura y se pesó en una balanza analítica. Transcurrido el tiempo se retiró el pesafiltros de la estufa y se dejó enfriar dentro de un desecador, posteriormente se pesó (hasta que 2 pesadas consecutivas no difirieron por más de 0.25% en peso) (NMX-F-527-1992). Esta determinación se repitió 7 veces.

4.4.4 Determinación de densidad relativa

Esta prueba se basa en la relación que existe entre el peso de un volumen de una sustancia y el peso del mismo volumen de agua, a una temperatura dada (NOM-138-SSA1-1995).

Se pesó el picnómetro vacío, previamente puesto a peso constante, y se anotó su masa (m_1). Enseguida se llenó el picnómetro con agua (fluido de referencia), al cerrarlo, el nivel de agua sube por el capilar y el capilar también se llenará de agua. Cuando el agua llenó el capilar, se secó el picnómetro por fuera y se pesó (m_2). Posteriormente, se eliminó el agua del picnómetro, se enjuagó con la muestra y después se llenó con el extracto. Se secó el picnómetro por fuera y se pesó (m_3). Con los tres datos de peso obtenidos se determinó de la densidad de la disolución: La determinación se realizó 7 veces con muestras independientes.

$$\rho_{rel} = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1}$$

4.4.5 Determinación de alcohol

Se midieron 25 mL del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera* a una temperatura de 20°C en un matraz volumétrico. Se transfirieron a un matraz balón de 250 mL y se agregó un volumen igual de agua destilada. Se destiló a una velocidad que permitiera obtener un líquido claro. El destilado se llevó a la temperatura inicial de 20°C, después se ajustó el volumen al inicial con agua destilada y se determinó la densidad relativa a 20 °C (ver Determinación de la densidad relativa). Por medio de la tabla de grado alcohólico volumétrico correspondiente a la densidad relativa a 20°C se calculó el porcentaje en volumen de alcohol contenido en el extracto.

4.4.6 Determinación de microorganismos

La determinación microbiológica se realizó de la misma forma como se describe en el punto 4.2.1.8; consistió en determinar la presencia de mesófilos totales, hongos, Levaduras, *Escherichia coli*, *Pseudomona aeruginosa*, *Salmonella spp* y *Staphylococcus aureus*.

4.4.7 Determinación del contenido de principios activos.

Como compuesto marcador se utilizó al flavonoide linarina, como propuesta del presente trabajo, ya que cumple con las características que una molécula debe tener para ello (Navarrete et al., 2006).

4.4.7.1 Condiciones cromatográficas para el análisis de linarina.

El análisis de linarina se realizó en un cromatógrafo Waters Modelo 600E (Waters Corp., Milford, MA, USA) equipado con una bomba Waters Delta 600, un inyector Waters 717 Plus, un controlador automático de gradientes y un detector UV con arreglo de fotodiodos Waters 2996 y una estación computarizada para el procesamiento de datos equipada con el software Waters Empower.

4.4.7.2 Condiciones cromatográficas del método analítico para la detección y cuantificación de linarina.

El análisis cromatográfico por CLAR se realizó a 25°C empleando una columna Symmetry® C18 (250 mm de largo x 4.6 mm de diámetro interno, con un tamaño de partícula de 5 µm) equipada con una precolumna LC-18 de 2 cm (Supelco). Se utilizó el modo automático del inyector con un volumen de 20 µL. La fase móvil consistió en una mezcla de ácido fosfórico al 0.4% en agua (A) y acetonitrilo (B), la secuencia de elución en gradiente se muestra en el Cuadro 5. El flujo se ajustó a 1.0 mL/min, y un tiempo de corrida de 30 minutos. La longitud de onda para la detección de linarina fue de 269 nm.

Cuadro 5. Gradiente de elución de la fase móvil.

Tiempo (min)	Flujo (mL/min)	%A	%B
0	1.0	72	28
20	1.0	60	40
30	1.0	72	28

4.4.7.3 Validación del método analítico para la detección y cuantificación de linarina.

La validación del método se realizó siguiendo los criterios establecidos por la ICH y la Guía del Validación de métodos analíticos editada por el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos. Los parámetros de desempeño descritos en estos documentos se describen a continuación.

4.4.7.3.1 Preparación de la matriz de trabajo.

Siete gramos de raíz de *Valeriana edulis* ssp *procera* seca y molida se extrajo a reflujo durante 2 horas con metanol, el procedimiento se repitió tres veces. La raíz extraída (matriz de trabajo) se secó bajo corriente de aire y se almacenó en un lugar fresco hasta el momento de su uso.

Para la obtención del placebo analítico se colocaron 200 mg de la raíz extraída, se extrajeron con 3 mL de metanol en agitación ultrasónica durante 15 minutos y se centrifugaron a 2070 G por 10 minutos, el sobrenadante se transfirió a un matraz volumétrico de 10 mL, el procedimiento se realizó por triplicado. Se juntaron los sobrenadantes de cada extracción y se llevó a volumen con metanol. La solución obtenida se clarificó a través de un filtro de membrana de nylon (0.45 µm, Acrodisc®) y se inyectó en el cromatógrafo de líquidos para su análisis. El procedimiento se realizó por triplicado.

4.4.7.3.2 Validación del sistema de análisis

4.4.7.3.2.1 Adecuabilidad

La evaluación de los parámetros de desempeño del sistema cromatográfico se determinó con la inyección por quintuplicado de una solución de referencia de linarina con una concentración de 140 µg/mL. Los parámetros calculados fueron el

coeficiente de variación (CV), factor de capacidad (k') y el factor de asimetría (T) obtenidos directamente del software Empower.

4.4.7.3.2.2 Linealidad

La curva de calibración (concentración vs absorbancia) se construyó a partir de una solución madre de 400 $\mu\text{g/mL}$, pesando 10 mg de linarina que se disolvió en 25.0 mL de metanol, de ésta se tomó una alícuota de 7.0 mL y se aforó a 10.0 mL con metanol. De la solución anterior se prepararon las disoluciones necesarias para obtener 6 niveles de concentración de linarina (28, 84, 112, 140, 168 y 196 $\mu\text{g/mL}$). Cada solución se filtró, se colocó en un vial y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo.

Se grafica el área bajo la curva (ABC) correspondiente al pico de linarina con respecto a la concentración para cada solución y se determinó por un análisis de regresión simple la pendiente (b_1), ordenada al origen (b_0) y el coeficiente de determinación (r^2).

Los valores de regresión obtenidos se compararon con los siguientes criterios de aceptación $b_1 \neq 0$, $b_0 = 0$ y $r^2 \geq 0.98$.

4.4.7.3.2.3 Precisión

En la evaluación de la repetibilidad del sistema se preparó una solución de referencia de linarina con una concentración de 140 $\mu\text{g/mL}$, correspondiente al punto central de la curva de calibración; la solución se filtró y se inyectó por sextuplicado. Con los valores de ABC del pico correspondiente a linarina se determinó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (s) y el coeficiente de variación (CV). El criterio de aceptación fue $CV \leq 2.0\%$.

4.4.7.3.3 Validación del método de análisis

4.4.7.3.3.1 Especificidad

Se utilizó hesperidina para evaluar la especificidad del método debido a que es un flavonoide similar a la linarina; tiene un grupo metilo en la posición C-3'. Se inyectó una solución de referencia de linarina a una concentración de 140 µg/mL junto con una solución de referencia de hesperidina 140 µg/mL en metanol. Las soluciones se inyectaron bajo las condiciones experimentales descritas con anterioridad, se analizaron los cromatogramas y se observó que los picos correspondientes a linarina y hesperidina no se encontraron traslapados entre sí.

4.4.7.3.3.2 Linealidad

Para la determinación de este parámetro se utilizaron los mismos niveles de concentración que se utilizaron para la curva estándar. Se prepararon tres placebos adicionados para los cuales se pesaron 200 mg del placebo analítico en tubos de 15 mL, se les adicionó a partir de una solución stock de linarina, el volumen correspondiente para obtener concentraciones de 28, 84, 112, 140, 168 y 196 µg/mL correspondientes a cada nivel de la curva.

Cada uno de los placebos adicionados se extrajo con 2.5 mL de metanol en agitación ultrasónica durante 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 2070 G durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en matraces volumétricos de 10 mL. Este procedimiento se realizó por triplicado, se reunieron los sobrenadantes, aforándolos posteriormente con metanol. Estas muestras se analizaron en el cromatógrafo con el método de análisis "Valeriana".

Se construyó la gráfica de cantidad adicionada contra cantidad recuperada y se calculó la pendiente (m), el porcentaje de recobro para cada placebo adicionado, el promedio (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

4.4.7.3.3.3 Exactitud y repetibilidad (García et al, 2002; ICH 2005)

Se prepararon seis placebos adicionados con una concentración de 140 µg/ mL de linarina y se realizó el mismo procedimiento de extracción que se describió en linealidad del método (ICH, 2005). Las muestras se analizaron en el cromatógrafo de líquidos. Se determinó el porcentaje de recobro, promedio (\bar{y}), la desviación estándar (S), el coeficiente de variación (CV) y el intervalo de confianza para la media (IC_{μ}) del porcentaje de recobro.

$$IC_{\mu} = \bar{y} \pm t_{0.975, n-1} \frac{S}{\sqrt{n}}$$

4.4.7.3.3.4 Precisión (Precisión intermedia).

Para este parámetro dos analistas prepararon tres placebos adicionados por cada uno, con una concentración de 140 µg/ mL, en dos días diferentes. Los placebos se prepararon siguiendo el procedimiento descrito anteriormente para determinar los parámetros anteriores y posteriormente se analizaron las muestras.

Se calculó la media aritmética (\bar{y}), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

4.4.7.3.3.5 Robustez (García et al, 2002; ICH 2005)

Para este parámetro se preparó un placebo adicionado con una concentración de 140 µg/mL, el cual se inyectó por triplicado utilizando las condiciones normales del método para el análisis de linarina. La misma muestra se analizó por triplicado variando la temperatura del método a 30°C o 35°C.

Se determinó la media aritmética de la muestra analizada con las condiciones normales (\bar{y}_0) y de cada condición diferente a la normal (\bar{y}_i). Se calculó la diferencia de la media aritmética de cada condición con respecto a la condición normal (d_i).

$$|d_i| = |\bar{y}_i - \bar{y}_0|$$

El criterio de aceptación para la prueba es una diferencia absoluta (d_i) menor al 2%.

4.4.7.3.3.6 Tolerancia

Se preparó un placebo adicionado con una concentración de 140 $\mu\text{g/mL}$. La muestra se analizó por triplicado utilizando una columna Symmetry® C18 150 mm x 4.6 mm d.i. con tamaño de partícula de 5 μm y una columna Symmetry® C18 250 mm x 4.6 mm d.i. con tamaño de partícula de 5 μm (García et al, 2002; ICH 2005).

Se calculó la media aritmética (\bar{y}), desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV) para el área de cada columna. Y se comparó que los valores obtenidos no fueran diferentes por más del 5%.

4.4.7.3.3.7 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) (García et al, 2002; ICH 2005)

Se determinó con la señal de ruido del equipo, lo cual consiste en inyectar en el cromatógrafo una muestra de placebo analítico utilizando el método de análisis "Valeriana" y medir la respuesta presente en el tiempo de retención de la linarina (señal de ruido). La concentración correspondiente al límite de detección es aquella que presente una señal tres veces mayor a la señal de ruido mientras que la concentración que corresponde al límite de cuantificación es 10 veces mayor a la señal de ruido (García et al, 2002; ICH 2005).

Posteriormente se prepararon 3 placebos adicionados con la concentración correspondiente al límite de detección para ser analizadas y finalmente determinar el coeficiente de variación (CV), por otra parte, a 3 placebos adicionados con la concentración correspondiente al límite de cuantificación se determinó exactitud y repetibilidad (García et al, 2002; ICH 2005).

4.5 Pruebas de toxicidad.

Las pruebas para evaluar la toxicidad involucran organismos vivos que permiten realizar mediciones experimentales sobre toxicología, efectos no cancerígenos, genotoxicidad, carcinogenicidad, así como la reproducción y el desarrollo causados por agentes químicos en sistemas biológicos, ofreciendo resultados fiables, rápidos y a bajo costo (Musa, 2012; Ávalos-Soto et al., 2014; Teke y Kuete, 2014).

4.5.1 Toxicidad aguda en ratones.

Los experimentos se realizaron en ratones macho albinos ICR (peso corporal de 25 a 30 g) obtenidos de ENVIGO. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz/oscuridad y libre acceso al agua. Se preparó a partir del extracto hidroalcohólico de la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* las siguientes dosis: 10, 100, 600 y 1000 mg/kg. Las dosis se administraron por vía intraperitoneal en un volumen de 0.1 mL/10 g de peso corporal.

De acuerdo con la metodología de Lorke (1983) los animales se dividen en dos fases, en la primera fase se administraron a los animales con las dosis de 10, 100 y 1000 mg/kg y en la fase dos con las dosis de 600, 1200 y 1600 mg/kg. Cabe mencionar que las dosis de 1200 y 1600 mg/kg no se prepararon porque el extracto no se solubilizaba en la cantidad necesaria para preparar dichas dosis.

Los ratones se observaron durante las primeras 8 h posteriores a la administración del tratamiento, a las 24 horas y diariamente durante 14 días, a fin de observar la

mortalidad o efectos tóxicos en los animales. Una vez finalizado el experimento los animales se sacrificaron por sobredosis en una cámara de CO₂.

4.5.2 Toxicidad en ratas.

Los experimentos se realizaron en ratas macho y hembras Wistar (peso corporal de 200 a 225 g) obtenidas de ENVIGO. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12 h luz/oscuridad y libre acceso al agua. Se preparó a partir del extracto hidroalcohólico de la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* una dosis exploratoria de 2000 mg/kg. La dosis se administró por vía oral en un volumen de 0.3 mL/100 g de peso corporal.

4.5.3 Toxicidad aguda en ratas.

La toxicidad aguda del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera* se evaluó siguiendo las directrices para pruebas de productos químicos de la OECD en su guía de evaluación para toxicidad aguda por vía oral (OECD 423). En la evaluación se crearon grupos de ratas macho y hembra (n = 3), a las que se les asignó uno de los siguientes tratamientos: Solución salina o extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp *procera*.

Se observaron los grupos cada hora durante las 8 horas próximas al tratamiento y posteriormente la observación se llevó cada 24 h hasta cumplir 14 días. Se registraron los cambios el peso al inicio y final del tratamiento. Al término de los 14 días se realizó una autopsia para observar cambios macroscópicos en los órganos.

4.5.4 Toxicidad subcrónica en ratas.

La toxicidad subcrónica del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera* se evaluó siguiendo las directrices para pruebas de productos químicos de la OECD en su guía de estudio de toxicidad en dosis repetidas por 28 días en roedores vía oral (OECD 407). Para todas las evaluaciones se usaron grupos de ratas macho y

hembra (n = 3), a las que se les asignó uno de los siguientes tratamientos diariamente: Solución salina o extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*.

Se observaron los grupos cada hora durante las 8 horas próximas al tratamiento y posteriormente la observación se llevó cada 24 h hasta cumplir 28 días. Se registraron los cambios de peso al inicio y cada día de tratamiento. Al término del periodo de observación se realizó una autopsia para observar cambios macroscópicos en los órganos.

4.6 Ensayos de eficacia.

Las evaluaciones farmacológicas sobre el sistema nervioso central (SNC) se realizaron con un perfil neurofarmacológico que consiste en un conjunto de pruebas conductuales que permiten identificar de manera preliminar la actividad en el SNC que tiene una sustancia desconocida.

La evaluación comienza con la prueba de Irwin que consiste en hacer un estudio preliminar observacional, para identificar un efecto depresor o estimulante del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* spp. *procera* (100, 300 y 1000 mg/Kg, i.p.) en el SNC de ratones. Posteriormente, se realizaron las pruebas neurofarmacológicas específicas para evaluar la ansiedad, motriz exploratoria, la coordinación motora, y percepción sensorial.

4.6.1 Actividad ansiolítica.

La evaluación del efecto ansiolítico se realizó como prueba exploratoria en el extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera* y posteriormente con la linarina y el valeiridósido A utilizando modelos de respuesta no condicionada, donde se busca medir la respuesta conductual o fisiológica ante estímulos estresantes o nuevos (Vogel y Vogel, 1997; Takeda et al., 1998).

4.6.1.1 Prueba de cilindro de exploración.

La evaluación se realizó sobre ratones ICR los cuales fueron administrados con los diferentes tratamientos (extracto hidroalcohólico, linarina o valeiridósido A). El grupo control recibió solución salina y el grupo testigo diacepam (2.5 mg/kg). Transcurridos 30 minutos posteriores a la administración se introdujo a cada animal dentro de un cilindro de vidrio por la parte superior de éste y se observó el número de levantamientos realizados por el animal por un periodo de 5 minutos. Finalmente, el animal se retira del cilindro y se registra el número de levantamientos que realizó (Hiller y Zetler, 1996; Oliva et al., 2004).

La reducción del número de levantamientos mostrado por un ratón después de ser colocado en un ambiente no familiar revela un efecto sedante (Oliva et al., 2004).

4.6.1.2 Prueba de enterramiento de esferas

Para la evaluación se usa una caja de acrílico (26 cm de largo, 20 cm de ancho y 20 cm de altura) que se llena con aserrín formando una cama con un espesor entre 5 a 10 cm, en el que se colocarán canicas en hileras distribuidas uniformemente (Angoa-Pérez, 2013).

La prueba inicia colocando al ratón en el centro de la caja y dejando interactuar con el entorno por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo se contabiliza el número de esferas enterradas hasta 2/3 de profundidad (Kedia y Chattarji, 2014). El tratamiento se administró por vía intraperitoneal 30 minutos antes de la prueba (Njung'e y Handley, 1991).

El modelo evalúa el comportamiento de los roedores de enterrar de manera defensiva objetos desconocidos al encontrarse en un entorno nuevo (Pinel y Treit, 1978). Por lo tanto, el mayor número de esferas enterradas es un indicador de ansiedad, neofobia o comportamiento obsesivo-compulsivo (Çalışkan et al., 2017).

4.6.2 Actividad motriz exploratoria.

4.6.2.1 Prueba de campo abierto.

La prueba se realizó utilizando un actímetro (Harvard apparatus, MA, USA) que consiste en una caja (40 cm de ancho x 40 cm de largo x 40 cm de alto), con 2 anillos empotrados sobre las paredes que contienen 32 rayos infrarrojos (16 en cada uno); que permiten registrar en el equipo la actividad locomotora, movimientos estereotipados y levantamientos de los roedores. Para la prueba se deposita al animal en el centro de la caja y se registra la deambulaci3n por un periodo de 5 minutos.

La evaluaci3n se basa en la medici3n de la deambulaci3n de los roedores que es una combinaci3n de la actividad locomotora, unidad de exploraci3n, la neofobia, agorafobia y otros aspectos de la ansiedad o el miedo en ratones. Por lo que una disminuci3n en el nivel de actividad b3sica del aparato locomotor en el animal es causada por la ansiedad y el miedo (Seo-Hee et al., 2013). Por lo que un aumento en dicha actividad inducido por una sustancia se relaciona principalmente con un efecto ansiol3tico (Gonz3lez-Trujano et al., 1998).

4.6.2.2 Prueba de tablero de hoyos.

Consiste en un prisma cuadrangular descubierto, de 25 cm de altura y base cuadrada de 40 cm de lado. Su superficie presenta distribuidos uniformemente dieciséis agujeros (3 cm de diámetro) equipados con un par de fotoceldas infrarrojas que registran automáticamente el número de veces que el rat3n introduce la cabeza en ellos. La prueba en el tablero tiene una duraci3n de 3 minutos y se desarrolla bajo iluminaci3n con luz roja. La sesi3n comienza con el animal situado en el centro del aparato. Los extractos, veh3culos y f3rmacos se administraron por v3a intraperitoneal 30 minutos antes de la prueba (Vogel y Vogel, 1997; Takeda et al., 1998).

La prueba se fundamenta en la tendencia de los roedores para introducir su cabeza u hocico dentro de agujeros como una respuesta conductual a un entorno nuevo por lo que la disminución en el número de hoyos explorados indica un efecto ansiolítico por parte de la sustancia administrada (Vogel y Vogel, 1997; Takeda et al., 1998).

4.6.2.3 Prueba de miorrelajación

El aparato consiste en una barra metálica (2 mm de diámetro y 60 cm de largo) que se encuentra sujeta a 40 cm de altura. La prueba consiste en colocar al ratón suavemente sobre la parte superior de la barra de modo que sólo sus patas delanteras puedan sujetarse a ella. Se mantiene el torso del animal procurando que permanezca perpendicular a la barra y se tira del ratón de manera constante (sin sacudidas) hasta que el ratón suelte la barra o se cumplan 30 segundos (Vogel y Vogel, 1997).

Los tratamientos utilizados durante la prueba se administraron por vía intraperitoneal. Después de la administración, cada 10 minutos, hasta alcanzar un tiempo de 120 minutos, los ratones se colocan en el equipo durante 30 segundos. Se registró el tiempo que permaneció sujetó el animal a la barra en cada periodo de evaluación de la prueba.

Esta prueba considera que la miorrelajación del músculo esquelético inducida por un compuesto se evalúa por la capacidad de los ratones de permanecer sujetos a una barra por un tiempo determinado, el cambio en el tiempo de agarre se considera un efecto del compuesto sobre la función neuromuscular (Vogel y Vogel, 1997).

4.6.2.4 Prueba de Rota – Rod

El equipo (Ugo Basile 7600) consiste en un tubo (3-3.5 cm de diámetro) de madera o metal recubierto de plástico (Pritchett y Mulder, 2003) unido a un rotor ajustado a una velocidad angular de 16 rpm (Vogel, 2002). La barra se encuentra a una altura

aproximada de 15 cm por encima de la mesa a fin de desalentar a los animales de saltar del rodillo (Pritchett y Mulder, 2003).

Para la prueba se utilizan ratones sometidos a una prueba preliminar. Únicamente los animales que han demostrado la capacidad para permanecer sobre el vástago en movimiento por al menos 30 segundos se utilizan para la evaluación de los compuestos.

Los tratamientos utilizados durante el ensayo se administraron por vía intraperitoneal. Después de la administración, cada 10 minutos, hasta alcanzar un tiempo de 120 minutos, los ratones se colocan en el equipo durante 30 segundos. El tiempo que duró sobre el rodillo cada animal se registró.

Esta prueba considera que la relajación del músculo esquelético inducida por un compuesto puede ser evaluada por la habilidad de los ratones o ratas de permanecer sobre un vástago giratorio (Vogel, 2002), el cambio en la coordinación motora se considera un efecto del compuesto sobre el Sistema Nervioso Central (González-Trujano et al., 1998).

4.6.3 Percepción sensorial.

En la evaluación de sustancias con actividad sobre el SNC se busca que éstas no tengan efecto sobre los estímulos que recibe el individuo de su entorno. La manera más común de evaluar esta actividad es con modelos de nocicepción donde se evalúa que no se modifique la respuesta dolorosa a un estímulo nocivo.

4.6.3.1 Prueba de estiramiento abdominal.

El modelo consiste en la administración de un algógeno por vía intraperitoneal para inducir dolor visceral que provoca como respuesta refleja el estiramiento abdominal del animal (Laird et al, 2002).

La prueba se realizó administrando intraperitonealmente el tratamiento (solución salina, diclofenaco o extractos orgánicos) al ratón. Transcurridos 30 minutos después de la administración del tratamiento, se administra ácido acético 0.6% i.p. Inmediatamente después de la administración del algésico, se contabilizó el número de estiramientos en intervalos de 5 minutos hasta alcanzar un periodo de 20 minutos (Gebhart, 2000).

4.6.3.2 Prueba de Randall-Selitto

La prueba consiste en una pieza cónica acabada en punta roma motorizada que avanza lentamente contra un sitio estandarizado en el animal. La punta de estimulación va montada sobre una galga extensiométrica (un indicador de tensión), que permite determinar la fuerza (expresada en gramos fuerza) que se ejerce. La prueba termina cuando se observa que la presión provoca una respuesta de abstinencia o una vocalización que se designa como el umbral de dolor del animal (Bennett et al., 2003).

En la evaluación se utilizó un Analgesímetro (Ugo Basile 37215), donde se colocó la parte media de la cola del animal, se activó el mecanismo que ejerce la fuerza y se mantuvo hasta que el animal emitiera una vocalización. Durante el estudio la fuerza máxima aplicada por el mecanismo nunca superó los 500 g para evitar daño tisular en los animales. La prueba se realizó previa administración i.p. del tratamiento y 30 minutos posteriores a este.

4.6.3.3 Prueba de retirada de cola por inmersión en agua caliente y fría.

Esta prueba de comportamiento tuvo como propósito obtener una reacción por efecto de un estímulo térmico localizado, empleando la analogía de las respuestas inducidas por una estimulación similar y registradas a nivel supraespinal en experimentos electrofisiológicos (Attal et al., 1990). El principio de la prueba consistía en sumergir la parte final de la cauda de la rata (5 cm) en un baño de agua

a una temperatura de $55 \pm 2^{\circ}\text{C}$ o $5 \pm 2^{\circ}\text{C}$ según sea el caso. El animal se manipuló cuidadosamente y se envolvió en una toalla para que solo las extremidades traseras y la cola quedaran libres, las ratas que no retiraban la cola durante un período de 15 segundos se retiraban del agua para evitar daño tisular. La prueba se evalúa antes y 30 minutos posteriores de la administración i.p. del tratamiento.

4.6.3.4 Prueba de la formalina

El modelo evalúa los efectos analgésicos de compuestos para estados de dolor persistente en los que se produce daño tisular (Bannon, 2001). Se marcó la pata derecha trasera con un marcador permanente para indicar que se inyectaría con formalina. Se colocó a las ratas marcadas en una caja de acrílico transparente y espejos de 40 x 40 cm detrás y al lado del contenedor para asegurarse de que las patas marcadas de los animales se puedan ver desde todos los ángulos. Los animales se aclimataron por lo menos durante 15 minutos. Se inyectó por vía i.p. a los animales con el compuesto de prueba o el vehículo según fuera el caso, se dejó reposar a los animales por 30 minutos para que la sustancia surtiera efecto.

Posteriormente, en la región plantar de la pata trasera marcada del animal se administró vía subcutánea 50 μL de formalina 0.5% (v/v). Inmediatamente después de la inyección de formalina, se contó el número de sacudidas de la pata administrada por periodos de 1 minuto cada 5 minutos durante 60 minutos. Se consideró una retirada rápida y breve o una flexión de la pata como sacudida.

4.6.3.5 Inflamación inducida por carragenina

El volumen de la pata trasera izquierda de los animales se midió antes del tratamiento utilizando un pletismómetro (Ugo Basile, 37140). A continuación, se administró el tratamiento y 30 minutos después se inyectó 50 μL de carragenina al 1% (p/v) en una solución isotónica en la zona plantar de la pata trasera izquierda de todos los animales para inducir el edema. El volumen del líquido desplazado por la

pata con edema se midió a los 60, 120, 180 y 240 minutos posteriores a la administración de la carragenina (Zlatanova et al., 2018).

4.7 Análisis estadístico.

Se empleó un diseño de bloques aleatorizados en cada una de las pruebas neurofarmacológicas. Cada bloque se construyó con al menos 6 individuos. Los resultados se expresan como la media aritmética \pm el error estándar medio. En cada evaluación se contó con el grupo control (solución salina) y grupos testigo (fármaco de referencia).

El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza de una vía (ANOVA) con un valor de significancia de 0.05 ($\alpha = 0.05$), utilizando el programa GraphPad Prism ver. 6. En caso de encontrar una diferencia significativa entre los grupos con la prueba ANOVA se realizó la prueba *post hoc* t de Dunnett para encontrar la diferencia significativa con el grupo control.

4.8. Caracterización y elucidación estructural de compuestos naturales.

Los espectros de resonancia magnética nuclear protónica (RMN ^1H) y de carbono 13 (RMN ^{13}C), así como los experimentos de correlación homonuclear COSY, TOCSY y de correlación heteronuclear HMBC fueron determinados en el equipo Varian Unity INOVA 400 MHz, operado a 400 MHz para RMN ^1H y a 100 MHz para RMN ^{13}C , empleando cloroformo deuterado (CDCl_3), agua deuterada (D_2O) o metanol deuterado (CD_3OD) como disolventes. Los desplazamientos químicos (δ) están expresados en partes por millón (ppm) y las constantes de acoplamiento (J) en hercios (Hz). Las multiplicidades están asignadas con la siguiente notación: singulete (s), doblete (d), triplete (t), cuatriplete (c), multiplete = (m), doble doblete = (dd), doble triplete = (dt), etc.

Los espectros de masas (EM) fueron realizados por la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la Industria (USAI) en los espectrómetros de masas Synapt G2-S y Agilent 6890L. Los fragmentos significativos se indican como: m/z (relación masa-carga), con masa exacta determinada para el ion molecular (M) o fragmento iónico adecuado.

4.8.1 Estudio químico de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

4.8.1.1 Fraccionamiento del extracto de etanol (EE).

El fraccionamiento del extracto de etanol se realizó de dos maneras, de acuerdo con el tipo de compuestos que se aislarían; en el primer fraccionamiento la columna se eluyó con una fase móvil inicial de cloroformo y en el segundo fraccionamiento se usó hexano.

El primer fraccionamiento del extracto **EE** (27.6 g) se realizó por CC sobre gel de sílice y se eluyó con una fase móvil de mezclas de cloroformo-metanol en polaridad creciente (1:0 a 0:1), del fraccionamiento se obtuvieron 11 fracciones iniciales (F₁ – F₁₁).

En el segundo fraccionamiento del extracto **EE** (25.5 g) se realizó por CC sobre gel de sílice y se eluyó con una fase móvil de mezclas de cloroformo-acetato de etilo en polaridad creciente (1:0 a 0:1), del fraccionamiento se obtuvieron 11 fracciones iniciales (F_A – F_K).

4.8.1.2. Aislamiento, purificación e identificación de valepotriatos.

De la fracción F₁ (1.42 g; CH₃Cl) se eluyó con una mezcla hexano-acetato de etilo (7:3) obteniéndose 10 fracciones secundarias (F_{1A}-F_{1J}) de las que las fracciones F_{1A} a F_{1D} (0.98 g) mostró la mayor cantidad de valepotriatos. Se mezclaron las fracciones y se eluyeron con una mezcla tolueno-acetato de etilo, obteniendo 10

fracciones terciarias (F_{1AD1} - F_{1AD10}) y de las fracciones F_{1AD2} a F_{1AD4} se obtuvo un aceite de coloración amarillenta (0.24 g), identificado como una mezcla de valepotriatos.

4.8.1.3 Aislamiento, purificación e identificación de valeiridósido A.

De la fracción F_J [0.8 g; CH_3Cl -AcOEt (1:1)] se eluyó con una mezcla hexano-acetato de etilo en polaridad creciente (1:0 a 0:1) obteniéndose 10 fracciones secundarias (F_{Fa} - F_{Fj}). En la fracción F_{Fe} se obtuvo un precipitado purificado por recristalización en acetato de etilo, identificado como valerianósido A (38 mg).

4.8.1.4 Aislamiento, purificación e identificación de linarina.

Durante la concentración de la fracción F_{11} a presión reducida se observó la precipitación espontánea de un sólido blanco que por filtración se separó del extracto. El sólido se lavó y recristalizó en etanol, identificándose como el flavonoide linarina (1.56 g, 0.2%).

5. Resultados y Discusión.

5.1. Pruebas Farmacopéicas para la raíz de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

Las pruebas realizadas a las raíces de *Valeriana edulis* ssp. *procera* Kunth permitieron sugerir parámetros fisicoquímicos y microbiológicos como especificaciones de calidad en el uso de esta especie vegetal como materia prima en la fabricación de preparados herbolarios o fitomedicamentos.

5.1.1. Caracterización macroscópica y microscópica

La primera evidencia de la autenticidad del material vegetal es la identificación botánica, que para el caso de la especie de Valeriana que se encuentra bajo escrutinio, se obtuvieron los siguientes resultados:

Valeriana edulis ssp. *procera* es una hierba perenne de 30 a 100 cm de altura, tallo comúnmente glabro [Figura 10A] y rizoma cónico con ramificaciones [Figura 10B]. Las hojas son predominantemente basales, ampliamente decurrentes por debajo del raquis [Figura 10C], el lóbulo es de 1.2-5 cm de ancho. Las caulinares 3-6 se encuentran dispuestas en pares. La corola de las flores estaminadas es de 2.5 a 3 mm de largo [Figura 10D Y 10E], el pistilo de aproximadamente 0.5 mm de largo con el interior de la garganta glabro. Aquenios de 1.8 a 3.0 mm de largo, densamente hirsutus a corto-canescientes. Cáliz de 8 a 12 dividido (Meyer, 1951; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007).

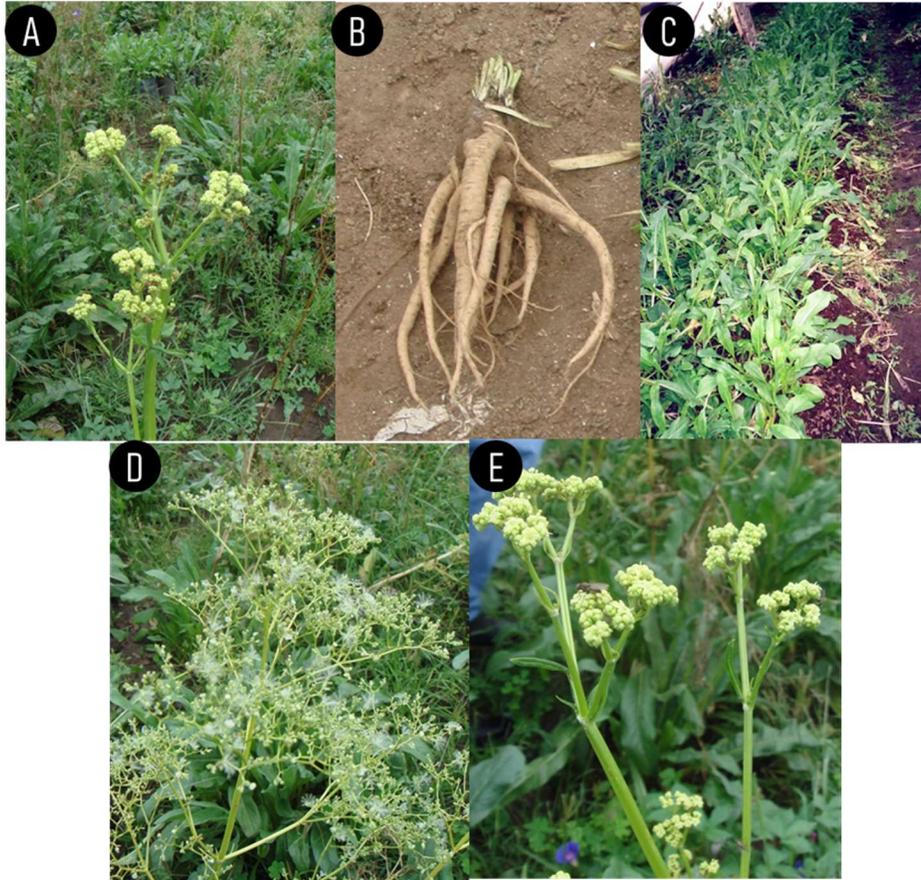


Figura 10. Hierba (A), Rizoma cónico (B), Raquis (C), Corola (D y E) de *V. edulis* ssp. *procera*.

Una vez realizada la descripción botánica se continuó con la definición de la droga que en el caso de la presente investigación corresponde a las partes subterráneas de *Valeriana edulis* ssp *procera*, incluidos el rizoma, las raíces y los estolones (Figura 11).



Figura 11. Rizoma, raíces y estolones de *Valeriana edulis* ssp *procera*

Una vez definida la droga se realizó la descripción macro- y microscópica de ésta, de donde se generó la siguiente información.

5.1.1.1. Descripción macroscópica.

El rizoma de la *V. edulis* ssp. *procera* es de aproximadamente 30 cm de largo y hasta aproximadamente 5 cm de ancho, fusiforme que va disminuyendo y termina en punta de color amarillo-café pálido, con crestas longitudinales. En la corona se puede apreciar vestigios de uno o más tallos y varias raicillas aparecen a la mitad de la raíz (Figura 12). Las raíces no tienen sabor al principio, después son ligeramente amargas y tienen un olor desagradable (Joshi et al., 2005).



Figura 12. Raíz de *Valeriana edulis* ssp *procera*.

Las características macroscópicas que se describieron en este trabajo permiten identificar a la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* de una forma simple y rápida, sin embargo, esta descripción no se puede emplear cuando la droga se encuentra molida. Todas las muestras analizadas presentaron las características que se han definido previamente para esta especie (Meyer, 1951; Rzedowski y Rzedowski, 2003; Joshi et al., 2005; Monroy-Ortiz y Castillo-España, 2007). Por otra parte, el tamaño varía notablemente entre muestras porque depende del lugar de adquisición, del proveedor y del tiempo de cosecha.

5.1.1.2. Descripción microscópica

La raíz de *V. edulis* ssp. *procera* consiste en una epidermis con 7-8 capas de células suberizadas lignificadas, que contienen una sustancia café-rojiza, que presumiblemente se trata de melanina. La corteza externa tiene 7-15 capas de células colénquimas rectangulares y a la vez redondeadas con contenido café-rojizo. La endodermis es ausente. La corteza interna contiene células ovaladas a poligonales con contenido café-rojizo. Los vasos son abundantes, están diseminados en la corteza, generalmente en conjuntos de 2-3 vasos, sin rayos distintos. El tamaño de los vasos va de 20 a 60 μm . No tiene médula; ni contiene granos de almidón; se observan cristales de oxalato de calcio cuando se trata con ácido sulfúrico al 3% [Figura 13] (Joshi et al., 2005)

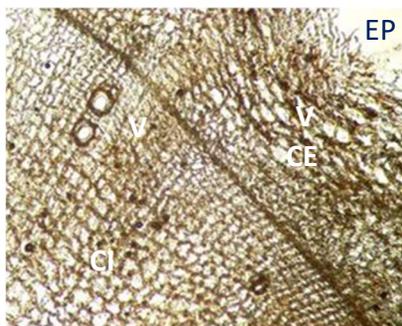


Figura 13. Sección transversal de raíz de *Valeria edulis* ssp. *procera* (Aumento 4X). CE= Corteza externa; CI= Corteza interna; EP=Epidermis; V= Vasos.

Las pruebas microscópicas que se llevaron a cabo permitieron determinar algunas de las estructuras características de la raíz de *V. edulis* ssp. *procera*. Los cristales de oxalato de calcio (figura 13), es un rasgo característico de la especie nacional ya que éstos se encuentran ausentes en *V. officinalis* mientras que, sucede lo contrario con la presencia de granos de almidón (Joshi et al., 2005).

5.1.2. Pruebas de identidad cromatográfica.

El perfil cromatográfico realizado como prueba de identidad para *V. edulis* ssp. *procera* se realizó por tres técnicas cromatográficas CCF, CLAR y CG. En el caso

de CCF se utilizó *V. officinalis* y otras especies de valerianas endémicas como comparación. Para las otras dos técnicas únicamente se usó para comparación *V. officinalis*.

5.1.2.1. Identidad por cromatografía en capa fina (CCF).

En la figura 14 se puede observar que cada especie de *Valeriana* presenta un perfil característico destacando que *V. edulis* ssp. *procera* (carril 3) presenta manchas de color café y azul más intensas que las otras especies. Esto se debe a que contiene una mayor cantidad de valepotriatos los cuales reaccionan con el reactivo de ácido clorhídrico/ ácido acético formando sales azules de ciclopentapirrilio (Violon et al., 1983; Caetano et al., 1999). También se observa que las muestras contienen una mayor cantidad de valepotriatos de tipo dieno que bajo condiciones ácidas extremas, estos compuestos se degradan para producir baldrinales (20%) y sales de ciclopentapirrilio (80%), estas últimas adquieren un color marrón con el tiempo (Thies, 1969; Caetano et al., 1999).

En la figura 14b observamos nuevamente perfiles característicos para cada especie, en donde los valepotriatos no fluorescen bajo la irradiación con luz ultravioleta a 365 nm; sin embargo, sus productos de degradación como baldrinales y homobaldrinales si lo hacen (Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1996).

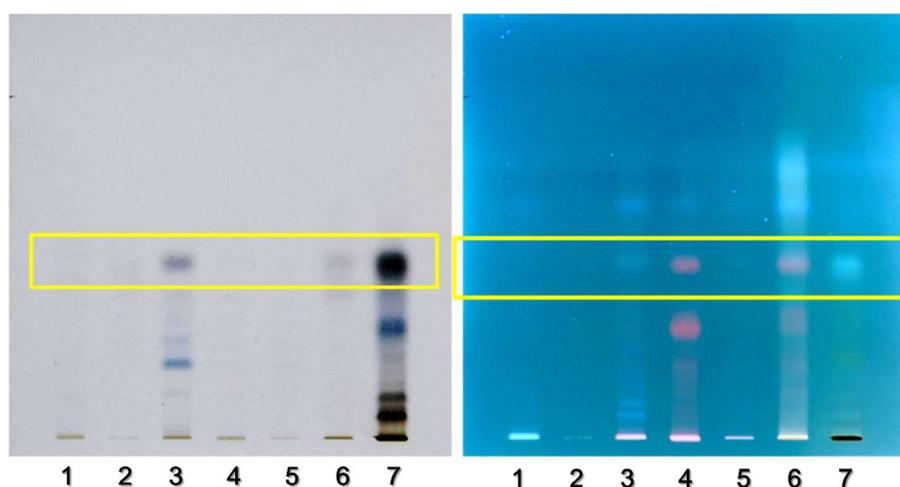


Figura 14. Cromatoplaqueta de muestras de extracto metanólico de 1: *V. officinalis*, 2: *V. urticifolia*, 3: *V. edulis* ssp. *procera*, 4: *V. robertianifolia*, 5: *V. seledorum*, 6: *V. sorbitolia*, 7: Valepotriatos (referencia). Fase móvil Hexano: Acetato de etilo (7:3). (A) Revelador: Ácido clorhídrico: Ácido acético glacial (4:1) y (B) Luz ultravioleta 365 nm.

5.1.2.2. Identidad en cromatografía de alta resolución (CLAR).

El perfil cromatográfico obtenido para *V. edulis* ssp. *procera* se comparó con el de *V. officinalis* bajo las mismas condiciones de análisis (Figura 15), en busca del establecimiento de la identidad de la droga vegetal. Durante el análisis cromatográfico se obtuvo un patrón característico para cada especie de Valeriana formado por múltiples señales de sus constituyentes. Estos patrones son específicos para cada especie y se pueden utilizar como una huella dactilar en la identificación de la droga.

Las huellas dactilares obtenidas en el estudio son capaces de identificar las diferencias y semejanzas entre las muestras de *V. edulis* ssp. *procera* y *V. officinalis*, además el uso de la CLAR proporciona información adicional sobre los perfiles cromatográficos ya que permite obtener los espectros para cada uno de los picos. (Lucio-Gutiérrez, 2012).

En la actualidad, la aceptación por parte de la OMS en la aplicación de la técnica de huellas digitales para evaluar la calidad de plantas medicinales ha tenido un auge importante en la identificación rápida de moléculas con actividad biológica dentro de los extractos vegetales (Ladino-Torres y López-Carrillo, 2016).

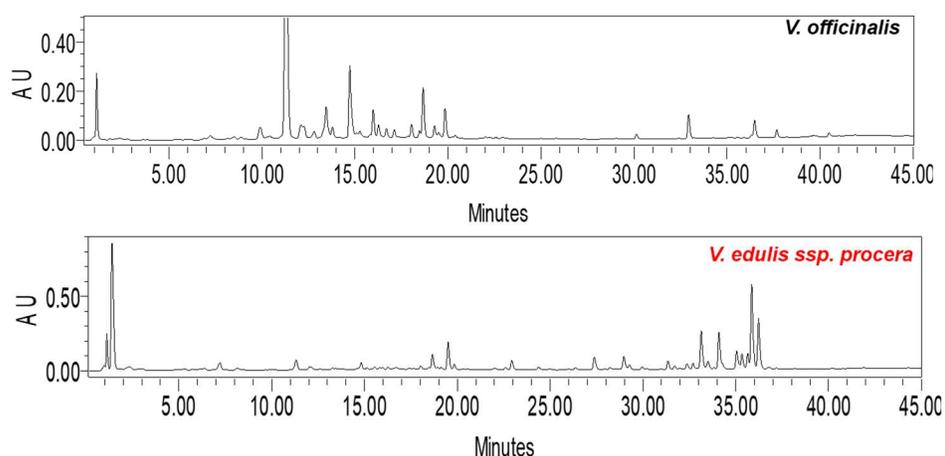


Figura 15. Perfil cromatográfico de *V. officinalis* y *V. edulis* ssp. *procera* por CLAR. Fase móvil: sistema binario en gradiente constituido por agua (A) y acetonitrilo-metanol (1:1), velocidad de flujo 0.8 mL/min. Fase estacionaria: columnas Luna C18 (2) (Phenomenex), tamaño de partícula de 5 μ m), de 3.0 mm de diámetro interno y 150 mm de longitud. Detección UV: 224 nm.

5.1.1.1. Identidad en cromatografía de gases (CG).

Finalmente, en el caso de la identidad del aroma procedente de la raíz, se obtuvo el perfil cromatográfico por microextracción en fase sólida en modo headspace (HS-SPME) y los compuestos se analizaron por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) (Cuadro 6). Este estudio se realizó comparando su composición con *V. officinalis* (Figuras 16 y 17).

Cuadro 6. Compuestos volátiles identificados por GC-EM a partir de la raíz de *V. edulis* y *V. officinalis*.

Compuesto	Contenido relativo (media \pm DE)		TR. ^a (s)	IK ^b		Referencia
	<i>V. officinalis</i>	<i>V. edulis</i>		Exp.	Teo.	
<i>Isovalerato de metilo</i>	5.61 \pm 1.40	13.42 \pm 4.26	222	773	770	11
<i>Isovalerato de etilo</i>	3.65 \pm 0.94	8.26 \pm 3.07	293	856	856	12
<i>Ácido isovalérico</i>	-	3.55 \pm 1.12	313	879	873	11

<i>β- metilvalerato de metilo</i>	1.53±0.48	-	317	883	NR	
<i>Isovalerato de isopropilo</i>	1.36±0.47	9.06±1.95	326	894	904	13
<i>α-Pineno</i>	6.46±1.13	0.42±0.06	354	934	939	14
<i>Canfeno</i>	31.13±2.21	2.71±0.11	366	951	953	14
<i>β- Ácido metilvalérico</i>	0.18±0.02	-	371	958	NR	
<i>Isovalerato de isobutilo</i>	6.47±1.27	46.28±13.97	401	1005	1005	15
<i>o- Cimeno</i>	1.41±0.50	-	412	1027	1027	16
<i>D-Limoneno</i>	2.47±0.18	-	416	1033	1029	17
<i>L-Fenchona</i>	0.82±0.09	-	450	1098	1087	12
<i>Isovalerato de isopentilo</i>	-	2.23±0.13	456	1110	1103	12
<i>Artemiseole</i>	0.48±0.12	-	477	1151	NR	
<i>L-alcanfor</i>	0.28±0.08	-	481	1158	1139	18
<i>Borneol</i>	1.30±0.25	-	494	1182	NR	
<i>Estragol</i>	1.13±0.12	1.45±0.06	504	1201	1195	19
<i>α-Thujenal</i>	1.18±0.20	-	504	1203	NR	
<i>O- Metiltimol</i>	0.38±0.08	-	517	1231	1235	17
<i>β-Pineno</i>	9.52±0.27	-	544	1295	NR	
<i>Acetato de bornilo</i>	11.15±20.5	-	545	1296	1285	14
<i>Isoestragol</i>	9.94±0.65	-	546	1298	NR	
<i>Anetol</i>	-	5.05±0.60	544	1295	1283	12
<i>Acetato de myrtenilo</i>	0.44±0.07	-	560	1330	1325	20
<i>α-Selineno</i>	0.45±0.02	-	618	1472	1480	21
<i>γ-Gurjuneno</i>	0.38±0.03	5.22±1.28	618	1473	1474	16
<i>α-Patchuleno</i>	-	0.95±0.26	622	1484	1464	22
<i>2,5-Bornanediol</i>	0.85±0.18	-	647	1549	NR	
<i>Globulol</i>	0.63±0.23	-	662	1588	1573	21
<i>Valeranona</i>	0.38±0.10	-	699	1697	1672	23
<i>Alcohol de pachulí</i>	-	1.37±0.31	700	1699	1663	24
	99.58	99.99				

TOTAL

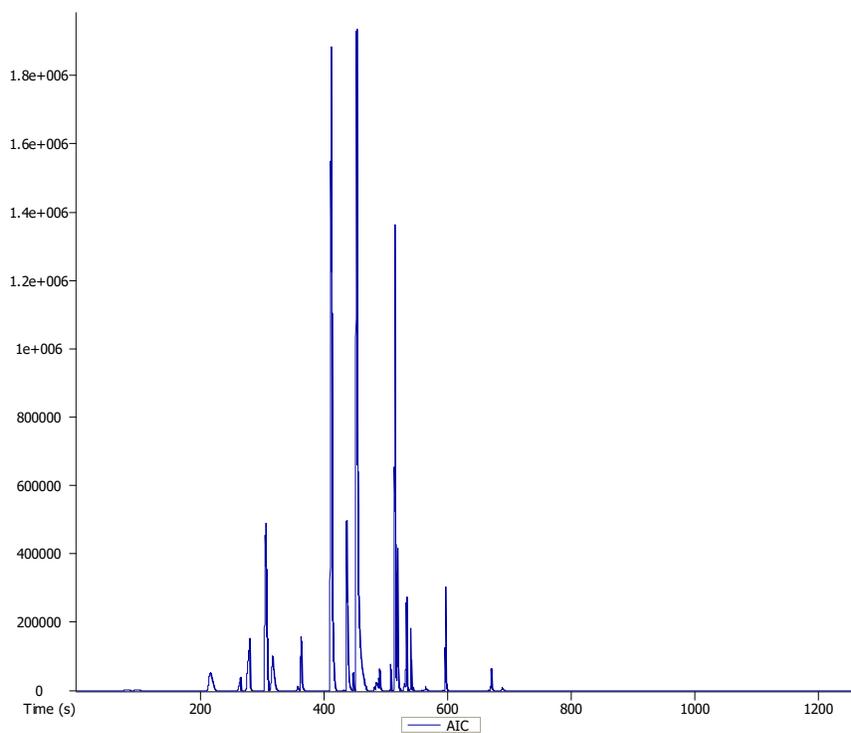


Figura 16. Cromatograma de gases correspondiente a las raíces de *V. edulis ssp. procera* analizado en una columna capilar DB-5.

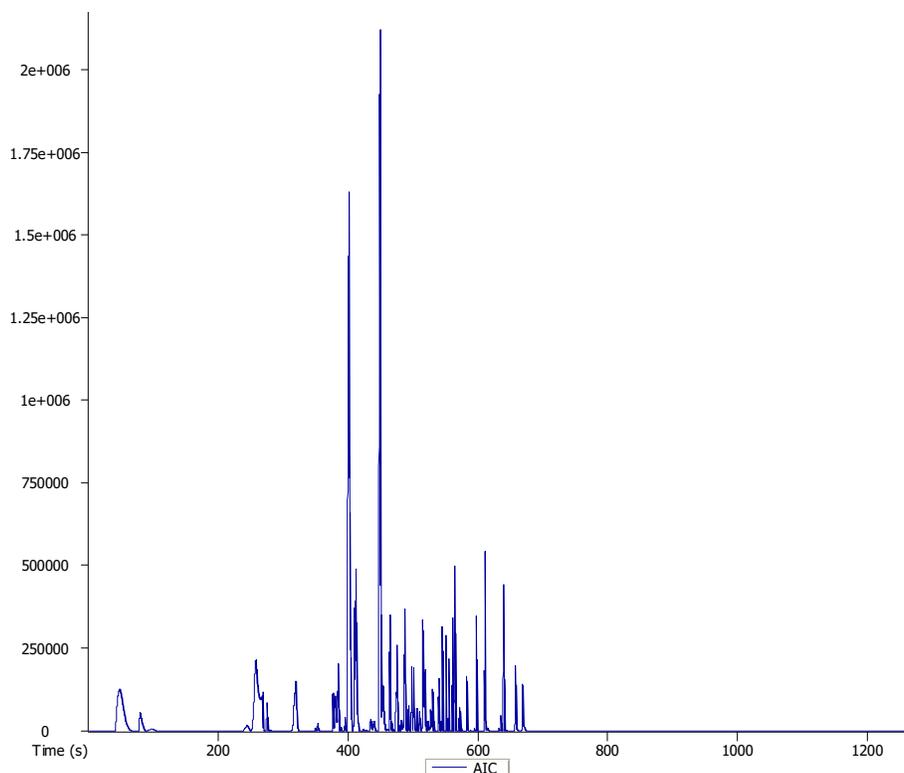


Figura 17. Cromatograma de gases correspondiente a las raíces de *V. officinalis* analizado en una columna capilar DB-5.

El cuadro 6 muestra los resultados del análisis cualitativo de los compuestos volátiles en las raíces de *V. edulis* ssp. *procera* y *V. officinalis*. En total, se identificaron 31 compuestos entre las 2 especies que representan más del 99% de la composición volátil total. Los componentes principales en *V. officinalis* fueron canfeno (31.13%), acetato de bornilo (11.15%), isoestragol (9.94%) y β -pineno (9.52%), mientras que para *V. edulis* ssp. *procera* fueron isovalerato de isobutilo (46,28%), isovalerato de metilo (13,42%), isovalerato de isopropilo (9,06%) e isovalerato de etilo (8,26%) fueron los componentes principales. Sin embargo, el análisis reportado para *V. officinalis* var. *Latifolia* (Huang et al, 2009) fue diferente al encontrado; el acetato de bornilo y el ácido isovalérico se encontraron como los dos compuestos principales en ese estudio. El canfeno y el acetato de bornilo fueron los compuestos principales en las muestras de *V. officinalis* de nuestro estudio. Estas diferencias podrían atribuirse a la variabilidad genética y biogeográfica de las poblaciones, y también podrían deberse a que las especies sin mejora genética tienen una amplia variabilidad dentro de los individuos (Hay y Waterman, 1993).

Las raíces presentan un aroma desagradable que puede describirse como olor a pies. Sin embargo, la mayoría de los compuestos aromáticos encontrados en *V. officinalis* tienen olores frescos, especialmente el canfeno y el acetato de bornilo se consideran aromas mentolados, pero *V. edulis* ssp. *procera* tiene principalmente compuestos tipo valeratos, que dan un olor desagradable (Klinea et al., 2000). Se han reportado otros compuestos minoritarios comunes en ambas especies, como α -pineno, γ -gurjuneno y estragol que pueden afectar el aroma de las raíces. Estos compuestos minoritarios no deben considerarse de menor importancia ya que son parte de la fragancia final de las raíces de valeriana. Es importante resaltar que para *V. edulis* ssp. *procera* no produce aceites esenciales por hidrodestilación, por lo tanto, el HS-SPME es una técnica útil para distinguir diferentes especies de Valeriana y una valiosa herramienta de control de calidad en las monografías de farmacopea.

5.1.3. Materia extraña.

La materia extraña en la raíz de *Valeriana edulis* ssp *procera* fue del 0.059 % \pm 0.027 % (Cuadro 7) correspondiente principalmente a fragmentos de hojas y tallos de la misma planta. El valor hallado es menor al límite de 2.0% establecido en MGA-FH-0030 de la FHEUM (2013). Cabe resaltar que no se encontraron organismos ni partes de ellos y tampoco residuos minerales como piedras, arena o polvo. Por otra parte, el resultado también indica adecuado proceso de recolección, secado y almacenamiento del material vegetal.

Cuadro 7. Cantidad y porcentaje de materia extraña obtenida al examinar muestras individuales de 500 g.

Muestra (g)	Materia extraña (g)	% Materia extraña
500.0	0.1540	0.0308
499.5	0.5439	0.1089
500.0	0.3539	0.0708
500.1	0.1781	0.0356
500.1	0.2141	0.0428
500.1	0.3317	0.0663
	Promedio	0.0592

Desviación estándar 0.0267

5.1.4. Determinación de cenizas.

En la determinación del contenido de cenizas totales se obtuvo como resultado 5.78 % \pm 0.12 % (Cuadro 8) valor inferior a lo establecido en la FHEUM en el MGA-FH-0060 que establece un valor límite de 10 %. El contenido de sustancias inorgánicas presentes en el material vegetal es bajo, lo que sugiere que el cultivo se realizó con abono orgánico y favorece la pureza de la droga para preparar los extractos (Márquez Hernández, 2017).

Cuadro 8. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas totales que representan la materia inorgánica después de incinerar la muestra.

# Crisol	Peso del crisol	Peso del crisol + Valeriana (calcinado)	Peso de la muestra	Peso Final Cenizas Totales	% Cenizas
1	28.8548	28.9639	1.9943	0.1091	5.4706
2	28.1928	28.3055	1.992	0.1127	5.6576
3	28.1156	28.2289	1.9919	0.1133	5.6880
4	26.2951	26.4096	1.9928	0.1145	5.7457
5	27.1551	27.2722	2.0072	0.1171	5.8340
6	24.1725	24.289	1.9996	0.1165	5.8262
7	24.0364	24.1535	1.9921	0.1171	5.8782
8	25.3961	25.5131	1.9907	0.117	5.8773
9	26.6008	26.7198	1.9927	0.119	5.9718
10	27.7306	27.8472	1.9985	0.1166	5.8344
11	27.4265	27.5428	1.9992	0.1163	5.8173
12	34.1509	34.2673	1.9969	0.1164	5.8290
13	15.65	15.7662	2.0026	0.1162	5.8025
				Promedio	5.7871
				Desviación estándar	0.1251

5.1.4.1. Cenizas solubles en agua.

Las cenizas hidrosolubles (3.14% \pm 0.07%) que contienen las sales solubles en agua contenidas en la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* después de su incineración (Cuadro 9) no exceden el 5% que de acuerdo con la MGA-FH-0060 (FHEUM, 2013) es un valor aceptable para un material vegetal usado en la preparación de productos herbolarios.

Cuadro 9. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas solubles en agua que representan.

# Crisol	Peso del crisol	Peso de la muestra	Cenizas Totales	Cenizas insolubles en agua	Cenizas solubles en agua	% Cenizas solubles en agua
1	28.1928	1.992	0.1127	0.0508	0.0619	3.1074
2	28.1156	1.9919	0.1133	0.0524	0.0609	3.0574
3	26.2951	1.9928	0.1145	0.0528	0.0617	3.0961
4	27.1551	2.0072	0.1171	0.0524	0.0647	3.2234
5	24.1725	1.9996	0.1165	0.0538	0.0627	3.1356
6	24.0364	1.9921	0.1171	0.0525	0.0646	3.2428
Promedio						3.1438
Desviación estándar						0.0738

5.1.4.2. Cenizas insolubles en ácido.

Se encontró un valor de 0.097% ± 0.07% (Cuadro 10) de cenizas insolubles en ácido en la muestra que representan la cantidad de sílice, arenas y tierra silíceas presente en la droga. El contenido límite recomendando por la FHEUM (MGA-FH-0060) de estos residuos es de 1.5% del peso de la muestra, por lo que el resultado encontrado cumple con la especificación.

Cuadro 10. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas insolubles en ácido.

# Crisol	Peso del crisol	Peso de la muestra	Cenizas Insolubles	Cenizas insolubles en ácido	% Cenizas insolubles en ácido
1	25.3961	1.9907	25.3977	0.0016	0.0804
2	26.5993	1.9927	26.6	0.0007	0.0351
3	15.4079	1.9985	15.4086	0.0007	0.0350
4	27.4265	1.9992	27.4276	0.0011	0.0550
5	34.1509	1.9969	34.1547	0.0038	0.1903
6	15.65	2.0026	15.6538	0.0038	0.1898
Promedio					0.0976
Desviación estándar					0.0735

5.1.5. Material extraíble

La cantidad de materias extraíbles hidrosolubles y solubles en alcohol se determinó utilizando el método I descrito en el MGA-FH 0070, que implica el uso de agua o etanol

como disolvente y calor, en consecuencia, se generara un el extracto con una composición similar a la obtenida cuando se preparan los remedios herbolarios (Rojas-Tomé et al., 2010).

Cuadro 11. Porcentaje en peso de material extraíble obtenido por el Método I, con etanol.

#	Muestra (g)	Extracto en 25 mL (g)	Extracto total 100 mL (g)	% Material extraíble
1	4.0235	0.1215	0.4860	12.0790
2	4.0087	0.1318	0.5272	13.1514
3	4.0126	0.1169	0.4676	11.6533
4	4.0125	0.1254	0.5016	12.5009
5	4.001	0.124	0.4960	12.3969
6	4.0074	0.1152	0.4608	11.4987
Promedio				12.2134
Desviación estándar				0.6064

La falta de una referencia sobre el porcentaje de materia extraíble para la raíz de *V. edulis spp. procera* que corrobore los resultados encontrados y presentados en el cuadro 11 y 12, únicamente permitirá que los valores reportados se usen como de referencia para establecer una especificación a la especie. El agua tuvo un mayor rendimiento de extracción que el etanol esto sugiere que el material vegetal presenta un mayor porcentaje de metabolitos con polaridad alta e intermedia que de metabolitos de polaridad baja a intermedia (Cabrera-Suárez et al., 2012).

Cuadro 12. Porcentaje en peso de material extraíble obtenido por el Método II, con agua.

#	Muestra (g)	Extracto en 25 mL (g)	Extracto total 100 mL (g)	% Material extraíble
1	4.0013	0.3756	1.5024	37.5478
2	4.0018	0.388	1.5520	38.7825
3	4.0015	0.3855	1.5420	38.5355
4	4.0019	0.3924	1.5696	39.2214
5	4.0007	0.3985	1.5940	39.8430
6	4.0003	0.3827	1.5308	38.2671
Promedio				38.6996
Desviación estándar				0.7908
Error estándar de la media				0.3229

Debe tomarse en cuenta que la extracción de una sustancia depende de varios factores que influyen en el proceso extractivo; entre ellas están el tamaño de partícula de la droga, la agitación, la temperatura, el pH, el disolvente y el tiempo de extracción (Cabrera-Suárez et al., 2012). La polaridad del disolvente impacta en el poder extractivo y las mezclas de alcoholes alifáticos y agua son los más empleados de tal modo que logran extraer la gran mayoría de las sustancias naturales de interés como alcaloides, flavonoides, glucósidos cardiotónicos y terpenos (Sharapin et al., 2000).

5.1.6. Agua y material volátil.

En la prueba de pérdida por secado, realizada de acuerdo con el MGA-FH 0080, los resultados reflejan que la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* contiene $7.98\% \pm 0.16\%$ de agua y material volátil (Cuadro 13), mientras que en la determinación de humedad contiene $9.28\% \pm 0.77\%$ de agua (Cuadro 14). La EDQM (2007) sugiere que el valor de humedad residual no debe exceder el 10% por lo que los resultados se encuentran por debajo del valor recomendando.

Cuadro 13. Cantidad en gramos y porcentaje de pérdida por secado en estufa de muestras de 2 g.

Muestra	Peso inicial (g)	Peso final (g)	Diferencia de peso (g)	% Perdida por secado
1	1.9976	1.8349	0.1627	8.1448
2	1.9928	1.8304	0.1624	8.1493
3	1.9946	1.833	0.1616	8.1019
4	1.9972	1.8401	0.1571	7.8660
5	1.9934	1.8374	0.1560	7.8258
6	1.9982	1.8422	0.1560	7.8070
			Promedio	7.9825
			Desviación estándar	0.1657

Se debe prestar atención a la humedad residual de la raíz de la droga recordando que el exceso de agua en una droga puede provocar la aparición de microorganismos, hongos o insectos asimismo el deterioro de esta, seguido de la hidrólisis de los principios activos (Salgueiro et al., 2010); por esta razón, es fundamental un proceso de secado adecuado que preserve y asegure la estabilidad

de los metabolitos secundarios contenidos en el material vegetal (Omelchuk, et al., 1999; Torres y Gil, 2004).

Cuadro 14. Cantidad en gramos y porcentaje de pérdida por secado en Termobalanza de muestras de 2 g.

Peso Inicial	% Perdida por secado
2.0012	10.0
2.0015	9.5
2.0006	8.1
2.0012	8.6
2.0014	9.5
2.0005	10.0
Promedio	9.283
Desviación estándar	0.773

5.1.7. Determinación de metales pesados.

Como resultado de la determinación de metales pesados, realizada según el MGA-0561 de FEUM (2011), se obtuvo una concentración menor a 10 ppm. La regulación mexicana en el MGA-FH-0160 establece que no debe existir una concentración mayor a 10 mg/kg de plomo y 0.3 mg/kg de cadmio en plantas medicinales, por lo que la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* cumple con el requisito.

Este valor nos ofrece cierta seguridad que el contenido de metales pesados en las muestras no alcanza niveles tóxicos que causen daño a las personas que ingieran la planta. Sin embargo, el riesgo para la salud debido a la contaminación por metales, en general, depende de la ingesta diaria promedio de la dieta (Dghaim et al., 2015).

No hay que olvidar que las plantas son extremadamente sensibles a las condiciones ambientales y son capaces de acumular metales pesados en sus partes (Tangahu et al., 2011) y pueden contaminarse durante el cultivo, la cosecha y el procesamiento. Las fuentes de contaminación por metales pesados en las hierbas podrían estar relacionadas con el agua utilizada en el riego, suelos contaminados,

fertilizantes y pesticidas, emisiones industriales, transporte y procesos de cosecha y almacenamiento (Dghaim et al., 2015).

5.1.8. Determinación de microorganismo

Con base en los resultados obtenidos en el Cuadro 15, se observa que la cantidad de bacterias aerobias en la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* exceden los límites establecidos por la FHEUM (2013), además que se reporta la presencia de Salmonella.

Cuadro 15. Análisis microbiológico de *Valeriana edulis* ssp *procera*, cuenta de microorganismos totales y presencia de principales patógenos.

Microorganismo	Resultado
Mesófilos aerobios	125000 UFC/g
Hongos filamentosos	50 UFC/g
Levaduras	10 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Positivo
<i>Salmonella spp</i>	Positivo
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente

Entre las posibles fuentes de contaminación se encuentra el personal que manipula las drogas durante la cosecha, secado, almacenamiento y manejo. También el suelo influye en la calidad bacteriológica de la materia prima que a su vez afecta la calidad total de la preparación a base de hierbas (Abba et al., 2008).

En la presente investigación, se observó la presencia de Salmonella, bacteria Gram negativa patógena, que pueden sobrevivir durante largos períodos de tiempo en productos de baja humedad y se ha asociado con numerosos brotes de salmonelosis en todo el mundo (CFIA, 2018). Además, los coliformes como *E. coli* y *Salmonella* son los indicadores de contaminación fecal puesto que estas bacterias forman parte de la flora intestinal de los humanos y otros animales (APHA, 1992).

Por lo tanto, las personas involucradas en la cadena de suministro de drogas deben garantizar un alto nivel de higiene en sus productos para mantener la calidad, seguridad y eficacia de las de las hierbas.

5.2. Pruebas de calidad para extracto hidroalcohólico.

El extracto hidroalcohólico al 60% de las raíces y rizomas *V. edulis ssp. procera* es el extracto que se utiliza para preparar diferentes formulaciones herbolarias, por ello es importante proponer pruebas de calidad para este extracto. Estas pruebas podrían incluirse en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos en una monografía adicional a la monografía para la droga cruda. El extracto debe cumplir con las siguientes características organolépticas, a saber, color café, consistencia líquida viscosa con aroma desagradable.

5.2.1. Determinación de Sólidos

La determinación de este parámetro permite el control de procesos ya que se establece la cantidad de sólidos suspendidos en un líquido. Con esta información se puede establecer una concentración en un extracto.

Se ajustó el proceso de obtención del extracto a un valor de $8.85 \pm 0.54\%$ (Cuadro 16) para poder determinar otros parámetros en el extracto.

Cuadro 16. Porcentaje de sólidos totales del extracto hidroalcohólico de *V. edulis ssp. procera*

Muestra	Peso cristalizador vacío (g)	Peso cristalizador más residuo (g)	Volumen de la muestra (mL)	% Sólidos totales
1	69.3395	69.7845	5	8.90
2	80.4275	80.8455	5	8.36
3	73.5841	74.0611	5	9.54
4	75.6809	76.0904	5	8.19
5	82.0911	82.5591	5	9.36
6	76.7069	77.1429	5	8.72
Promedio				8.85
Desviación estándar				0.54

5.2.2. Densidad relativa

Este parámetro junto con el de sólidos totales nos permite evaluar la eficiencia de extracción del proceso junto con la solubilidad de los compuestos obtenidos.

Se obtuvo un valor de 0.93 ± 0.004 g/mL (Cuadro 17) con lo que se observa que el ajuste de los sólidos nos da también una densidad relativa consistente, lo que permite un control del producto adecuado ya que se mantiene el extracto para las siguientes etapas del proceso.

Cuadro 17. Densidad relativa del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*

Muestra	Peso picnómetro vacío (g)	Peso picnómetro con agua (g)	Peso picnómetro con muestra (g)	Densidad relativa
1	10.2153	20.2061	19.4678	0.9261
2	10.2097	20.2117	19.4565	0.9245
3	10.1926	20.1917	19.4248	0.9233
4	10.2191	20.2197	19.4147	0.9195
5	10.1960	20.1981	19.4900	0.9292
6	10.2027	20.2021	19.4991	0.9297
			Promedio	0.9254
			Desviación estándar	0.0038

5.2.3. Determinación del contenido de alcohol.

La cantidad de alcohol dentro de un extracto tiene una implicación importante tanto en su composición química como en la probabilidad de contaminarse microbiológicamente. En el cuadro 18 podemos observar los resultados.

Cuadro 18. Contenido de alcohol del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp *procera*

Muestra	% Alcohol
1	60.80
2	61.08
3	59.58
4	61.08
5	60.64
6	59.12
Promedio	60.48
Desviación estándar	0.96
Coficiente de Variación	1.58

El valor promedio de 60% de alcohol nos proporcionó una estabilidad adecuada para el extracto y durante la investigación no se presentó crecimiento microbiano.

5.2.4. Determinación de pH

El pH es la medida del grado alcalino, neutral y ácido de una sustancia normalmente en estado líquido. El valor obtenido fue de 5.06 ± 0.12 (Cuadro 19) que nos indica la presencia de sustancias ácidas en el extracto, ya que el pH del etanol al 60% es de aproximadamente 7.

Cuadro 19. pH del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp *procera*

Muestra	Valor de pH
1	4.93
2	5.21
3	5.15
4	5.06
5	5.09
6	4.92

Promedio	5.06
Desviación estándar	0.12

5.2.5. Microorganismos

La determinación de los microorganismos en un extracto es necesario para evaluar la seguridad de los usuarios finales, asimismo, permite que el extracto se pueda almacenar. Se encontró 1 UFC/g de mesófilos aerobios y la ausencia de los otros microorganismos en el extracto (Cuadro 20). Este hecho corrobora que la aparición de microorganismos en la materia prima no es de importancia ya que se eliminan durante el proceso de elaboración del extracto hidroalcohólico.

Cuadro 20. Análisis microbiológico del extracto de *Valeriana edulis* ssp *procera*, cuenta de microorganismos totales y presencia de principales patógenos.

Microorganismo	Resultado
Mesófilos aerobios	1 UFC/g
Hongos filamentosos	0 UFC/g
Levaduras	0 UFC/g
<i>Escherichia coli</i>	Ausente
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	Ausente
<i>Salmonella spp</i>	Ausente
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausente

5.2.6. Determinación de contenido.

5.2.6.1. Identificación y cuantificación del compuesto marcador químico

La identificación de linarina en la raíz y en el extracto de las raíces de *V. edulis* ssp. *procera*, se realizó mediante la comparación entre el cromatograma de una

muestra de referencia de linarina y el cromatograma correspondiente de cada muestra. Los cromatogramas se muestran en la Figura 18.

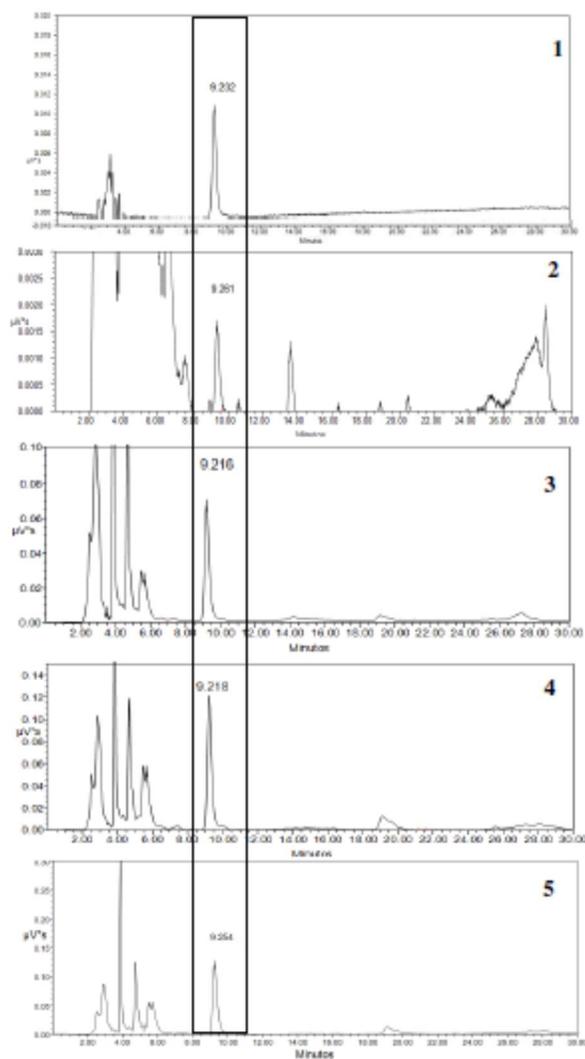


Figura 18. Cromatograma correspondiente al placebo adicionado con linarina (1), Valeriana officinalis (2), Valeriana edulis muestra 1 (3), Valeriana edulis muestra 2 (4), y extracto de Valeriana (5). Se encuadra la señal correspondiente al pico de linarina.

5.2.6.2. Validación del método analítico de linarina por CLAR

En la validación del sistema se determinaron los siguientes parámetros de desempeño: linealidad, precisión y adecuabilidad, mientras que para la validación del método de análisis se estimaron la linealidad, exactitud y repetibilidad, la

precisión intermedia, el límite de detección, el límite de cuantificación, la robustez y la tolerancia, además de la especificidad.

5.2.6.3. Validación del Sistema

5.2.6.3.1. Linealidad

La linealidad se evaluó con el análisis de 6 concentraciones de linarina, los valores de las áreas con los cuales se construyó la curva de calibración se encuentran registrados en el Cuadro 21. La curva de calibración de la linealidad del sistema se muestra en la Figura 19.

El método presenta un comportamiento lineal dado que se obtuvo un coeficiente de determinación (r^2) mayor a 0.98% y el intervalo de confianza para la pendiente ($IC(\beta_1)$) no incluye el cero. Con lo que cumple los criterios de aceptación establecidos por la ICH (2005) y el Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos (García et al., 2012).

Cuadro 21. Concentración de linarina en metanol para la curva estándar, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación por concentración y promedio.

Concentración linarina (mg/ mL)	Área ($\mu V*s$)	Promedio de las áreas ($\mu V*s$)	Desviación estándar de las áreas (s)	Coeficiente de variación (CV)
0.028	1905107	1883468.67	19063.31	1.01
	1869150			
	1876149			
0.08	5413456	5469967.33	76123.94	1.39
	5439916			
	5556530			
0.11	7207898	7214593	17985.69	0.25
	7234966			
	7200915			
0.14	9062543	9050343.67	51185.20	0.57
	8994161			
	9094327			
0.17	11150694	11073143.3	110885.72	1.00

	10946135			
	11122601			
0.20	12918748	12942715	172296.28	1.35
	12783657			
	13125740			

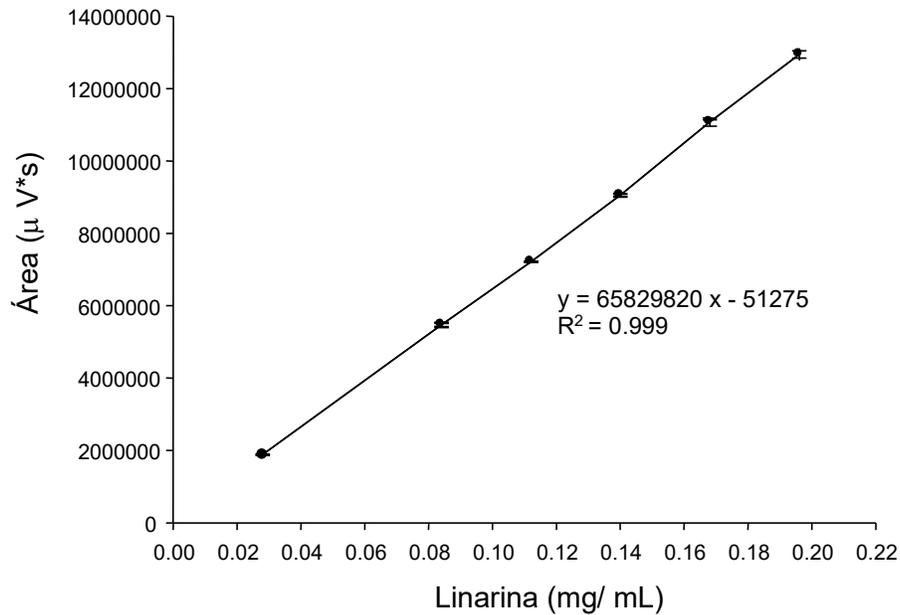


Figura 19. Curva de calibración para la linealidad del sistema; se realizó ANOVA de la regresión lineal obteniendo una $P < 0.001$. Cada punto representa la media de tres determinaciones \pm EEM.

5.2.6.3.2. Precisión

Los valores para la determinación de la precisión del sistema se representan en el Cuadro 22. Los valores cumplen el criterio de aceptación de un coeficiente de variación (CV) menor a 2%.

Cuadro 22. Concentración de linarina en metanol para determinar precisión del sistema.

Concentración de Linarina (mg/ mL)	Área (µV*s)
0.14	5550774
0.14	5423402
0.14	5673867
0.14	5687307

0.14	5689671
0.14	5623948
Promedio	5608161.50
Desviación estándar (S)	104788.96
Coefficiente de Variación (%CV)	1.87

5.2.6.3.3. Adecuabilidad

Para la determinación de los parámetros de desempeño de este parámetro (Cuadro 23) se usaron nuevamente los datos del Cuadro 22, calculando el factor de capacidad (k') y el factor de asimetría (T). Encontrándose que ambos valores están dentro de los límites establecidos en la FEUM, ya que su coeficiente de variación del k' no excede el 2% y el T es menor de 2.

**Cuadro 23. Parámetros de desempeño de Adecuabilidad
Factor de capacidad y factor de asimetría.**

Muestra	Factor de capacidad (k')	Factor de Asimetría (T)
1	1.01	1.03
2	0.99	1.04
3	1.02	1.04
4	1.00	1.01
5	1.00	1.00
6	1.00	1.03
7	1.00	1.00
8	1.011	1.01
9	1.011	1.01
Promedio (\bar{Y})	1.00	1.02

Desviación estándar (S)	0.01	0.02
Coficiente de Variación (CV)	1.14	1.54

5.2.6.4. Validación del Método

5.2.6.4.1. Especificidad

El método es específico puesto que tiene la capacidad de identificar en forma inequívoca la presencia de linarina en presencia de sustancias con alta similitud estructural, que en esta prueba fue la hesperidina (Figura 20). La hesperidina tiene un grupo Hidroxilo (-OH) en la posición 3' que no se encuentra presente en la linarina (Figura 21).

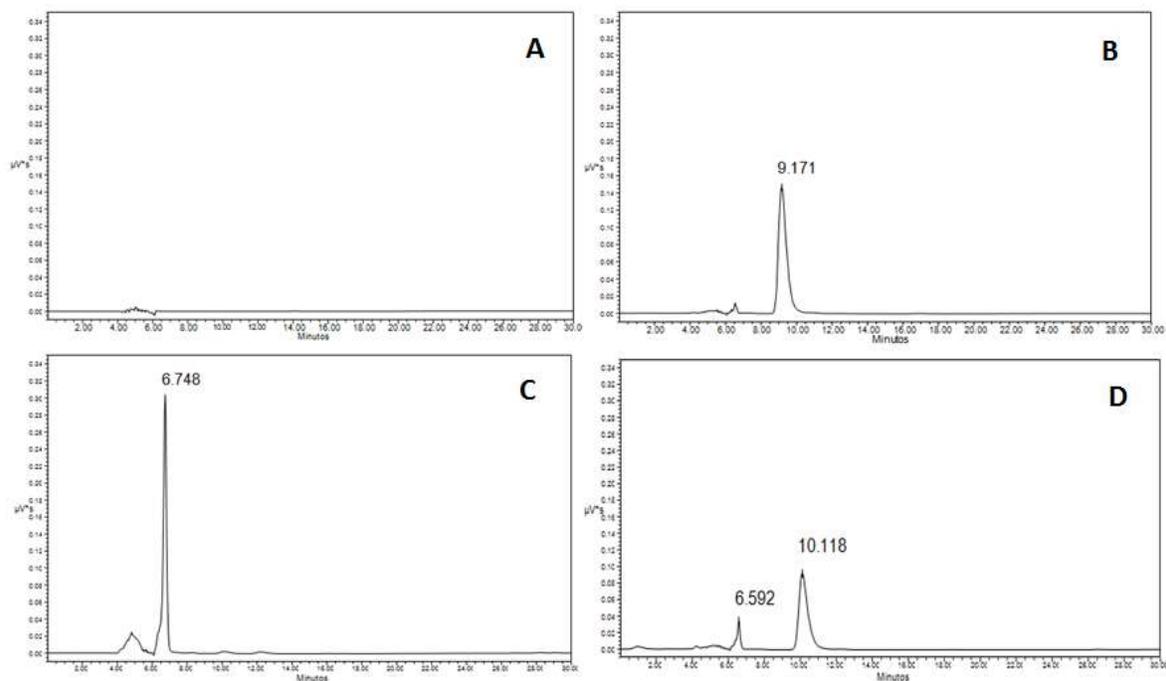


Figura 20. Cromatogramas correspondientes a las señales de los picos correspondientes al blanco de metanol (A), linarina (B), hesperidina (C) y linarina + hesperidina (D).

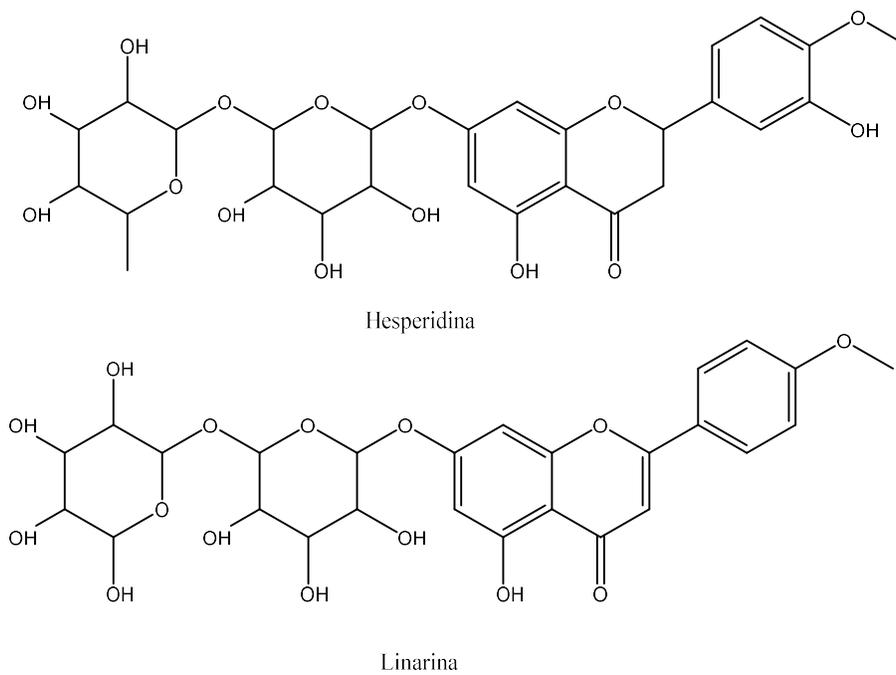


Figura 21. Estructura de linarina y hesperidina.

5.2.6.4.2. Linealidad y exactitud

Los datos obtenidos para determinar la linealidad y exactitud del método se muestran en el Cuadro 24. Así mismo, en la Figura 22 se observa la curva de calibración para determinar la linealidad del método en donde los datos muestran un comportamiento lineal y donde se puede observar una buena correlación entre las áreas obtenidas con respecto a sus respectivas concentraciones.

Cuadro 24. Porcentaje de recobro a partir de las cantidades adicionadas y recuperadas.

Linarina (mg/ mL)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Linarina Recuperada (mg/ mL)	% Recobro	% Recobro promedio	S	CV
0.02801	1815097	0.02	79.31	78.91	0.41	0.52
	1796206	0.02	78.49			
	1806314	0.02	78.93			
0.08404	5076353	0.08	93.59	95.09	1.86	1.96
	5270438	0.08	97.17			
	5125327	0.08	94.49			
0.11205	7111053	0.11	99.40	100.18	1.77	1.77
	7311837	0.11	102.21			
	7077723	0.11	98.94			
0.1400	8874329	0.14	98.89	98.97	0.84	0.85
	8810613	0.14	98.18			
	8961152	0.14	99.86			
0.16808	10515751	0.16	95.77	97.89	1.85	1.89
	10885611	0.17	99.14			
	10845977	0.17	98.78			
0.19609	12061354	0.18	93.98	95.92	1.88	1.96
	12543824	0.19	97.74			
	12323734	0.19	96.03			

Linealidad del Método

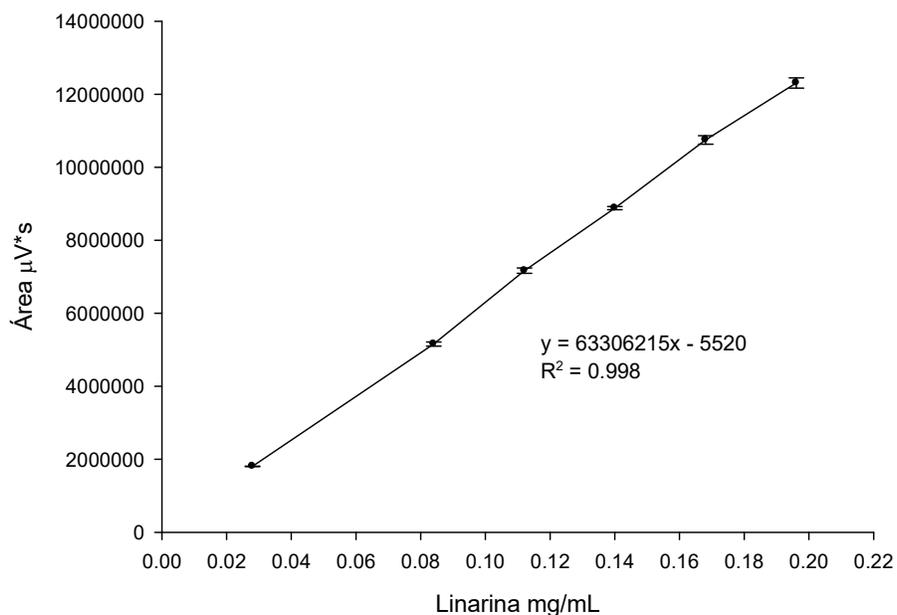


Figura 22. Curva de calibración para determinar la linealidad del método; se realizó ANOVA de la regresión lineal obteniendo una $P < 0.001$. Cada punto representa la media de tres determinaciones \pm EEM.

5.2.6.4.3. Repetibilidad

Los resultados obtenidos en la linealidad del método se emplearon en la determinación de la repetibilidad, se calculó el porcentaje de recobro (Cuadro 25). El valor del CV fue de 1.00% menor al 2% del criterio de aceptación; sin embargo, el del intervalo de confianza para la media poblacional $IC(\mu)$ del porcentaje de recobro, se encontró por debajo del valor 98 y 102%; estos resultados indican que el método no es repetible. A pesar de que las determinaciones realizadas tienen la precisión requerida por el método estas no cumplen con el recobro necesario. Después de varias determinaciones experimentales se observó que parte de la linarina adicionada al placebo es retenida por la matriz del placebo. Sin embargo, en las muestras analizadas no se observa este fenómeno por lo que el método es factible en el análisis de rutina.

Cuadro 25. Concentración de linarina para determinar exactitud y repetibilidad del método, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación.

Muestra	Linarina adicionada (mg/ mL)	Área ($\mu\text{V*s}$)	Linarina recuperada (mg/ mL)	% Recobro
1	0.14	8299368	0.13	92.48
2	0.14	8211071	0.13	91.5
3	0.14	8328433	0.13	92.81
4	0.14	8269387	0.13	92.15
5	0.14	8101214	0.13	90.27
6	0.14	8195901	0.13	91.33
Promedio				91.76
Desviación Estándar Áreas				0.92
Coficiente de Variación				1.00
IC(μ)				90.79% – 92.72%

5.2.6.4.4. Precisión intermedia

La precisión se realizó analizando la misma muestra de referencia en dos días y por dos analistas diferentes, usando los mismos instrumentos y equipos. Los resultados se muestran en el Cuadro 26, los cuales demuestran que el método es preciso, obteniendo así un CV menor al 2 %.

Cuadro 26. Concentración de linarina en metanol para determinar precisión intermedia, con sus áreas correspondientes, porcentaje de recobro, promedios, desviación estándar y coeficiente de variación.

Analista/día	Linarina adicionada mg/ mL	Área ($\mu\text{V*s}$)	Linarina recuperada mg/ mL	% Recobro	Promedio	S % recobro	CV
1,1	0.07	4663734	0.07	105.04	106.11	2.01	1.89
	0.07	4677064	0.07	105.34			
	0.07	4648600	0.07	104.70			
1,2	0.07	4795515	0.07	108.01			
	0.07	4801081	0.07	108.13			
	0.07	4863392	0.08	109.54			

2,1	0.07	4841300	0.08	109.04
	0.07	4795120	0.07	108.00
	0.07	4696203	0.07	105.77
2,2	0.07	4655577	0.07	104.86
	0.07	4620224	0.07	104.06
	0.07	4624978	0.07	104.17
	0.07	4608702	0.07	103.80
	0.07	4613588	0.07	103.91
	0.07	4759971	0.07	107.21

5.2.6.4.5. Robustez y tolerancia

La robustez y la tolerancia se evaluaron realizando variaciones consientes en algunos parámetros del método relacionados con el flujo de fase móvil, temperatura de la columna, volumen de inyección, columna, pH, porcentaje de un disolvente en la fase móvil y longitud de onda. En la Cuadro 27 se reportan los resultados de cambiar la temperatura de la columna y en el Cuadro 28 se reportan los valores de cambiar la longitud de la columna.

Cuadro 27. Concentración de linarina en metanol para determinar robustez; para este parámetro se aumentó la temperatura de la columna y se calculó a diferencia absoluta (di).

Temperatura de la columna	Linarina adicionada (mg/ mL)	Área ($\mu\text{V}\cdot\text{s}$)	Linarina recuperada (mg/ mL)	% Recobro	Promedio	Diferencia Absoluta (di)
30°C	0.14	8072983	0.13	89.78	94.11	1.48
		8740073	0.14	97.20		
		8573550	0.13	95.35		
25°C	0.14	8483487	0.13	94.34	95.59	
		8686817	0.14	96.61		
		8615348	0.13	95.81		
35°C	0.14	8491940	0.13	94.44	93.84	1.75
		7858652	0.12	87.40		
		8961948	0.14	99.67		

Cuadro 28. Concentración de linarina en metanol para determinar tolerancia; para este parámetro se cambió la columna por una de 150 mm y 250 mm.

Longitud de columna (mm)	Linarina mg/ mL	Área	Promedio	S	CV
150	0.14	7647457	7498762.67	144178.96	1.92
		7489262			
		7359569			
250	0.14	9625555	9688922.67	168606.31	1.74
		9880032			
		9561181			

Se observa que, los factores temperatura y largo de la columna, no afecta los resultados obtenidos en la concentración de linarina. Lo anterior demuestra que el método es robusto y tolerante a pequeños cambios.

5.2.6.4.6. Límite de detección

Se determinó mediante el método de la señal de ruido. Se inyectaron 5 blancos y se midió la señal de ruido con un promedio de área igual a $16,413\mu\text{V}^*\text{s}$ y se determinó que la concentración que presenta una respuesta similar a 3 veces la señal de ruido ($51,543\mu\text{V}^*\text{s}$) es igual a $0.771\mu\text{g/ mL}$.

5.2.6.4.7. Límite de cuantificación

Se determinó mediante el método de la señal de ruido. Se inyectaron 5 blancos y se midió la señal de ruido con un promedio de área igual a $16,413\mu\text{V}^*\text{s}$ y se determinó que la concentración que presenta una respuesta similar a 10 veces la señal de ruido ($178,813\mu\text{V}^*\text{s}$) es igual a $2.57\mu\text{g/ mL}$.

5.3. Pruebas de seguridad.

Los estudios de toxicidad del extracto hidroalcohólico de las raíces de *Valeriana edulis* en ratones por el método de Lorke demostró que el extracto por vía intraperitoneal no provocó muerte a todas las dosis ensayadas (10, 100, 600 y 1000 mg/kg). Esta información se reforzó con los resultados obtenidos en la administración del extracto por vía oral siguiendo las directrices de la OECD, donde tampoco se encontró mortalidad en machos ni en hembras. El examen *post mortem* a nivel macroscópico no mostraron deformaciones o daño en los órganos internos de los animales.

La evaluación de dosis repetidas del extracto tampoco mostró muertes o efectos tóxicos sobre las ratas macho ni ratas hembra. El seguimiento del desarrollo de los animales se realizó monitoreando el peso corporal, donde tampoco se encontraron cambios con respecto al control (Figura 23). Al término de la evaluación los animales se sacrificaron y se realizó una necropsia donde no se encontró daño orgánico. Esto coloca a los extractos en la categoría 5 del Sistema Mundialmente Armonizado (GHS, por sus siglas en inglés), indicando que no existe riesgos para la salud.

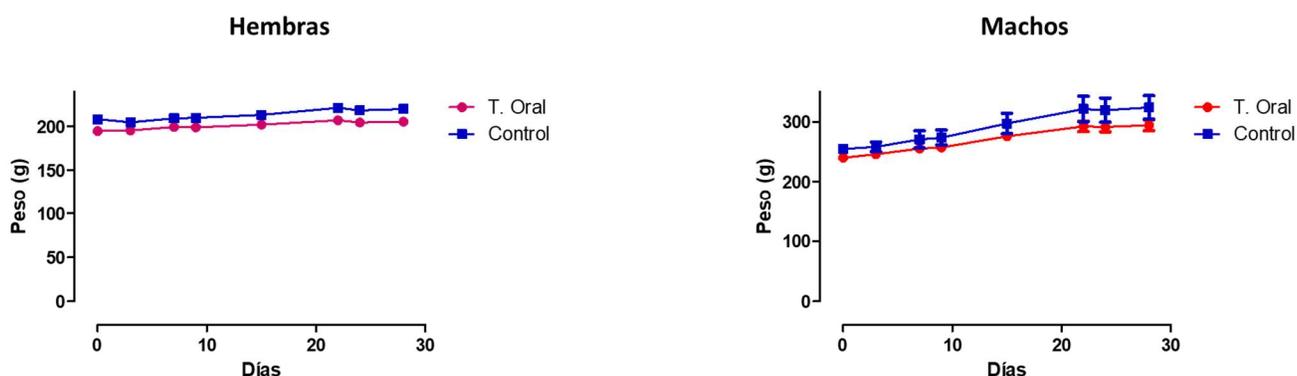


Figura 23. Gráfica de seguimiento de peso a través del tiempo de ratas administradas con dosis repetidas del extracto hidroalcohólico de *V. edulis ssp. procera*.

5.4. Pruebas de eficacia.

La evaluación de la eficacia de *V. edulis* ssp. *procera* se realizó en el extracto etanólico debido a que es el extracto en el que se reporta el mayor número de actividades y es el que se prepara industrialmente. Las pruebas se seleccionaron considerando los usos populares de valeriana y consistieron en pruebas conductuales, pruebas sobre la función motora y efecto antinociceptivo.

5.4.1. Evaluación sobre la conducta.

5.4.1.1. Cilindro de exploración.

Se evaluó la actividad sobre el SNC del extracto etanólico de las raíces de *V. edulis* ssp. *procera* en ratones en el modelo farmacológico de cilindro de exploración. El extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera*, administrado por vía intraperitoneal, presentó efecto sedante (Figura 24), que corresponde a lo reportado por Oliva y colaboradores (2004). La dosis efectiva 50 (DE₅₀) calculada fue de 83.4 mg/kg.

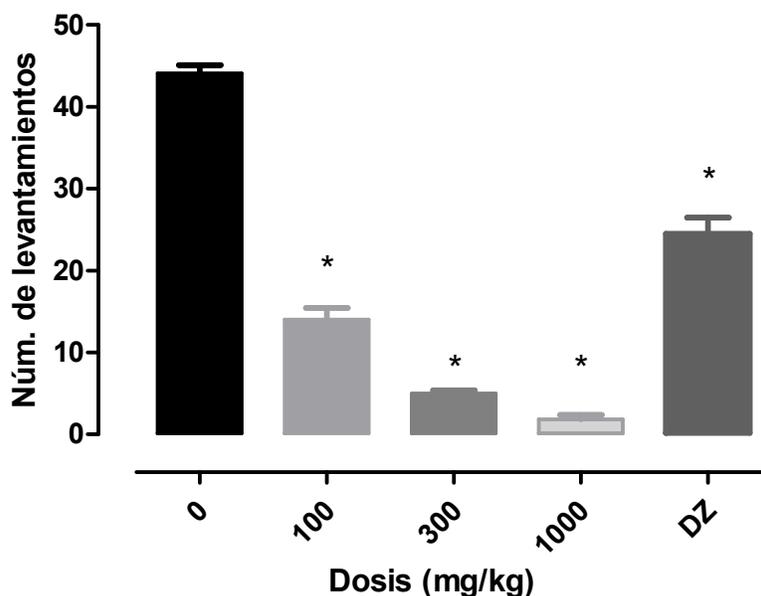


Figura 24. Efecto del extracto hidroalcohólico de *V. edulis* ssp. *procera* por vía i.p. sobre la actividad exploratorio. DZ – diazepam (2.5 mg/kg). Cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVIA de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica significativa con el control.

5.4.1.2. Prueba de enterramiento de esferas

El comportamiento de los ratones de enterrar objetos simula algunos aspectos del comportamiento obsesivo-compulsivo; por lo tanto, a menudo se usa para detectar sustancias con actividad anticompulsiva (Kalariya et al., 2015). Los resultados muestran que la única sustancia con efecto en la prueba fue la sertralina, un compuesto cuyo mecanismo de acción es la inhibición selectiva de la recaptura de serotonina (ISRS). Este grupo de fármacos usados en los trastornos obsesivos ha demostrado tener actividad en este modelo inhibiendo el comportamiento de los ratones de enterrar objetos (Shinomiya et al., 2005). El extracto de valeriana no presentó efecto en esta prueba (Figura 25)

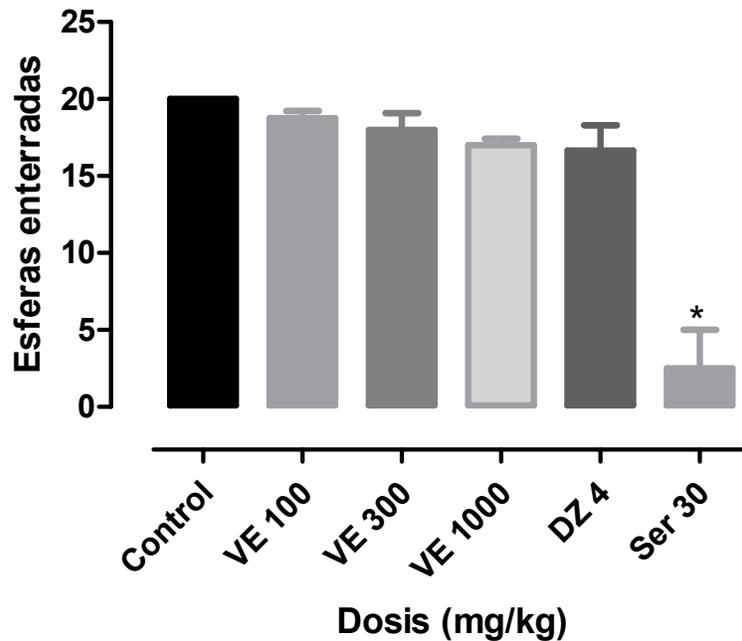


Figura 25. Número esferas enterradas en la prueba de marble-burying. Los valores se representan como la media \pm EEM para una prueba de 30 minutos con 20 canicas. * $p < 0,05$ en comparación con el grupo control (vehículo), (ANOVA seguido de la prueba post hoc de Dunnett). Ser: sertralina, DZ: diacepam, VE: Valeriana edulis.

5.4.2. Evaluación sobre la función motora.

La función motora se evaluó con dos pruebas, la primera, determina el efecto de una sustancia sobre la función neuromuscular, y segunda, sobre la coordinación motora. La combinación de estas pruebas nos da una idea del posible mecanismo de acción de la sustancia.

5.4.2.1. Prueba de función neuromuscular.

El extracto hidroalcohólico de valeriana presentó efecto a las dosis de 300 y 1000 mg/kg, presentando un efecto máximo del 30% a los 30 minutos a la dosis de 300 mg/kg y del 50% a los 70 minutos a la dosis de 1000 mg/kg. Sin embargo, el efecto

no es dosis dependiente y en momentos el efecto disminuye con el tiempo y vuelve a presentarse más tarde (Figura 26).

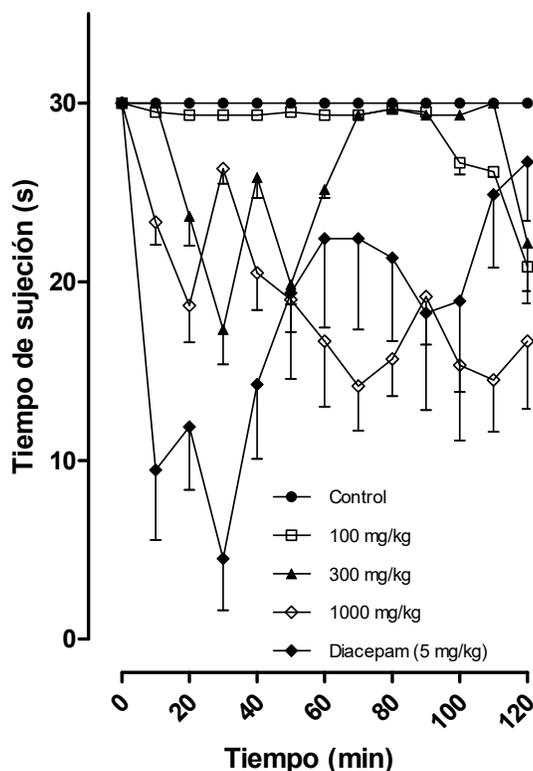


Figura 26. Efecto sobre la miorelajación de *V. edulis ssp procera ip*. Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$).

5.4.2.2. Prueba de Rota-Rod

La evaluación de extracto hidroalcohólico mostró efecto únicamente a la dosis de 1000 mg/kg 60 minutos posterior a la administración (Fig. 27). El resultado es un poco contradictorio a los observados en la prueba de sedación, donde todas las dosis tenían efecto. El efecto sedante normalmente está acompañado con la pérdida de la coordinación motora (Rivera Brenes, 2002).

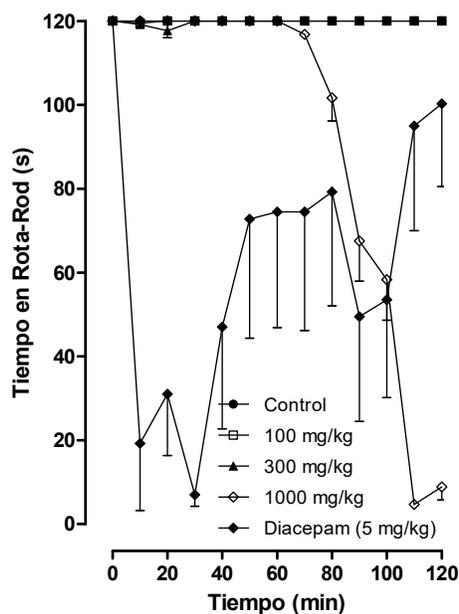


Figura 27. Efecto sobre la coordinación motora en Rota–Rod del extracto etanólico de *V. edulis ssp procera* administrado por vía ip. Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$).

5.4.3. Evaluación eficacia antinociceptiva

A continuación, se muestran los resultados obtenidos para la evaluación de los extractos de *V. edulis ssp. procera* sobre la nocicepción en el modelo de contracciones inducidas por ácido acético.

El extracto acuoso (Figura 28A) y etanólico (Figura 28B) presentaron efecto antinociceptivo a todas las dosis evaluadas. La mezcla de valepotriatos (Figura 28C) superó en eficacia al diclofenaco (10 mg/kg) utilizado como fármaco de referencia. Lo anterior proporciona una nueva perspectiva para el uso de los valepotriatos.

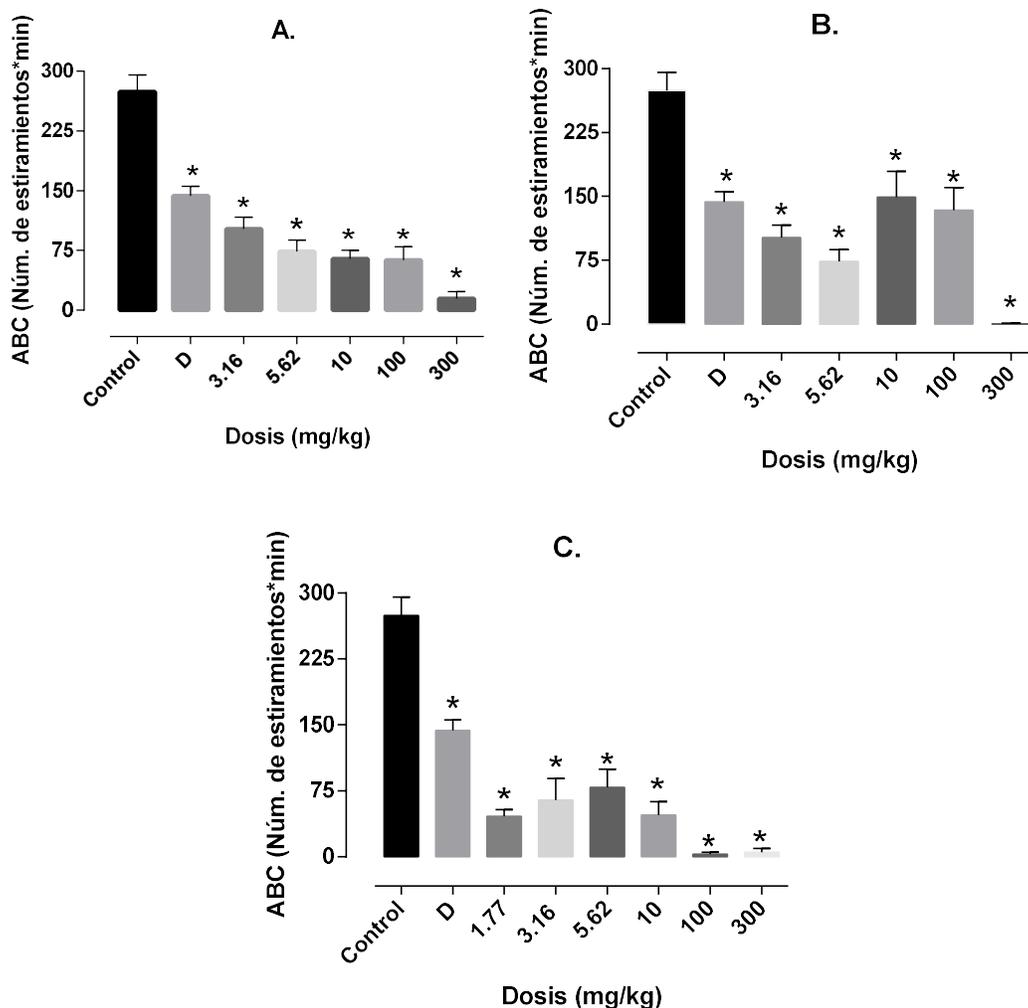


Figura 28. Actividad antinociceptiva de (A) extracto acuoso, (B) extracto hidroalcohólico y (C) mezcla de valepotriatos. D = diclofenaco. Cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVIA de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

5.5. Estudio químico y farmacológico de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

5.5.1. Mezcla de valepotriatos.

De las fracciones F_{1AD2} a F_{1AD4} se obtuvo un aceite de coloración amarillenta (0.24 g), que se analizó por CLAR para determinar el número de compuestos que constituían la fracción aislada. Las condiciones cromatográficas empleadas fue una columna Symmetry C18 con

elución isocrática con una fase móvil de ACN: H₂O (80:20). La velocidad de flujo fue de 0.8 mL/min. Los compuestos se detectaron a 256 nm.

La mezcla se analizó por RMN protónica (Figura 29) y de carbono 13 (Figura 30) encontrando la estructura de iridoides característica en los valepotriatos, compuestos frecuentes en especies de valeriana (Bos et al., 2002).

Se realizó la separación e identificación de los componentes de la mezcla por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). Se encontró la presencia de 5 picos mayoritarios (Figura 31) los cuales al analizarlos se encontró que eran valepotriatos, sin embargo, solo se pudo identificar tres de ellos: valtrato, acevaltrato e isohomoacevaltrato.

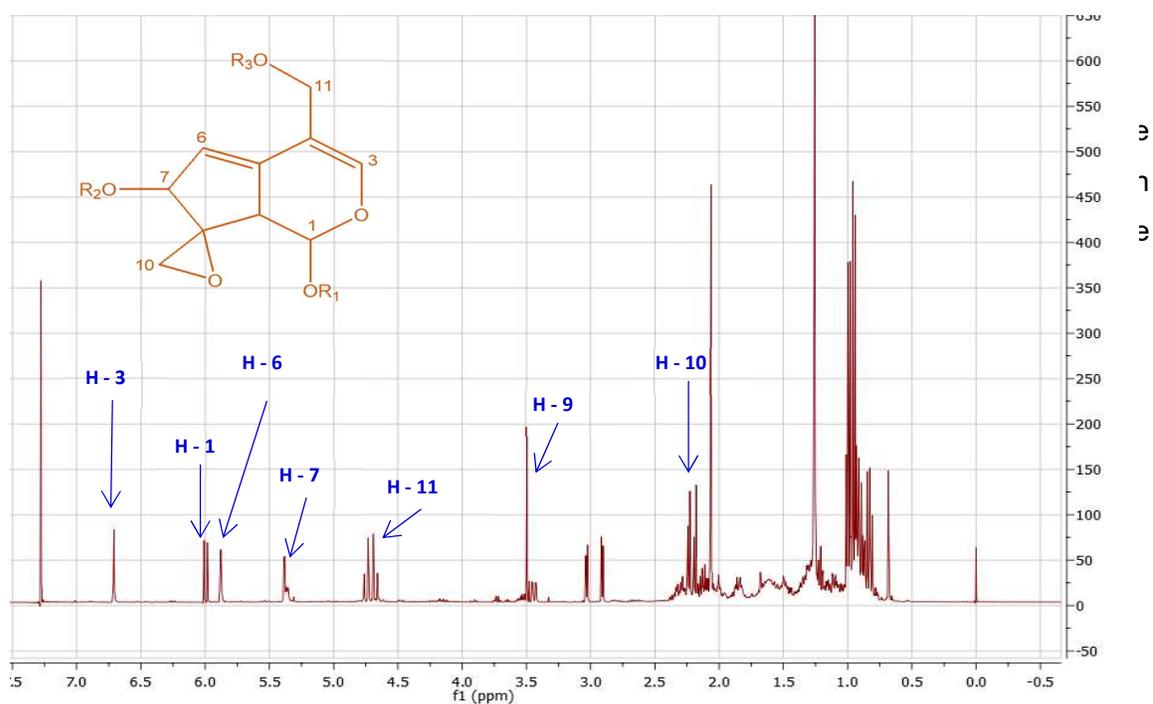


Figura 29. Espectro de RMN¹H (400MHz, CDCl₃) mezcla de valepotriatos. Se indica como H-x la señal de los protones característicos de la estructura de los valepotriatos.

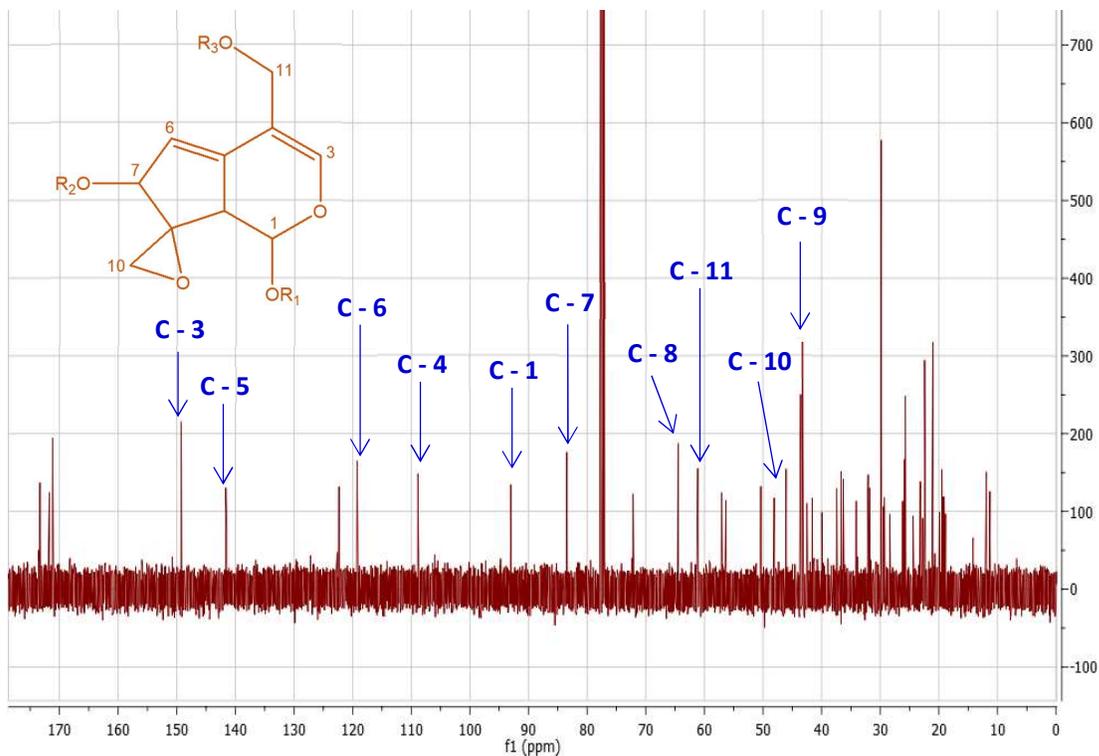


Figura 30. Espectro de RMN¹³C (100 MHz, CDCl₃) mezcla de valepotriatos

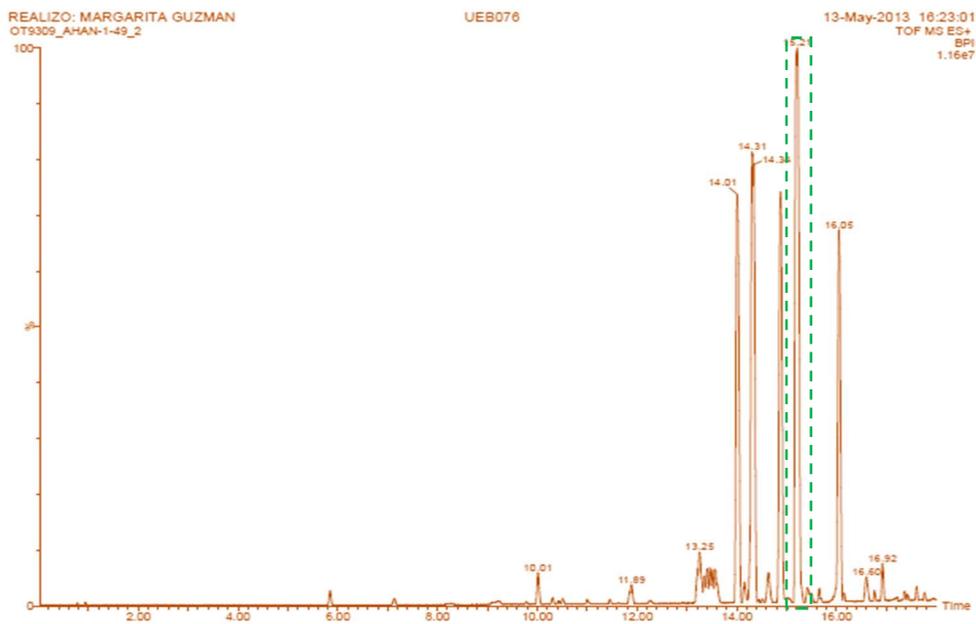


Figura 31. Cromatograma de gases (CG) de la mezcla de valepotriatos.

Se proponen los siguientes patrones de fragmentación para los compuestos identificados:

5.5.1.1. Valtrato

En la Figura 32 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 (Figura 32) se forma cuando el isovalerilo de la posición 1 pierde un metilo terminal, convirtiendo al isovalerato en 2-butenato.

A su vez, el fragmento m/z 405 se divide en tres maneras distintas, en una de ellas resultan 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-butenato de la posición 1 se pierde como 2-butenilo, 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-butenato 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-butenato 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.

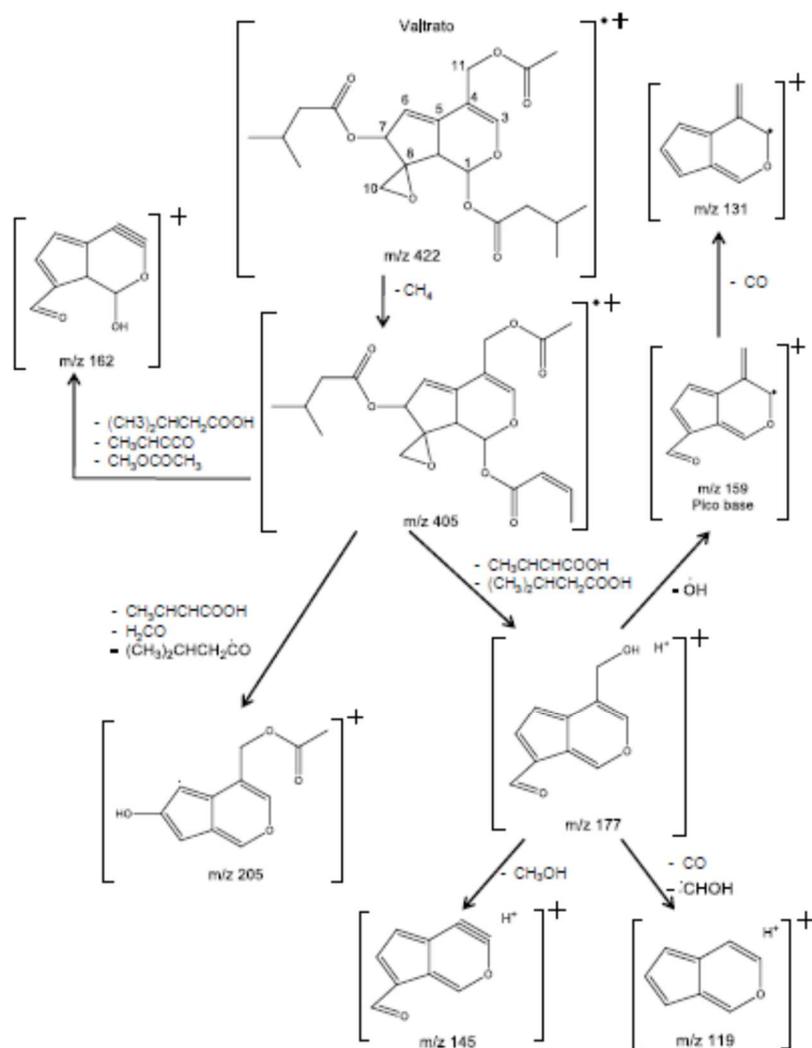


Figura 32. Patrón de fragmentación del valtrato.

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.

5.5.1.2. Acevaltrato

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, 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 33).

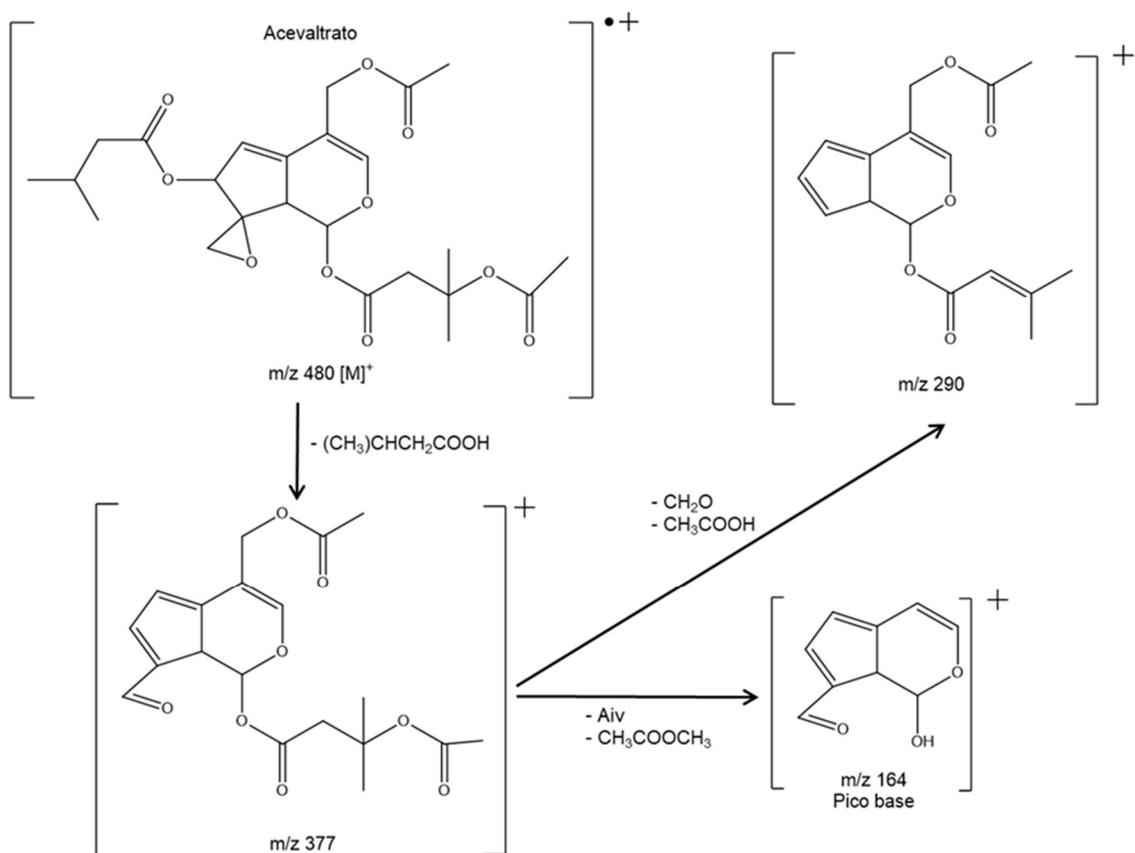


Figura 33. Patrón de fragmentación del acevaltrato.

5.5.1.3. Isohomoacevaltrato

Para el isohomoacevaltrato 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 34).

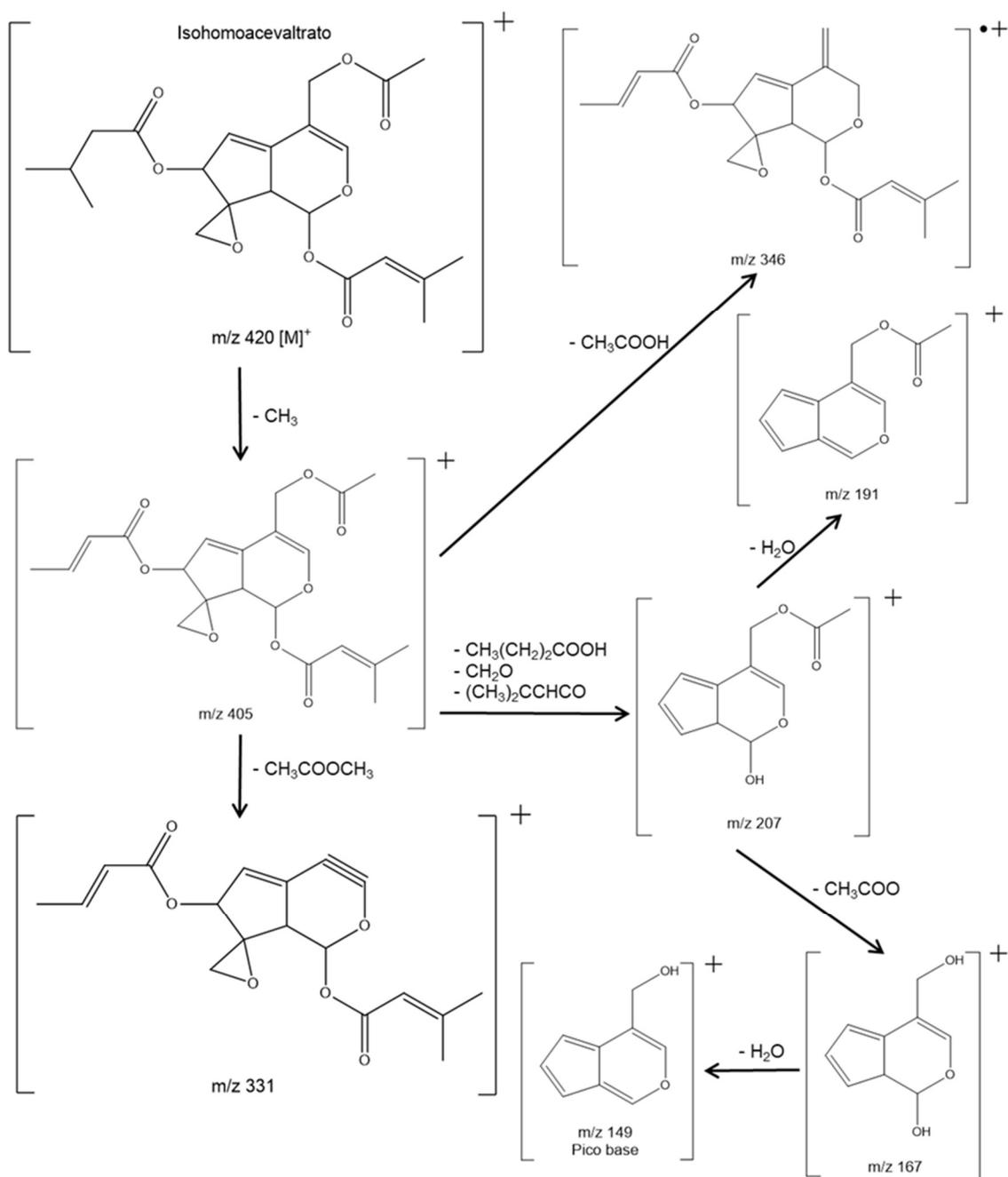


Figura 34. Patrón de fragmentación del isohomoacevaltrato.

Los compuestos y las proporciones relativas encontradas en la mezcla de valepotriatos es consistente a lo reportado por Bos et al. (2002) donde encontró mayor cantidad de valtrato en el extracto etanólico de *V. edulis* ssp. *procera*. En estudios con otras especies como son *V. officinalis* y *V. capense* también se encontró que el valtrato era el constituyente más abundante en los extractos (Occhiuto et al., 2009, Fuzzati et al., 1996).

5.5.1.4. Efecto antinociceptivo y antiinflamatorio de los valepotriatos.

5.5.1.4.1. Prueba de Randall-Selitto

Los valepotriatos presentan actividad antinociceptiva en estos modelos de dolor periférico a dosis de 31 y 100 mg/kg, indicando que a dosis altas actúa sobre nociceptores, interviniendo en la transmisión del impulso nociceptivo causado por un estímulo mecánico hacia el SNC.

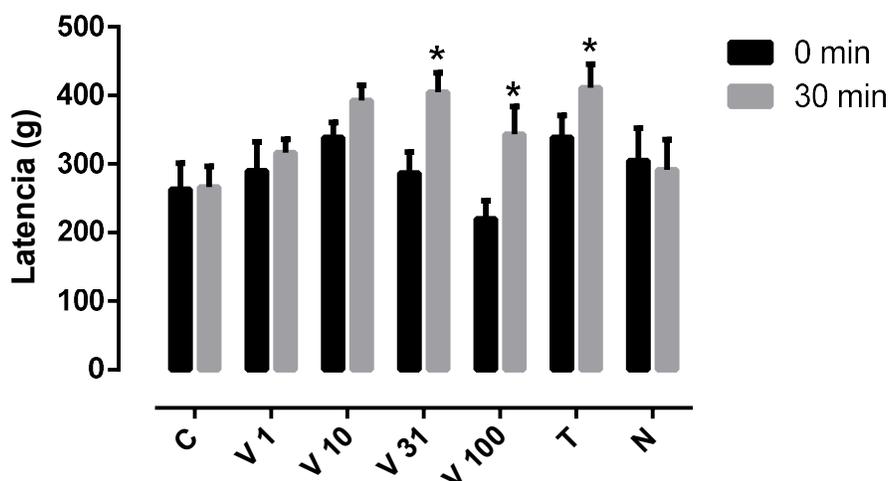


Figura 35. Efecto antinociceptivo de la mezcla de valepotriatos en la prueba de Randall-Sellitto. Latencia de retiró de la pata antes y 30 minutos después de la administración del tratamiento. Se representa el promedio \pm E.E.M. ($n \geq 6$ en cada grupo). Las dosis de tratamiento (mg/kg) se administraron (i.p.) 30 minutos antes de aplicar el estímulo. V= mezcla de valepotriatos, T= Tramadol (10 mg/kg), N= Naproxeno (10 mg/kg). Diferencia significativa * $p < 0.05$ en una prueba estadística t pareada.

5.5.1.4.2. Prueba de retirada de la cola.

El efecto de la mezcla de los valepotriatos a dosis de 10 y 31 mg/kg prolonga el tiempo de retiro de cola por un daño nocivo al frío (Figura 36A) y a dosis de 1, 10 y 31 mg/kg por daño al calor (Figura 36B). Lo anterior demuestra acción de los valepotriatos a nivel central (Dong, 2018).

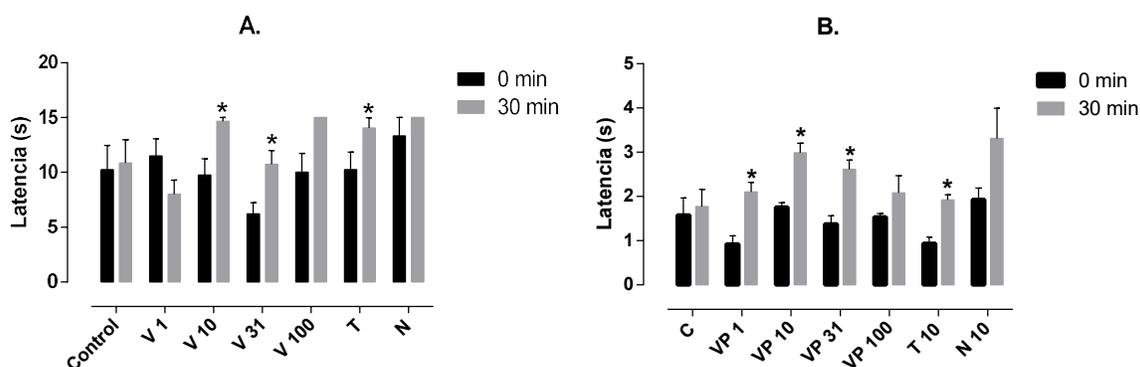


Figura 36. Efecto analgésico de la mezcla de valepotriatos en la prueba de retiro de cola en (A) agua fría (4°C) y (B) agua caliente (55°C). Efecto analgésico de la mezcla de valepotriatos en la prueba de retiro de cola en (A) agua fría (4°C) y (B) agua caliente (55°C) (Figura 36). Se representa el promedio \pm E.E.M. ($n \geq 6$ en cada grupo) de Latencia de retiró de cola antes y 30 minutos después de la administración del tratamiento. Las dosis de tratamiento (mg/kg) se administraron (i.p.) 30 minutos antes de aplicar el estímulo doloroso. V = mezcla de valepotriatos, T= Tramadol (10 mg/kg), N= Naproxeno (10 mg/kg). Diferencia significativa $*p < 0.05$ en una prueba estadística ANOVA de dos vías para medias repetidas.

5.5.1.4.3. Prueba de formalina

En la prueba de formalina, se evaluó la mezcla de valepotriatos a las dosis de 1, 10, 31 y 100 mg/kg. En la gráfica del curso temporal (Figura 37) las curvas correspondientes a los animales tratados con los valepotriatos aparecieron por debajo de la curva del lote control. El efecto de los valepotriatos a dosis bajas (1-31.6 mg/kg) en fase 1 en la prueba de la formalina (Figura 38A) indica que tienen

un efecto a nivel neuronal similar al de los opioides, puesto que este modelo se utiliza para diferenciar a los analgésicos opioides de los fármacos analgésicos antiinflamatorios no esteroideos (Pizziketti, 1985).

Los valepotriatos a dosis de 10 mg/kg también presentaron actividad en la fase 2 de esta prueba (Figura 38B), indicando un efecto antinociceptivo en la fase inflamatoria periférica, que concuerda con lo encontrado en la prueba de Randall-Sellito.

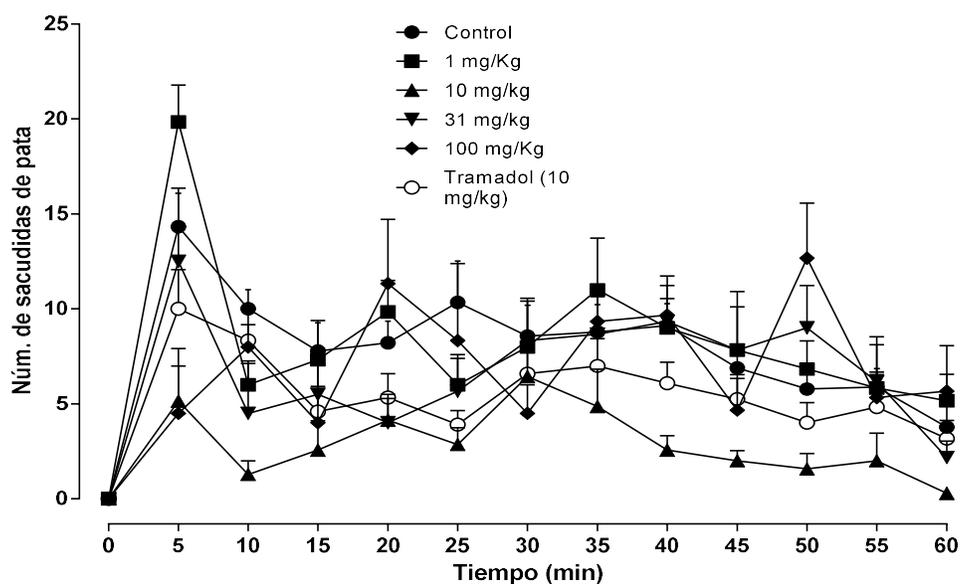


Figura 37. Curso temporal del comportamiento nociceptivo inducido por una inyección s.c. de una formalina a ratas (0.5 %). Cada punto es el promedio del número de lamida \pm EEM de $n \geq 6$ ratones.

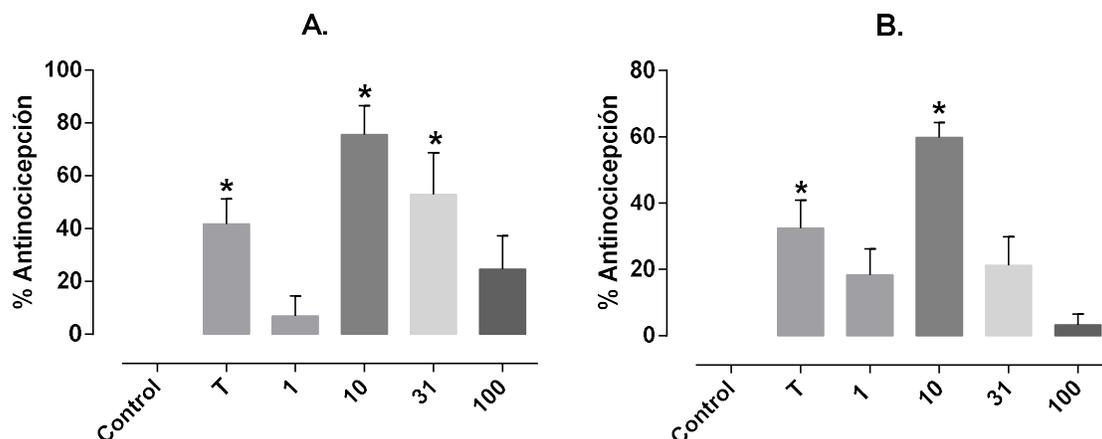


Figura 38. Efecto antinociceptivo de la mezcla de valepotriatos en (A) la fase aguda (0-10 min) y (B) la fase tónica (10-60 min) de dolor inflamatorio inducido por formalina. El comportamiento nociceptivo se cuantificó contando el número de sacudidas de la pata inyectada con formalina en periodos de 1 min cada 5 minutos. Se representa el promedio \pm E.E.M. ($n \geq 6$ en cada grupo). Las dosis (mg/kg) se administraron (i.p.) 30 minutos antes que la formalina. T= Tramadol (10 mg/kg). ANADEVIA de 1 vía, post hoc Dunnett. $*p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

5.5.1.4.4. Prueba de edema plantar inducido por carragenina

En el curso temporal del volumen de la pata de las ratas (Figura 39) se observa que existe una disminución en el edema inducido por carragenina a todas las dosis empleadas de valepotriatos en comparación con el control (Figura 40) esto nos permite sugerir que la mezcla tiene un efecto antiinflamatorio por bloqueo de los mediadores de la inflamación (Tielle et al., 2019).

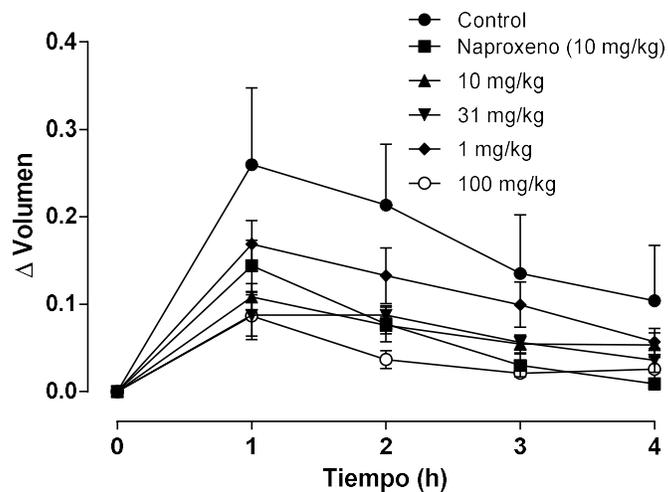


Figura 39. Curso temporal del cambio de volumen de la pata inducido por una inyección s.c. de carragenina (1 %) a ratas. Cada punto es el promedio de la diferencia de volumen de edema inducido por carragenina \pm EEM de $n \geq 6$ ratones.

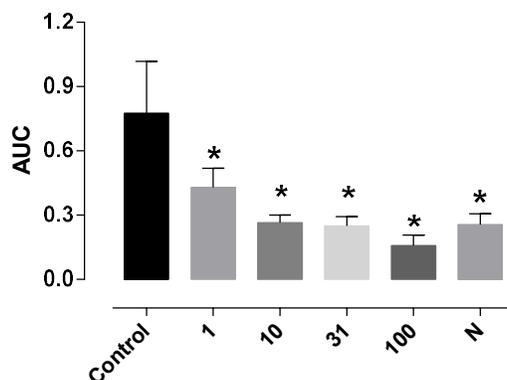


Figura 40. Efecto antiinflamatorio de la mezcla de valepotriatos en la prueba de edema inducido por carragenina. Cada barra representa el promedio del área bajo la curva (ABC, mL*h) \pm E.E.M. ($n \geq 6$ en cada grupo). Las dosis de tratamiento (mg/kg) se administraron (i.p.) 30 minutos antes que la carragenina. N= Naproxeno (10 mg/kg). ANADEVIA de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

5.5.2. Linarina.

La linarina se obtuvo como un sólido blanco amorfo. El espectro de infrarrojo se muestra en la Figura 30.

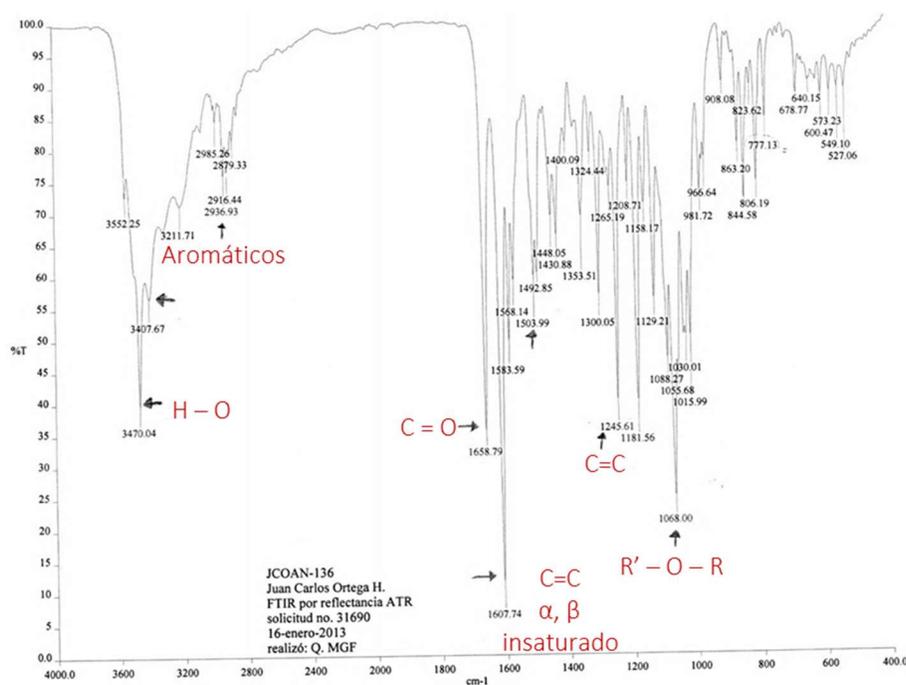


Figura 41. Espectro de IR de linarina.

La sustancia en cuestión presenta una banda de absorción en 3471, 3407 y 2936 cm^{-1} correspondiente a grupos hidroxilos, así como una banda a 1658 cm^{-1} característica del grupo carbonilo, tres bandas a 1608, 1500 y 1245 cm^{-1} correspondientes a dobles enlaces y dos bandas a 1070 y 777 cm^{-1} que indica la presencia de enlaces glicosídicos.

En su espectro de masas por impacto electrónico (Figura 42), EM(IE), se observa el ion molecular a una m/z de 284, para una fórmula molecular de $\text{C}_{16}\text{H}_{12}\text{O}_5$, que corresponde a la acetina (aglicona de la linarina). Esto sucede ya que por esta técnica no es posible ver las fracciones de azúcares. Además, se observan los fragmentos a m/z 152 y 132, características de una ruptura retro Diels-Alder de los enlaces del anillo C del flavonoide (Tsimogiannis D, *et al.*, 2007). El fragmento en m/z 241 $[\text{M}-\text{H}-\text{CH}_2\text{CO}]$ se forma también de la ruptura del anillo C de la acetina (Figura 42).

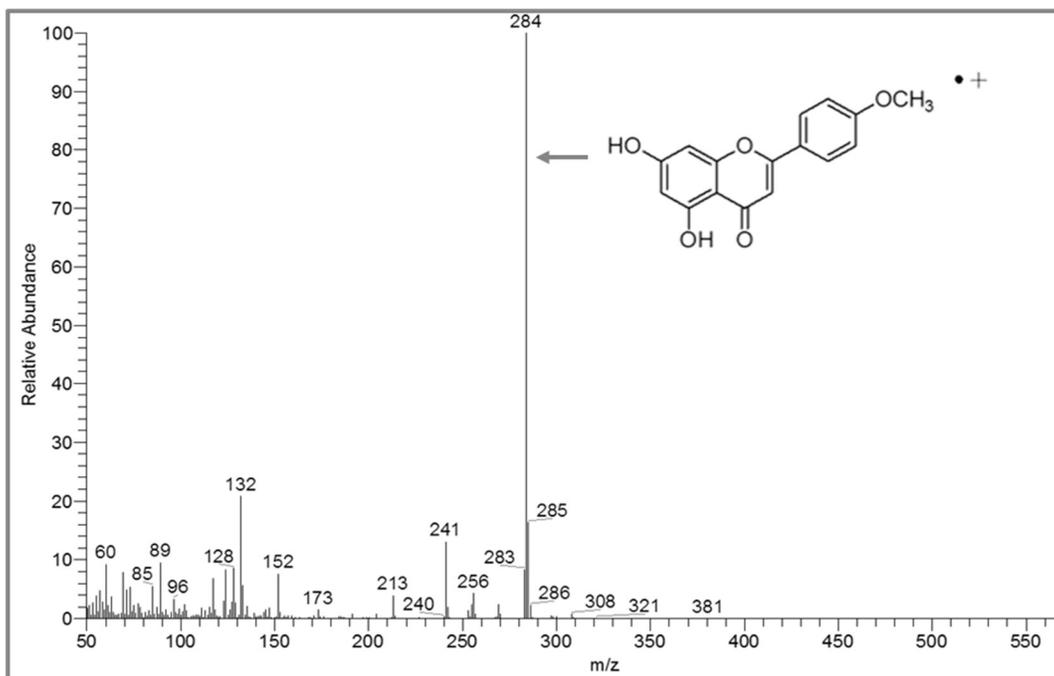


Figura 42. Espectro de masas por impacto electrónico de acetina.

Para obtener el espectro de masas de la estructura completa del glicósido de flavonoides se realizó un análisis por la técnica de espectrometría de masas FAB⁺). El espectro EM-FAB⁺ muestra una señal m/z 593 que corresponde a la molécula protonada [M-H⁺] de linarina con peso molecular de 592.

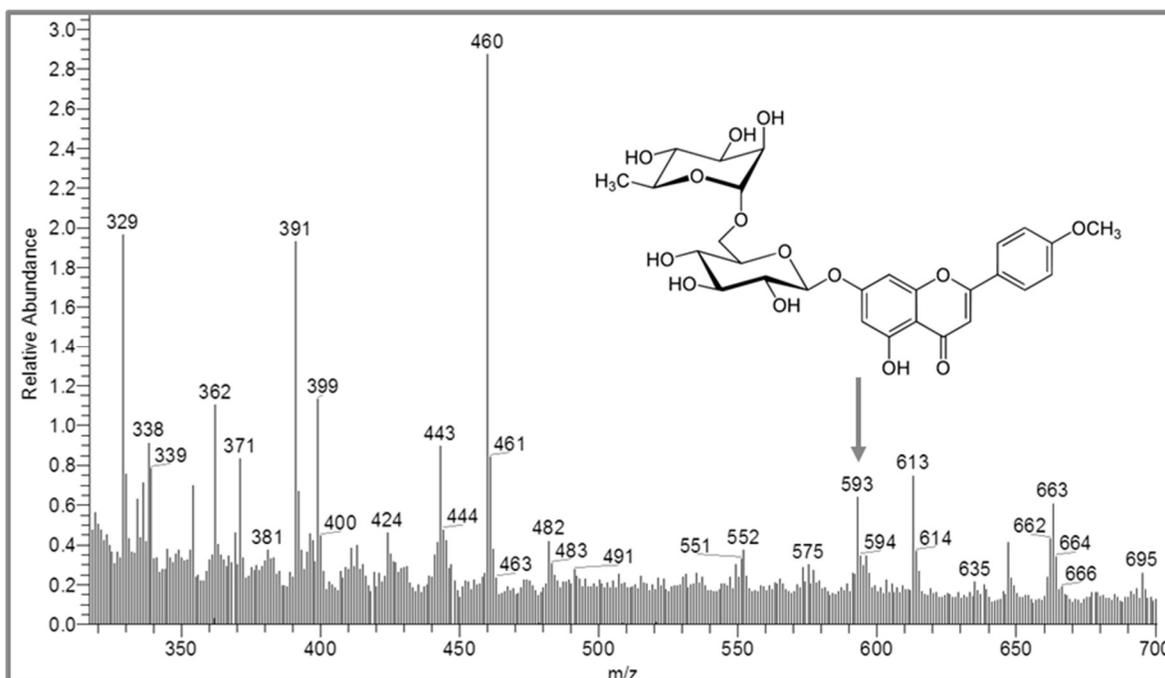


Figura 43. Espectro FAB-MS de linarina.

En el espectro de RMN se obtuvieron las señales presentadas en el Cuadro 29, que corresponden con la estructura de linarina (Arciniegas et al., 1996).

Cuadro 29. Señales de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para linarina.

Posición	δH (J en Hz)	δC
Acacetina		
2	--	163.04
3	6.85, s	103.89
4	--	182.14
5	--	157.08
6	6.36, d (1.5)	100.63
7	--	164.07
8	6.7, s (2.1)	94.88
9	--	161.23
10	--	105.55
1'	--	122.75
2'	7.95, d (7.5)	128.58
3'	7.05, d (8.0)	114.82
4'	--	162.53
5'	7.05, d (8.0)	114.82
6'	7.95, d (7.5)	128.58
Glucosa		
2''	3.76	73.16
3''	3.12– 3.64	76.32
4''	3.12– 3.64	69.68
5''	3.12– 3.64	75.74
6''	3.12– 3.64	66.18
Ramnosa		
1'''	5.39, d (6.2)	99.77
2'''	3.12– 3.64	70.82

3'''	3.12– 3.64	70.44
4'''	3.12– 3.64	72.15
5'''	2.41	68.44
6'''	0.98	17.92
-OH		
5	12.81, s	--
-OCH3		
4'	3.76	55.66

5.5.3. Valeiridósido A

El valeiridósido A (Figura 44) se aisló como agujas incoloras y con una fórmula molecular $C_{15}H_{25}O_8$ que se determinó por HR-APCI-MS en modo positivo 333.1631 m/z [M + H]⁺. El espectro IR indicó la presencia de múltiples grupos funcionales hidroxilo (3445 cm⁻¹) y carbonilo de lactona (1725 cm⁻¹). El espectro de ¹H NMR (Figura 2S, Anexo 1) exhibió señales para dos grupos metilo a δ_H 1.26 (3H, s) y 0.99 (3H, d, J = 6.6 Hz); tres grupos metileno a 4.67 (1H, m, H-1a) y 4.24 (¹H, dd, J = 12.4, 5.5 Hz, H-1b), 3.75 (1H, d, J = 12.3 Hz, H-6'a) y 3.57 (1H, dd, J = 12.2, 5.6 Hz, H-6'b); 1.64 (1H, m, H-6a) y 1.51 (1H, dt, J = 14.0, 6.9 Hz, H-6b); ocho metinos a 4.56 (d, J = 7.8 Hz, H-2'), 3.90 (t, J = 6.0 Hz, H-7), 2.86 (dt, J = 12.8, 6.4 Hz, H-4), 3.16 (m, H-3'), 3.35 (m, H-4'), 3.26 (m, H-5'), 2.77 (m, H-5) y 2.42 (dd, J = 10.4, 5.4 Hz, H-9). Los espectros de ¹³C NMR (Figura 3S, Anexo 1) de este compuesto revelaron la presencia de dos grupos metilo, tres metileno, ocho metinos y dos carbonos cuaternarios.

El espectro H-H COSY (Figura 6S, Anexo 1) mostró la conectividad de las secuencias de acoplamiento de protones para las correlaciones H-1 / H-9 / H-5 / H-6 / H-7 y H-5 / C-4. En las correlaciones HMBC (Figura 5S, Anexo 1) de H-7 (δ_H 3.90) / C-10 (δ_C 17.47) y H-9 (δ_H 2.42) / C-7 (δ_C 76.01) indicaron un iridoide bicíclico con dos grupos hidroxilo en δ_C 76.01 y δ_C 87.55. Las señales de carbono restantes coinciden para un resto glucósido con tres grupos hidroxilo y un grupo metileno. Las correlaciones H-H COSY de H-2' (δ_H 4.56) / H-3' (δ_H 3.16) / H-4' (δ_H 3.35) / H-5' (δ_H 3.26) / H-6' (δ_H 3.57 y 3.75) indicaron una pentosa en forma de piranosa. La correlación HMBC del hidrógeno anomérico δ_H 4.56 con δ_C 76.01 (C-7) confirmó que el resto β -piranosil estaba ubicado en C-7 del anillo B del iridoide. La configuración relativa del compuesto se determinó mediante el espectro 2D NOESY y

mediante la comparación de los datos de RMN del valeiridósido A con los datos reportados (Kouno et al., 1994).

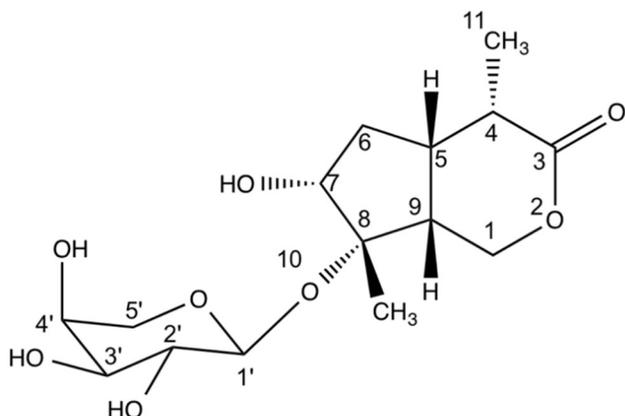


Figura 44. Valeiridósido A aislado de *Valeriana edulis* ssp. *procera*.

Cuadro 30. Señales de los espectros de RMN ^1H y ^{13}C para linarina.

Posición	^{13}C	^1H (J)
1	66.38	4.67 (m) 4.24 dd ($J = 12.4, 5.5$ Hz)
2	-	-
3	181.22	-
4	36.52	2.86 dt ($J = 12.8, 6.4$ Hz)
5	36.66	2.77 (m)
6	31.83	1.51 dt ($J = 14.0, 6.9$ Hz) 1.64 (m)
7	76.01	3.90 t ($J = 6.0$ Hz)
8	87.55	-
9	45.76	2.42 dd ($J = 10.4, 5.4$ Hz)
10	17.47	1.26 (s)
11	11.89	0.99 d ($J = 6.6$ Hz)
1'	-	-
2'	97.16	4.56 d ($J = 7.8$ Hz)
3'	73.12	3.16 (m)
4'	75.52	3.35 (m)
5'	69.65	3.26 (m)

5.5.4. Pruebas de eficacia

5.5.4.1. Prueba de Rota- rod

Los resultados obtenidos en la prueba de la evaluación de linarina y Valeiridósido A mostraron que la administración de dichos compuestos a ratones, a dosis de 10 mg/kg la linarina es capaz de modifica la coordinación motora (Figura 45A). Si bien la dosis de 100 mg/kg de Valeiridósido A (Figura 45B) muestra reducción de la actividad en algunos tiempos evaluados (20, 30, 40, 60, 90 y 100 min) esta no representa ser significativa debida a la dispersión de los datos.

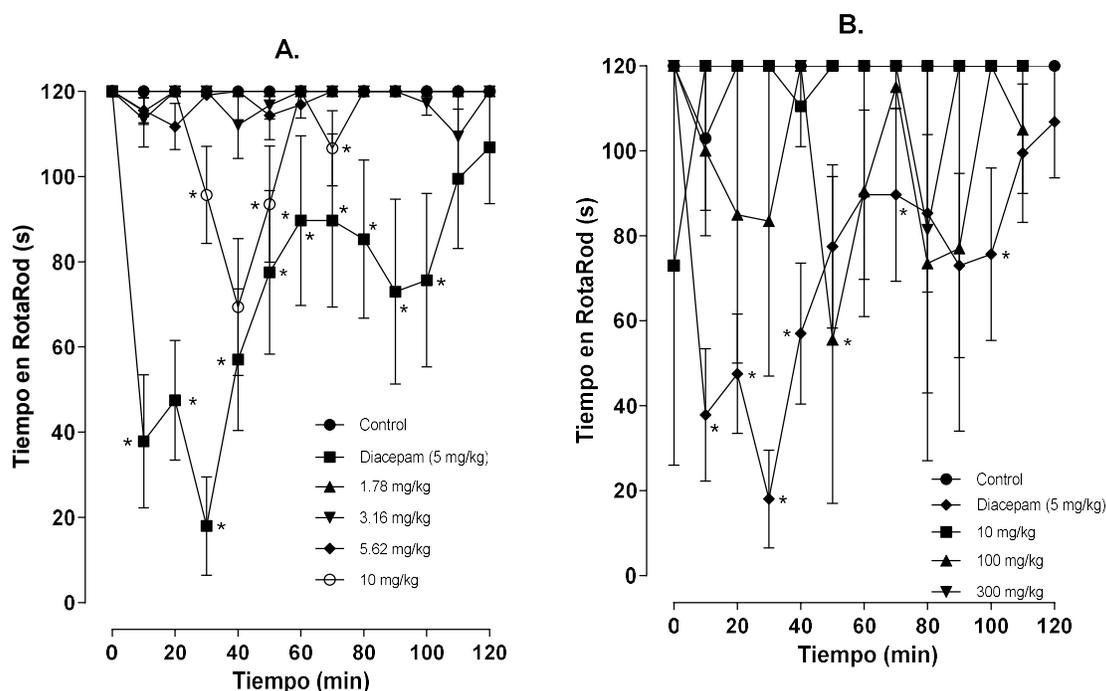


Figura 45. Efecto sobre la coordinación motora en Rota-Rod por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido A (B). Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVA de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

5.5.4.2. Prueba sobre la función neuromuscular

Una sustancia con actividad miorrelajante produce deterioro en la habilidad de los roedores para asirse de una barra metálica (grip strenght test) con las extremidades. Dicha actividad se observa disminuida en los ratones por efecto del Valeiridósido A a las dosis de 100 y 300 mg/kg durante los primeros 30 minutos de la prueba (Figura 46B) y para el caso de la linarina no se observa efecto de ella sobre la miorrelajación (Figura 46A).

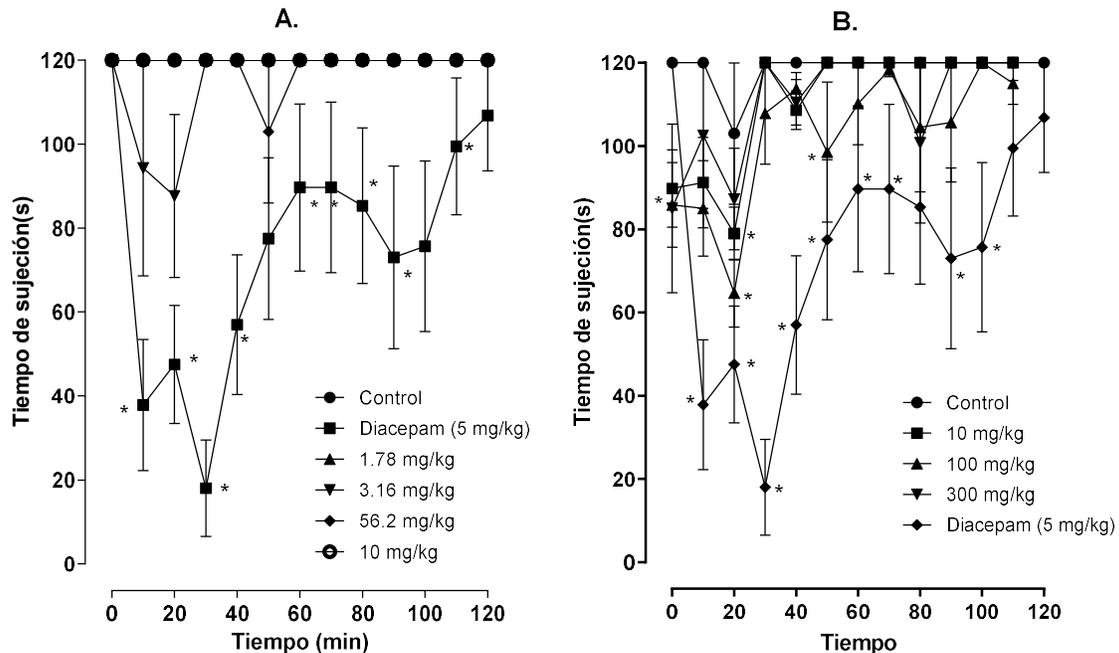


Figura 46. Efecto sobre la miorrelajación por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido (B). Cada punto representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVIA de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

5.5.4.3. Prueba de cilindro de exploración

En la evaluación de la actividad sedante se observa un aumento en la actividad exploratoria de los ratones administrados con la dosis de 10 mg/kg de valeiridósido A (Figura 47B) con respecto al control. En los animales tratados con linarina no se observa un cambio significativo sobre la actividad exploratoria (Figura 48A).

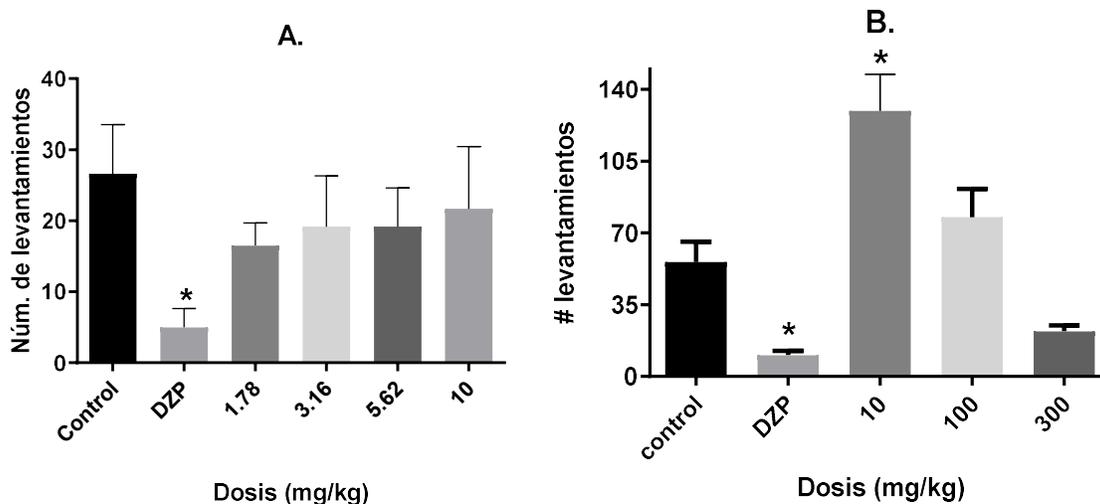


Figura 47. Efecto sobre la actividad exploratorio por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido A (B). Cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVIA de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

5.5.4.4. Prueba de tablero de hoyos

Los resultados obtenidos para linarina (Figura 48A) y Valeiridósido A (Figura 48B) no muestran efecto sobre la actividad exploratorio de los ratones a las dosis empleadas en la evaluación para ambos tratamientos.

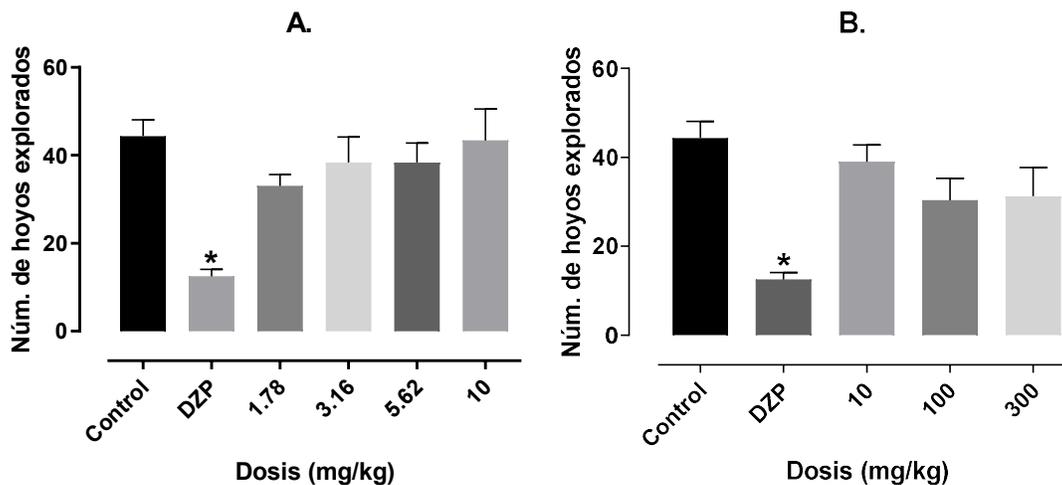


Figura 48. Efecto sobre la actividad ansiolítica por vía i.p. en dosis única de linarina (A) y valeiridósido A (B). cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). ANADEVa de 1 vía, post hoc Dunnett. * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Dentro de los hallazgos más relevantes se observó que el valeiridósido A, (en lo sucesivo VA) tiene un efecto ansiogénico en la prueba del cilindro de exploración a la dosis de 10 mg/kg; esto muestra un efecto contrario al esperado debido a que el género valeriana es conocido por ser ansiolítico. Por lo anterior se decidió explorar el mecanismo de acción por el cual el valeiridósido A tiene la capacidad de generar ansiedad.

5.5.4.5. Pruebas para elucidar el mecanismo de acción de Valeiridósido A.

Para la determinación del mecanismo de acción del compuesto VA como ansiogénico se utilizaron los fármacos ketanserina, 5-(N-etilcarboxamida)-adenosina (NECA) y diazepam. La ketanserina es un antagonista selectivo de los receptores 5-HT₂ entre los efectos encontrados en el SNC se encuentran somnolencia, trastornos del sueño, mareos, aturdimiento y falta de concentración (Aronson, 2016), NECA es un agonista no selectivo de receptores de adenosina que estimula la formación de AMPc que a altas dosis produce catalepsia (Knapp *et al.*, 2000) y finalmente, el diazepam se une a un sitio alostérico en la interfaz de la subunidad alfa y gamma del canal del receptor GABA-A, por lo que se aumenta la conductancia de los iones cloruro y se reduce la excitabilidad neuronal (Dhaliwal *et al.*, 2020).

La evaluación se realizó en ratones macho ICR de un peso de 25 – 30 g. Los animales se mantuvieron en condiciones estándar de temperatura y humedad. El compuesto y los fármacos de referencia se administraron por vía intraperitoneal. El modelo experimental utilizado para la evaluación fue cilindro de exploración.

En la evaluación de la actividad sedante se observa un aumento en la ansiedad del ratón con la dosis de 10 mg/kg del compuesto VA con respecto al control. El efecto ansiogénico de dicho compuesto solo es inhibido por la ketanserina, pero no por el diazepam ni NECA (Figura 49). Lo anterior indicaría que el efecto es debido a la interacción con receptores serotoninérgicos.

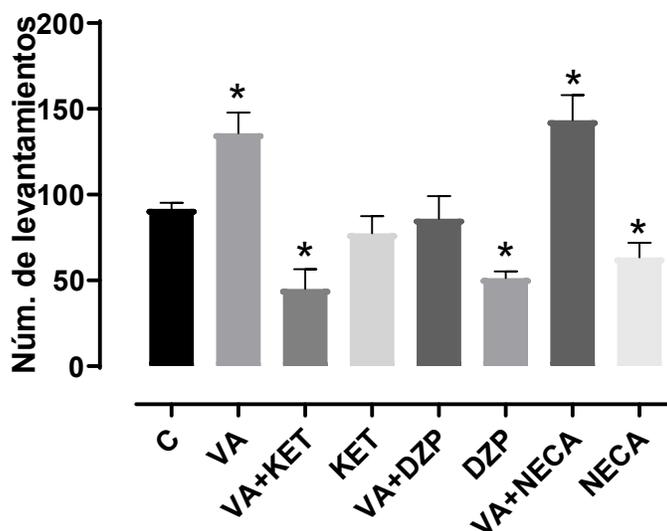


Figura 49. Interacción del valeiridósido A (VA) con los fármacos de referencia ketanserina (KET), diazepam (DZP) y 5-(N-etilcarboxamida)-adenosina (NECA) sobre la actividad exploratoria en la prueba del cilindro de exploración. Cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control.

Con el hallazgo anterior se planteó utilizar un antagonista selectivo de receptor 5-HT₁ (WAY-100635) los cuales están involucrados en los procesos de ansiedad y también se utilizó flumazenil (antagonista GABA_A) para observar una posible interacción del efecto ansiogénico por bloqueo gabaérgico.

Se encontró que way-100635 es capaz de inhibir el efecto del valeiridósido A (Figura 50A) y que persiste la ansiogénesis inducida por VA en la interacción con flumazenil (Figura 50B). Lo anterior sugiere que el valeiridósido A es un modulador de los

receptores 5-HT₁ que disminuye la liberación de GABA provocando un aumento en la ansiedad (Barros *et al.*, 2003).

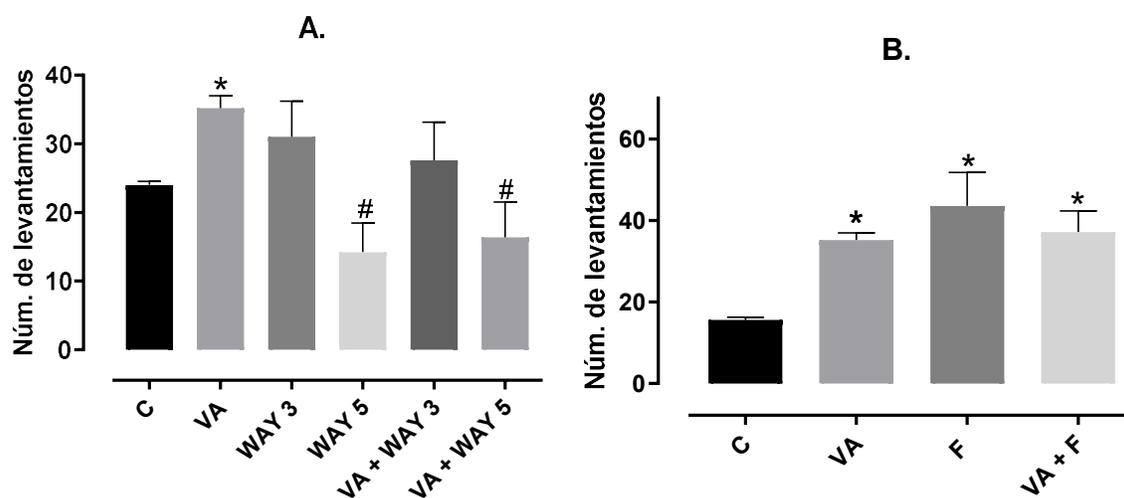


Figura 49. Interacción del valeiridósido A (VA) con (A) WAY100625 (WAY) y (B) flumazenil sobre la actividad exploratoria en la prueba del cilindro de exploración. Cada barra representa el promedio \pm EEM de los animales de cada grupo ($n \geq 6$). * $p < 0.05$, indica diferencia significativa con el control y # $p < 0.05$, indica diferencia con el valeiridósido A.

6. Conclusiones

Se aisló un nuevo glucósido de iridoide del extracto de etanol de raíces de *Valeriana edulis* ssp. *procera*, se definió como (4S*, 4aS*, 6R*, 7S*, 7aR*) - 6-hidroxi-4,7-dimetil-7 -(((2S*, 3R*, 4S*, 5S*)-3,4,5-trihidroxitetrahydro-2H-piran-2-il) oxi) hexahidrociclopenta[c]piran-3(1H)-ona, nombrado como Valeiridósido A y es el primer glucósido de iridoide reportado en este género.

Se encontró que el Valeiridósido A tiene actividad ansiogénica a la dosis de 10 mg/kg en el modelo de cilindro de exploración y esta puede ser causada por su interacción con los receptores serotoninérgicos.

Se encontró que el extracto acuoso, extracto etanólico y una mezcla de valepotriatos presentan actividad analgésica. Además, la mezcla de valepotriatos presentó actividad antinociceptiva central en los modelos de retiro de cola por inmersión en

agua caliente y fría, y en la prueba de la formalina, fase 1 y en la prueba de Randall-Selitto. Así mismo presentó actividad antiinflamatoria en la prueba de la formalina, fase 2 y en el modelo de inflamación de edema inducido por carragenina.

Se propuso como compuesto marcador químico para la especie a linarina y se desarrolló y validó un método analítico por CLAR que servirá para estandarizar extractos.

La evaluación de la toxicidad preclínica por la metodología de Lorke y la OECD permitió establecer que el extracto es inocuo y pertenece a la clasificación 5 del GHS.

Finalmente, los resultados generados permitirán integrar una monografía para la raíz de *V. edulis* ssp. *procera* y el extracto hidroalcohólico preparado a partir de ella, cumpliendo con el objetivo principal de la investigación.

Referencias

1. Abba, D., Inabo, H. I., Yakubu, S. E., & Olonitola, O. S. (2008). Contamination of herbal medicinal products marketed in Kaduna metropolis with selected pathogenic bacteria. *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM*, 6(1), 70–77.
2. Almeida A.M., Castel-Blanco M.M., Falcão A.C. Linear regression for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B*. 2002; 774:215-222.
3. Ameyia, H. Z., Gathumbi, P. K., Mbaria, J. M., Thaiyah, A. G., & Thoithi, G. N. (2014). Sub-acute toxicity of the chloroformic extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in rats. *Journal of ethnopharmacology*, 154(3), 593–599. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.04.001>.
4. Angoa-Pérez, M., Kane, M. J., Briggs, D. I., Francescutti, D. M., & Kuhn, D. M. (2013). Marble burying and nestlet shredding as tests of repetitive, compulsive-like behaviors in mice. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (82), 50978.

5. APHA (1992) Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 18th Edition, American Public Health Association (APHA), American Water Works Association (AWWA) and Water Pollution Control Federation (WPCF), Washington DC.
6. Arciniegas, Amira; Avendaño, Aidé; Pérez-Castorena, Ana-L.; Romo de Vivar, Alfonso. Inst. Química, Univ. Nacional Autónoma México, Coyoacán, Mex. Biochemical Systematics and Ecology (1997), 25(2), 185-186.
7. Arellano A., Villegas G., Uriostegui C., Álvarez L., Pineda G., Álvarez A., Tortoriello J. Polysomnographic evaluation of the hypnotic effect of *Valeriana edulis* standardized Extract in patients suffering from insomnia. Planta Med. 2001;67(8):695-699.
8. Attal, N., Jazat, F., Kayser, V., & Guilbaud, G. (1990). Further evidence for 'pain-related' behaviors in a model of unilateral peripheral mononeuropathy. Pain, 41(2).
9. Ávalos, Soto. J., Treviño, N. J. F., Verde, S. M. J., Rivas, M. C., Oranday, C. A.,
10. Banerjee, S., Rahman, L., Uniyal, G.C., Ahuja, P.S., 1998. Enhanced production of valepotriates by *Agrobacterium rhizogeneses* induced hairy root cultures of *Valeriana wallichii* DC. Plant Sci. 131: 203-208.
11. Bannon A. W. (2001). Models of pain: hot-plate and formalin test in rodents. Current protocols in pharmacology, Chapter 5.
12. Bennett, G.J., Chung, J.M., Honore, M. and Seltzer, Z. (2003), Models of Neuropathic Pain in the Rat. Current Protocols in Neuroscience, 22: 9.14.1-9.14.16.
13. Bettero GM, Salles L, Figueira RRM, Von Poser G, Rates SMK, Noël F,
14. Betz, J., Lyon, R., Nguyen P. A., Sander, L., Sharpless, K., Wise, S., Ziobro, G. Development of standard reference materials for the analysis of dietary supplements. HerbalGram, 2004, 63, 44–47.
15. Bone, K. Standardized extracts: Neither poison nor panacea. HerbalGram, 2001, 53, 50–55.
16. Bos R., Woerdenbag H., Pras N. Determination of valepotriatos. J Chromatogr. 2002; 967:131-346.
17. Bos, R., 1997. Analytical and phytochemical studies on valerian and valerian-based preparations. Groningen University, Netherlands.

18. Bos, R., Hendriks, H., Scheffer, J. J. C., & Woerdenbag, H. J. (1998). Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine*, 5(3), 219–225.
19. Byng J., Chase M., Christenhusz M., Fay M., Judd W., Mabberley D., Sennikov A., Soltis D., Soltis P., Stevens P. (2016). Angiosperm phylogeny classification of flowering plants (APG IV) with the families organized alphabetically within orders.
20. Cabrera Suárez, Hirán R, Morón Rodríguez, Francisco J, Amador, María del Carmen Victoria, García Hernández, Ana Ibis, & Acosta de la Luz, Lérida. (2012). Composición fitoquímica de partes aéreas frescas de *Phania matricarioides*. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(3), 268-278.
21. Caetano L., Charlwood B., Gahan P. (1999). The localisation and accumulation of valepotriates in hairy roots of *Valerianella discoidea* (L.) Loisel. *Phytochemical Analysis - PHYTOCHEM ANALYSIS*. 10. 181-186.
22. Çalışkan H., Şentunali B., Özden, F.M., Cihan K. H., Uzunkulaoğlu M., Çakan, O., Kankal, S., Zaloğlu, N. (2017). Marble burying test analysis in terms of biological and non-biological factors. *Journal of Applied Biological Sciences*. 11. 54-57.
23. Canadian Food Inspection Agency. (2019). Bacterial Pathogens in Dried Herbs and Dried Teas - April 1, 2014 to March 31, 2018 - Food microbiology - Targeted Surveys – Final report.
24. Cañigueral, S. R. Vila (2001) “Principios de la Fitoterapia”, en “Plantas medicinales y Fitoterapia”, Consejo General de Colegios Oficiales de Farmacéuticos, Madrid, Vol. 1, 173-193.
25. Dghaim R., Al Khatib S., Rasool H., Ali Khan M. (2015). Determination of Heavy Metals Concentration in Traditional Herbs Commonly Consumed in the United Arab Emirates. *Journal of Environmental and Public Health*, Volume 2015, Article ID 973878.
26. Domínguez M. Capítulo IV. El arsénico y la salud. Monografías de la real academia nacional de farmacia. Monografía XXII. Contaminación y salud. 2007; 153-243.
27. Dong, F.-W., Jiang, H.-H., Yang, L., Gong, Y., Zi, C.-T., Yang, D., ... Hu, J.-M. (2018). Valepotriates From the Roots and Rhizomes of *Valeriana jatamansi* Jones as Novel N-Type Calcium Channel Antagonists. *Frontiers in Pharmacology*, 9.

28. Drugs Containing Valepotriates (*Valerianae radix*). In: Plant Drug Analysis. (1996). Springer, Berlin, Heidelberg.
29. EDQM. European Directorate for the Quality of Medicines & Health Care. Guide for the elaboration of monographs on herbal drugs and herbal drug preparation. European Pharmacopoeia. 2007.
30. 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. J Pharm Pharmacol. 2010;62(9):1167-1174.
31. FHEUM. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Segunda edición. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México 2013.
32. Flaster, T. y Lassiter, J. Quality control in herbal preparations: using botanical reference standards for proper identification. HerbalGram, 2004, 63, 32–37.
33. Francis AJP. y Dempster RJW. Effect of valerian, *Valeriana edulis*, on sleep difficulties in children with intellectual deficits: randomized trial. Phytomedicine. 2002;9(4):273-279.
34. Fuzzati, N., Wolfender, J.L., Hostettmann, K., Msonthi, J.D., Mavi, S. and Molleyres, L.P. (1996), Isolation of Antifungal Valepotriates from *Valeriana capense* and the Search for Valepotriates in Crude Valerianaceae Extracts. Phytochem. Anal., 7: 76-85.
35. Ganzera M., Pöcher A., Stuppner H. Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS. Phytochem Analysis. 2005; (16): 205-209.
36. García M., Soberón E., Cortés M., Rodríguez R., Herrera J. y Alcántara A. (2002). Guía de validación de métodos analíticos. Colegio Nacional de Químicos Biólogos México, A.C. México, 123 p.
37. Gebhart GF. 2000. JJ. Bonica Lecture-2000: Physiology, Pathophysiology, and pharmacology of visceral pain. Regional Anesthesia and Pain Medicine, 25(6):632-638.

38. González-Trujano M.E., Martínez A.L., Reyes-Ramírez A., Reyes Trejo B., Navarrete A. Palmitone Isolated From *Annona diversifolia* Induces Anxiolytic-Like Effect in Mice. *Planta Med.* 2006; 72:703-707.
39. Hazelhoff, B., Malingré, T. M., & Meijer, D. K. (1982). Antispasmodic effects of *Valeriana* compounds: an in-vivo and in-vitro study on the guinea-pig ileum. *Archives internationales de pharmacodynamie et de therapie*, 257(2), 274–287.
40. Hernández, F. Historia natural de las plantas de la Nueva España. Obras completas tomos I y II. –1571–1576–. UNAM, México, 1959.
41. Hiller K.O., Zetler G. Neuropharmacological Studies on Ethanol Extracts of *Valeriana officinalis* L.: Behavioral and Anticonvulsant Properties. *Phytoter Res.* 1996;(10):145-151.
42. ICH. International Conference on Harmonisation Of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1). November 2005. INVEMAR. Manual de técnicas analíticas para la determinación de parámetros fisicoquímicos y contaminantes marinos (aguas, sedimentos y organismos. Ed. Precombi, Santa Marta, 2003.
43. Jensen S., Dahlgren R., Nielsen B. (1975). Iridoid Compounds, Their Occurrence and Systematic Importance in the Angiosperms. *Botaniska Notiser (Lund)*. 128. 148-180.
44. Joshi V., Navarrete A., Khan I. Authentication of *Valeriana procera* Kunth and
45. Kedia S., Chattarji S. (2014) Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. *J. Neurosci. Methods*, 233, pp. 150-154.
46. Ladino Torres, Fabian Ricardo; Lopez Carrillo, Lizeth Johanna. (2016). Estudio cromatográfico por HPLC-DAD, en extractos acetónicos de las especies *Gnaphalium Elegans*, *Achyrocline Satureioides* y *Achyrocline Bogotensis*.
47. Laird, J. M., Souslova, V., Wood, J. N., & Cervero, F. (2002). Deficits in visceral pain and referred hyperalgesia in Nav1.8 (SNS/PN3)-null mice. *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience*, 22(19), 8352–8356.

48. Lorke, D. A new approach to practical acute toxicity testing. *Archives of Toxicology*, 1983, 54, 275–287.
49. Lucio-Gutiérrez J. Aplicación de Métodos Quimiométricos para la Caracterización y Control de Calidad de Plantas Medicinales. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma de Barcelona. (2012).
50. Manzanero-Medina G., Flores-Martínez A., Sandoval-Zapotitla E., Bye-Boettler R. (2009). Etnobotánica de siete raíces medicinales en el mercado de Sonora de la Ciudad de México. *Polibotánica*. 191-228.
51. Marles R.J. and Farnsworth, N.R. (1995) Antidiabetic Plants and Their Active Constituents. *Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology*, 2, 137-189.
52. Márquez-Hernández I., Bastidas-Guerrero T. L., Fernández-Valarezo G.K. Campo Fe M. (2017). Preliminary pharmacognostic study of the stem and root of the species *Moringa Oleifera* lam grown in Machala. *Rev Cub de Plant Med*. 2017;22(1).
53. Meyer, F. G., 1951. Valeriana in North America and the West Indies (Valerianaceae). *Annals of the Missouri Botanical Garden* 38(4): 377-503.
54. Monroy-Ortiz, C., & Castillo-España, M. (2007) Plantas medicinales utilizadas en el estado de Morelos. 2da Ed., ED. CONABIO.
55. Morán, M. J., Serrano, G. L. B., Morales, R. M. E. (2014). Evaluación citotóxica de
56. Müller L.G., de Andrade-Salles L., Sakamoto S., Stein A.C., Cargnin S.T., Cassel E., Vargas R.F., Rates S.M., von Poser G.L. Effect of storage time and conditions on the diene valepotriates content of the extract of *Valeriana glechomifolia* obtained by supercritical carbon dioxide *Phytochem. Anal.*, 23 (2012), pp. 222-227.
57. Musa, A.A. (2012). Cytotoxicity activity and phytochemical screening of *Cochlospermum tinctorium* Perr Ex A. Rich Rhizome. *JAPS*. 2 (7): 155-159.
58. Navarrete A., Avula B., Choi YW., Khan IA. Chemical Fingerprinting of Valeriana
59. Njung'e, K., & Handley, S. L. (1991). Evaluation of marble-burying behavior as a model of anxiety. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 38(1), 63–67.
60. NMX-AA-008-SCFI-2016. Análisis de agua. medición del ph en aguas naturales, residuales y residuales tratadas.

61. NMX-F-260-1978. Determinación del porcentaje de las cenizas solubles e insolubles en té y productos similares.
62. NMX-F-327-S-1979. Determinación del porcentaje de las cenizas insolubles en ácido clorhídrico del té y productos similares.
63. NMX-F-428-1982. Alimentos. Determinación de humedad (método rápido de la termobalanza).
64. NMX-F-527-1992. Alimentos. Determinación de sólidos totales, sólidos disueltos y sólidos en suspensión en agua.
65. NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-138-SSA1-1995, que establece las especificaciones sanitarias del alcohol desnaturalizado, antiséptico y germicida (utilizado como material de curación), así como para el alcohol etílico de 96°g.l., sin desnaturalizar y las especificaciones de los laboratorios o plantas envasadoras de alcohol.
66. NORMA Oficial Mexicana NOM-247-SSA1-2008, Productos y servicios. Cereales y sus productos. Cereales, harinas de cereales, sémolas o semolinas. Alimentos a base de: cereales, semillas comestibles, de harinas, sémolas o semolinas o sus mezclas. Productos de panificación. Disposiciones y especificaciones sanitarias y nutrimentales.
67. Occhiuto F., Pino A., Palumbo D., Samperi S., Pasquale R., Sturlese E., Circosta C. (2009). Relaxing effects of *Valeriana officinalis* extracts on isolated human non-pregnant uterine muscle. *The Journal of pharmacy and pharmacology*. 61. 251-6.
68. Oliva I, González-Trujano M, Arrieta J, Enciso-Rodríguez R, Navarrete A. 2004. Neuropharmacological profile of hydroalcoholic extract of *Valeriana edulis* ssp. *procera* roots in mice. *Phytotherapy Research* 18:290-296.
69. Omelchuk, M., Krivut, B., & Voroshilov, A. (1984). Efectos de las condiciones de secado en la calidad de *Caléndula officinalis* Lin. como materia prima para medicamentos. *Khimiko-Farmatsevticheskii Zhurnal*, 18, 329-331.
70. on rat P-type ATPases. *Planta Medica*. 2011; 77: 1702-1706.
71. Piaña, M, L. Persano, A. Bentabol, E. Bruneau, S. Bogdanovd y C. Declerck. 2004. Sensory analysis applied to honey: State of the Art. *Apidologie* 35: S26-S37.

72. Pinel, J. P., & Treit, D. (1978). Burying as a defensive response in rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 92(4), 708–712.
73. Pritchett, K., & Mulder, G. B. (2003). The rotarod. *Contemporary topics in laboratory animal science*, 42(6), 49.
74. Rea-Páez H. *Manual de Prácticas de la Unidad de Aprendizaje de Bromatología*. ECORFAN, Nayarit, 2017. p. 13.
75. Reif, K., Sievers, H. y Steffen, J. The role of chemical reference standards as analytical tools in the quality assessment of botanical materials. A European perspective. *HerbalGram*, 2004, 63, 38–43.
76. Rios-Gomez Y. (2015). *Química y Farmacología de Iridoides*. Temas Selectos de Química de Productos Naturales, Edition: 1, Chapter: 4, Publisher: Universidad Nacional Autónoma de México, Editors: Guillermo Delgado, Alfonso Romo de Vivar, 95 – 133.
77. Rolland A, Fleurentin J, Lanhers M, Younos C, Misslin R, Mortier F, Pel J. 1991. Behavioral effects of the American traditional plant *Eschscholzia californica*: Sedative and anxiolytic properties. *Planta Medica*, 57:212-216.
78. Rzedowski, J., y Rzedowski, G. Calderón de, 2003. Valerianaceae. En: Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski (eds.). *Flora del Bajío y de regiones adyacentes*. Fascículo 113. Instituto de Ecología-Centro Regional del Bajío. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
79. Salgueiro L., Martins A., Correia H. (2010). Raw materials: the importance of quality and safety. *Flavour and Fragrance Journal*, 25, 253-271.
80. Selles F. E., Sánchez M. J., Solan M. C., Suiñe N. J., Tico-Grau J. *Tratado de*
81. Seo-Hee A., Eun-Hae J., Jun-Hyeok C., Hye-Ryeon L., Bakes J., Young-Yun K., Bong-Kiun K. (2013) Basal anxiety during an open field test is correlated with individual differences in contextually conditioned fear in mice, *Animal Cells and Systems*, 17:3, 154-159
82. Sharapin, N. *Fundamentos de tecnología de Productos Fitoterápicos*. CYTED, Santa Fe de Bogotá, 2000. p. 145-157.

83. Species: Simultaneous Determination of Valerenic Acids, Flavonoids, and Phenylpropanoids Using Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *J AOAC Int.* 2006;89(1):8-15.
84. Stone, H.; Sidel, J.L. *Sensory evaluation practices*; Academic Press: London, UK, 2006.
85. Takeda H., Tsuji M., Matsumiya T., Changes in head-dipping behavior in the hole-board test reflect the anxiogenic and/or anxiolytic state in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 1998;(350):21-29.
86. Tangahu, B.V., Abdullah, S., Rozaimah, S., Basri, H., Idris, M., Anuar, N., Mukhlisin, M., 2011. A review on heavy metals (As, Pb, and Hg) uptake by plants through phytoremediation. *Int. J. Chem. Eng.* 2011.
87. Teke, G., N., Kuete. V. *Toxicological Survey of African Medicinal Plants.* (2014).
88. Tielle M. de A., Danielli L., Apel M.A., Cassel E., Vargas R., L. Von Poser G., Müller L.G., Rates S.M.K., A valepotriate-enriched fraction from *Valeriana glechomifolia* Meyer inhibits leukocytes migration and nociception in formalin test in rodents, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, Volume 29, Issue 4, 2019, Pages 477-482,
89. Thies PW (1969) Zum chromogenen Verhalten der Valepotriate. *Arzneimittelforschung* 19:319–322.
90. Tomé I.S., Hernández A.P., Estrada E.R., Reyes R.S., Dirzo G.S. 2010. Análisis botánico y químico de la corteza de *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roemer & Schultes) DC. *Investigación Universitaria Multidisciplinaria: Revista de Investigación de la Universidad Simón Bolívar* (9):6
91. Torres, A., & Gil, M. (2004). *Estabilidad de medicamentos. Requisitos de los estudios según la normativa actual.* España: Monografías de AEFI (Asociación Española de Farmacéuticos de Industria).
92. Violon, C., Van Cauwenbergh, N., Vercruysse, A., 1983. Valepotriate content in different in vitro cultures of Valerianaceae and characterization of *Valeriana officinalis* L. callus during a growth period. *Pharm. Weekblad.* 5: 205-209
93. vivo and in vitro study on the guinea-pig ileum. *Archives Internationales*
94. Vogel G. y Vogel W. (editores). 1997. *Drug discovery and evaluation. Pharmacological assays.* Springer, Alemania: E.1.2.1.

95. Wang Y., Jin L., Yu S., Shi Q., Gu Y., Kiyota H. (2010). Chemical Constituents of Plants from the Genus Valeriana. *Mini-Reviews in Organic Chemistry*. 7. 161-172.
96. World Health Organization. General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine. World Health Organization, Geneva, 2000a.
97. World Health Organization. Situación reglamentaria de los medicamentos. Una reseña mundial. World Health Organization, Geneva, 2000b.
98. World Health Organization. WHO Monographs on selected medicinal plants. Vol. 1. World Health Organization, Geneva, 1999.
99. Zlatanova, H., Vladimirova, S., Kostadinov, I., & Bijev, A. T. (2018). In Vivo Evaluation of Anti-inflammatory Activity of 2- [3-Acetyl- 5-(4-chloro-phenyl)-2-methyl-pyrrol-1-yl]-4-methylsulfanylbutyric Acid. *Folia medica*, 60(2), 270–274.

ANEXO 1. ESPECTROS DE LAS SUSTANCIAS AISLADAS

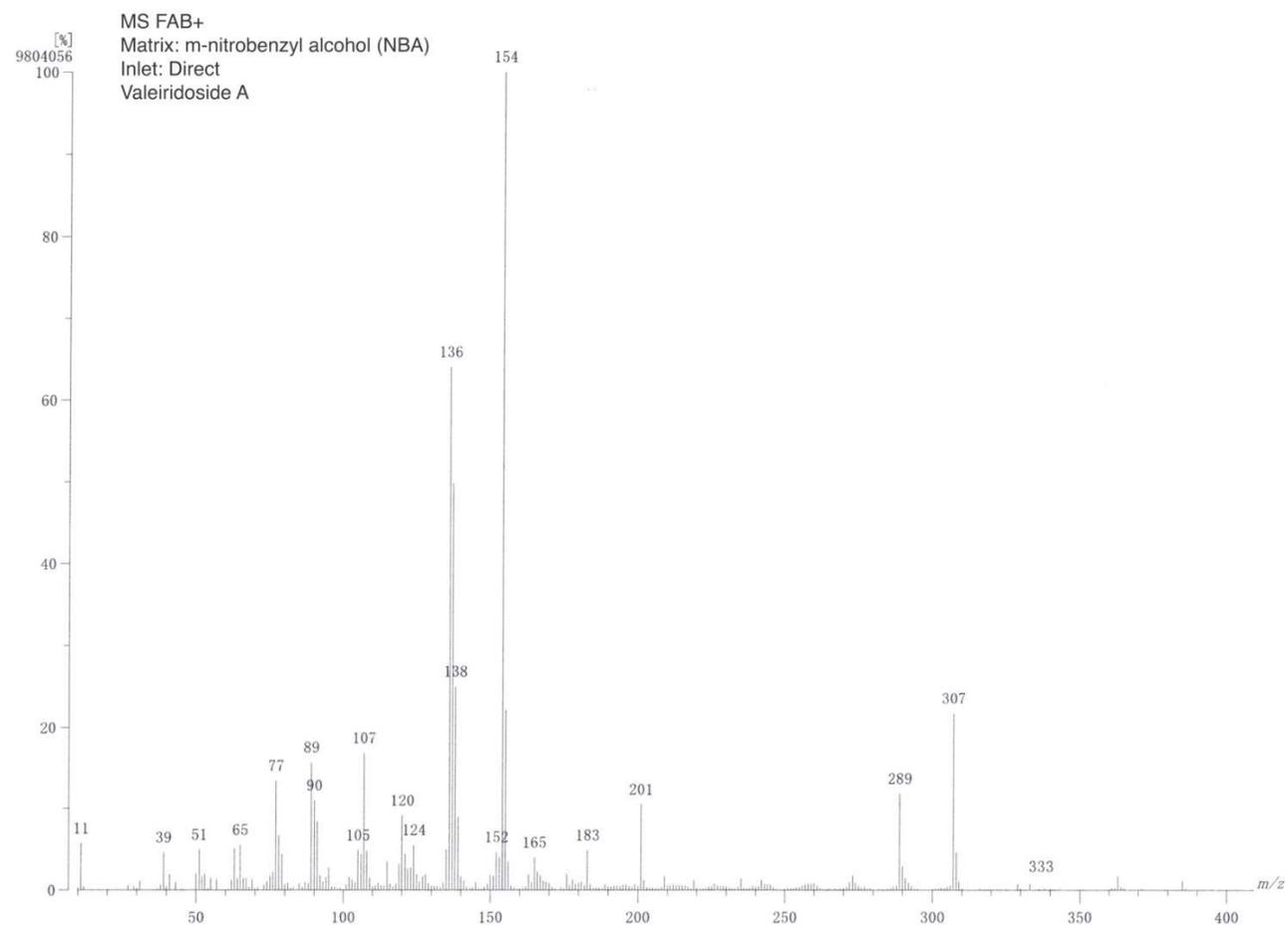


Figura 1S. EM FAB⁺ de Valeiridósido A.

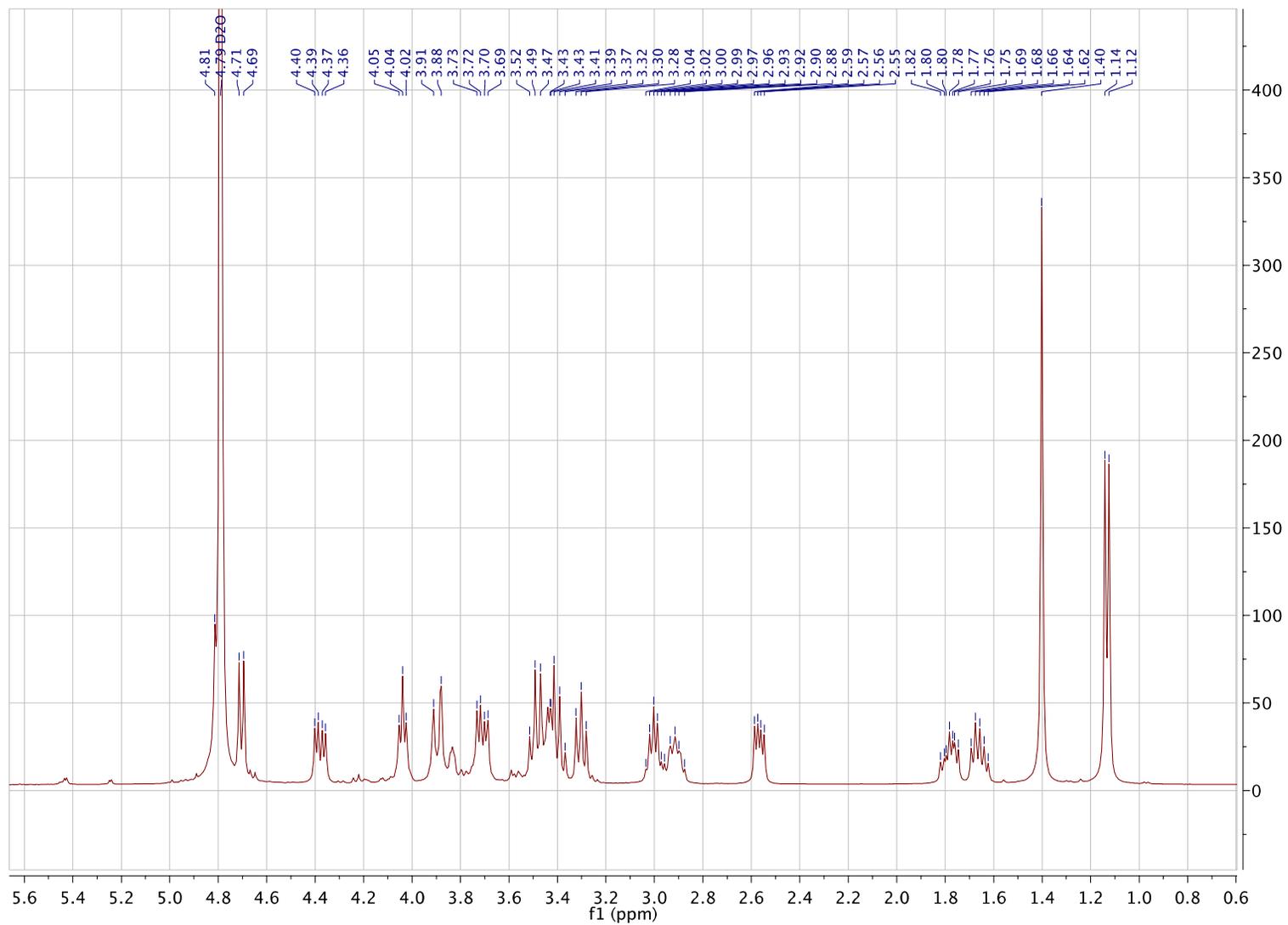


Figura 2S. RMN ^1H (400 MHz, D_2O) espectro de Valeiridósido A.

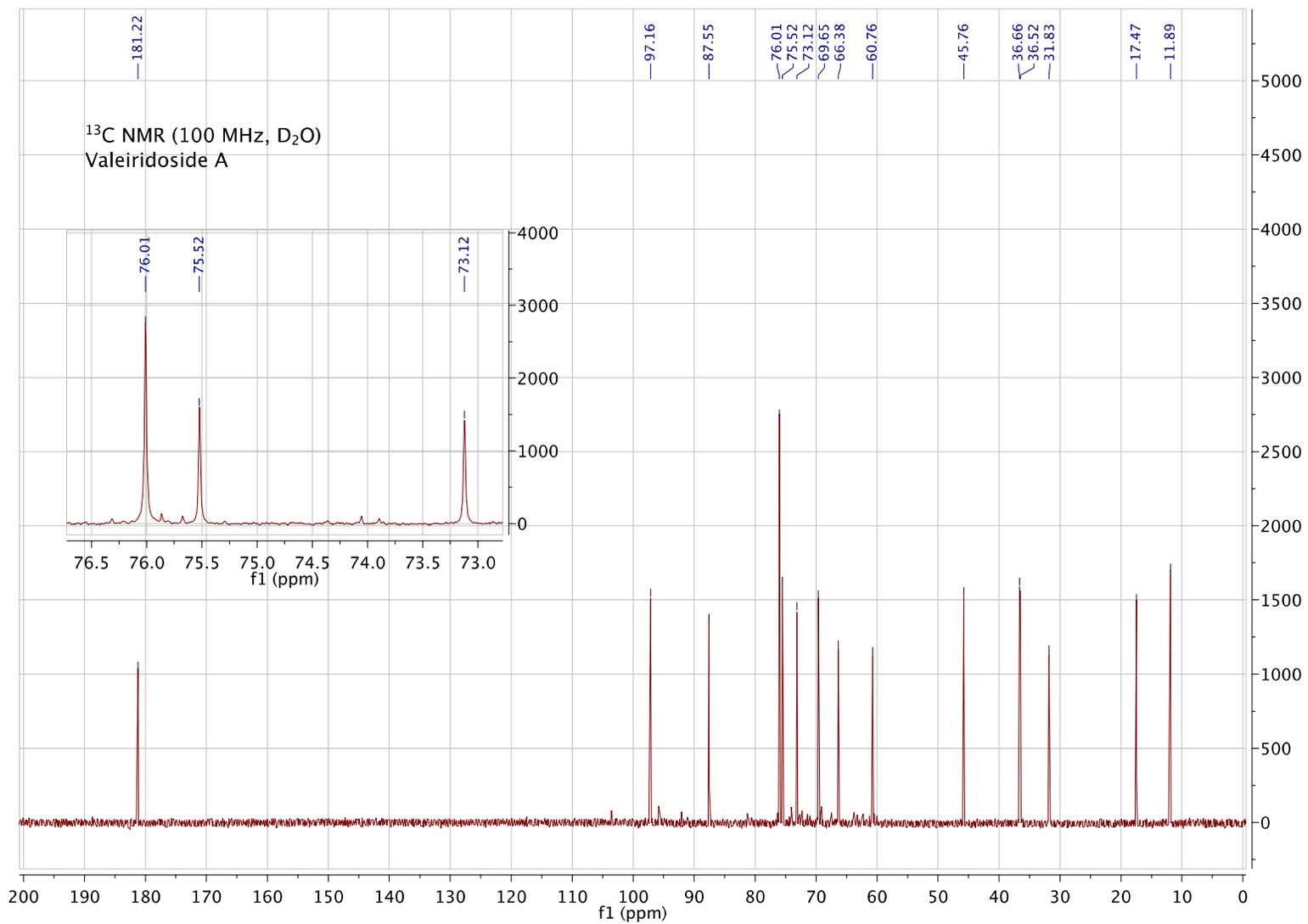


Figura 3S. RMN ¹³C (100 MHz, D₂O) espectro de Valeiridósido A.

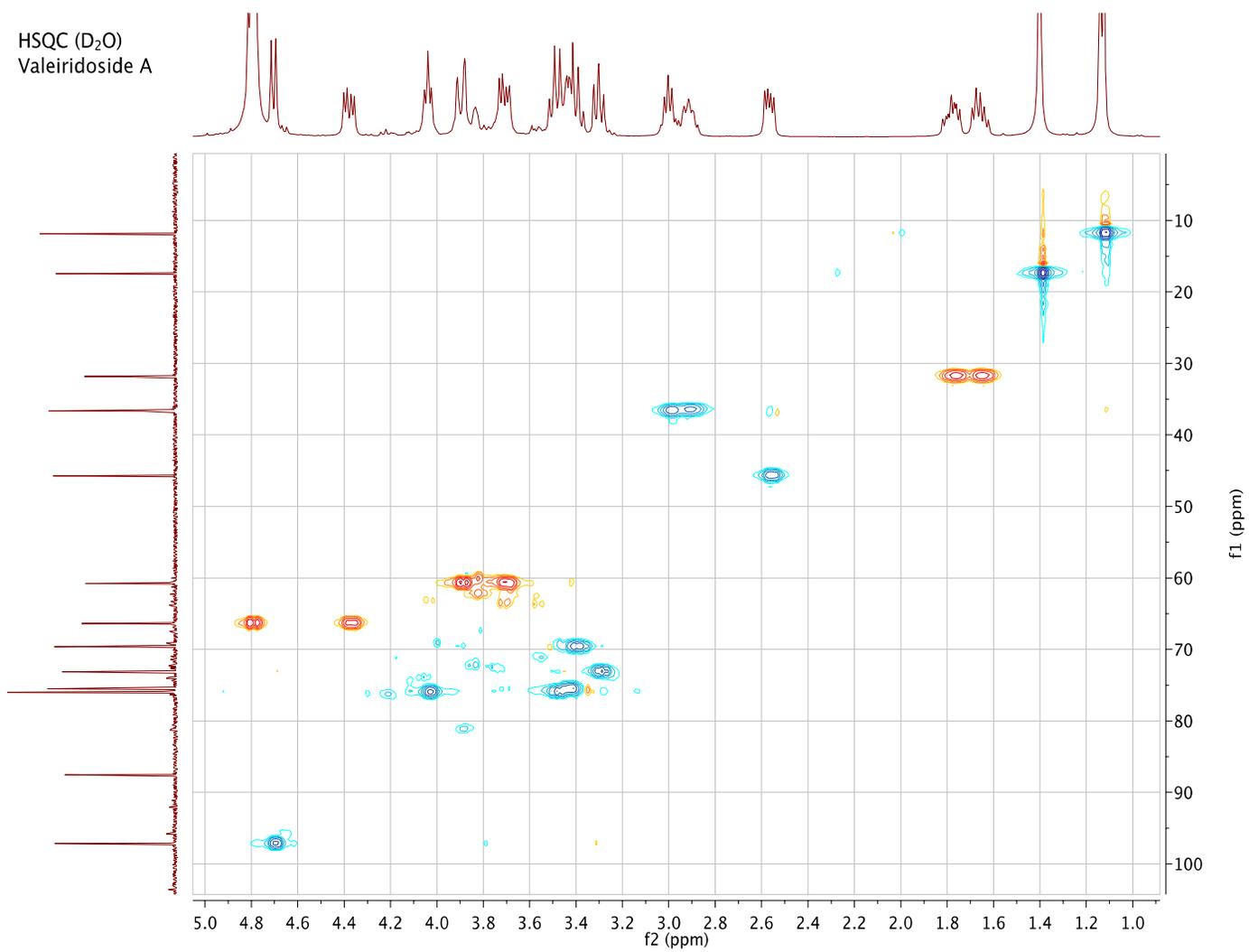


Figura 4S. HSQC (D₂O) espectro de Valeiridósido A.

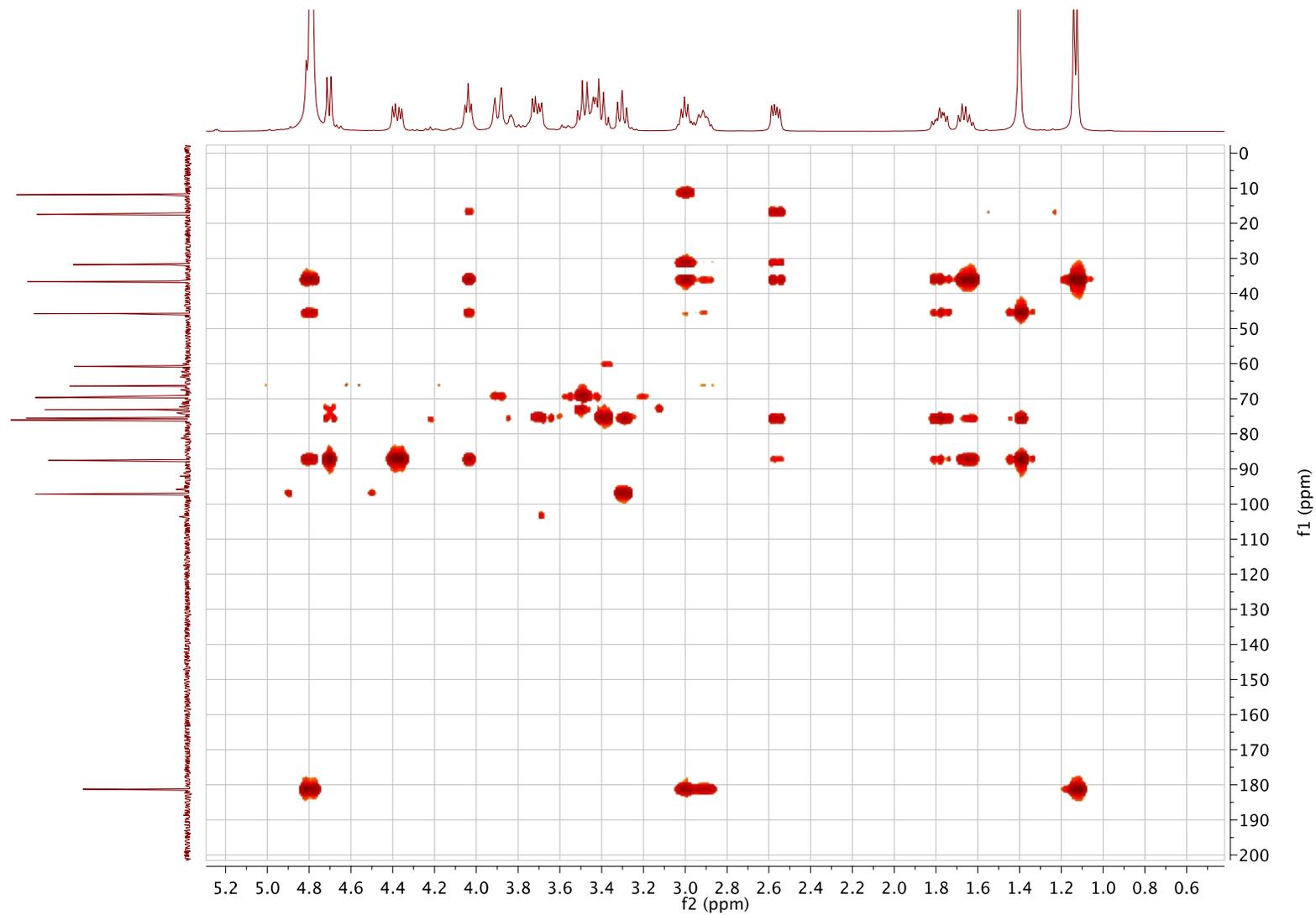


Figura 5S. HMBC (D₂O) espectro de Valeiridósido A.

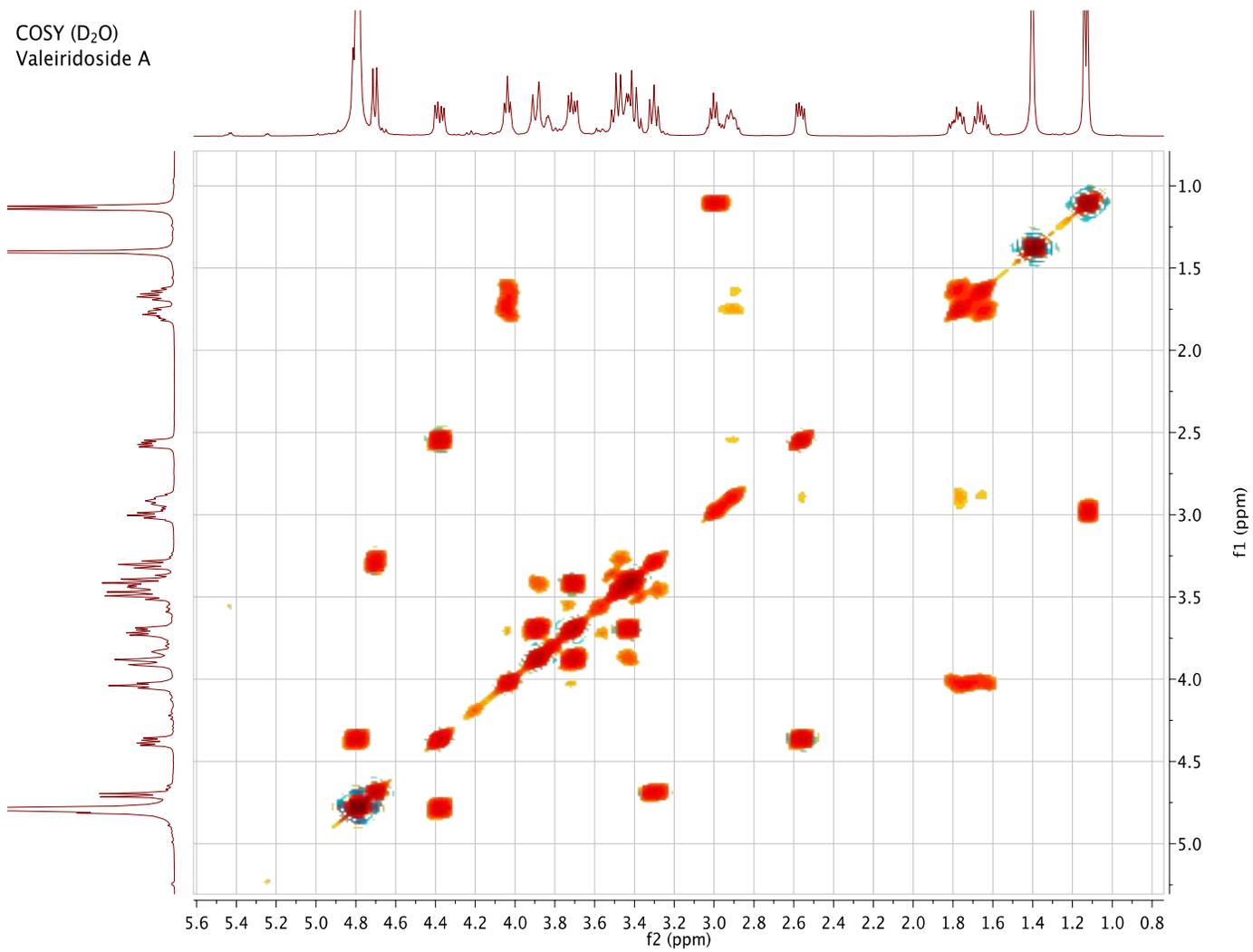


Figura 6S. COSY (D₂O) espectro de Valeiridósido A.

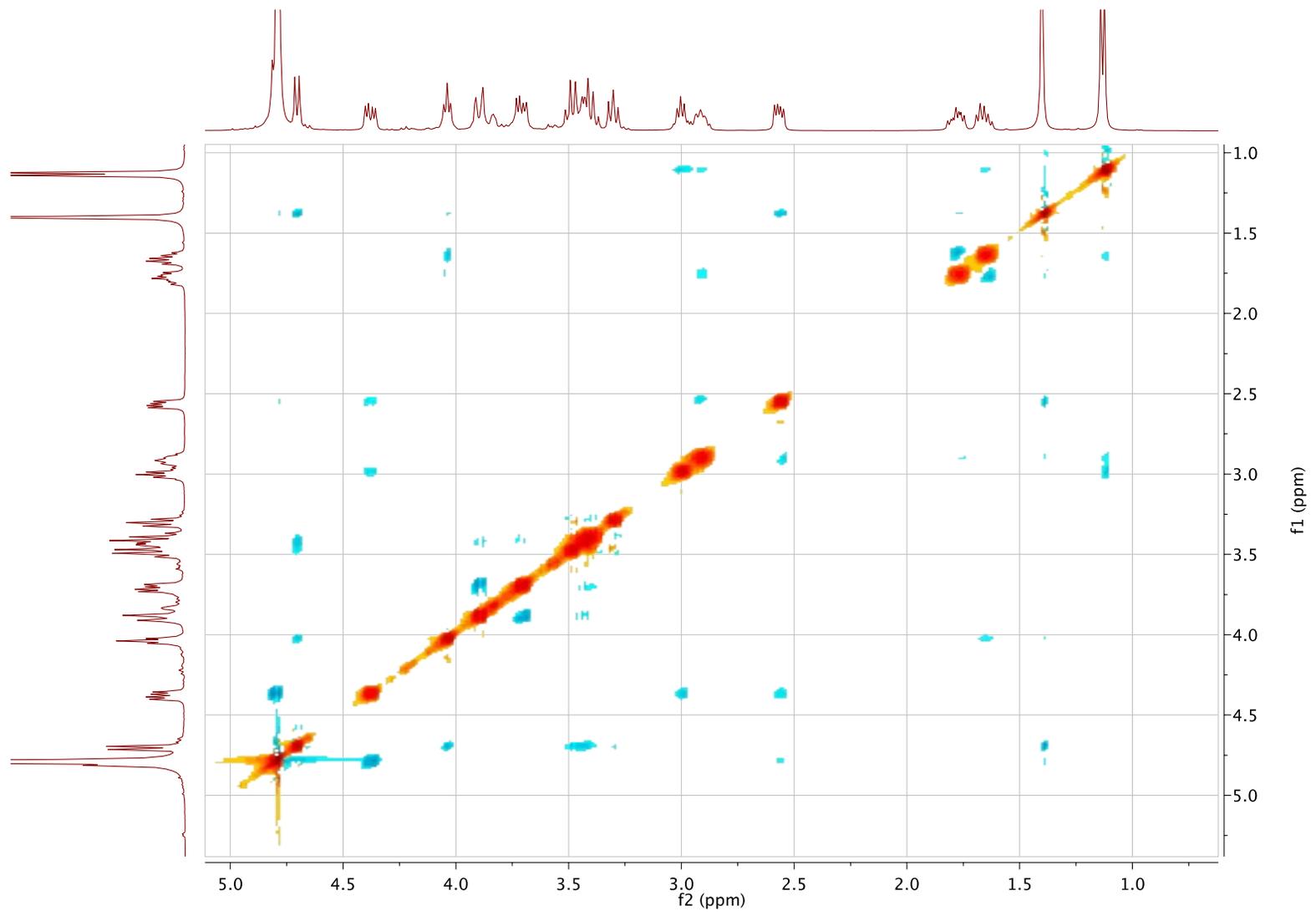


Figura 7S. NOESY (D₂O) espectro de Valeiridósido A.

ANEXO 2. PARÁMETROS DE EVALUACIÓN PARA LA VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

Resumen de los parámetros determinados para la validación, criterios de aceptación evaluados y resultados obtenidos conforme a la guía de validación de la ICH.			
Parámetro	Criterio	Resultado	Dictamen
Sistema			
Linealidad	$r^2 > 0.98$	0.999	Se acepta
	$CV \leq 2\%$	1.35%	Se acepta
Precisión	$CV \leq 2\%$	1.87%	No se acepta
Adecuabilidad	(k') $CV \leq 2\%$	1.14%	Se acepta
	(t) $CV \leq 2\%$	1.54%	Se acepta
Método			
Linealidad	$R^2 > 0.98$	0.998	Se acepta
	$CV \leq 2\%$	1.49%	Se acepta
Exactitud y repetibilidad	$CV \leq 2\%$	0.52%	Se acepta
	IC(μ) 98-102%	92.42 - 93.44 %	Se acepta
Precisión intermedia	$CV \leq 2\%$	1.89%	Se acepta
Robustez	$ di \leq 2\%$	30 °C $ di = 1.48\%$	Se acepta
		35 °C $ di = 1.75\%$	Se acepta
Tolerancia	$CV \leq 2\%$	150 mm CV=1.92%	Se acepta
		250 mm CV= 1.74%	Se acepta
Límite de detección	3 (s)	7.71×10^{-4} mg/ mL	Se acepta
Límite de cuantificación	10 (s)	2.57×10^{-3} mg/ mL	Se acepta

ANEXO 3. PROPUESTA DE MONOGRAFÍA FARMACOPÉICA PARA LA RAÍZ DE *V. edulis* ssp. *procera*.

VALERIANA MEXICANA, RAÍZ MOLIDA *Valeriana edulis* ssp *procera*

DEFINICIÓN. Consiste en la raíz seca y molida de *Valeriana edulis* ssp *procera*.

DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA.

La Valeriana está compuesta por las partes subterráneas de *Valeriana edulis* ssp *procera*, incluidos el rizoma, las raíces y los estolones.

DESCRIPCIÓN MICROSCÓPICA

Las raíces consisten en una epidermis con 7-8 capas de células acorchadas-lignificadas, que contiene una sustancia de color marrón rojizo. La corteza exterior tiene de 7 a 15 capas de células colenquimatosas con forma rectangular, a veces redondeadas, con contenido de color marrón rojizo. La endodermis está ausente, y en algunas muestras silvestres, se observaron las paredes celulares engrosadas. La corteza interior oval contiene a las células poligonales con contenido de color marrón rojizo. Los vasos se encuentran dispersos, generalmente en grupos de 2 a 3 vasos con un tamaño 20 y 60 μm .

ENSAYO DE IDENTIDAD. MGA-FH 0050, Cromatografía en capa fina.

Soporte. Gel de sílice F₂₅₄.

Fase móvil. Acetato de etilo: metanol: agua: ácido acético (80:20:5:5)

Preparación de la muestra. Colocar 200 mg de raíz, previamente molida, en un tubo para centrifuga, adicionar 10 mL de metanol y colocar en agitación ultrasónica durante 15 minutos, centrifugar a 2069.75 G durante 10 minutos y filtrar.

Preparación de referencia. Preparar una solución de 140 µg/ mL de linarina en metanol.

Revelador. sulfato cérico amoniacal - ácido sulfúrico.

Procedimiento. Aplicar en líneas separadas la solución de referencia y la muestra; eluir hasta un 90% de la longitud de la placa. Dejar secar y aplicar el revelador, calentar en una placa de calentamiento hasta la aparición de coloración.

Interpretación. El Cromatograma obtenido con la preparación de muestra presenta una mancha con un R_f = 0.61 la cual debe coincidir con la solución estándar.

MATERIA EXTRAÑA. MGA-FH 0030. 0.059 % ± 0.026 %.

CENIZAS TOTALES. MGA-FH 0060. 5.78 % ± 0.12%.

CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO. MGA-FH 0060. 0.097 % ± 0.07%.

CENIZAS SOLUBLES EN AGUA. MGA-FH 0060. 3.14 % ± 0.07%.

MATERIAL EXTRAÍBLE. MGA-FH 0070.

Método I. 12.21 % ± 0.60 % para etanol.

Método II. 38.69 % ± 0.79 % para agua.

PERDIDA POR SECADO. MGA-FH 0080. 7.98 % ± 0.16 %.

Determinado en 2 .0 g de la raíz previamente molida, secando en una estufa a una temperatura de 100 °C a 105°C durante 3 horas y 9.28 % ± 0.77% en termobalanza a 105°C durante 5 minutos

ARSÉNICO Y METALES PESADOS. MGA 0561 Arsénico y metales pesados. No más de 10 ppm.

DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS. MGA 0571 Determinación de microorganismos.

Bacterias aerobias. Menos de 10^7 UFC/g

Levaduras, Menos de 10^4 UFC/g.

Hongos filamentosos. Menos de 10^4 UFC/g.

Escherichia coli. Menos de 10^2 UFC/g.

Otras enterobacterias. Menos de 10^4 UFC/g.

Salmonella spp. Ninguna.

VALORACIÓN. MGA 0241 Cromatografía.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Soporte. Columna de acero inoxidable, de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con gel de sílice octadecilsilano con un tamaño de partícula de 5µm.

Fase móvil. Se compone de Acetonitrilo (A) y ácido fosfórico al 0.4% (B). En el tiempo 0 la fase es A: B (28:72), a los 20 minutos A: B (40:60) y a los 30 minutos A: B (28:72).

Velocidad de flujo. 1 mL/min

Temperatura de la columna. 25°C

Detector. UV ajustado a 269 nm

Preparación de la muestra. Colocar 200 mg de la raíz previamente molida en un tubo de centrifuga y adicionar 3 mL de metanol. Colocar en agitación ultrasónica durante 10 minutos y centrifugar a 2069.75 G durante 10 minutos. Repetir este procedimiento por triplicado colocando el sobrenadante en un matraz volumétrico de 10 mL aforando con metanol. Filtrar con un filtro de nylon, tamaño de poro 0.45µm.

Preparación de la referencia. Preparar una solución de 0.14 mg/ mL de linarina en metanol. Filtrar con un filtro de nylon, tamaño de poro 0.45 µm e inyectar en el cromatógrafo.

Procedimiento. Inyectar 20 µL de cada una de las preparaciones. Calcular el porcentaje de linarina con la siguiente formula:

$$Cm = \left(\frac{Cr Am}{Ar} \right) x \frac{1000}{Pm}$$

Dónde:

Cm = Concentración de linarina en 1 g de la muestra (mg/mL).

Cr = Concentración de linarina en la solución de referencia (mg/mL).

Am = Área de la muestra.

Ar = Área de la solución de referencia.

Pm = Peso de la muestra en mg.

CONSERVACIÓN. A temperatura ambiente en envases cerrados, sacos o costales protegidos de la luz y la humedad.

ANEXO 4. PROPUESTA DE MONOGRAFÍA FARMACOPÉICA PARA EL EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO DE LA RAÍZ DE *V. edulis ssp. procera*.

VALERIANA MEXICANA, Extracto hidroalcohólico al 60%

DEFINICIÓN

Extracto hidroalcohólico producido a partir de la raíz de *Valeriana edulis ssp. procera*.

PRODUCCIÓN

El extracto es producido de la droga mediante un proceso que utiliza 2 partes de etanol (90 – 96% V/V) por una parte de material vegetal.

CARACTERÍSTICAS.

Líquido de café oscuro con olor penetrante fétido.

ENSAYO DE IDENTIDAD. MGA-FH 0050, Cromatografía en capa fina.

Soporte. Gel de sílice F₂₅₄.

Fase móvil. Acetato de etilo: metanol: agua: ácido acético (80:20:5:5)

Preparación de la muestra. Colocar 200 mg de raíz, previamente molida, en un tubo para centrifuga, adicionar 10 mL de metanol y colocar en agitación ultrasónica durante 15 minutos, centrifugar a 2069.75 G durante 10 minutos y filtrar.

Preparación de referencia. Preparar una solución de 140 µg/ mL de linarina en metanol.

Revelador. sulfato cérico amoniacal - ácido sulfúrico.

Procedimiento. Aplicar en líneas separadas la solución de referencia y la muestra; eluir hasta un 90% de la longitud de la placa. Dejar secar y aplicar el revelador, calentar en una placa de calentamiento hasta la aparición de coloración.

Interpretación. El Cromatograma obtenido con la preparación de muestra presenta una mancha con un R_f = 0.61 la cual debe coincidir con la solución estándar.

PORCENTAJE DE SÓLIDOS TOTALES. Entre 7.0 – 10.0%

Se obtiene de 5.0 mL del extracto evaporado a 105°C.

DENSIDAD RELATIVA. Entre 0.9100 – 0.9300.

PORCENTAJE DE ALCOHOL. Entre 58.0 – 62.0%

CENIZAS SOLUBLES EN AGUA. MGA-FH 0060. 3.14 %± 0.07%.

pH. Entre 5.8 – 6.2.

El valor se obtiene del extracto sin diluir.

DETERMINACIÓN DE MICROORGANISMOS. MGA 0571 Determinación de microorganismos.

Bacterias aerobias. Menos de 100 UFC/g

Levaduras, Menos de 10³ UFC/g.

Hongos filamentosos. Menos de 10 UFC/g.

Escherichia coli. Menos de 10 UFC/g.

Otras enterobacterias. Menos de 10 UFC/g.

Salmonella spp. Ninguna.

VALORACIÓN. MGA 0241 Cromatografía.

Cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Soporte. Columna de acero inoxidable, de 250 mm de longitud y 4.6 mm de diámetro interno, con gel de sílice octadecilsilano con un tamaño de partícula de 5µm.

Fase móvil. Se compone de Acetonitrilo (A) y ácido fosfórico al 0.4% (B). En el tiempo 0 la fase es A: B (28:72), a los 20 minutos A: B (40:60) y a los 30 minutos A: B (28:72).

Velocidad de flujo. 1 mL/min

Temperatura de la columna. 25°C

Detector. UV ajustado a 269 nm

Preparación de la muestra. Colocar 1 mL del extracto en un matraz volumétrico de 10 mL aforando con metanol. Filtrar con un filtro de nylon, tamaño de poro 0.45 µm.

Preparación de la referencia. Preparar una solución de 0.14 mg/ mL de linarina en metanol. Filtrar con un filtro de nylon, tamaño de poro 0.45 µm e inyectar en el cromatógrafo.

Procedimiento. Inyectar 20 µL de cada una de las preparaciones. Calcular el porcentaje de linarina con la siguiente fórmula:

$$\%Linarina = \left(\frac{Cr Am}{Ar} \right) \times 1000$$

Dónde:

Cr = Concentración de linarina en la solución de referencia (mg/mL).

Am = Área de la muestra.

Ar = Área de la solución de referencia.

CONSERVACIÓN. A temperatura ambiente en envases cerrados, sacos o costales protegidos de la luz y la humedad.



Root Scent Composition in *Valeriana officinalis* and *Valeriana edulis* ssp. *procera* Analyzed by HS-SPME-GC-MS^a.

Alejandro Alfaro-Romero, José Luis Balderas-López, Georgina Duarte-Lisci & Andrés Navarrete

To cite this article: Alejandro Alfaro-Romero, José Luis Balderas-López, Georgina Duarte-Lisci & Andrés Navarrete (2016) Root Scent Composition in *Valeriana officinalis* and *Valeriana edulis* ssp. *procera* Analyzed by HS-SPME-GC-MS^a, *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 19:7, 1821-1825, DOI: [10.1080/0972060X.2015.1107512](https://doi.org/10.1080/0972060X.2015.1107512)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/0972060X.2015.1107512>



Published online: 14 Dec 2016.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 3



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



**Root Scent Composition in *Valeriana officinalis* and
Valeriana edulis ssp. *procera* Analyzed by HS-SPME-GC-MS^a.**

**Alejandro Alfaro-Romero¹, José Luis Balderas-López¹,
Georgina Duarte-Lisci² and Andrés Navarrete^{1*}**

¹Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, México

²Departamento de Química Analítica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, Coyoacán 04510, Ciudad de México, México

Received 04 March 2015; accepted in revised form 10 October 2015

Abstract: The headspace solid-phase micro extraction (HS-SPME) procedure coupled with gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) was used to determine profiling volatile components from the roots of *Valeriana officinalis* and *Valeriana edulis* ssp. *procera*. In the two species were identified more than 30 compounds finding terpenoids and aliphatic esters as principal metabolites. The major components in *V. officinalis* were camphene (31.13 %) and bornyl acetate (11.15 %), whereas isobutyl isovalerate (46.28 %) and methyl isovalerate (13.42 %) were the major components in *V. edulis* ssp. *procera*.

Key words: *Valeriana officinalis*; *Valeriana edulis* ssp. *procera*; root scent; HS-SPME; isobutyl isovalerate; camphene; methyl isovalerate.

Introduction

Valerian is the common name for over 200 worldwide plant species of the genera *Valeriana* (Valerianaceae)¹. The roots and rhizomes of several species of this genus are currently used as a sleep aid or mild sedative and as a gastrointestinal spasmolytic agent^{2,3}. *Valeriana officinalis* and *Valeriana edulis* ssp. *procera* are two of the most important commercial species of this genus. These species show large differences with regard to chemical constituents, as well as in their morphology and macroscopic and microscopic features⁴.⁵ Consequently, the phytomedicines prepared from these species are characterized by different chemical composition⁶. *V. edulis* ssp. *procera* has been considered as an adulterant as well as a sub-

^aTaken in part of the PhD work of A. Alfaro.

stitute of *V. officinalis*⁷ in commercial products. The essential oil of *V. officinalis* roots is regarded as an important bioactive constituent and plays an important role in its sedative and hypnotic action; however *V. edulis* ssp. *procera* roots do not produce essential oils. As part of our authentication program on Mexican medicinal plants, in this study we used the headspace solid phase micro-extraction (HS-SPME) to analyze *V. edulis* ssp. *procera* and *V. officinalis* roots as a relatively simple, sensitive, and solvent-free method for analysis of volatile components of these plants.

Materials and methods

The roots of *Valeriana officinalis* L. and *V. edulis* ssp. *procera* (Kunth) F.G. Mey. were harvested from plants growing in the crop land of Laboratorios Mixim S.A. in Mesas Altas, Estado

*Corresponding authors (Andrés Navarrete)

E-mail: <anavarrt@unam.mx >

de México in December 2012. Freshly roots were dried in the shade and then were milled and samples of 200 mg were introduced into screw-cap 40 mL vials and tightly capped with caps containing PTFE/silicone septa (Supelco, Bellefonte, PA, USA).

The syringe injector of the SPME unit (Supelco), equipped with a 50/30 μm coating of DVB/Carboxen/PDMS, was inserted through the septum of the vial cap into the headspace of the sample. The SPME fiber was then retracted, the syringe was removed and the volatiles were thermally desorbed into the GC column by placing the SPME injection unit in the injector of the GC-MS system. Extraction at 10, 20 and 30 minutes were evaluated at 25°C, and the effect of multiple extractions from the same extraction vessel was determined.

GC analyses were carried out using an Agilent 6890N gas chromatograph instrument coupled with a MS-TOF analyzer; a DB-5 (10 m \times 0.18 mm \times 0.18 μm , J & W Scientific) fused-silica capillary column was employed. The operating conditions were as follows: initial oven tempera-

ture, 40°C for 2 min, rising to 300°C at 20°C/min and held for 10 min; injector temperature, 300°C; carrier gas flow He, 1 mL/min. The volatiles were desorbed from the SPME fiber in the splitless injector mode for 2 minutes. Retention indices were calculated against those of C₈-C₂₄ n-alkanes. Quantitative determinations were carried out by the normalization method, without consideration of calibration factors for all compounds. Significant MS operating parameters: ionization voltage, 70 eV; ion source temperature, 200°C; scan mass range, 45-600 m/z.

Compounds were identified by comparison of their mass spectra with reference spectra in the computer library NIST 2.0 and confirmed by comparison of their retention indices with data in the literature.

Results and discussion

The optimal time for the analysis of valerian samples was 10 minutes, because at longer times and multiple extractions the fiber was saturated. Table 1 shows the results of the qualitative scent analysis of the volatiles in *V. officinalis* and *V.*

Table 1. Volatile compounds identified by SPME GC-MS in the roots of *V. officinalis* and *V. edulis* ssp. *procera*

Compound	Relative content (mean \pm SD)		R.T. ^a (s)	KI ^b		Reference
	<i>V. officinalis</i>	<i>V. edulis</i>		Exp.	Theo.	
Methyl isovalerate	5.61 \pm 1.40	13.42 \pm 4.26	222	773	770	11
Ethyl isovalerate	3.65 \pm 0.94	8.26 \pm 3.07	293	856	856	12
Isovaleric acid	-	3.55 \pm 1.12	313	879	873	11
Methyl β -methylvalerate	1.53 \pm 0.48	-	317	883	NR	
iso-Propyl iso-valerate	1.36 \pm 0.47	9.06 \pm 1.95	326	894	904	13
α -Pinene	6.46 \pm 1.13	0.42 \pm 0.06	354	934	939	14
Camphene	31.13 \pm 2.21	2.71 \pm 0.11	366	951	953	14
β -Methylvaleric acid	0.18 \pm 0.02	-	371	958	NR	
Isobutyl isovalerate	6.47 \pm 1.27	46.28 \pm 13.97	401	1005	1005	15
o-Cymene	1.41 \pm 0.50	-	412	1027	1027	16
D-Limonene	2.47 \pm 0.18	-	416	1033	1029	17
L-Fenchone	0.82 \pm 0.09	-	450	1098	1087	12
Isopentyl isovalerate	-	2.23 \pm 0.13	456	1110	1103	12
Artemiseole	0.48 \pm 0.12	-	477	1151	NR	
L-camphor	0.28 \pm 0.08	-	481	1158	1139	18
Borneol	1.30 \pm 0.25	-	494	1182	NR	
Estragole	1.13 \pm 0.12	1.45 \pm 0.06	504	1201	1195	19

table 1. (continued).

Compound	Relative content (mean \pm SD)		R.T. ^a (s)	K I ^b		Reference
	<i>V. officinalis</i>	<i>V. edulis</i>		Exp.	Theo.	
	α -Thujenal	1.18 \pm 0.20		-	504	
O-Methylthymol	0.38 \pm 0.08	-	517	1231	1235	17
β -Pinene	9.52 \pm 0.27	-	544	1295	NR	
Bornyl acetate	11.15 \pm 20.5	-	545	1296	1285	14
Isoestragole	9.94 \pm 0.65	-	546	1298	NR	
Anethole	-	5.05 \pm 0.60	544	1295	1283	12
Myrtenyl acetate	0.44 \pm 0.07	-	560	1330	1325	20
α -Selinene	0.45 \pm 0.02	-	618	1472	1480	21
γ -Gurjunene	0.38 \pm 0.03	5.22 \pm 1.28	618	1473	1474	16
α -Patchoulene	-	0.95 \pm 0.26	622	1484	1464	22
2,5-Bornanediol	0.85 \pm 0.18	-	647	1549	NR	
Globulol	0.63 \pm 0.23	-	662	1588	1573	21
Valeranone	0.38 \pm 0.10	-	699	1697	1672	23
Patchouli alcohol	-	1.37 \pm 0.31	700	1699	1663	24
Total	99.58	99.99				

^aR.T.: Retention time

^bKI: Kovats index

Exp.: Experimental kovats index

Theo.: Theoretical kovats index

NR.: No reported

edulis ssp. *procera* roots. In total, 31 compounds were identified in 2 species accounting for more than 99 % of the total volatile composition. The major constituents in *V. officinalis* were camphene (31.13 %), bornyl acetate (11.15 %), isoestragole (9.94 %) and β -pinene (9.52 %), whereas for *V. edulis* ssp. *procera*, isobutyl isovalerate (46.28 %), methyl isovalerate (13.42 %), isopropyl isovalerate (9.06 %) and ethyl isovalerate (8.26 %) were the major constituents. However, the analysis reported for *V. officinalis* var. *latifolia*⁸ was different to the analysis described here. Bornyl acetate and isovaleric acid were found as the two major compounds in that study, whereas we found camphene and bornyl acetate as major compounds. These differences could be attributed to the genetic and bio-geographical variability of the populations, and also could be related that species without genetic improvement, have a wide variability within individuals⁹.

The roots have a scent, which can be described

as smell like feet. Most of the aromatic compounds encountered in *V. officinalis* have rather fresh odors, and especially camphene and bornyl acetate are regarded as mint odor but *V. edulis* ssp. *procera* have mainly valerates, which gives an unpleasant odor¹⁰. Other minor compounds have been reported¹ and they were identified in both species, such as α -pinene, γ -gurjunene and estragole that can affect the scent of the roots. These minor compounds should not be considered less important as part of the final fragrance of the valerian roots. It is important to highlight that for *V. edulis* ssp. *procera* does not produce essential oils by hydrodistillation, therefore the HS-SPME is a useful technic to distinguish different Valeriana species and a valuable tool of quality control in pharmacopoeia monographs.

Acknowledgements

This work was supported by DGAPA IN216516.

References

1. **Bicchi, C., Drigo, S. and Rubiolo, P. (2000)**. Influence of fibre coating in headspace solid-phase microextraction-gas chromatographic analysis of aromatic and medicinal plants. *J. Chromatogr. A*. 892: 469-485.
2. **Hobbs, C. (1989)**. Valerian a literature review. *Herbal Gram* 21: 19-34.
3. **Bos, R., Woerdenbag, H.J., Van Putten, F., Hendriks, H. and Scheffer J.J.C. (1998)**. Seasonal variation of the essential oil, valerenic acid and derivatives, and velopotriates in *Valeriana officinalis* roots and rhizomes, and the selection of plants suitable for phytomedicines. *Planta Med.* 64: 143-147.
4. **Joshi, V.C., Navarrete, A., Khan, I.A. (2005)**. Authentication of *Valeriana procera* Kunth and comparative account of five *Valeriana* species. *J. AOAC Int.* 88: 1621-5.
5. **Navarrete, A., Avula, B., Choi, Y.W., Khan, I.A. (2006)**. Chemical fingerprinting of valeriana species: simultaneous determination of valerenic acids, flavonoids, and phenylpropanoids using liquid chromatography with ultraviolet detection. *JAOAC Int.* 89: 8-15.
6. **Bos, R., Woerdenbag, H.J., Hendriks, H., Zwaving, J.H., De Smet, P.A.G.M., Tittel, G., Wilkstrom, H.V. and Scheffer, J.J.C. (1996)**. Analytical Aspects of Phytotherapeutic Valerian Preparations. *Phytochem Anal.* 7: 143-151
7. **Council of Europe. (2014)**. European Pharmacopoeia: supplement 8.5. 8th ed. Strasbourg: EDQM Council of Europe; p. 4957-49588.
8. **Huang, B., Qin, L., Chu, Q., Zhang, Q., Gao, L. and Zheng, H. (2009)**. Comparison of Headspace SPME with Hydrodistillation and SFE for Analysis of the Volatile Components of the Roots of *Valeriana officinalis* var. *latifolia*. *Chromatographia* 69: 489-496.
9. **Hay, R. and Waterman, P. (1993)**. Volatile Oil Crops: Their Biology, Biochemistry and Production. Longman Scientific and Technical, Essex, England, 56.
10. **Klinea, J., Blackharta, G., Woodwardb, K., Williamsb, S. and Schwartzc, G. (2000)**. Anterior electroencephalographic asymmetry changes in elderly women in response to a pleasant and an unpleasant odor. *Biol Psychol.* 52: 241-250.
11. **Scheidig, C., Czerny, M. and Schieberle, P. (2007)**. Changes in Key Odorants of Raw Coffee Beans during Storage under Defined Conditions, *J. Agric. Food Chem.*, 55: 5768-5775.
12. **Adams, R.P. (2000)**. Systematics of Juniperus section Juniperus based on leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDs), *Biochem. Syst. Ecol.*, 28: 515-528.
13. **Isidorov, V.A., Zenkevich, I.G., Krajewska, U., Dubis, E.N., Jaroszynska, J. and Bal, K. (2001)**. Gas chromatographic analysis of essential oils with preliminary partition of components, *Phytochem. Anal.*, 12: 87-90.
14. **Adams, R.P., González Elizondo, M.S., González Elizondo, M. and Slinkman, E. (2006)**. DNA fingerprinting and terpenoid analysis of *Juniperus blancoi* var. *huehuentensis* (Cupressaceae), a new subalpine variety from Durango, Mexico. *Biochem. Syst. Ecol.*, 34: 205-211.
15. **Maia, J.G.S., Andrade, E.H.A. and Zoghbi, M.G.B. (2004)**. Aroma volatiles from two fruit varieties of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.), *Food Chem.*, 85: 195-197.
16. **Lucero, M.E., Fredrickson, E.L., Estell, R.E., Morrison, A.A. and Richman, D.B. (2006)**. Volatile Composition of *Gutierrezia sarothrae* (Broom Snakeweed) as Determined by Steam Distillation and Solid Phase Microextraction, *J. Essent. Oil Res.*, 18: 121-125.
17. **Adams, R.P., Morris, J.A., Pandey, R.N. and Schwarzbach, A.E. (2005)**. Cryptic speciation between *Juniperus deltoides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean, *Biochem. Syst. Ecol.*, 33: 771-787.
18. **Özel, M.Z., Gögüs, F. and Lewis, A.C. (2006)**. Determination of *Teucrium chamaedrys* volatiles by using direct thermal desorption-comprehensive two-dimensional gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1114: 164-169.

19. **Adams, R.P., and Nguyen, S. (2005).** Infra-specific variation in *Juniperus deppeana* F. *Sperryi* in the Davis Mountains of Texas: variation in leaf essential oils and random amplified polymorphic DNAs (RAPDS), *Phytologia*, 87: 96-108.
20. **Blázquez, M.A., Pérez, I. and Boira, H. (2003).** Essential oil analysis of *Teucrium libanitis* and *T. turredanum* by GC and GC-MS, *Flavour Fragr. J.*, 18: 497-501.
21. **Marongiu, B., Piras, A., Pani, F., Porcedda, S. and Ballero, M. (2003).** Extraction, separation and isolation of essential oils from natural matrices by supercritical CO₂, *Flavour Fragr. J.*, 18: 505-509.
22. **De Feo, V., Della Porta, G., Urrunaga Soria, E., Urrunaga Soria, R. and Senatore, F., (1998).** Composition of the essential oil of *Tagetes filifolia* Lag., *Flavour Fragr. J.*, 13: 145-147.
23. **Blagojevic, P., Radulovic, N., Palic, R. and Stojanovic, G. (2006).** Chemical composition of the essential oils of Serbian wild-growing *Artemisia absinthium* and *Artemisia vulgaris*, *J. Agric. Food Chem.*, 54: 4780-4789.
24. **Rout, P.K., Rao, Y.R., Sree, A. and Naik, S.N. (2007).** Composition of essential oil, concrete, absolute, wax and headspace volatiles of *Murraria paniculata* (Linn.) Jack flowers, *Flavour Fragr. J.*, 22: 352-357.