



Universidad Nacional Autónoma de México  
Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

---

Propuesta de monografía farmacopéica  
para la raíz de *Valeriana edulis ssp*  
*procera*.

TESIS

Para obtener el título de:  
Químico Farmacéutico Biólogo

PRESENTA:

Juan Carlos Ortega Huerta

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro  
Asesor: M. en F. Martha Ugalde Hernández

México, D.F., 2014





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES "ZARAGOZA"

DIRECCIÓN

JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN  
ESCOLAR  
P R E S E N T E .

Comunico a usted que el alumno ORTEGA HUERTA JUAN CARLOS  
con número de cuenta 305216137 de la carrera de Q. F. B.  
se le ha fijado el día 24 del mes de Marzo de 2014 a las 15:00 hrs.,  
para presentar examen profesional, que tendrá lugar en la sala de exámenes  
profesionales Campus II de esta Facultad, con el siguiente jurado:

PRESIDENTE	M. en F. IDALIA LETICIA FLORES GÓMEZ
VOCAL	DR. ANDRÉS NAVARRETE CASTRO
SECRETARIO	M. en F. MA. MARTHA UGALDE HERNÁNDEZ
SUPLENTE	M. en C. JOSÉ LUIS TREJO MIRANDA
SUPLENTE	Q.F.B. LILIANA MA. LÓPEZ GONZÁLEZ

El título de la tesis que se presenta es : **Propuesta de monografía  
farmacopéica para la raíz de *Valeriana edulis ssp. Procera***

Opción de titulación: **Tesis Experimental**

ATENTAMENTE  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
México, D.F. a 04 de Febrero de 2014.

DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ  
DIRECCIÓN  
ZARAGOZA

RECIBÍ:  
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES  
Y DE GRADO

Vo.Bo.   
DRA. MARTHA A. SÁNCHEZ RODRIGUEZ  
JEFA DE LA CARRERA DE Q.F.B.

## **JURADO ASIGNADO**

Presidente: M. en F. Idalia Leticia Flores Gómez

Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro

Secretario: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Suplente: M. en C. José Luis Trejo Miranda

Suplente: Q.F.B Liliana Ma. López González

Sitio de elaboración de la Tesis:

Laboratorio 126. Departamento de Farmacia. Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Director: Dr. Andrés Navarrete Castro

Asesor: M. en F. Ma. Martha Ugalde Hernández

Sustentante: Juan Carlos Ortega Huerta

## AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y tener el orgullo de pertenecer a la mejor universidad del país y una de las mejores universidades del mundo.
- ❖ A la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza mi segunda casa, por desarrollar todas mis habilidades en el ámbito académico y personal, las cuales me permiten salir adelante como persona y en el ámbito laboral.
- ❖ Al Dr. Andrés Navarrete Castro por brindarme la oportunidad para la elaboración de este trabajo, así como por su paciencia e infinita tolerancia durante todo este tiempo.
- ❖ A la M. en F. Martha Ugalde Hernández por todos los conocimientos compartidos durante toda la carrera, en especial por toda la asesoría y apoyo proporcionado durante este periodo de titulación.
- ❖ Al Dr. José Luis Balderas López por los conocimientos compartidos así como por la asesoría durante este proyecto en especial en la parte de espectrometría y espectroscopia.
- ❖ Al alumno de maestría Iván Villatoro por la asesoría y ayuda en el manejo de animales y pruebas en el bioterio.
- ❖ Al alumno de la ENP 6 Andrés Burgos por la ayuda proporcionada durante su servicio social.
- ❖ Al integrante del L-126 M. en C. Alejandro Alfaro por la asesoría técnica recibida durante este proyecto.
- ❖ A mis compañeros del Laboratorio 126, que con sus buenas y no tan buenas intenciones, compartieron tiempo, espacio y conocimiento durante todo este proyecto.
- ❖ Al proyecto PAIP 5000-9143 y PAPIIT IN203614 por los recursos proporcionados.

## **DEDICATORIA**

**A mis padres Gerardo y Rocío, por su amor y cariño incondicional, agradezco principalmente el haber luchado por mí desde mis primeros días de vida, así como todas las noches en vela, regaños, jalones de oreja y consejos que me dieron a lo largo de este camino; ya que me dieron las armas necesarias para alcanzar todas mis metas y objetivos, así como superar todos los obstáculos. Me enorgullece decir que son mis padres, los amo.**

**A mi hermano por los buenos y malos momentos compartidos, pero sobre todo por la compañía, comprensión, sobre todo por la relación tan estrecha que hemos creado así como por siempre presionarme a ser mejor.**

**A mis abuelos, por enseñarme que no importa el título, grado o que tan lejos llegue uno en la vida, siempre debemos tener los pies en la tierra sin menospreciar a nadie, ya que no sabemos cuándo necesitaremos de esa persona, y sobre todo a ser humilde.**

**A mis tíos y tías por todo lo que me ayudaron voluntaria e involuntariamente; a mis primos por esos momentos compartidos y por enseñarme que la competencia no es mala siempre y cuando se enfoque de manera correcta.**

**A Marylu, mi mejor amiga y compañera de vida, agradezco la confianza y la comprensión, así como por las palabras alentadoras, por seguir a mi lado a pesar de mi carácter tan difícil, así como los buenos y malos momentos que hemos vivido.**

**A los incondicionales, mis hermanos de otra madre. Misael, Alfonso, Luis, Eduardo, Beatriz y Gabriela, que me enseñaron que una amistad va más allá de solo fiesta, alcohol y diversión. Por acompañarme en los momentos difíciles y siempre tener una frase que me hiciera sentir mejor, por todas las noches de trova y bohemia.**

**¡Gracias!**

## Contenido

Índice de Figuras.....	8
Índice de Cuadros.....	9
Abreviaturas .....	10
1 Resumen .....	12
2 Introducción .....	13
3 Marco Teórico.....	14
3.1 Farmacopea Mexicana.....	14
3.2 Monografía.....	15
3.2.1 Contenido.....	15
3.3 Control de calidad para Medicamentos Herbolarios.....	17
3.4 Compuesto marcador.....	17
3.5 Generalidades de las Valerianas.....	19
3.5.1 Composición Química .....	20
3.5.2 Actividad Biológica.....	23
3.5.3 Métodos de Análisis .....	23
3.6 Linarina .....	24
3.6.1 Propiedades físicas.....	24
3.6.2 Actividad biológica .....	24
3.6.3 Métodos de análisis.....	25
4 Planteamiento del Problema.....	26
5 Objetivos .....	27
5.1 General.....	27
5.2 Específico.....	27
6 Hipótesis .....	27
7 Material.....	28
7.1 Sustancias .....	28
7.2 Equipos.....	28
7.3 Animales de experimentación.....	29
8 Metodología .....	30
8.1 Extracción del compuesto marcador.....	31
8.2 Desarrollo del método analítico por HPLC.....	31
8.2.1 Condiciones del método.....	31
8.2.2 Preparación de la solución estándar .....	32
8.2.3 Preparación y análisis de una muestra de <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .....	32

8.2.4	Determinación de la concentración de linarina en la muestra de <i>Valeriana edulis ssp procera</i>	32
8.3	Validación del Sistema.....	33
8.3.1	Linealidad del sistema .....	33
8.3.2	Precisión del sistema .....	33
8.3.3	Adecuabilidad del sistema.....	33
8.4	Validación del Método .....	34
8.4.1	Preparación del placebo analítico.....	34
8.4.2	Especificidad del método. ....	34
8.4.3	Linealidad del método .....	34
8.4.4	Exactitud y repetibilidad del método.....	36
8.4.5	Precisión del método (Precisión intermedia).....	36
8.4.6	Robustez.....	36
8.4.7	Tolerancia.....	37
8.4.8	Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC) .....	37
8.5	Análisis de muestras de <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .....	37
8.6	Pruebas farmacopéicas de control de calidad .....	38
8.6.1	MGA-FH 0030 Materia extraña.....	38
8.6.2	MGA-FH 0040 Examen visual e inspección microscópica .....	38
8.6.3	MGA-FH 0050 Cromatografía en capa fina.....	38
8.6.4	MGA-FH 0060 Determinación de cenizas.....	39
8.6.5	MGA-FH 0070 Material extraíble.....	39
8.6.6	MGA-FH 0080 Agua y material volátil.....	39
8.6.7	MGA 0561 Arsénico y metales pesados .....	39
8.6.8	MGA 0571 Determinación de microorganismos .....	40
8.7	Evaluación del perfil neurofarmacológico. ....	41
8.7.1	Preparación de las dosis. ....	41
8.7.2	Administración.....	41
8.7.3	Efecto sedante.....	41
8.7.4	Efecto ansiolítico.....	42
8.7.5	Coordinación motora .....	42
8.7.6	Efecto miorrelajante .....	43
8.7.7	Potenciación de la hipnosis .....	43
9	Resultados .....	44
9.1	Extracción de Linarina .....	44
9.2	Validación del Sistema.....	44
9.3	Validación del Método .....	47

9.3.1	Límite de detección.....	52
9.3.2	Límite de cuantificación.....	52
9.4	Análisis de muestras de <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .....	53
9.5	Pruebas farmacopéicas de control de calidad .....	54
9.5.1	Examen visual e inspección microscópica.....	54
9.5.2	Cromatografía en capa fina .....	56
9.5.3	Arsénico y metales pesados.....	59
9.5.4	Determinación de microorganismo .....	60
9.6	Certificado de análisis para la raíz de <i>Valeriana edulis ssp. procera</i> .....	61
9.7	Evaluación del perfil neurofarmacológico. ....	62
10	Discusión de Resultados .....	66
11	Conclusiones.....	68
12	Perspectivas.....	68
13	Referencias.....	69
14	Anexos .....	75
	Anexo A. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN).....	75
	Anexo B. Espectro de Infrarrojo (IR). ....	78
	Anexo C. Espectro de masas FAB.....	80
	Anexo D. Espectrometría de masas por impacto electrónico .....	81
	Anexo E. Parámetros de evaluación para la Validación del método analítico.....	82
	Anexo F. Propuesta de monografía farmacopéica.....	83

## Índice de Figuras

Figura 1. Especies vegetales contenidas en las ediciones oficiales entre 1846 y 2013.	14
Figura 2. <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .	20
Figura 3. Estructura de la linarina.	24
Figura 4. Estructura de la apigenina y 6-metil apigenina.	25
Figura 5. Cilindro de exploración.	41
Figura 6. Tablero de hoyos.	42
Figura 7. Rota-Rod.	42
Figura 8. Prueba de tracción.	43
Figura 9. Gráfica de linealidad del sistema.	45
Figura 10. Estructura de linarina y hesperidina.	47
Figura 11. Cromatograma de linarina y hesperidina.	47
Figura 12. Gráfica de linealidad del método.	49
Figura 13. Cromatograma comparativo de distintas especies de <i>Valeriana</i> .	53
Figura 14. <i>Valeriana edulis ssp procera</i> proveniente de Mixim®.	54
Figura 15. Corte transversal de la raíz de <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .	55
Figura 16. Cromatografía en capa fina para distintas especies de <i>Valeriana</i> .	56
Figura 17. Gráfico de porcentaje de actividad en el cilindro de exploración.	62
Figura 18. Gráfico de porcentaje de actividad en el tablero de hoyos.	63
Figura 19. Gráfico de porcentaje de actividad en la prueba de tracción.	63
Figura 20. Gráfico de tiempo de latencia.	64
Figura 21. Gráfico de tiempo de hipnosis.	64
Figura 22. Gráfico de porcentaje de actividad en el Rota-Rod.	65
Figura 23. Espectro de RMN <sup>1</sup> H de linarina.	76
Figura 24. Espectro de RMN <sup>13</sup> C de linarina.	77
Figura 25. Espectro de IR de linarina.	79
Figura 26. Espectro EM (FAB+) de linarina.	80
Figura 27. Espectro de EM (IE) de linarina.	81

## Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Requerimientos farmacopéicos para la introducción de una monografía.	16
Cuadro 2. Componentes mayoritarios de la <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .	21
Cuadro 3. Métodos de análisis reportados para <i>Valeriana ssp</i>	23
Cuadro 4. Método de análisis para la identificación de linarina.	25
Cuadro 5. Gradiente de elución de la fase móvil.	32
Cuadro 6. Concentración de linarina en metanol para la curva estándar.	44
Cuadro 7. Concentración de linarina en metanol para determinar precisión.	45
Cuadro 8. Factor de capacidad, factor de asimetría para el método de linarina.	46
Cuadro 9. Concentración de linarina en metanol para determinar linealidad del método.	48
Cuadro 10. Concentración de linarina en metanol para determinar exactitud y repetibilidad.	49
Cuadro 11. Concentración de linarina en muestras adicionadas y nuestras sin adicionar.	50
Cuadro 12. Concentración de linarina en metanol para determinar precisión intermedia.	50
Cuadro 13. Concentración de linarina en metanol para determinar robustez.	51
Cuadro 14. Concentración de linarina en metanol para determinar tolerancia.	51
Cuadro 15. Cantidad y porcentaje de materia extraña.	56
Cuadro 16. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas totales.	57
Cuadro 17. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas solubles en agua.	57
Cuadro 18. Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas insolubles en ácido.	58
Cuadro 19. Porcentaje en peso de material extraíble obtenido por el Método I.	58
Cuadro 20. Porcentaje en peso de material extraíble obtenido por el Método II.	58
Cuadro 21. Cantidad en gramos y porcentaje de pérdida por secado en Termobalanza.	59
Cuadro 22. Cantidad en gramos y porcentaje de pérdida por secado en estufa.	59
Cuadro 23. Análisis microbiológico de <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .	60
Cuadro 24. Certificado de análisis de materia prima para la raíz de <i>Valeriana edulis ssp procera</i> .	61
Cuadro 25. Señales de los espectros de RMN $^1\text{H}$ y $^{13}\text{C}$ para linarina.	75
Cuadro 26. Señales del espectro de IR de linarina.	78
Cuadro 27. Parámetros determinados en la validación conforme a la guía de la ICH.	82

## Abreviaturas

<b>% RE</b>	Por ciento de error relativo
<b>°C</b>	Grados Celsius
<b>µg</b>	Microgramos
<b>µV*s</b>	Microvolt por segundo
<b><sup>13</sup>C</b>	Carbono Trece
<b><sup>1</sup>H</b>	Protón
<b><sup>3</sup>H</b>	Tritio
<b>AChE</b>	Acetil colina (Acetylcholinesterase).
<b>AKT</b>	Serina/treonina quinasa (Serine Threonine Kinase).
<b>ANOVA</b>	Análisis de Varianza (Analysis of Variance).
<b>b</b>	Ordenada al origen
<b>BP</b>	Farmacopea Británica (British Pharmacopoeia).
<b>cm</b>	Centímetro
<b>CV</b>	Coefficiente de variación
<b>DAD</b>	Detector de diodos (Diode Array Detector).
<b>di</b>	Diferencia de la media aritmética de cada condición con respecto a la condición normal
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EEM</b>	Error estándar de la media
<b>EMA</b>	Agencia Europea de Medicamentos (European Medicine Agency).
<b>FAB</b>	Bombardeo rápido de átomos (Fast Atom Bombardmet).
<b>FEUM</b>	Farmacopea de los Estados Unido Mexicanos
<b>FHEUM</b>	Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos
<b>g</b>	Gramos
<b>G</b>	Fuerza G
<b>GABA</b>	Ácido Gama Amino Butírico (Gaba Aminobutyric Acid).
<b>h</b>	Horas
<b>HPLC</b>	Cromatografía de Líquidos de Alta Eficiencia (High Performance Liquid Chromatography).
<b>ICµ</b>	Intervalo de confianza para la media poblacional
<b>ICH</b>	Conferencia internacional de Armonización (International Conference on Harmonisation).

<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IR</b>	Infrarrojo (Infra Red).
<b>K'</b>	Factor de capacidad
<b>Kg</b>	Kilogramo
<b>L</b>	Litro
<b>m</b>	Pendiente
<b>mg</b>	Miligramos
<b>min</b>	Minuto
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MS</b>	Masas
<b>n</b>	Número de muestras
<b>nm</b>	Nanometros
<b>PI3K</b>	Fosfoinositol 3-quinasa (Phosphoinositol 3 Kinase).
<b>RMN</b>	Resonancia Magnética Nuclear
<b>s</b>	Desviación estándar
<b>s</b>	Segundos
<b>ssp</b>	Sub especie (Subspecies).
<b>t</b>	Factor de asimetría (solo para adecuabilidad del sistema)
<b>t</b>	Tiempo
<b>USP</b>	Farmacopea de los Estados Unidos Americanos (United States Pharmacopeia).
<b>UV</b>	Ultravioleta
$\bar{y}$	Promedio
$\bar{y}_0$	Media aritmética de las muestras analizadas a condiciones normales
$\bar{y}_i$	Media aritmética de las muestras analizadas a condiciones diferente a la normal

## 1 Resumen

La *Valeriana edulis ssp procera* es una de las principales plantas utilizada en la medicina herbolaria mexicana debido a su efecto ansiolítico y sedante. Sin embargo no existe un método para realizar el control de calidad de los productos elaborados con esta planta. Por lo anterior en este trabajo se desarrolló un método analítico para cuantificar la linarina como compuesto marcador de *Valeriana edulis ssp procera*. El método se validó utilizando una columna Symmetry ODS y una fase de elusión por gradiente compuesta por acetonitrilo y ácido fosfórico al 0.4% en un tiempo de 30 minutos a una velocidad de flujo de 1 mL/min a 25°C. El método fue lineal en un rango de concentración desde 28 µg/ mL hasta 91.6 µg/ mL con un coeficiente de variación (CV) en precisión inter-intra día menor al 2%, un límite de detección de 0.771 µg/ mL y la exactitud con un CV=0.052%, un porcentaje de recuperación en un rango del 92.4% al 93.4%. Al aplicar el método a muestras de *Valeriana edulis ssp procera* se obtuvo un CV < 2%. La linarina fue aislada de *Buddleja cordata* (Tepozán) a la que se le determinó el perfil neurofarmacológico en ratones ICR; sólo se alteró la coordinación motora a la dosis más alta (10 mg/Kg), por lo que la linarina se estableció como un marcador analítico. Los resultados indican que el método desarrollado junto con las pruebas de calidad realizadas a la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* se pueden proponer como una monografía farmacopéica para ser incluida en la FHEUM.

## 2 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<sup>1,2</sup>. Las especies de *Valeriana* de mayor importancia comercial en la medicina herbolaria son *Valeriana officinallis* (Valeriana Europea), *Valeriana edulis* (Valeriana Mexicana), *Valeriana jatamansi* (Valeriana India o Pakistán), y la *Valeriana faurier* (Valeriana Japonesa).<sup>3</sup>

En México, existen distintas plantas con propiedades curativas que son utilizadas comúnmente en la población de forma empírica, una de las más importantes 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.<sup>4</sup>

Debido a su amplio uso y a su valor comercial 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.

La FHEUM contiene monografías de plantas medicinales que son importantes para el control de calidad de los productos que contengan plantas en su formulación, sin embargo existe poca información científica sobre las plantas medicinales utilizadas en México por lo cual el número de monografías reportadas es muy reducido.

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 FEUM y la FHEUM para su inclusión como monografía en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

### 3 Marco Teórico

#### 3.1 Farmacopea Mexicana.

En el año de 1552 se elaboró en el colegio de la Santa Cruz en Tlatelolco de la ciudad de México el “*Libellus de medicinalibus indorum herbis*” que se conocería después como Códice de la Cruz-Badiano, el cual contiene una descripción del uso medicinal de más de 150 plantas endémicas que se empleaban en la medicina prehispánica<sup>5</sup>. De igual manera Fray Bernardino de Sahagún, elaboró el Códice Florentino que contiene una sección exclusiva de plantas medicinales utilizadas por los indígenas en México.<sup>6</sup>

La tradición herbolaria fue prohibida durante la colonia y fue hasta después de la independencia en el siglo XIX donde se publicaron tres ediciones de “La Nueva Farmacopea” en los años de 1874, 1884 y 1896 por la Sociedad Farmacéutica Mexicana. En 1904 y 1925 hubo dos ediciones más de la Farmacopea por la Sociedad Farmacéutica Mexicana, sin embargo, a partir de 1930 el Estado asumió la publicación y financiamiento del texto llamándolo “Farmacopea Nacional de los Estados Unidos Mexicanos” la cual a partir de 1974 cambiaría su nombre por el actual “Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos”.<sup>7</sup>

En el siglo XX debido al aumento de medicamentos genéricos y compuestos químicos el Departamento de Salubridad Pública suprimió gradualmente más de 407 monografías (**Figura 1**) entre las cuales figuraban plantas y productos naturales.<sup>7</sup>



**Figura 1.** Especies vegetales contenidas en las ediciones oficiales entre 1846 y 2013 (modificado de la referencia 7).

Fue hasta el año 2000 que apareció la FHEUM la cual contenía 41 monografías y su segunda edición en el año 2013 con 90 monografías.

Debido a que la mayoría de las plantas se utiliza como droga vegetal y principio activo de distintas formas farmacéuticas, se debe contar con una monografía farmacopéica para tener los parámetros necesarios de calidad y que las autoridades sean capaces de regular la industria de los productos naturales tales como principios activos, remedios y medicamentos herbolarios.

Conforme al Artículo 195 de la Ley General de Salud menciona que la Secretaria de Salud emitirá las normas oficiales mexicanas que deberán sujetarse el proceso y las especificaciones de los medicamentos y demás insumos para la salud, siendo obligatorio conforme al artículo 200 sección III el uso de la última edición de la FEUM y sus suplementos.

### **3.2 Monografía.**

Se le denomina monografía a la descripción científico-técnica de un fármaco, radiofármaco, aditivo, preparado farmacéutico, producto biológico, biotecnológico, hemoderivado, gas medicinal o dispositivo médico, en la que se señalan las especificaciones mínimas que debe cumplir y los métodos de prueba para la verificación de las mismas.<sup>8</sup>

La información suministrada en la monografía debe diferenciar claramente lo que se atribuye al producto, es decir aquello sobre lo cual no haya ninguna evidencia controlada, y la información tipo testimonio basada en casos aislados sin controles, de los estudios sobre efectos terapéuticos, a favor o en contra que se hayan efectuado, y que sean aceptables como evidencia.<sup>9</sup>

En general, el control de calidad se basa en tres importantes definiciones farmacopéicas: Identidad: ¿es la planta que debe ser? Pureza: ¿hay contaminantes que no deberían estar? Contenido: ¿es el contenido de constituyentes activos dentro de ciertos límites definidos?<sup>10</sup>

#### **3.2.1 Contenido**

Las monografías farmacopéicas para una planta, aun tratándose de distintos países, presentan una estructura similar como se observa en el **Cuadro 1**.<sup>11</sup>

<b>Cuadro 1.</b> Requerimientos farmacopéicos para la introducción de una monografía a las farmacopeas de la Unión Europea y México. <sup>11,12</sup>	
<b>Requerimientos de la Unión Europea</b>	<b>Requerimientos de la FHEUM</b>
<b>1) Nomenclatura</b>	<b>1) Título</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nombre común</li> </ul>	<b>2) Nombre científico de la planta</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Nombre científico</li> </ul>	<b>3) Contenido</b>
<b>4) Definición</b>	<b>4) Sustancia de referencia</b>
<b>5) Características</b>	<b>5) Descripción</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Características organolépticas</li> </ul>	<b>6) Solubilidad</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Características macroscópicas y microscópicas</li> </ul>	<b>7) Ensayos de identidad</b>
<b>8) Identificación</b>	<b>8) Análisis y valoración</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Determinación de cenizas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Aplicación</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Materia extraña</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Cálculo</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Metales pesados</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Limites</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Perdida por secado</li> </ul>	<b>9) Metales Pesados</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Material extraíble</li> </ul>	<b>10) Plaguicidas</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Agua y material volátil</li> </ul>	<b>11) Determinación de Microorganismos</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Índice de hinchamiento</li> </ul>	<b>12) Materia Extraña</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>Índice de espuma</li> </ul>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Determinación de microorganismos</li> </ul>	
<b>13) Ensayo de identidad</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cromatografía en capa fina.</li> </ul>	
<b>14) Valoración</b>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Cromatografía de líquidos o gases</li> </ul>	
<b>15) Almacenamiento</b>	

### **3.3 Control de calidad para Medicamentos Herbolarios.**

En los medicamentos a base de plantas toda la mezcla de la planta molida o el extracto, es considerado como el ingrediente farmacéutico activo, independientemente de si se conocen los constituyentes con actividad farmacológica definida.

En el control de calidad y pruebas de estabilidad de medicamentos de origen vegetal, se utilizan cromatogramas de huellas digitales como herramientas para evaluar y comparar la composición de compuestos en dichos productos.<sup>13</sup>

Conforme a la ICH los cromatogramas de huellas digitales son un conjunto de componentes que deben proporcionar un patrón visible de bandas o picos y para su validación se deben incluir los parámetros de estabilidad, la selectividad, robustez, y reproducibilidad.<sup>13</sup>

Idealmente, para conseguir el máximo de información de una huella dactilar, se deben utilizar varios métodos adecuados así como distintos grupos de componentes que posiblemente se originen de diferentes vías biosintéticas útiles para demostrar la consistencia y la estabilidad de los materiales o extractos.<sup>13</sup>

### **3.4 Compuesto marcador.**

Un compuesto marcador es un constituyente químico de una materia prima botánica, el cual se utiliza para la identificación y/o control de calidad.<sup>14</sup>

Conforme a la EMEA un compuesto marcador es un constituyente químicamente definido o un grupo de componentes de una sustancia vegetal, un preparado de hierbas o un producto a base de hierbas medicinales que son de interés para fines de control; independientemente de si tienen alguna actividad terapéutica o farmacológica. Los marcadores sirven para calcular la cantidad de sustancia vegetal o preparado de hierbas en un medicamento herbolario, si el marcador se ha determinado cuantitativamente en la sustancia vegetal o en el preparado de hierbas.<sup>15</sup>

Existen distintos Tipos de marcadores los cuales se pueden clasificar en:

- Marcadores activos.
- Marcadores analíticos.
- Marcadores negativos

a) Marcadores activos

Son componentes o grupo de componentes, que contribuyen a la actividad terapéutica del material vegetal.<sup>15</sup>

Estos compuestos se pueden clasificar de la siguiente forma:

- Componentes terapéuticamente activos: Sustancia o grupo de sustancias químicamente definidas que al ser aisladas tienen el mismo o un efecto similar al extracto total.<sup>16</sup>
- Componentes activos: Sustancia o grupo de sustancias químicamente definidas que al ser aisladas no tienen el mismo efecto que el extracto total; sin embargo se sabe que contribuyen a la actividad terapéutica del extracto.<sup>16</sup>

b) Marcadores analíticos

Son componentes o grupo de componentes que sirven para fines analíticos, pero no necesariamente tienen un efecto sobre el organismo que al estar presentes en el material vegetal permiten desarrollar un método analítico que cumpla con los principales parámetros de validación.<sup>15</sup>

c) Marcadores negativos

Son componentes que generalmente no deben estar presentes en el material vegetal ya que diferencian unas especies de otras con lo cual se obtiene un tipo de huella digital para cada especie de plantas pudiendo así diferenciarlas mediante métodos analíticos más precisos.<sup>17</sup>

En general los marcadores deben ser sustancias características y típicas del género o especie a identificar, debe estar en una cantidad cuantificable así como presentar una estabilidad aceptable.<sup>18</sup>

### 3.5 Generalidades de las Valerianas

Desde tiempos antiguos las valerianas han sido utilizadas por los griegos y la medicina herbolaria china para desordenes digestivos y problemas del tracto urinario; desde el siglo XVII ganaron popularidad en el oeste como principal cura para algunos padecimientos del sistema nervioso tales como epilepsia, histeria, ansiedad e insomnio.<sup>4</sup> La raíz y rizomas de distintas especies de este género se utilizan como sedante y como agente antiespasmódico.<sup>19</sup>

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<sup>2,3</sup>. Las especies de *Valeriana* de mayor importancia comercial en la medicina herbolaria son *Valeriana officinallis* (Valeriana Europea), *Valeriana jatamansi* (Valeriana India o Pakistán), *Valeriana edulis ssp procera* (Valeriana Mexicana) y *Valeriana faurieri* (Valeriana Japonesa).<sup>4</sup>

En México, la Valeriana se encuentra distribuida principalmente en el Estado de México, Distrito Federal, Hidalgo, Oaxaca, Querétaro, Puebla y San Luis Potosí.<sup>20,21</sup> La *Valeriana edulis ssp. procera* o *Valeriana procera*, también conocida como Valeriana mexicana, es una especie de gran importancia debido a que se utiliza como alternativa a la *Valeriana officinallis* la cual se utiliza en la medicina herbolaria mexicana por sus efectos sedantes.<sup>22</sup>

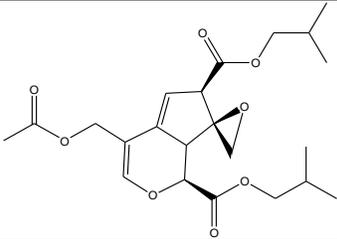
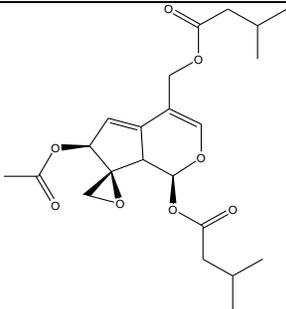
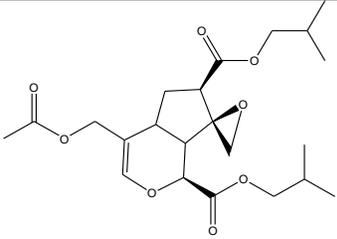
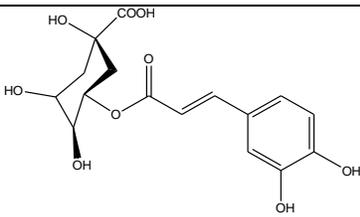
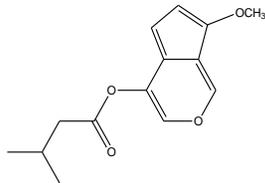
La *Valeriana edulis ssp. procera* (**Figura 2**) es una planta perenne que crece hasta 125 centímetros de altura, con pares de hojas opuestas, en forma de almendra y filo ondulado que surgen de un tallo hueco ranurado con flores pequeñas de color rosa que crecen en la parte superior del tallo en los meses de verano<sup>23</sup>. Tiene un rizoma de unos 30 cm de largo y hasta unos 5cm de ancho, fusiforme y afilado en un pequeño punto, pálido amarillo-marrón, con crestas longitudinales. En la corona se observan una o más cicatrices madre y varias raicillas aparecen a medio camino de la raíz las cuales tienen un sabor desagradable en un principio, seguido por un sabor ligeramente amargo y un olor fétido.<sup>3</sup>

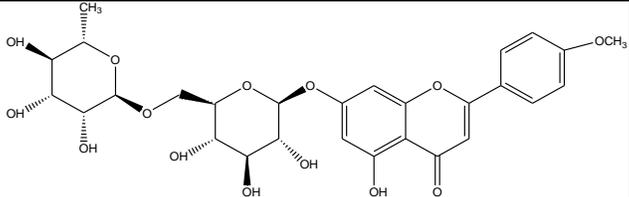
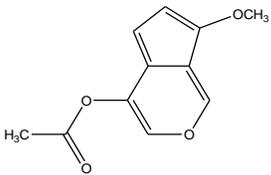
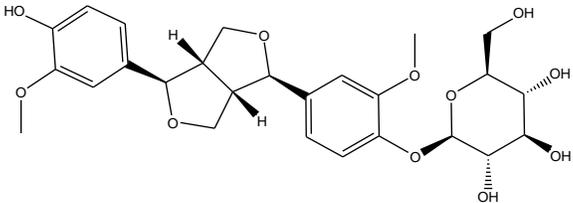
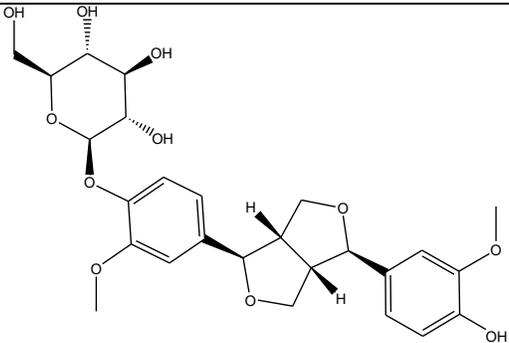
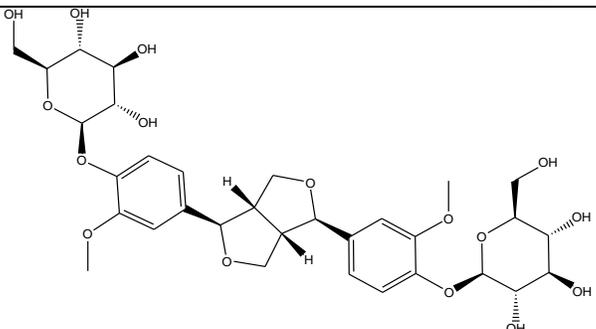


**Figura 2.** *Valeriana edulis ssp. procera*.<sup>24</sup>

### 3.5.1 Composición Química

La composición química de la raíz de *Valeriana* incluye principalmente sesquiterpenoides, iridoides y lignanos (**Cuadro 2**). Los valepotriatos son compuestos que se encuentran en la familia valerianaceae y varios componentes del aceite esencial, en particular el ácido valerénico y sus derivados se han considerado en gran medida como los responsables de la actividad biológica de la *Valeriana*<sup>1</sup>. Los valepotriatos; son sustancias de naturaleza monoterpénoides ciclopentan-c-piranos que poseen un esqueleto básico de 10 carbonos. Destaca la presencia de valtrato y dihidrovaltrato, los cuales constituyen entre ellos dos del 8-12% de los valepotriatos.<sup>25</sup>

<b>Cuadro 2.</b> Componentes mayoritarios de la <i>Valeriana edulis ssp. procera</i> . <sup>4,19</sup>		
<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad en 10 mL de extracto fresco</b>	<b>Estructura</b>
Valtrato	54.95 mg	
Isovaltrato	26.25 mg	
Dihidrovaltrato	10.9 mg	
Ácido clorogénico	1.30 mg	
Homobaldrinal	0.32 mg	

<b>Cuadro 2.</b> Componentes mayoritarios de la <i>Valeriana edulis ssp procera</i> (continuación).		
<b>Sustancia</b>	<b>Cantidad en 10 mL de extracto fresco</b>	<b>Estructura</b>
Linarina	0.14 mg	
Baldrinal	0.09 mg	
Pinoresinol -4-O-β-D-glucósido	0.04 mg	
8-hidroxipinoresinol-4'-O-β-D-glucósido	0.004 mg	
Pinoresinol -4,4'-di-O-β-D-glucósido	DLC	

DLC= Detectado bajo el límite de cuantificación.

### 3.5.2 Actividad Biológica

La *Valeriana edulis ssp procera* ha demostrado que induce la sedación y la hipnosis a través de la modulación del receptor ácido gamma amino butírico (GABA<sub>A</sub>). Se ha encontrado que los extractos de valeriana inhiben la recaptura y estimulan la liberación del neurotransmisor GABA usando el agonistas [<sup>3</sup>H] muscimol y [<sup>3</sup>H] GABA trititados; se ha demostrado en extractos de valeriana la presencia de altos niveles de GABA y glutamina que pueden ser metabolizados al neurotransmisor GABA, con lo que se piensa que son las sustancias responsables del efecto depresor; sin embargo su absorción después de la administración oral es dudosa.<sup>26,27</sup>

Algunos de las principales actividades biológicas de la *Valeriana edulis ssp procera* son:

- Inductor del sueño<sup>1,2</sup>
- Sedante.<sup>26,28</sup>
- Actividad anticonvulsivante.<sup>29</sup>
- Antimicobacteriano.<sup>30</sup>
- Antinociceptivo y Antiespasmódico.<sup>23</sup>

### 3.5.3 Métodos de Análisis

Los primeros análisis de la *Valeriana* se enfocaron hacia los valepotriatos; estos compuestos sólo se encuentran en la familia valerianaceae y a partir de 1980 se comenzaron a desarrollar métodos de análisis para el ácido valerénico a partir de *Valeriana officinalis*<sup>18</sup> (**Cuadro 3**).

**Cuadro 3.** Métodos de análisis reportados para *Valeriana ssp.*<sup>19,26</sup>

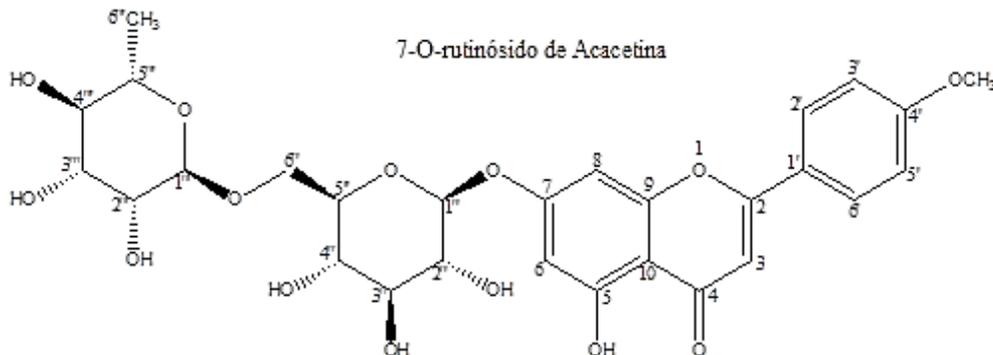
Referencia	Método	Sustancia que cuantifica
Bos R. 1998	HPLC	Ácido valerénico, Valtrato, isovaltrato, dihidrovaltrato, baldrinal, ácido hidroxivalerénico y ácido acetoxivalerénico.
Ugalde M. 2005	HPLC/MS-ESI	Valtrato e isovaltrato.

Se ha reportado que la *Valeriana edulis ssp procera* (Valeriana mexicana) carece de ácido valerénico a diferencia de la *Valeriana officinalis*; sin embargo la Valeriana mexicana contiene una cantidad cuantificable de 7-O-rutinósido de Acacetina [Linarina].<sup>4</sup>

### 3.6 Linarina

#### 3.6.1 Propiedades físicas

La linarina (**Figura 3**) es un sólido blanco; su fórmula condensada es  $C_{28}H_{32}O_{14}$  con un punto de descomposición de 273-275°C y un índice de refracción de 1.693; es soluble 1 mg en 0.3 mL de DMSO y es insoluble en agua.<sup>31</sup>

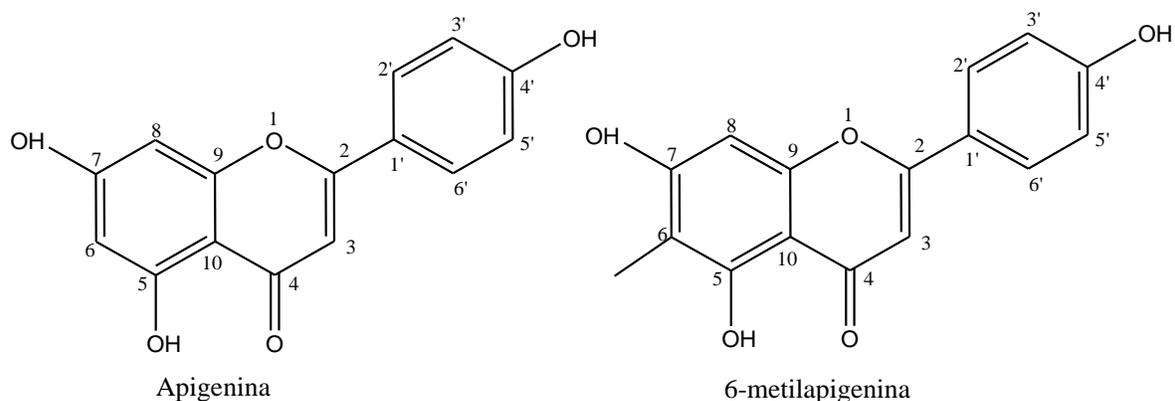


**Figura 3.** Estructura de la linarina (CAS 480-36-4).

#### 3.6.2 Actividad biológica

La linarina fue identificada en la *Valeriana officinalis* con un efecto sedante y ansiolítico a una dosis de 7 mg/kg y 14 mg/kg en solución salina con etanol al 10% y DMSO 10% administrado por vía intraperitoneal, el cual se ve potenciado con la administración de ácido valerénico<sup>28</sup>; tiene un efecto neuroprotector mediante la activación de la ruta PI3K/Akt y un efecto inhibitor de la acetilcolinesterasa [AChE].<sup>32,33</sup>

Se ha demostrado que algunos flavonoides con estructura similar a la linarina, como la apigenina y la 6-metil apigenina (**Figura 4**), aislados de *Valeriana wallichii*, son ligandos competitivos para el sitio alostérico de unión de las benzodiazepina de los receptores GABA<sub>A</sub>.<sup>27</sup>



**Figura 4.** Estructura básica de flavonoides que presentan efecto en el receptor GABA<sub>A</sub>.

### 3.6.3 Métodos de análisis.

Actualmente existen varios métodos para cuantificar la linarina por HPLC (**Cuadro 4**) sin embargo ninguno ha sido desarrollado y validado para su cuantificación en alguna especie de *Valeriana*.<sup>34,35,36</sup>

<b>Cuadro 4.</b> Métodos de análisis para la identificación de linarina.	
<b>Método</b>	<b>Tiempo de retención</b>
HPLC – UV-DAD	Linarina= 21.5min
HPLC- UV	Linarina =9.6 min
HPLC-MS	Linarina =15-17min

Por lo anterior se propuso linarina como posible compuesto marcador para *Valeriana edulis ssp procera*.

## 4 Planteamiento del Problema

En la Farmacopea de los Estados Unidos Americanos y la Farmacopea Británica, esta reportado un método analítico para *Valeriana officinalis* el cual emplea como compuesto marcador al ácido valerénico sin embargo, esta sustancia no se encuentra en todas las especies de *Valeriana*, por lo que no es útil para el análisis de cualquier especie del genero *Valeriana*.<sup>4</sup>

Al proponer una monografía y desarrollar un método analítico que cuantifique como compuesto marcador a la linarina, la cual se encuentra presente en la mayoría de las especies de *Valeriana* y principalmente en la *Valeriana edulis ssp. procera*<sup>4</sup>, se tendrán las bases necesarias para identificar y estandarizar los extractos de diferentes especies de *Valeriana*, así como contar con los métodos requeridos para realizar el control de calidad de los medicamentos herbolarios que utilizan distintas especies de esta planta en su formulación sin las limitaciones del método oficial reportado . Por ello, en este proyecto se estableció una monografía farmacopéica en la que se utiliza a la linarina como compuesto marcador para proponerla a la Comisión Permanente de la FEUM como prueba oficial para el análisis de la valeriana mexicana.

## 5 Objetivos

### 5.1 General

- Desarrollar y proponer una monografía para la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* que cumpla las especificaciones de calidad de acuerdo a los requisitos de la FHEUM, utilizando como compuesto marcador al flavonoide linarina.

### 5.2 Específico

- Extraer y purificar linarina a partir de hojas y tallos de Tepozán (*Buddleia cordata*) para utilizarlo como analito de referencia en el desarrollo de un método analítico con una pureza mayor del 92%.
- Desarrollar un método analítico por cromatografía de líquidos capaz de cuantificar linarina como compuesto marcador de *Valeriana edulis ssp procera*.
- Realizar las pruebas de control de calidad necesarias para proponer una monografía farmacopéica para la raíz molida de *Valeriana edulis ssp procera*.
- Comprobar la actividad sedante de la linarina en ratones para clasificarlo como marcador activo.

## 6 Hipótesis

Mediante el desarrollo del método analítico por cromatografía de líquidos, utilizando como compuesto marcador al flavonoide linarina y determinando las pruebas de control de calidad para la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* se logrará conformar una monografía para proponer su inclusión en la FHEUM.

## 7 Material

### 7.1 Sustancias

Se utilizó *Valeriana edulis ssp procera* proveniente de los Laboratorios Mixim® y recolectada en Mesas Altas, Municipio de San Juan de Xoconusco, Estado de México en Diciembre del 2012.

La linarina se aisló de hojas y flores de *Buddleia cordata* (Tepozán) que se colectó en el Barrio de la Soledad, Aculco Estado de México. Se aisló mediante 3 maceraciones sucesivas de hexano, seguidas de 3 maceraciones con metanol, siendo esta última fase donde se obtiene la linarina por precipitación. Se purificó mediante un proceso de recristalización y se comprobó su pureza mediante cromatografía en capa fina y cromatografía de líquidos de alta resolución.

Para los análisis de todas las muestras obtenidas se utilizó reactivos grado HPLC como acetonitrilo y metanol adquiridos de Merck, ácido fosfórico marca Fluka Analytical y agua destilada filtrada por un equipo Millipore Direct-Q UV.

Para las pruebas en animales se utilizó pentobarbital sódico, solución salina isotónica (0.9%) y tween 80.

### 7.2 Equipos

El sistema cromatográfico consistió de una bomba Waters Delta 600 (Waters Corp., Milford, MA, USA), un inyector Waters 717 Plus, un controlador automático de gradientes 600, un detector UV con arreglo de fotodiodos Waters 2996 y una estación computarizada para procesamiento de datos equipada con el software Waters Empower.

Equipo Fisher Johns marca Fisher Scientific que cuenta con un termómetro de 0°-300°C para la determinación del punto de fusión y un equipo de filtración de agua marca Millipore modelo DirectQ-3UV.

Para determinar la actividad biológica de la linarina se utilizó un rota-rod marca Ugo Basile modelo, un tablero de hoyos marca Ugo Basile modelo Hole-Board 6650, un actímetro marca Panlab modelo LE 8810-LE 8811, un cilindro de vidrio de 11cm de diámetro y 30 cm de alto y finalmente un equipo de tracción descrito por Gonzáles-Trujano y colaboradores.<sup>37</sup>

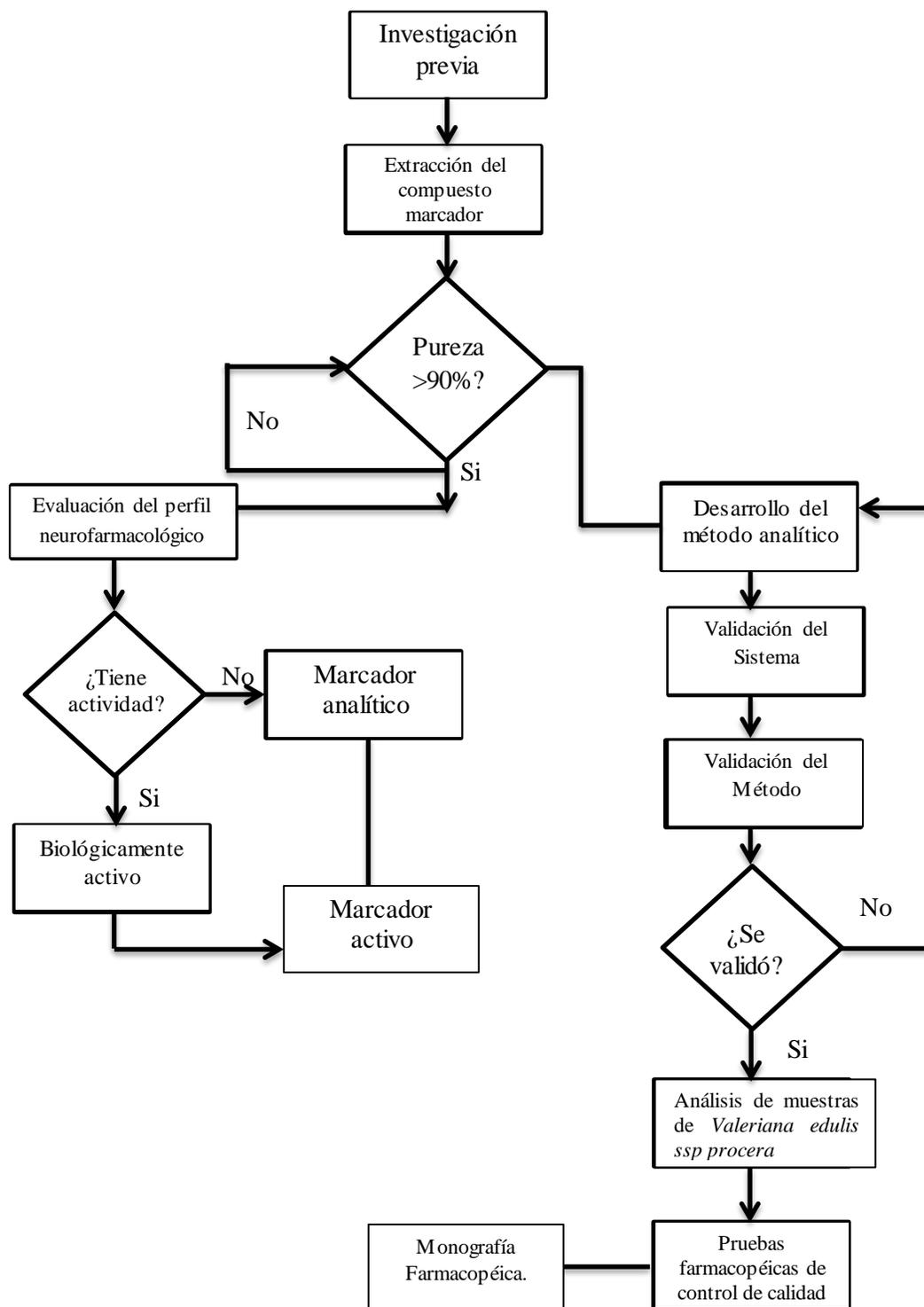
Para el análisis de pérdida por secado se utilizó una Termobalanza AND Infrared Moisture Determination Balance<sup>®</sup>; Modelo AD-4714.

### **7.3 Animales de experimentación.**

Todos los experimentos se realizaron con ratones ICR macho, con un peso entre 25-30g obtenidos de Harlan<sup>®</sup>. Los animales se alojaron en condiciones controladas estándar ( $22\pm 1$  ° C) y se mantuvieron en un ciclo de luz / oscuridad de 12 h con comida y agua disponible *ad libitum*. Los animales fueron tratados conforme a la Norma Oficial Mexicana 062-ZOO.<sup>38</sup>

## 8 Metodología

**Diagrama 1.** Diagrama de flujo con la metodología que se siguió para realizar la Propuesta de monografía farmacopéica para *Valeriana edulis ssp procera*.



## 8.1 Extracción del compuesto marcador

Las hojas y flores del árbol de tepozán se secaron a la sombra, se molieron en un molino manual y posteriormente se realizó la maceraciones sucesiva con hexano (72 h x 3 veces) y metanol (72 h x 3 veces); colocando 13 L de disolvente por cada kg de material vegetal.

El extracto de metanol se concentró a presión reducida hasta obtener un precipitado. El precipitado se purificó por recristalizaciones sucesivas en etanol y se determinaron sus propiedades fisicoquímicas (punto de descomposición y solubilidad), espectroscópicas (IR, RMN,  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$ ) y espectrométricas obteniendo así el analito de referencia.

## 8.2 Desarrollo del método analítico por HPLC

Se desarrolló un método de análisis para *Valeriana edulis ssp. procera* por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) capaz de cuantificar linarina cumpliendo todos los parámetros de validación de métodos analíticos definidos por la ICH y la Guía del Validación de métodos analíticos del Colegio Nacional de Químicos Farmacéuticos Biológicos.<sup>39</sup>

### 8.2.1 Condiciones del método

Se utilizó un método con las siguientes condiciones:

Velocidad de flujo: 1 mL/min

Volumen de la muestra: 20 $\mu\text{L}$ /min

Temperatura de la columna: 25°C

Tiempo de corrida: 30 min

Detector: UV a 269 nm

Tipo de columna: Symmetry® C18 250mm x 4.6mm d.i. con tamaño de partícula de 5 $\mu\text{m}$

Tipo de precolumna: Supelco ® C18 de 2cm de longitud con tamaño de partícula de 5 $\mu\text{m}$

El método de elución fue por gradiente el cual se muestra en el **Cuadro 5**.

<b>Tiempo (min)</b>	<b>Flujo ( mL/min)</b>	<b>% Acetonitrilo</b>	<b>% Ácido fosfórico al 0.4%</b>
0	1	28	72
20	1	40	60
30	1	28	72

### 8.2.2 Preparación de la solución estándar

Se preparó una solución stock de linarina con una concentración de 0.4 mg/ mL la cual fue inyectada en el cromatógrafo y analizada bajo las condiciones del método que se denominó “Valeriana” el cual se desarrolló para este compuesto.

### 8.2.3 Preparación y análisis de una muestra de *Valeriana edulis ssp procera*

Se secaron y molieron 200 mg de raíz de *Valeriana edulis ssp procera*, posteriormente se adiciono 2.5 mL de metanol, se colocó en agitación ultrasónica 15 minutos y posteriormente se centrifugó a 2069.75 G durante 10 minutos. El sobrenadante se colocó en un matraz volumétrico de 10 mL. Este procedimiento se realizó por triplicado y se llevó al aforo con metanol. La muestra se filtró utilizando un filtro de nylon de 0.45 µm. Esta muestra fue inyectada en el cromatógrafo y analizada con el método “Valeriana”.

### 8.2.4 Determinación de la concentración de linarina en la muestra de *Valeriana edulis ssp procera*

En el cromatograma obtenido para la muestra de *Valeriana edulis* se identificó el pico que correspondía a la linarina; esto se hizo con respecto al cromatograma obtenido para la solución estándar de linarina inyectada previamente. Se compararon las áreas de los picos para determinar la concentración de linarina presente en la muestra. Dicha concentración se tomó como el 100% de la curva para la validación.

## 8.3 Validación del Sistema

### 8.3.1 Linealidad del sistema

Se preparó una solución stock de 400 µg/ mL y de esta se tomó una alícuota de 7 mL y se aforó a 10 mL con metanol. De esta solución se realizó la curva estándar tomando alícuotas de 0.1, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, y 0.7 mL y se aforaron a 1 mL con metanol para obtener 6 niveles de concentraciones que corresponden a 28, 84, 112, 140, 168 y 196 µg/ mL. Cada solución se filtró con filtros de nylon de 0.45 µm, se colocó en un vial y se inyectó por triplicado en el cromatógrafo con el método “Valeriana”.

Con los resultados obtenidos se construyó la gráfica concentración contra área y se determinó la pendiente (m), ordenada al origen (b), el coeficiente de correlación ( $r^2$ ), promedio ( $\bar{y}$ ), desviación estándar (s) y coeficiente de variación (CV).

$$CV = \frac{s}{\bar{y}} \times 100$$

### 8.3.2 Precisión del sistema

Se preparó una solución de 140 µg/ mL de linarina, la cual corresponde al 100% de concentración de la curva estándar; se filtró y se inyectó por sextuplicado. Posteriormente se determinó el promedio ( $\bar{y}$ ), la desviación estándar (S) y el coeficiente de variación (CV).

### 8.3.3 Adecuabilidad del sistema

Se inyectó por quintuplicado una solución de linarina con una concentración de 140µg/ mL preparada por dilución. Se determinó el coeficiente de variación (CV), y para cada inyección se determinó el factor de capacidad ( $k'$ ), y el factor de asimetría (t) obtenidos directamente del software Empower.

## **8.4 Validación del Método**

### **8.4.1 Preparación del placebo analítico**

Se colocaron 7g de raíz seca y molida a reflujo durante 2 horas con 300 mL de metanol, se filtró en caliente. Este procedimiento se realizó 3 veces y la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* (placebo analítico) se dejó secar. Se colocaron 200 mg de cada muestra, se extrajeron con 2.5 mL de metanol en agitación ultrasónica durante 15 minutos y centrifugándolas a 2069.75 G por 10 minutos, este procedimiento se realizó por triplicado. El sobrenadante se colocó en matraces volumétricos de 10 mL y se llevó al aforo con metanol. Las muestras obtenidas se filtraron e inyectaron en el cromatógrafo para su análisis.

### **8.4.2 Especificidad del método.**

Se inyectó una solución de linarina 140 µg/ mL más hesperidina 140 µg/ mL en metanol para lo cual se observó que los picos obtenidos estuvieran bien definidos y separados entre sí. Se utilizó hesperidina debido a que es una molécula similar a la linarina; solo tiene un grupo metilo en el C-3'

### **8.4.3 Linealidad del método**

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 y 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 2069.75 G durante 10 minutos. Este procedimiento se realizó por triplicado y el sobrenadante se colocó en matraces volumétricos de 10 mL 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), el coeficiente de variación (CV)

#### 8.4.3.1 Prueba de Homocedasticidad

La condición de varianzas iguales se denomina homocedasticidad, la cual no siempre se cumple para datos analíticos, cuando el rango de valores x es grande se espera que la varianza de cada punto de datos sea muy diferente. Para obtener la curva de calibración más adecuada se realizó la prueba de homoscedasticidad.<sup>40</sup>

Se calculó la varianza del nivel de concentración menor ( $S_1^2$ ) y la varianza del nivel de concentración mayor ( $S_2^2$ ) de la curva. Posteriormente se determinó el valor de F por medio de la siguiente expresión:

$$F_{exp} = \frac{S_2^2}{S_1^2}$$

La F experimental ( $F_{exp}$ ) obtenida se comparó con la F de tablas con un nivel de confianza del 99%, con  $n_1-1$  y  $n_2-2$  grados de libertad.

Se calculó el valor de los residuales por medio de la siguiente expresión:

$$\text{Residual} = (y_{observada} - y_{predicta})$$

Se construyó la gráfica de residuales vs concentración para determinar si la distribución de los valores obtenidos está por arriba y por debajo de la media.<sup>38</sup> Para obtener la mejor curva se calculó la sumatoria del porciento de error relativo (%RE) de los modelos de calibración propuestos por Almeida y colaboradores<sup>38</sup>, utilizando la siguiente expresión:

$$\%RE = \frac{\text{Concentración}_{obtenida} - \text{Concetración}_{nominal}}{\text{Concentración}_{nominal}} \times 100$$

#### 8.4.4 Exactitud y repetibilidad del método

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. 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 poblacional ( $IC_{\mu}$ ) del porcentaje de recobro.

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

#### 8.4.5 Precisión del método (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).

#### 8.4.6 Robustez

Para este parámetro se preparó un placebo adicionado con una concentración de 140 µg/ mL, la 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 ( $d_i$ ).

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

#### **8.4.7 Tolerancia**

Se preparó un placebo adicionado con una concentración de 140 µg/ 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 5µm y una columna Symmetry® C18 250 mm x 4.6 mm d.i. con tamaño de partícula de 5µm

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

#### **8.4.8 Límite de detección (LD) y Límite de cuantificación (LC)**

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.

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.

### **8.5 Análisis de muestras de *Valeriana edulis ssp procera***

Para la preparación de las muestras, se pesaron 200 mg de cada muestra, se extrajeron con 2.5 mL de metanol en agitación por ultrasonido durante 15 minutos y centrifugándolas a 2069.75 Gpor 10 minutos, este procedimiento se realizó por triplicado. El sobrenadante se colocó en matraces volumétricos de 10 mL y se llevó al aforo con metanol. Las muestras obtenidas se filtraron e inyectaron en el cromatógrafo para determinar el contenido de linarina.

## **8.6 Pruebas farmacopéicas de control de calidad**

### **8.6.1 MGA-FH 0030 Materia extraña**

Esta prueba consiste en la examinación visual del material vegetal para descartar la presencia de otras partes de la misma u otra planta que no sea la especificada, insectos u otros animales, materiales minerales o bien ajenos a la droga vegetal.<sup>12</sup>

### **8.6.2 MGA-FH 0040 Examen visual e inspección microscópica**

Para cada planta medicinal debe elaborarse una descripción sensorial y definir las características macroscópicas y microscópicas como primer paso para establecer su identidad y grado de pureza. Siempre que sea posible debe contarse con especímenes auténticos y muestras de calidad farmacopéica del material en cuestión que sirvan como referencia.

Si se encuentra que una muestra no posee o difiere sustancialmente de las características de olor y sabor, se considera que no cumple con las especificaciones, sin embargo la identificación macroscópica de las plantas medicinales se basa en forma, tamaño, color, características de la superficie y textura de los diferentes órganos vegetales, así como la fractura y aspecto de la superficie de corte.

### **8.6.3 MGA-FH 0050 Cromatografía en capa fina**

Para realizar cromatografía en capa fina se analizan 200 mg material vegetal bajo diversas condiciones para determinar la solución de prueba y la solución de referencia, fase móvil, número de manchas, valor de R<sub>f</sub> y el método de detección, si es necesario detección bajo lámpara UV (254 nm ó 365 m) o luz blanca.<sup>12</sup>

La muestra se prepara colocando 200 mg de raíz, previamente 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 centrifuga a 2069.75 G durante 10 minutos; este proceso se realizó 3 veces y el sobrenadante se coloca en un matraz volumétrico de 10 mL el cual se aforó con metanol. Como referencia se utiliza una solución de 0.14 mg/ mL de linarina en metanol.

#### **8.6.4 MGA-FH 0060 Determinación de cenizas**

Las cenizas de los productos naturales están constituidas por el residuo inorgánico presente después de que el material vegetal ha sido incinerado. Se determinó 3 tipos de cenizas procedentes de material vegetal.<sup>12</sup>

- Cenizas totales. Determina la cantidad total de residuo después de la incineración.
- Cenizas solubles. Determina la cantidad de sales inorgánicas solubles en agua.
- Cenizas insolubles. Determina la cantidad de sílice en la muestra.

#### **8.6.5 MGA-FH 0070 Material extraíble**

Este método determina la cantidad de constituyentes activos extraídos con disolventes a partir de una cantidad dada de material vegetal. Se emplea para aquellos materiales que no cuentan con ensayos biológicos o químicos.<sup>12</sup>

#### **8.6.6 MGA-FH 0080 Agua y material volátil**

La prueba de pérdida por secado determina tanto agua como material volátil y se lleva a cabo a una temperatura entre 100 °C – 105 °C o en un desecador sobre pentóxido de fósforo a presión atmosférica o a presión reducida y temperatura ambiente.<sup>12</sup>

Un exceso de agua en materiales de plantas medicinales favorece el crecimiento microbiano, la presencia de hongos y bacterias así como el deterioro del material seguido de hidrólisis. El límite para el contenido de agua es específico para cada material vegetal.

#### **8.6.7 MGA 0561 Arsénico y metales pesados**

La contaminación de material de plantas medicinales con arsénico y metales pesados puede ser atribuida a muchas causas incluyendo contaminación ambiental y trazas de plaguicidas.<sup>40</sup>

Las plantas adquieren arsénico básicamente desde el suelo y cada vez menos desde los plaguicidas, este se fija fácilmente en las raíces, uniéndose a los péptidos fitoquelatina y homofitoquelatina, cuya síntesis estimula el arsénico y el cadmio, mientras que otros metales pesados sólo aumentan la síntesis de los precursores glutatión, homoglutation y cisteína.<sup>41</sup>

### **8.6.8 MGA 0571 Determinación de microorganismos**

El material procedente de plantas medicinales tiene normalmente un gran número de bacterias y hongos filamentosos, con frecuencia provenientes del suelo. De la gran variedad de microorganismos provenientes de la microflora propia de las plantas, predominan las bacterias aerobias y anaerobias formadoras de esporas. Las principales fuentes de contaminación microbiana son la materia fecal utilizada como abono, agua de irrigación y malas prácticas de cultivo, manejo y producción.<sup>36</sup>

## 8.7 Evaluación del perfil neurofarmacológico.

Los grupos experimentales estuvieron formados por un mínimo de 6 individuos, se evaluaron 4 dosis de linarina (1.78, 3.16, 5.62 y 10 mg/kg) y un grupo control al cual se le administro solución salina.

### 8.7.1 Preparación de las dosis.

Se pesaron 0.445, 0.79, 1.40 y 9.6 mg de linarina y se disolvieron en 2.5 mL de solución salina isotónica, se adicionó y homogeneizo con una gota de tween 80 como agente tensoactivo. Para la dosis de pentobarbital sódico (60 mg/Kg) se midió 1.52 mL de solución al 6.3% y se diluyó en 16 mL de solución salina isotónica.

### 8.7.2 Administración

Los ratones se administraron 30 minutos antes de la prueba; para todas las dosis, incluido el control se administró 0.1 mL por cada 0.01 Kg de peso de los ratones vía intraperitoneal.

### 8.7.3 Efecto sedante

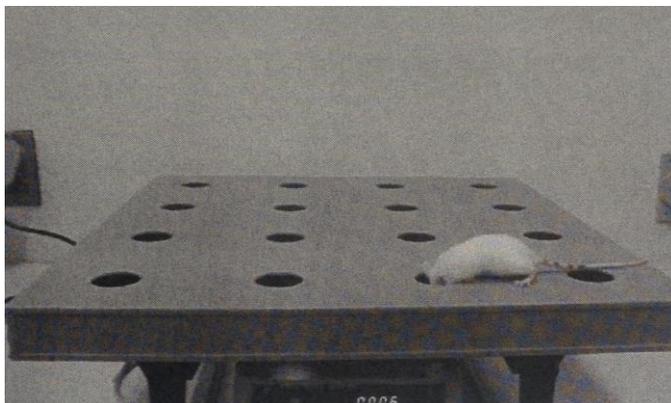
Para determinar el efecto sedante se utilizó el cilindro de exploración, para ello se colocó cada ratón dentro de un cilindro transparente de 30 cm de alto por 11 cm de diámetro y se contó el número de levantamientos sobre sus patas traseras que realizó por un periodo de 5 minutos (**Figura 5**).<sup>42</sup>



**Figura 5.** Cilindro de exploración.

#### 8.7.4 Efecto ansiolítico

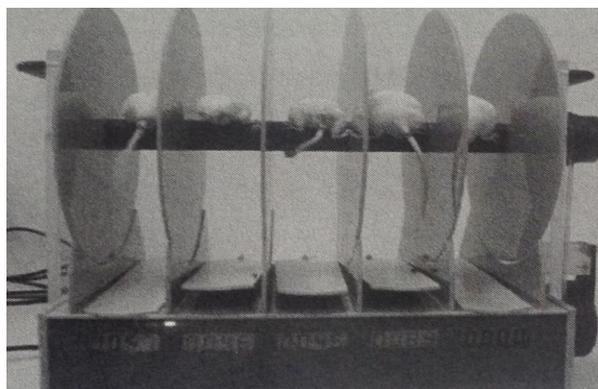
El efecto ansiolítico se determinó con el hole board. Los animales se colocaron de manera individual sobre una superficie cuadrada de plástico (40 x 40 cm lado y 25 cm de altura) con 16 hoyos (3cm de diámetro) distribuidos homogéneamente. De acuerdo a Takeda y colaboradores (1998) se registró en un periodo de 5 minutos el número de veces que el animal introducía la cabeza en un agujero (**Figura 6**).<sup>43</sup>



**Figura 6.** Tablero de hoyos.

#### 8.7.5 Coordinación motora

La prueba de rotarod mide la capacidad del raton de mantener el desplazamiento. Previamente cada raton pasó por un entrenamiento y se seleccionaron aquellos individuos que permanecieran 120 segundos en el Rota-Rod. Se determinó el tiempo que el ratón permanecía en equilibrio sobre el equipo (máximo 120 segundos), la prueba se realizó en intervalos de 10 minutos por un periodo de 2 horas (**Figura 7**).<sup>37,42</sup>



**Figura7.** Rota-rod.

### 8.7.6 Efecto miorrelajante

El modelo de Grip Strength mide el efecto miorrelajante, Cada ratón se entrenó durante 120 s y se seleccionaron aquellos ratones que permanecieran al menos 120 segundos sujetos con sus extremidades delanteras a un cable metálico de 30 cm de largo. Se determinó el tiempo que el ratón permanecía sujeto al cable por sus extremidades delanteras (máximo 120 segundos), la prueba se realizó en intervalos de 10 minutos por un periodo de 2 horas (**Figura 8**).<sup>37</sup>



**Figura 8.** Prueba de tracción.

### 8.7.7 Potenciación de la hipnosis

Se administró linarina a las dosis antes mencionadas y después de 30 minutos se administró pentobarbital sódico (60 mg/Kg) vía IP. Se cuantifico el tiempo al cual se presentaba hipnosis (latencia) y el tiempo en el cual el ratón recuperaba los reflejos.<sup>44</sup>

## 9 Resultados

### 9.1 Extracción de Linarina

Se obtuvo Linarina con un porcentaje de extracción del 0.4 % y un rendimiento de purificación del 80%; físicamente es un polvo de color blanco con un punto de descomposición (no corregido) de 269 – 270 ° C soluble en piridina y dimetilsulfóxido, ligeramente soluble en piridina-metanol 8:2, etanol y metanol, insoluble en agua, soluciones ácidas, hexano, diclorometano, cloroformo, acetato de etilo, n-butanol y acetona. Tiene un  $R_f \approx 0.6$ , Fase estacionaria: Sílica Gel 60 F254 Fase móvil: Acetato de etilo:metanol:agua:ácido acético (80:20:5:5).

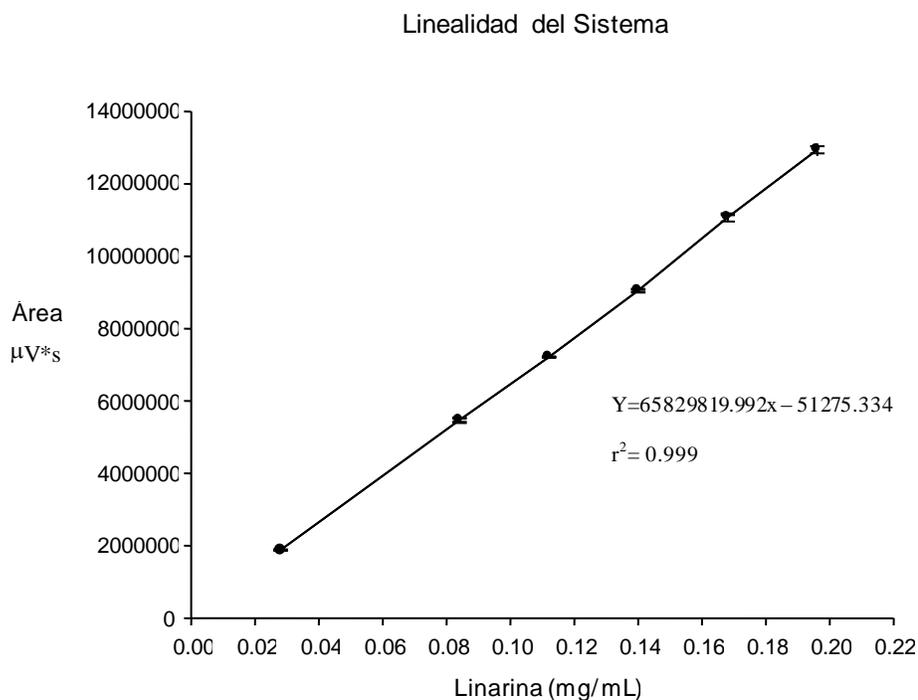
Se obtuvieron los espectros de resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  [**Anexo A, (Cuadro 26)**], infrarrojo [**Anexo B, (Cuadro 27)**], espectro de masas FAB (**Anexo C**) y espectrometría de masas por impacto electrónico (**Anexo D**) para caracterizar e identificar a la linarina. Los resultados coinciden con los descritos en la literatura <sup>45,46,47</sup>.

### 9.2 Validación del Sistema

Para la linealidad (**Figura 9**) se obtuvo un coeficiente de variación (CV) menor al 2% (**Cuadro 6**) y un coeficiente de determinación ( $r^2$ ) mayor al 0.98%. El método fue preciso con un CV= 1.87 (**Cuadro 7**); finalmente el método es adecuado al determinar el factor de capacidad ( $k'$ ) y el factor de asimetría (t) con un CV = 1.14 y 1.54 respectivamente (**Cuadro 8**).

**Cuadro 6.** 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 ( $\mu\text{V}^*\text{s}$ )	Promedio de las áreas ( $\mu\text{V}^*\text{s}$ )	Desviación estándar de las áreas (s)	Coficiente de variación (CV)
0.028	1905107 1869150 1876149	1883468.67	19063.31	1.01
0.08	5413456 5439916 5556530	5469967.33	76123.94	1.39
0.11	7207898 7234966 7200915	7214593	17985.69	0.25
0.14	9062543 8994161 9094327	9050343.67	51185.20	0.57
0.17	11150694 10946135 11122601	11073143.3	110885.72	1.00
0.20	12918748 12783657 13125740	12942715	172296.28	1.35



**Figura 9.** Gráfica de linealidad del sistema, se obtuvo una pendiente de 65829819.992  $\pm$ 517999.517 y una ordenada de -51275.334  $\pm$ 69078.901; se realizó ANOVA de la regresión lineal obteniendo una  $P<0.001$ . Cada punto representa la media de tres determinaciones  $\pm$  EEM.

**Cuadro 7.** Concentración de linarina en metanol para determinar precisión, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación.

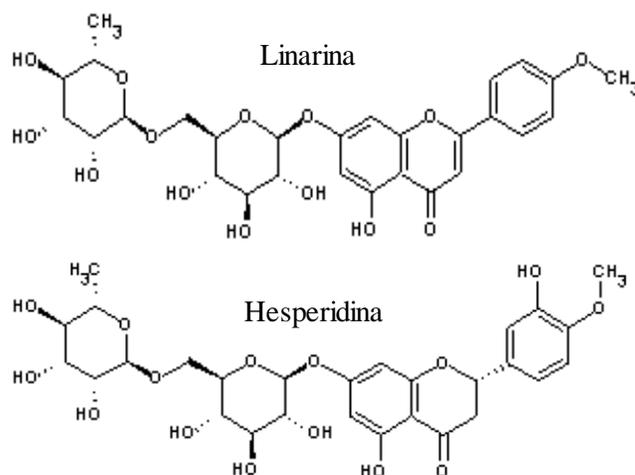
Concentración de Linarina mg/ mL	Área (µV*s)
0	0
0.14	5550774
0.14	5423402
0.14	5673867
0.14	5687307
0.14	5689671
0.14	5623948
<b>Promedio de áreas</b>	5608161.50
<b>Desviación estándar de las áreas (S)</b>	104788.96
<b>Coficiente de Variación (CV)</b>	1.87

**Cuadro 8.** Factor de capacidad, factor de asimetría para el método de linarina con una concentración correspondiente a 140 µg/ mL y su coeficiente de variación obtenidos directamente del software Empower.

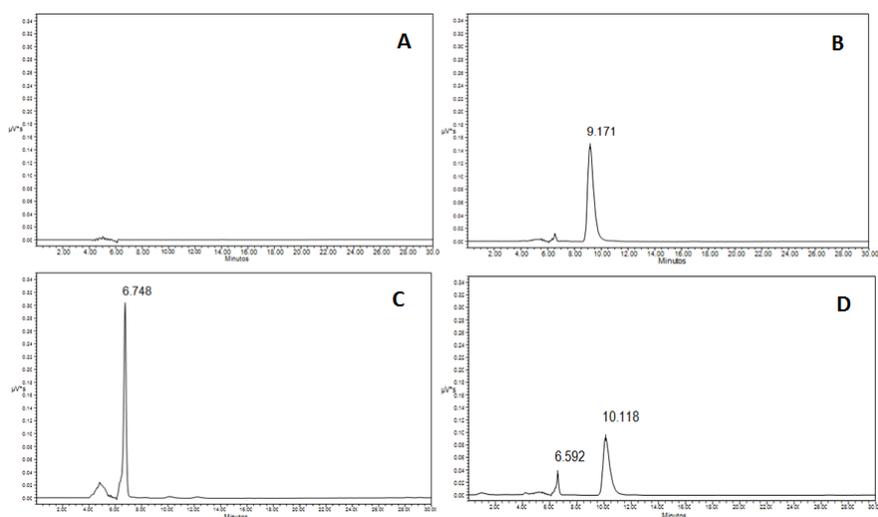
Muestra	Factor de capacidad (k')	Factor de Asimetría (t)
1	1.01	1.03
2	0.99	1.04
3	1.02	1.04
4	1.00	1.01
5	1.00	1.00
6	1.00	1.03
7	1.00	1.00
8	1.011	1.01
9	1.011	1.01
<b>Promedio (<math>\bar{Y}</math>)</b>	1.00	1.02
<b>Desviación estándar (S)</b>	0.01	0.02
<b>Coefficiente de Variación (CV)</b>	1.14	1.54

### 9.3 Validación del Método

El método fue específico al inyectar una solución de linarina 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  + hesperidina 140  $\mu\text{g}/\text{mL}$  flavonoide similar a la linarina (**Figura 10**); se observó que los picos obtenidos en el cromatograma estuvieran bien definidos y separados entre sí (**Figura 11**).



**Figura 10.** Se observa la estructura de linarina y hesperidina las cuales son muy similares y solo se diferencian por un grupo Hidroxilo (-OH) en la posición 3' de la hesperidina.



**Figura 11.** En los siguientes cromatogramas se muestran los picos correspondientes al blanco de metanol (**A**), linarina (**B**), hesperidina (**C**) y linarina + hesperidina (**D**) con lo cual se comprueba que el método es específico para cuantificar linarina ya que se observan ambos picos separados entre sí. Las condiciones del método se describen en la página 26.

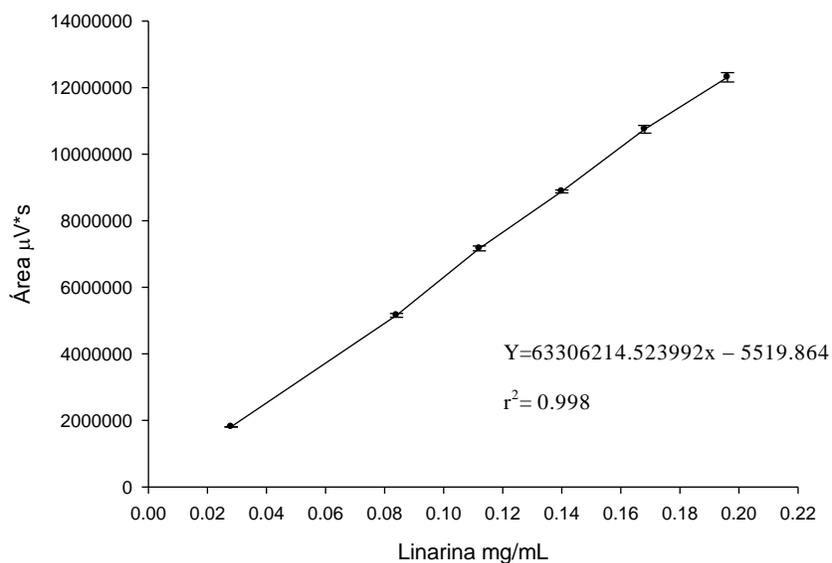
Se realizó la prueba de homocedasticidad comparando el valor obtenido de F experimental (20.76) con F de tablas (99.3) con lo cual la recta se ajusta a un modelo lineal; por lo cual en linealidad se obtuvo un CV menor a 2% (**Cuadro 9**) y un coeficiente de determinación mayor al 0.98% (**Figura 12**).

En exactitud se obtuvo un CV < 2% y un intervalo de confianza para la media poblacional (IC<sub>μ</sub>) que va desde 90.79% a 92.72% (**Cuadro 10**). Para la precisión intermedia se obtuvo un CV=1.89 (**Cuadro 12**) mientras que para robustez se obtuvo una diferencia absoluta (di) menor al 2% (**Cuadro 13**) y para tolerancia se obtuvo un CV= 1.92 y 1.74 para la columna de 150 mm y 250 mm respectivamente (**Cuadro 14**).

**Cuadro 9.** Concentración de linarina en metanol para determinar linealidad del método, con sus áreas correspondientes, porcentaje de recobro y coeficiente de variación.

Linarina (mg/mL)	Área (μV*s)	Linarina Recuperada (mg/mL)	% Recobro	% Recobro promedio	S	CV
0	0	0	0	0	0	0
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 12.** Gráfica de linealidad del método, se obtuvo una pendiente de  $63306214.523 \pm 699991.527$  y una ordenada de  $-5519.864 \pm 93348.823$ ; se realizó ANOVA de la regresión lineal obteniendo una  $P < 0.001$ . Cada punto representa la media de tres determinaciones  $\pm$  EEM.

**Cuadro 10.** Concentración de linarina en metanol para determinar exactitud y repetibilidad del método, con sus áreas correspondientes y coeficiente de variación.

#	Linarina adicionada (mg/ mL)	Área ( $\mu V \cdot s$ )	Linarina recuperada (mg/ mL)	% Recobro
<b>Blanco</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>1</b>	0.14	8299368	0.13	92.48
<b>2</b>	0.14	8211071	0.13	91.5
<b>3</b>	0.14	8328433	0.13	92.81
<b>4</b>	0.14	8269387	0.13	92.15
<b>5</b>	0.14	8101214	0.13	90.27
<b>6</b>	0.14	8195901	0.13	91.33
			<b>Promedio</b>	91.76
			<b>Desviación Estándar Áreas</b>	0.92
			<b>Coefficiente de Variación</b>	1.00
			<b>IC(<math>\mu</math>)</b>	90.79% – 92.72%

**Cuadro 11.** Concentración de linarina en muestras adicionadas (MA) y muestras sin adicionar (M) las cuales se compararon entre sí para asegurar que el método cuantifica linarina en su totalidad.

Muestra	Área	Concentración total	Linarina recuperada	% de Linarina	Promedio	s	CV
MA 1	10572763	0.159	0.090	101.163	100.766	1.878	1.863
MA 2	10266306	0.154	0.088	98.721			
MA 3	10128385	0.152	0.091	102.413			
M 1	4574687	0.069					
M 2	4408653	0.066					
M 3	4041522	0.061					
Stock	4947457	0.074					

**Cuadro 12.** 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 ( $\mu V*s$ )	Linarina recuperada mg/ mL	% Recobro	Promedio	Desviación estándar del % de recobro	Coficiente de Variación
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			
	0.07	4655577	0.07	104.86			
2,2	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			

**Cuadro 13.** 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 ( $\mu\text{V}^*\text{s}$ )	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 14.** Concentración de linarina en metanol para determinar tolerancia; para este parámetro se cambió la columna por una de 150 mm y 250mm.

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			

### 9.3.1 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  $16,413\mu\text{V}\cdot\text{s}$  y se determinó que la concentración que presenta una respuesta similar a 3 veces la señal de ruido ( $51,543\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) es igual a  $0.771\mu\text{g}/\text{mL}$ .

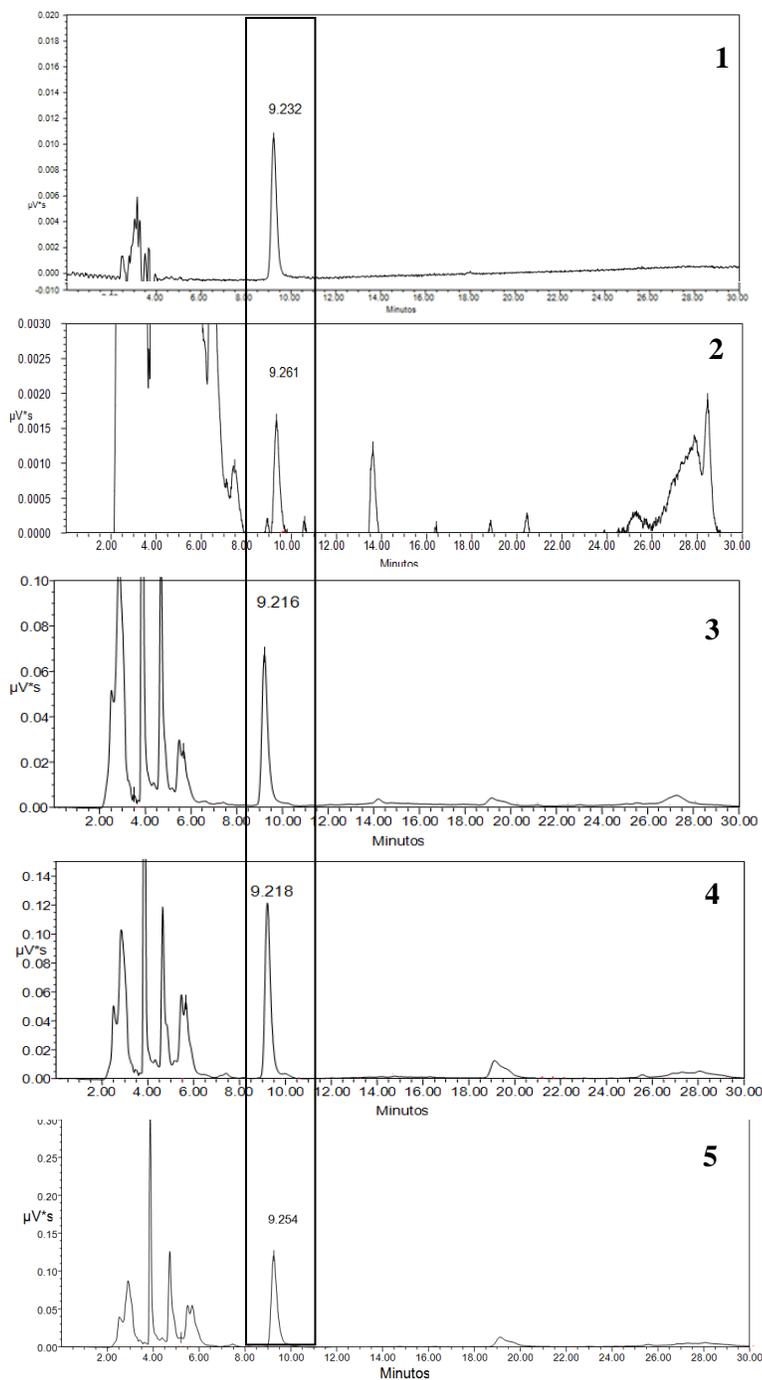
### 9.3.2 Límite de cuantificación

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  $16,413\mu\text{V}\cdot\text{s}$  y se determinó que la concentración que presenta una respuesta similar a 10 veces la señal de ruido ( $178,813\mu\text{V}\cdot\text{s}$ ) es igual a  $2.57\mu\text{g}/\text{mL}$ .

En el **Anexo E, Cuadro 27** se muestran los parámetros determinados para la validación del método analítico conforme lo establecido por la International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. Validation of Analytical Procedures.<sup>40</sup>

### 9.4 Análisis de muestras de *Valeriana edulis ssp procera*.

En la **Figura 13** se observan los cromatogramas para cuatro muestras de distintas especies de *Valeriana*, analizadas con el método desarrollado por HPLC.



**Figura 13.** Se observa el cromatograma de placebo adicionado con linarina (1), *Valeriana officinalis* (2), *Valeriana edulis* (3), *Valeriana edulis muestra 2* (4), y extracto de *Valeriana* (5) y se señala el pico correspondiente a linarina la cual se validó como marcador analítico.

## 9.5 Pruebas farmacopéicas de control de calidad

La materia extraña contenida en la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* es del  $0.059 \% \pm 0.026 \%$  (**Cuadro 15**) y se compone principalmente de hojas y tallos de la misma planta, así como de polvo de la misma raíz. En la determinación de cenizas totales se obtuvo un promedio de  $5.78 \% \pm 0.12\%$  (**Cuadro 16**); de las cuales un  $3.14 \% \pm 0.07\%$  son solubles en agua y un  $0.097 \% \pm 0.07\%$  son insolubles en ácido (**Cuadro 17 y 18**).

El material extraíble que se obtuvo con solución hidroalcohólica (etanol al 70%) en frío fue del  $12.21 \% \pm 0.60 \%$  y el extraído con agua caliente fue del  $38.69 \% \pm 0.79 \%$  (**Cuadro 19 y 20**). La determinación de agua y material volátil se realizó por dos métodos obteniendo una pérdida por secado con lámpara infrarroja de  $9.28 \% \pm 0.77\%$  y un promedio de pérdida por secado en estufa de  $7.98 \% \pm 0.16 \%$  (**Cuadro 21 y 22**). Se obtuvieron menos de 10 ppm de metales pesados y los resultados de límites microbianos se observan en el **Cuadro 23**.

Las pruebas de control de calidad se muestran en el **Anexo F**, junto con la propuesta de monografía farmacopéica para la raíz de *Valeriana edulis ssp procera*.

### 9.5.1 Examen visual e inspección microscópica

#### 9.5.1.1 Descripción Macroscópica

La Valeriana está compuesta por las partes subterráneas de *Valeriana edulis ssp procera*, incluidos el rizoma, las raíces y los estolones (**Figura 14**)<sup>3,48</sup>.



**Figura 14.** *Valeriana edulis ssp procera* proveniente de Mixim® utilizada para la validación del método analítico y pruebas de control de calidad.

### 9.5.1.2 Descripción Microscópica

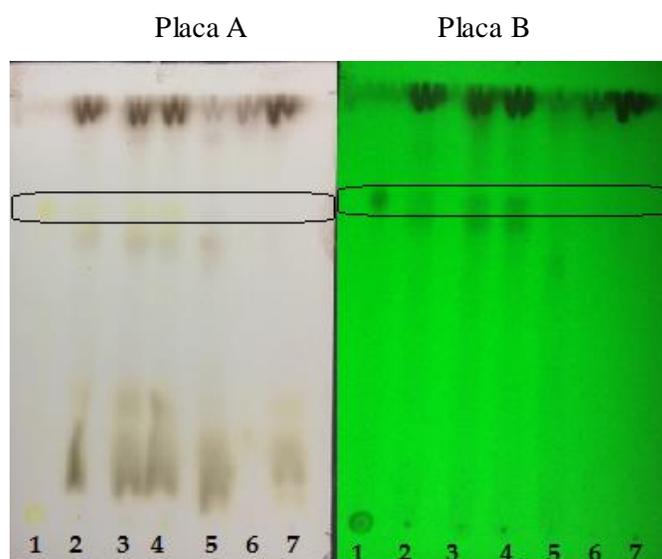
Las raíces consisten en una epidermis con 7-8 capas de células acorchadas-lignificadas, que contiene una sustancia de color marrón rojizo. La corteza exterior tiene de 7 a 15 capas de células colenquimatosas con forma rectangular, a veces redondeadas, con contenido de color marrón rojizo. La endodermis 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  $\mu\text{m}$  (**Figura 15**).<sup>3</sup>



**Figura 15.** Corte transversal de la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* (modificado de la referencia 3).

### 9.5.2 Cromatografía en capa fina

Se observaron 4 compuestos distintos en luz UV a 254 nm. Se utilizó como revelador principal al sulfato cérico amoniacal, los Rf fueron respectivamente de 0.87, 0.74, 0.61, 0.47. La linarina que se tomó como compuesto marcador para esta especie de *Valeriana* tiene un  $R_f \approx 0.61$  (Figura 16).



**Figura 16.** Cromatografía en capa fina de linarina (1), *V. edulis* proveniente de un extracto comercial (2), *V. edulis* de colecta (3), *V. edulis* nuestra 2 (4), *V. officinalis* (5), Extracto comercial de *Valeriana* (6) y *Valeriana* sin especie especificada (7). Se observa la presencia de linarina en las muestras 2-5 con revelador de sulfato cérico amoniacal (Placa A) y a 254 nm (Placa B).

<b>Cuadro 15.</b> Cantidad y porcentaje de materia extraña obtenida al examinar muestras individuales de 500 g.		
<b>Muestra (g)</b>	<b>Materia extraña (g)</b>	<b>% Materia extraña</b>
500	0.154	0.0308
499.5	0.5439	0.1089
500	0.3539	0.0708
500.1	0.1781	0.0356
500.1	0.2141	0.0428
500.1	0.3317	0.0663
<b>Promedio</b>		0.0592
<b>Desviación estándar</b>		0.0267
<b>Error estándar de la media</b>		0.0109

**Cuadro 16.** 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
<b>Promedio</b>					5.7871
<b>Desviación estándar</b>					0.1251
<b>Error estándar de la media</b>					0.0361
<b>Coefficiente de Variación</b>					0.5997

**Cuadro 17.** Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas solubles en agua que representan las sales solubles en agua contenidas en la muestra después de su incineración.

# Crisol	Peso del crisol	Peso de la muestra	Cenizas Totales	Cenizas Insolubles	Cenizas insolubles en agua	Cenizas solubles en agua	% Cenizas solubles en agua
1	28.1928	1.992	0.1127	28.2436	0.0508	0.0619	3.1074
2	28.1156	1.9919	0.1133	28.168	0.0524	0.0609	3.0574
3	26.2951	1.9928	0.1145	26.3479	0.0528	0.0617	3.0961
4	27.1551	2.0072	0.1171	27.2075	0.0524	0.0647	3.2234
5	24.1725	1.9996	0.1165	24.2263	0.0538	0.0627	3.1356
6	24.0364	1.9921	0.1171	24.0889	0.0525	0.0646	3.2428
<b>Promedio</b>							3.1438
<b>Desviación estándar</b>							0.0738
<b>Error estándar de la media</b>							0.0301
<b>Coefficiente de Variación</b>							0.9590

**Cuadro 18.** Cantidad y porcentaje obtenido de cenizas insolubles en ácido que representan la cantidad de sílice, arenas y tierra silíceas presente en la muestra.

# Crisol	Peso del crisol	Peso de la muestra	Cenizas Insolubles	Cenizas insolubles en ácido	% Cenizas insolubles en ácido
7	25.3961	1.9907	25.3977	0.0016	0.0804
8	26.5993	1.9927	26.6	0.0007	0.0351
9	15.4079	1.9985	15.4086	0.0007	0.0350
10	27.4265	1.9992	27.4276	0.0011	0.0550
11	34.1509	1.9969	34.1547	0.0038	0.1903
12	15.65	2.0026	15.6538	0.0038	0.1898
<b>Promedio</b>					0.0976
<b>Desviación estándar</b>					0.0735
<b>Error estándar de la media</b>					0.0300
<b>Coefficiente de Variación</b>					30.75

**Cuadro 19.** 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
<b>Promedio</b>				12.2134
<b>Desviación estándar</b>				0.6064
<b>Error estándar de la media</b>				0.2476
<b>Coefficiente de Variación</b>				2.0271

**Cuadro 20.** 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
<b>Promedio</b>				38.6996
<b>Desviación estándar</b>				0.7908
<b>Error estándar de la media</b>				0.3229
<b>Coefficiente de Variación</b>				0.8343

**Cuadro 21.** Cantidad en gramos y porcentaje de pérdida por secado en Termobalanza de muestras de 2 g.

Peso Inicial	% Pérdida
2.0012	10
2.0015	9.5
2.0006	8.1
2.0012	8.6
2.0014	9.5
2.0005	10
<b>Promedio</b>	9.283
<b>Desviación estándar</b>	0.773
<b>Error estándar de la media</b>	0.316
<b>Coefficiente de Variación</b>	3.3998

**Cuadro 22.** 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)	% pérdida 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
<b>Promedio</b>				7.9825
<b>Desviación estándar</b>				0.1657
<b>Error estándar de la media</b>				0.0677
<b>Coefficiente de Variación</b>				0.8476

### 9.5.3 Arsénico y metales pesados.

Se reportó el análisis realizado por el departamento de Control Analítico de la Facultad de Química de la UNAM, el cual utilizó la metodología descrita en la FEUM 10 edición, MGA 0561(método II. Calcinación de la muestra); reportando que la cantidad de metales pesados presentes en la muestra es menor a 10 ppm.

#### 9.5.4 Determinación de microorganismo

El análisis se realizó por el Departamento de Control Analítico (**Cuadro 23**), en el cual se utilizó la metodología descrita en la FEUM 10 edición, MGA 0571. Método de vaciado en placa y determinación de microorganismos específicos.

**Cuadro 23.** Análisis microbiológico de *Valeriana edulis ssp procera*, cuenta de microorganismos totales y presencia de principales patógenos.

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

UFC= Unidades Formadoras de Colonias.

## 9.6 Certificado de análisis para la raíz de *Valeriana edulis ssp. procera*.

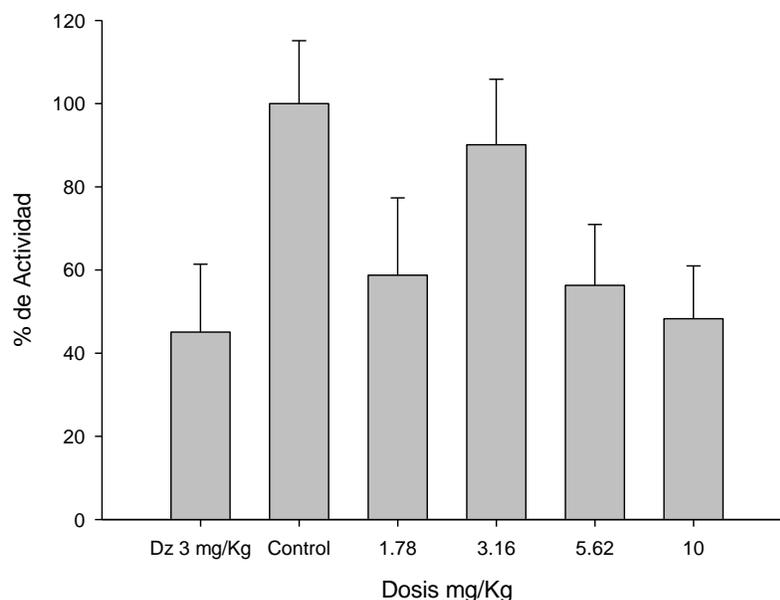
En el **Cuadro 24** se observa el certificado de análisis para la raíz de *Valeriana edulis ssp. procera* la cual es utilizada como materia prima para distintos medicamentos herbolarios así como remedio herbolarios por lo cual es importante cumpla con los parámetros de calidad para su consumo.

<b>Cuadro 24.</b> Certificado de análisis de materia prima para la raíz de <i>Valeriana edulis ssp. procera</i> .		
<b>Análisis</b>	<b>Límites</b>	<b>Resultados</b>
MGA-FH 0030 Materia extraña.	No más del 2%	Conforme. $\bar{Y}=0.0592\%$
MGA-FH 0050 Cromatografía en Capa Fina.	Rf $\approx$ 0.61	Rf $\approx$ 0.61.
MGA-FH 0060 Determinación de cenizas.	<b>Cenizas totales.</b> No más de 10% <b>Cenizas insolubles en ácido.</b> No más de 1.5% <b>Cenizas solubles en agua.</b> No más de 5%	<b>Cenizas totales.</b> Conforme. $\bar{Y}=5.7871$ <b>Cenizas insolubles en ácido.</b> Conforme. $\bar{Y}=0.0976$ <b>Cenizas solubles en agua.</b> Conforme. $\bar{Y}=3.1438$
MGA-FH 0070 Material extraíble.	<b>Método I.</b> No más de 10% para etanol. <b>Método II.</b> No menos de 35% para agua.	<b>Método I.</b> No conforme. $\bar{Y}=12.2134$ <b>Método II.</b> No conforme. $\bar{Y}=38.6996$
MGA-FH 0080 Agua y material volátil.	No más de 10%	<b>Termobalanza.</b> Conforme. $\bar{Y}=9.283$ <b>Estufa.</b> Conforme. $\bar{Y}=7.9825$
MGA 0561 Arsénico y metales pesados.	No más de 10 ppm	Conforme. Menos de 10 ppm
MGA 0571 Determinación de microorganismos.	<b>Bacterias aerobias.</b> Menos de $10^7$ UFC/g. <b>Levaduras y hongos.</b> Menos de $10^4$ UFC/g. <b>Escherichia coli.</b> Menos de $10^2$ UFC/g. <b>Otras enterobacterias.</b> Menos de $10^4$ UFC/g. <b>Salmonella spp.</b> Ninguna.	<b>Bacterias aerobias.</b> Conforme. $125000 \text{ UFC/g}$ <b>Levaduras y hongos.</b> Conforme. $10 \text{ UFC/g}$ y $50 \text{ UFC/g}$ respectivamente <b>Escherichia coli.</b> Conforme. Negativo <b>Otras enterobacterias.</b> Conforme. <b>Presencia de Pseudomona aeruginosa</b> <b>Salmonella spp.</b> No conforme. Positivo
MGA-FH 0070 Material extraíble.	<b>Método I.</b> No más de 10% para etanol. <b>Método II.</b> No menos de 35% para agua.	<b>Método I.</b> No conforme. $\bar{Y}=12.2134$ <b>Método II.</b> No conforme. $\bar{Y}=38.6996$
MGA-FH 0080 Agua y material volátil.	No más de 10%	<b>Termobalanza.</b> Conforme. $\bar{Y}=9.283$ <b>Estufa.</b> Conforme. $\bar{Y}=7.9825$
MGA 0561 Arsénico y metales pesados.	No más de 10 ppm	Conforme. Menos de 10 ppm

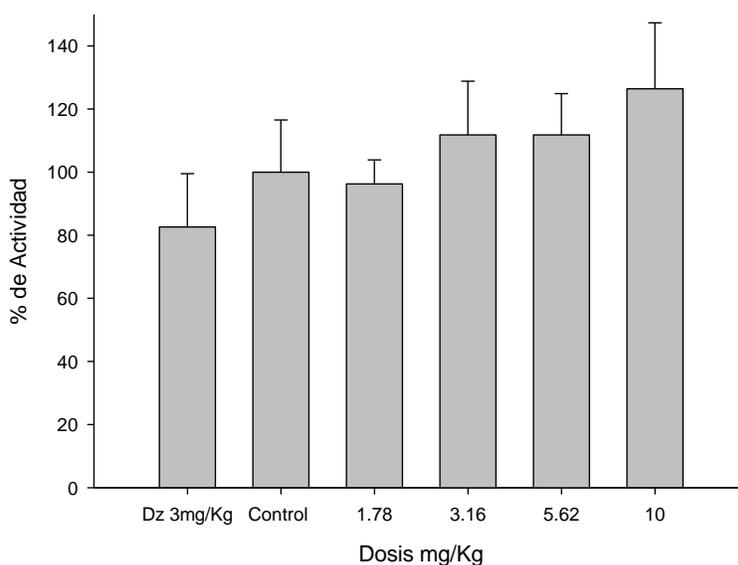
**NOTA.** Las especificaciones se tomaron de los métodos generales de análisis de la FHEUM y la FEUM.

## 9.7 Evaluación del perfil neurofarmacológico.

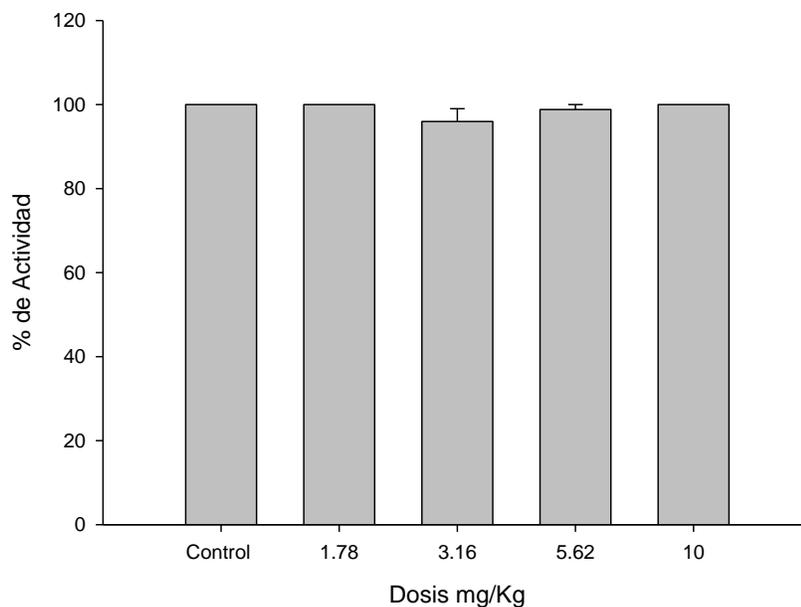
La linarina no presentó efecto sedante [ $p=0.075$  (**Figura 17**)], ansiolítico [ $p=0.504$  (**Figura 18**)], miorrelajante [ $p=0.19$  (**Figura 19**)] ni potenció el efecto hipnótico del pentobarbital ni en latencia ni en duración del efecto [ $p=0.836$  (**Figura 20 y 21**)] hasta la dosis de 10 mg/kg. Solamente a la dosis de 10 mg/kg presentó alteración de la coordinación motora [ $p<0.05$  (**Figura 22**)]



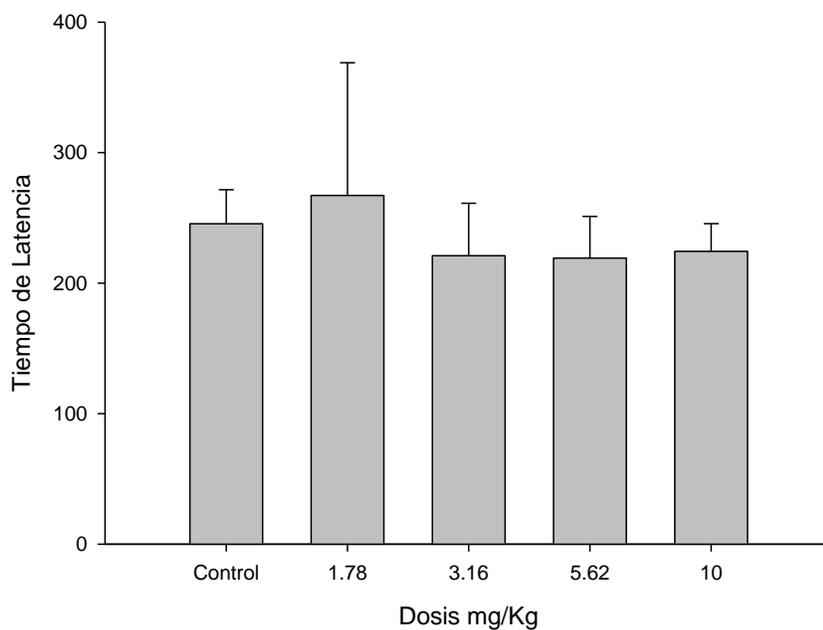
**Figura 17.** Gráfico de porcentaje de actividad en el cilindro de exploración de las distintas concentraciones de linarina, en el cual se tomó como el 100% de actividad el número de levantamientos que presentó el grupo control. Se realizó ANOVA y estadísticamente no presenta diferencia significativa ( $P=0.075$ ). Cada barra representa la media de seis determinaciones  $\pm$  EEM.



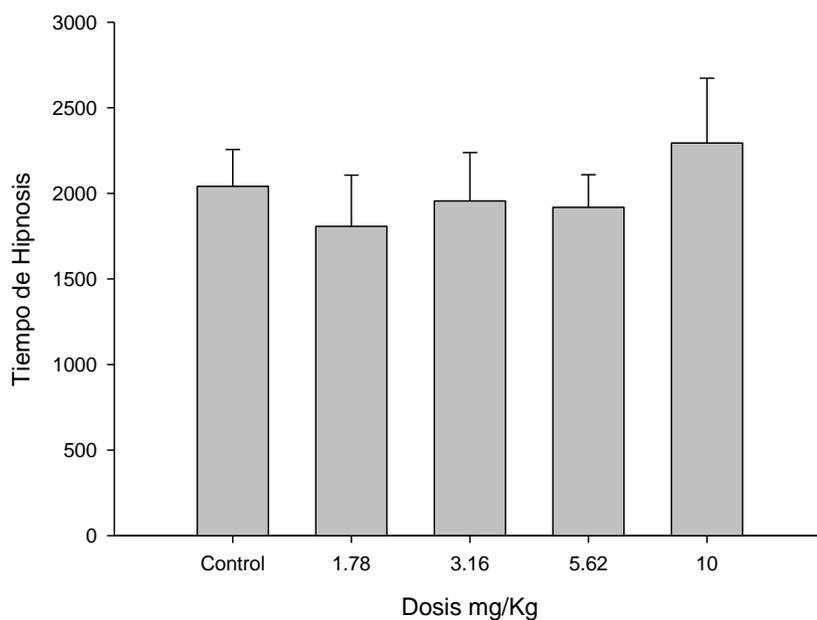
**Figura 18.** Gráfico de porcentaje de actividad en el tablero de hoyos de las distintas concentraciones de linarina, en el cual se tomó como el 100% de actividad el número de veces que el grupo control introdujo la cabeza en un orificio. Se realizó ANOVA y estadísticamente no presenta diferencia significativa ( $P=0.504$ ). Cada barra representa la media de seis determinaciones  $\pm$  EEM.



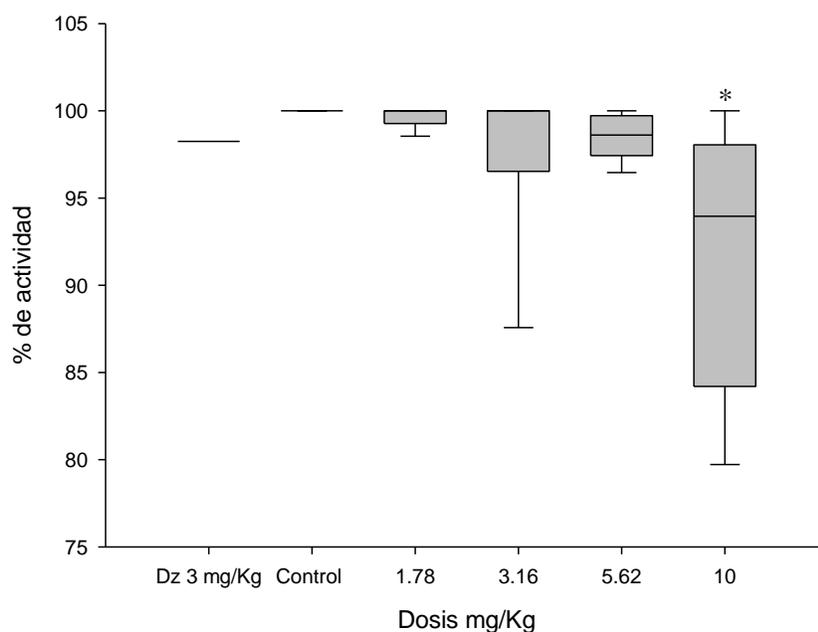
**Figura 19.** Gráfico de porcentaje de actividad en la prueba de tracción de las distintas concentraciones de linarina, en el cual, el 100% de actividad corresponde al área bajo la curva (ABC) del grupo control. Se realizó ANOVA y estadísticamente no presenta diferencia significativa ( $P=0.190$ ). Cada barra representa la media de seis determinaciones  $\pm$  EEM.



**Figura 20.** Gráfico del tiempo de latencia de las distintas concentraciones de linarina junto con pentobarbital sódico (60 mg/Kg). No existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ( $p=0.836$ ). Cada barra representa la media de seis determinaciones  $\pm$  EEM.



**Figura 21.** Gráfico del tiempo de hipnosis de las distintas concentraciones de linarina junto con pentobarbital sódico (60 mg/Kg). No existe diferencia estadísticamente significativa con respecto al grupo control ( $p=0.809$ ). Cada barra representa la media de seis determinaciones  $\pm$  EEM.



**Figura 22.** Gráfico de porcentaje de actividad en el Rota-Rod de las distintas concentraciones de linarina, en el cual, el 100% de actividad corresponde al área bajo la curva (ABC) del grupo control. Se realizó análisis estadístico por Kruskal-Wallis con una Post Hoc de Dunn's obteniendo una diferencia estadísticamente significativa (\* $P < 0.05$ ) entre el grupo control y el grupo administrado con la dosis más alta de linarina (10 mg/Kg). Cada caja representa la mediana de nueve determinaciones y el rango.

## 10 Discusión de Resultados

Se demostró que el método analítico desarrollado es capaz de cuantificar linarina como compuesto marcador de *Valeriana edulis ssp procera*. Aun con la presencia de flavonas estructuralmente similares como hesperidina, este método es específico y puede diferenciar entre ambos flavonoides (**Figura 11**).

Al realizar la exactitud del método se obtuvo un porcentaje de recobro menor al 100 % esto se debe a que parte de la solución stock es absorbida por el placebo analítico lo cual impide recuperar el 100% de la concentración adicionada de linarina (**Cuadro 10**) debido a que al preparar el placebo analítico la raíz se llevó a ebullición con metanol lo cual pudo modificar algunas propiedades de la materia vegetal y por esto se retiene el compuesto. Sin embargo, al realizar una prueba con muestras cargadas de linarina se obtuvo un porcentaje de recobro del 100% con un CV igual a 1.86% (**Cuadro 11**) lo cual demuestra que el método es exacto.

Con los parámetros evaluados en la validación (**Anexo F**) este método analítico es capaz de identificar y cuantificar linarina aun en cantidades muy pequeñas debido al límite de cuantificación que presenta (2.75µg/ mL) por lo cual es de gran utilidad para el análisis de materia prima y distintas formas farmacéuticas que contengan al género *Valeriana*.

Al realizar el control microbiológico a la raíz de *Valeriana mexicana* se encontró *Salmonella spp* y *Pseudomona aeruginosa* (**Cuadro 23**); esto se debe principalmente al manejo del material vegetal en las distintas etapas del proceso que van desde el tipo de suelo en el que se cosecha, el agua de riego, las condiciones en las que se maneja y su almacenamiento por lo cual es preciso implementar y estandarizar procedimientos para el cultivo y la producción de materias primas provenientes de plantas.<sup>36</sup>

Se propuso una monografía farmacopéica para la raíz de *Valeriana edulis ssp procera* con un método desarrollado y validado para esta especie endémica y que además se puede aplicar a distintas especies del genero *Valeriana* sin las limitaciones del método analítico reportado actualmente en distintas farmacopeas (**Anexo F**).

Finalmente se comprobó que la administración de linarina vía intraperitoneal no disminuye el tiempo de latencia y no aumenta el tiempo de hipnosis inducido con pentobarbital sódico, por lo

cual no tiene un efecto depresor del sistema nervioso central; el perfil neurofarmacológico de linarina no concuerda con lo descrito en la literatura, quizá esto se deba a la potenciación del efecto sedante del pentobarbital sódico con etanol al administrar linarina en solución alcohólica al 10%.

Con base en lo anterior se explica el efecto sedante de linarina reportado por Fernández y colaboradores <sup>28</sup>. Por lo cual, la linarina al no tener un efecto biológico, es un compuesto que sólo sirve como marcador analítico para el género *Valeriana*.

## 11 Conclusiones

Se desarrolló y se hizo la validación de un método por cromatografía de líquidos con una columna Symmetry C18 250mm x 4.6mm d.i. con tamaño de partícula de 5µm a una temperatura de 25°C, con un detector de UV a 269 nm, un volumen de muestra de 20 µL/min y un flujo de 1ml/min para cuantificar linarina como compuesto marcador analítico en materia prima y extractos de *Valeriana edulis ssp procera* y se determinaron las especificaciones farmacopéicas para esta planta medicinal mexicana que sirven de base para incluir su monografía en la Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos.

## 12 Perspectivas

- Realizar pruebas de control de calidad a muestras de *Valeriana edulis ssp. procera* provenientes de distintos lugares con la finalidad de que los resultados obtenidos sean homogéneos y representativos de la especie.
- Aplicar el método analítico para tener un estudio comparativo entre las distintas especies de *Valeriana*.

## 13 Referencias

1. Francis AJP., Dempster RJW. Effect of valerian, *Valeriana edulis*, on sleep difficulties in children with intellectual deficits: randomized trial. *Phytomedicine*. 2002;9(4):273-279.
2. Arellano A., Villegas G., Uriostegui C., Alvarez L., Pineda G., Alvarez 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.
3. Joshi V., Navarrete A., Khan I. Authentication of *Valeriana procera* Kunth and comparative account of five *Valeriana* species. *J AOAC Int*. 2005; 88(6):1621-1625.
4. Navarrete A., Avula B., Choi YW., Khan IA. Chemical Fingerprinting of *Valeriana* Species: Simultaneous Determination of Valerenic Acids, Flavonoids, and Phenylpropanoids Using Liquid Chromatography with Ultraviolet Detection. *J AOAC Int*. 2006;89(1):8-15.
5. Cortez V., Macedo J.P., Hernandez M., Arteaga G., Espinoza D., Rodriguez J.F. Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. *Revista Biomédica*. 2004; 15 (2):123-136.
6. Lozoya X. La Herbolaria en México. CONACULTA. México D.F. 1998.
7. Hersch P. La Farmacopea Nacional y el estatuto terapéutico de la flora en la biomedicina mexicana. *DYNAMIS. Acta Hispanica ad Medicinæ Scientiarumque Historiam Illustrandam*. 2001; 21:375-407.
8. México. Secretaría de Salud; NOM-001-SSA1-2010, “QUE INSTITUYE EL PROCEDIMIENTO POR EL CUAL SE REVISARA, ACTUALIZARA Y EDITARA LA FARMACOPEA DE LOS ESTADOS UNIDOS MEXICANOS”. Diario Oficial de la Federación; 26 Enero 2011.
9. Castro R. La monografía de los productos naturales de uso en salud. Registro y Control de Calidad de recursos y Productos Naturales de Uso en Salud. 1999; 9:23-24.

10. Waskman N. Control de calidad de Fitofármacos. *Conocimiento*. 2009; 89: 17-23.
11. 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.
12. FHEUM. Farmacopea Herbolaria de los Estados Unidos Mexicanos, Segunda edición. Comisión Permanente de la Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos. México 2013.
13. Koll K., Reich E., Blatter A., Vait M. Validation of standardized high-performance thin-layer chromatographic methods for quality control and stability testing of herbals. *J AOAC Int*. 2003;86 (5):909-915.
14. Center for drug evaluation and research. Guidance for industry. Botanical drug products. Food and drug administration. United States of America 2004.
15. European Medicines Agency. “Committee on herbal medicinal products. Guideline on specifications: test procedures and acceptance criteria for herbal substances, herbal preparations and herbal medicinal products/ traditional herbal medicinal products”. Union europea 2011.
16. Gaedcke F.W., Steinhoff K.B., Blasius R.H., Herbal Medicinal Products. Scientific and Regulatory Basis for Development, Quality Assurance and Marketing Authorisation. *Medpharm Scientific Publishers*. Stuttgart, Germany. 2003.
17. Reich E, Schibli A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. *Thieme Medical Publishers*. United States of America 2006.
18. Schilter B., Andersson C., Anton R., Constable A., Kleiner J., Brien J.O., Renwick A.G., Korver O., Smit F., Walker R. Guidance for the safety assessment of botanicals and botanical preparations for use in food and food supplements. *Food Chem Toxicol*. 2003(12); 41:1625-1649.

19. Bos R., Hendriks H., Scheffer J., Woerdenbag H. Cytotoxic potential of *Valerian* constituents and valerian tinctures. *Phytomedicine*. 1998;5(3):219-225.
20. Rzedowski G.C., Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
21. Rzedowski G.C., Rzedowski J. 2003. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. 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; Fascículo 112. Michoacán. México.
22. Mabberley D.J. The Plant Book: A Portable Dictionary of the Higer Plants, 2<sup>nd</sup> Ed. Cambridge University Press. Cambridge, UK 1997.
23. Boon H, Smith M, The Complete Natural Medicine Guide to the 50 Most Common Medicinal Herbs. 2ed. Toronto; 2004;264-267.
24. Encyclopedia of Life. National Museum of Natural History, Department of Botany. Missouri Botanical Garden. USA, 2013. URL: <http://eol.org/pages/488756/overview>
25. Bos R., Woerdenbag H., Pras N. Determination of valepotriatos. *J Chromatogr*. 2002; 967: 131-346.
26. Ugalde M., Reza V, González M., Avula B., Ikhlas A., Navarrete A. Isobolographic analysis of the sedative interaction between six central nervous system depressant drugs and *Valeriana edulis* hydroalcoholic extract in mice. *J Pharm and Pharmacol*. 2005;57(5):631-639.
27. Johnston G., Hanrahan J., Chebib M., Duke R., Mewett K. Modulation of ionotropic GABA receptors by natural products of plant origin. *Adv in Pharmacol*. 2006; 54:285-316.

28. Fernandez S., Wasowski C., Paladini C., Marder M. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. *Pharmacol Biochem Be.* 2004;(2) 399–404.
29. Olivia I., Trujano E., Arrieta J., Enciso R., Navarrete A. Neuropharmacological Profile of Hydroalcohol Extract of *Valeriana edulis ssp. procera* Roots in mice. *Phytoter Res.* 2004;18(4):290-296.
30. Estrada S. S., Arteaga G. V., Castillo E. P., Molina S. G. M., Said F. S., Navarrete V. G. Anti-mycobacterial activity of extracts from plants used in Mexico for the treatment of infectious diseases. *PHCOG Mag.* 2009;4(18):106-110.
31. Martínez V., Ramirez O., Aguilar H., Bye R. Analgesic and Antipyretic activities of an aqueous extract and of the flavone linarin of *Buddleia cordata*. *Planta Med.* 1996;62(2):137-140.
32. Fan P., Hay A., Marston A., Hostettmann K. Acetylcholinesterase-Inhibitory activity of linarin from *Buddleja davidii*, structure-activity relationships of related flavonoids, and chemical investigation of *Buddleja nitida*. *Pharm Biol.* 2008; 46(9):596-601.
33. Lou H., Fan P., Perez R., Lou H. Neuroprotective effects of linarin through activation of the PI3K/Akt pathway in amyloid-b-induced neuronal cell death. *Journal of Bioorg. Med. Chem.* 2011; 19(13):4021-4027.
34. Zhang Q., Li J., Wang C., Sun W., Zhang Z., Cheng W. A gradient HPLC method for the quality control of chlorogenic acid, linarina and luteoin in *Flos Chrysanthemi Indici* suppository. *J Pharm Biomed Anal.* 2006; (43) 753-757.
35. Jia Y., Li J., Tan J., Li Q., Bi K. RP-HPLC determination of Linarina in Beagle Dog Plasma After administration of Yejuhua Injection. *Chromatographia.* 2006; 64(5): 303-305.
36. Ganzera M., Pöcher A., Stuppner H. Differentiation of *Cirsium japonicum* and *C. setosum* by TLC and HPLC-MS. *Phytochem Analysis.* 2005; (16): 205-209.

37. Gonzales- Trujano M.E., Martínez A.L., Reyes-Ramírez A., Reyes Trejo B., Navarrete A. Palmitone Isolatd From *Annona diversifolia* Induces Anxiolytic-Like Effect in Mice. *Planta Med.* 2006; 72:703-707.
38. Secretaria de Agricultura, Ganaderia, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Norma Oficial Mexicana. NOM-062-ZOO-1999. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. México. 1999.
39. International Conference On Harmonisation Of Technical Requirements For Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. Validation Of Analytical Procedures: Text And Methodology Q2 (R1). Noviembre 2005.
40. Almeida A.M., Castel-Blanco M.M., Falcão A.C. Linear regresión for calibration lines revisited: weighting schemes for bioanalytical methods. *J Chromatogr B.* 2002; 774:215-222.
41. Domínguez M. Capitulo IV. El arsénico y la salud. Monografías de la real academia nacional de farmacia. Monografía XXII. *Contaminacion y salud.* 2007; 153-243.
42. Hiller K.O., Zetler G. Neuropharmacological Studies on Ethanol Extracts of *Valeriana officinalis L.*: Behavioural and Anticonvulsant Properties. *Phytoter Res.* 1996;(10):145-151.
43. 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.
44. Gonzales-Trujano M.E., Navarrete A., Reyes B., Hong E. Some Pharmacological Effects of the Ethanol Extract of Leaves of *Annona diversifolia* on the Central Nervous System in Mice. *Phytoter Res.* 1998;(12):600-602.
45. Singh R. P, Agrawal P, Yim D, Agarwal C, Agarwal R. 2005 Acacetin inhibits cel growth and cell cycle progression, and induces apoptosis in human prostate cancer cells: structure-activity relationship with linarina and linarina acetate. *Carcinogenesis.* 26(4):845-854.

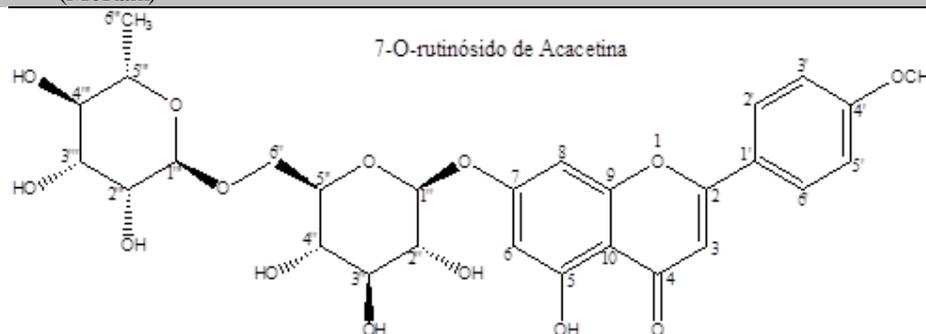
46. Marin P. D, Grayer R. J, Veitch N. C, Kite G. C, Harborne J. B. 2001 Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*. *Phytochem.* 58: 943-947.
47. Martínez M.A. Flavonoides. Tesis doctoral. Universidad de Antioquia. Facultad de Química Farmaceutica. Departamento de Farmacia. Medellín Colombia. 2005.
48. The United States Pharmacopeia Convention. 2013. United States Pharmacopeia 36. United States of America: 1780.

## 14 Anexos

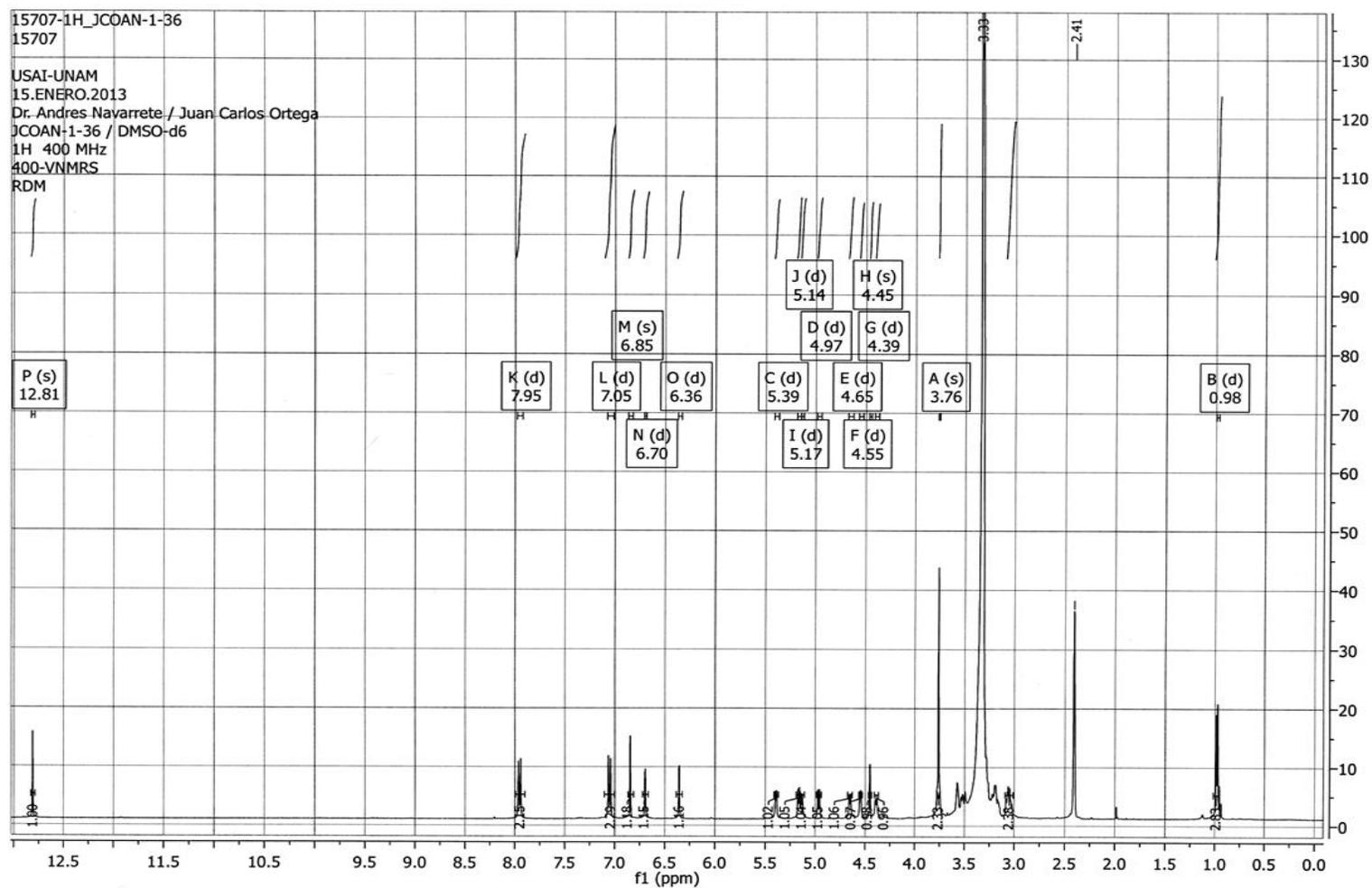
## Anexo A. Espectro de Resonancia Magnética Nuclear (RMN)

**Cuadro 25.** Señales de los espectros de RMN  $^1\text{H}$  y  $^{13}\text{C}$  para linarina que concuerdan con los descritos en la literatura.<sup>45,46</sup>

Posición	$^1\text{H}$ (ppm)	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	-	-
2	-	163.04
3	6.85	103.89
4	-	182.14
5	-	157.08
-OH	12.81	-
6	6.36	100.63
7	-	164.07
8	6.70	94.88
9	-	161.23
10	-	105.55
1'	-	122.75
2'	7.95	128.58
3'	7.05	114.82
4'	-	162.53
-OCH <sub>3</sub>	3.76	55.66
5'	7.05	114.82
6'	7.95	128.58
1''	4.97	99.96
2''	4.39-5.39	73.16
3''	4.39-5.39	76.32
4''	4.39-5.39	69.68
5''	Oscurecido por DMSO	75.74
6''	Oscurecido por DMSO	66.18
1'''	4.45	99.77
2'''	4.39-5.39	70.82
3'''	4.39-5.39	70.44
4'''	4.39-5.39	72.15
5'''	3.76	68.44
6''' (MeRam)	0.98	17.92

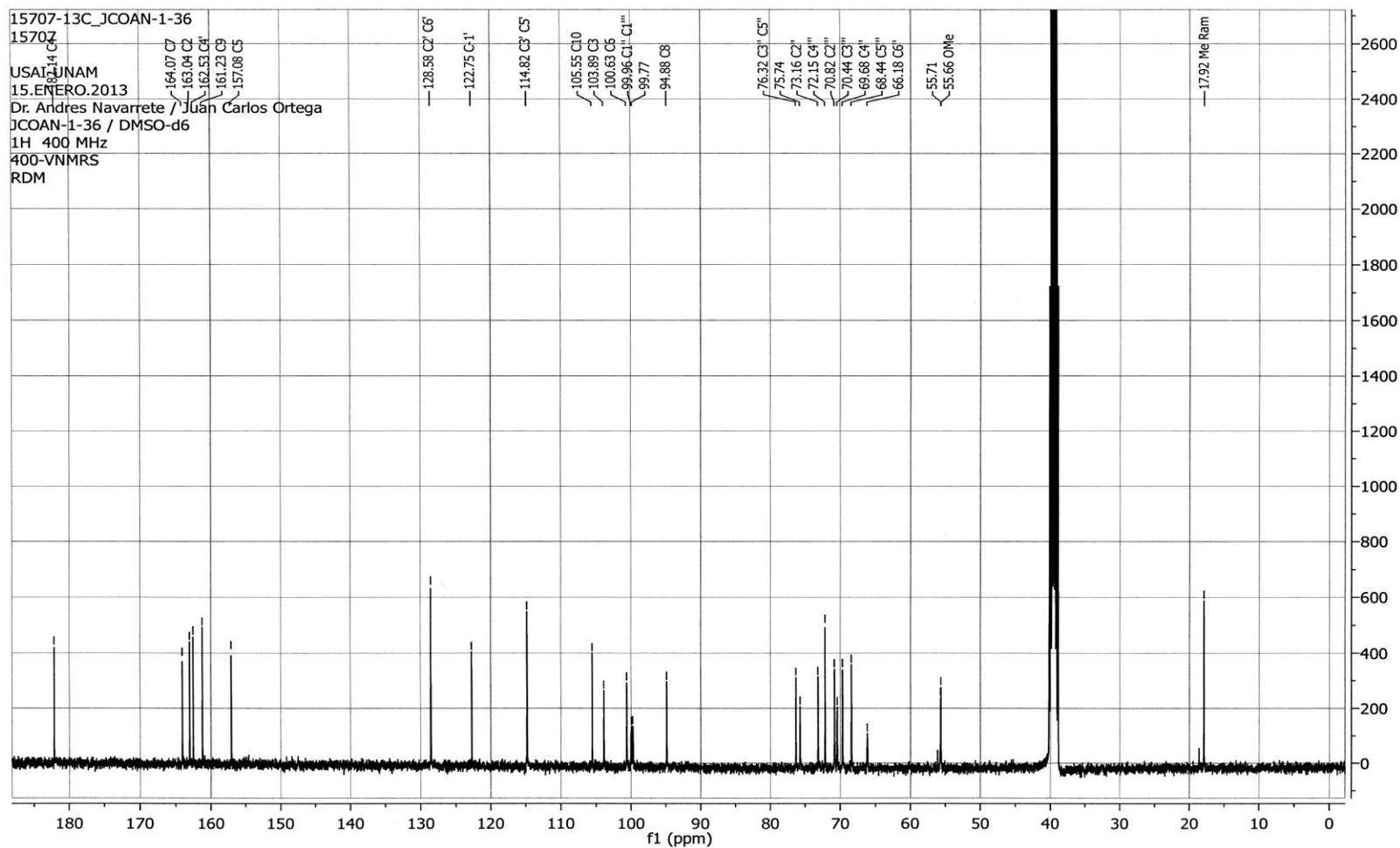


En la **Figura 23** se muestra la resonancia magnética nuclear  $^1\text{H}$  de linarina.



**Figura 23.** Espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ) mediante el cual se identificó el compuesto obtenido como linarina comparándolo con lo descrito en la literatura <sup>44,45,46</sup>.

En la **Figura 24** se muestra la resonancia magnética nuclear  $^{13}\text{C}$  de linarina.

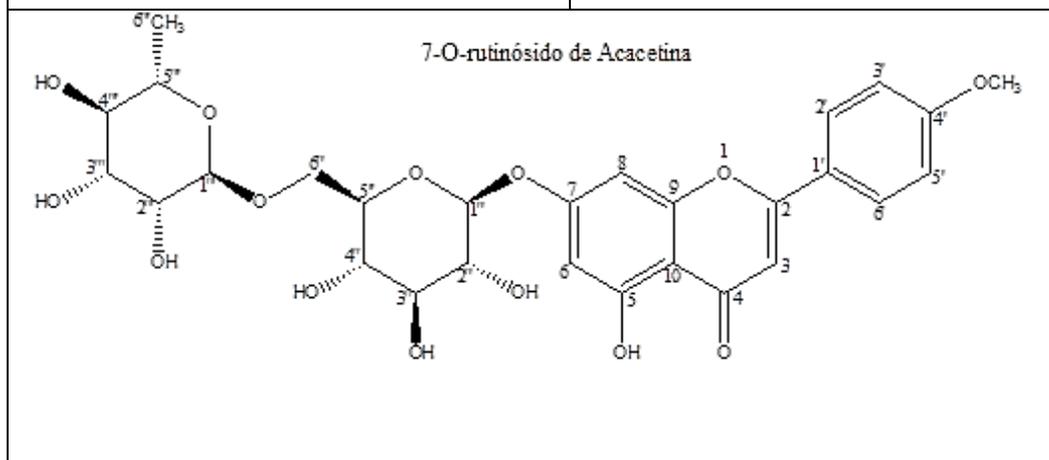


**Figura 24.** Espectro de  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  (100 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ) mediante la cual se identificó el compuesto obtenido como linarina, acorde con las descritas en la literatura.<sup>44,45,46</sup>

## Anexo B. Espectro de Infrarrojo (IR).

**Cuadro 26.** Señales del espectro de IR  $\nu_{m\acute{a}x}^{KBr}$  por lo cual se identificó el compuesto obtenido como linarina, comparada con los descritos en la literatura.<sup>44,45,46</sup>

Grupo funcional	Señal IR ( $cm^{-1}$ )
OH	3471
	3417
	2935
C=O	16058
C=C	1608
	1500
	1245
Glicósido	1070
	777



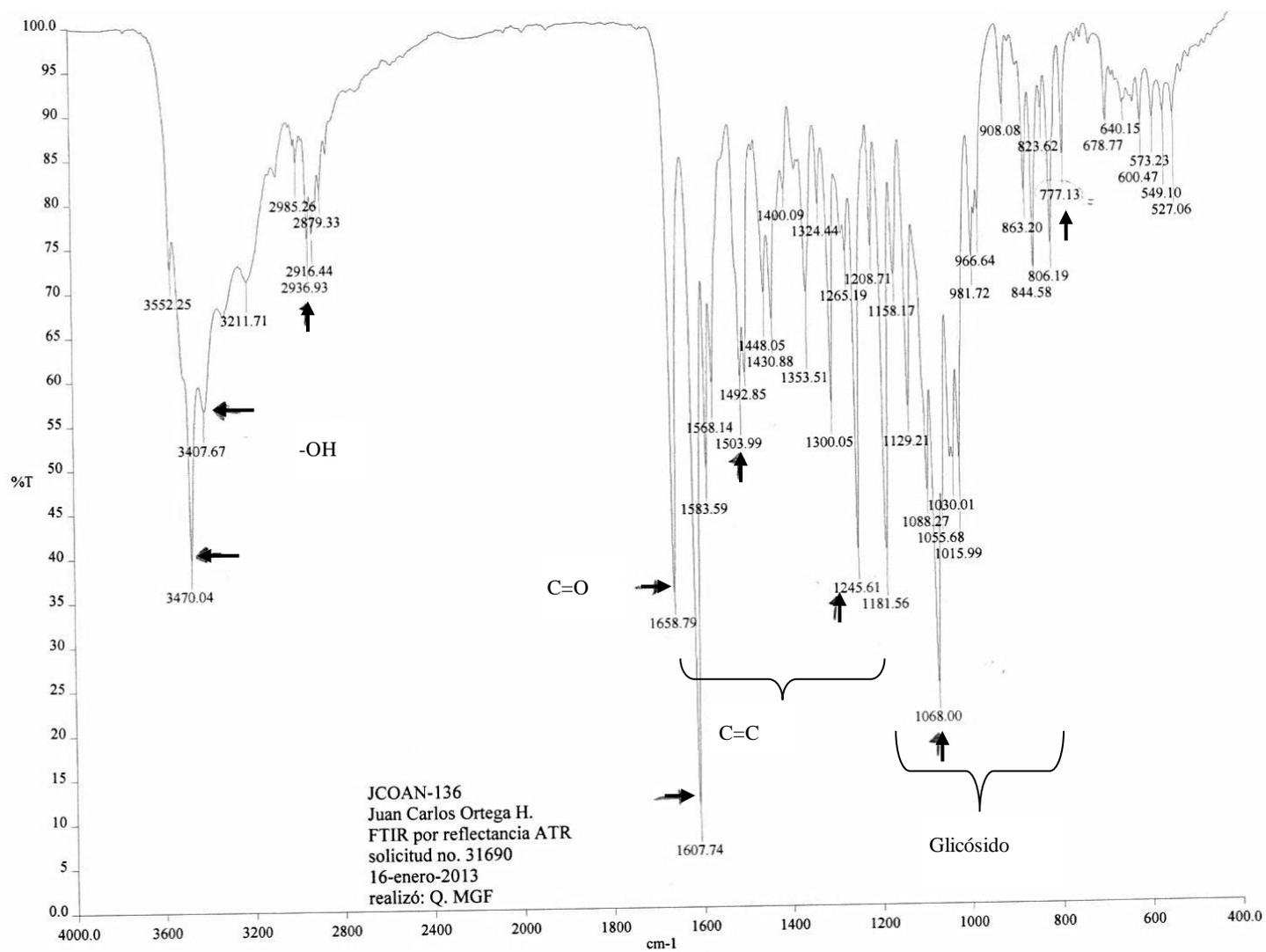
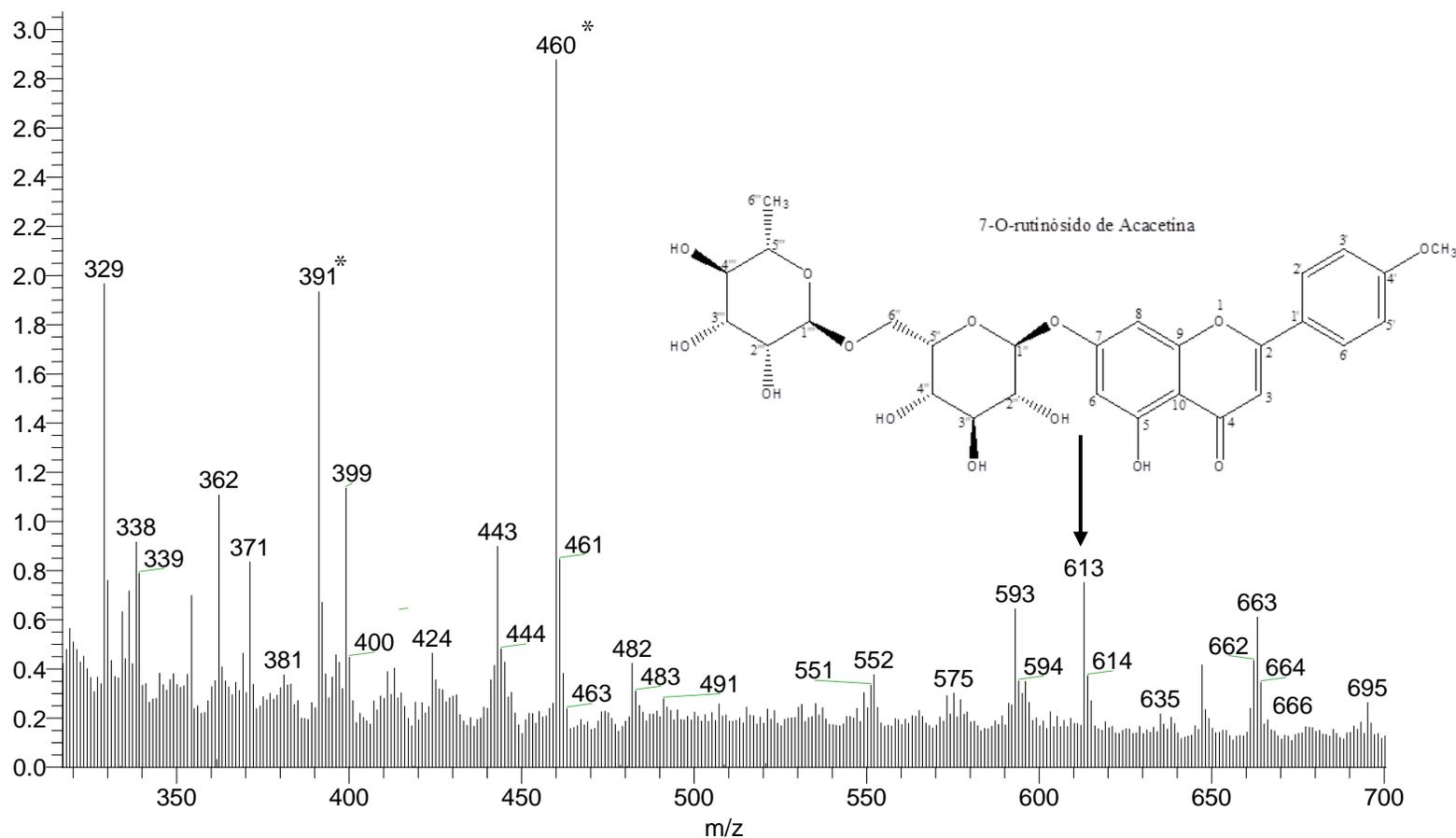


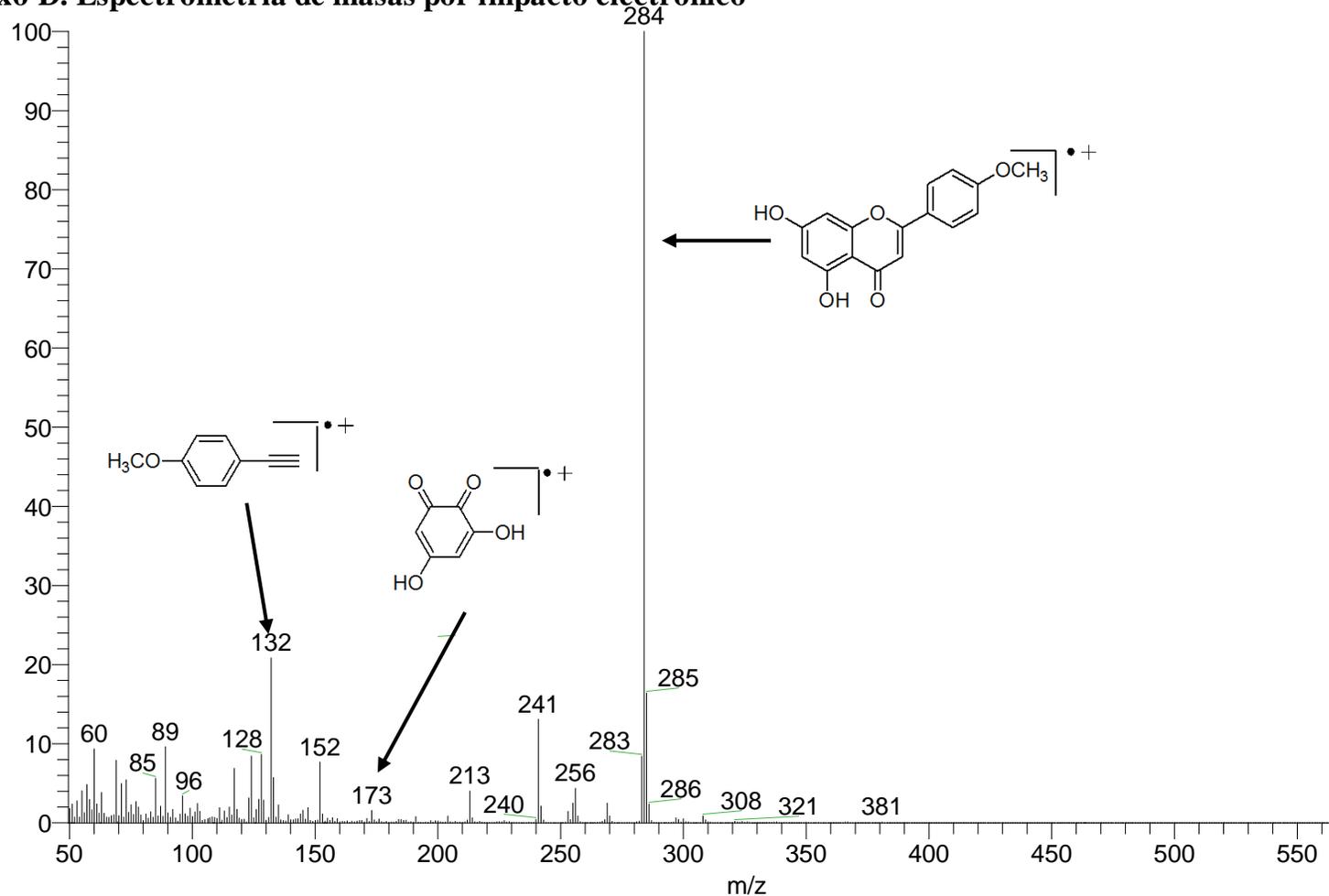
Figura 25. Espectro de IR  $\nu_{m\acute{a}x}^{KBr}$  por lo cual se identificó el compuesto obtenido como linarina.

## Anexo C. Espectro de masas FAB



**Figura 26.** Espectro EM (FAB+) se muestra una señal el (m/z 593  $[M+1]^+$ ) que corresponde al peso molecular de la linarina (592) más un  $H^+$  debido a que la molécula se protona. \* Señales correspondientes a la matriz de alcohol 3- Nitrobenílico.

Anexo D. Espectrometría de masas por impacto electrónico



**Figura 27.** Espectro de EM (IE)  $m/z$ , debido a que esta técnica no detecta los azúcares solo se observa una señal de la aglicona de la linarina (Acacetina) a  $m/z$  284 (100 %) y sus principales patrones de fragmentación 132 (20 %), 173(2 %).conforme a la literatura.<sup>47</sup>

**Anexo E. Parámetros de evaluación para la Validación del método analítico.**

<b>Cuadro 27.</b> Resumen de los parámetros determinados para la validación, criterios de aceptación evaluados y resultados obtenidos conforme a la guía de validación de la ICH. <sup>37</sup>			
<b>Parámetro</b>	<b>Criterio</b>	<b>Resultado</b>	<b>Dictamen</b>
<b>Sistema</b>			
Linealidad	$r^2 > 0.98$	0.999	Se acepta
	$CV \leq 2\%$	1.35%	Se acepta
Precisión	$CV \leq 2\%$	1.87%	Se acepta
Adecuabilidad	$(k') CV \leq 2\%$	1.14%	Se acepta
	$(t) CV \leq 2\%$	1.54%	Se acepta
<b>Método</b>			
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
	$IC(\mu) 98-102\%$	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)	$7.71 \times 10^{-4}$ mg/ mL	Se acepta
Límite de cuantificación	10 (s)	$2.57 \times 10^{-3}$ mg/ mL	Se acepta

$r^2$ =Coeficiente de correlación, CV= Coeficiente de Variación,  $k'$ = Factor de capacidad,  $t$ = factor de asimetría,  $IC(\mu)$ = Intervalo de confianza para la media poblacional,  $|di|$ = diferencia de la media aritmética de cada condición con respecto a la condición normal y  $s$ = Desviación estándar.

## **Anexo F. Propuesta de monografía farmacopéica.**

### **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.<sup>3,48</sup>

### **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  $\mu\text{m}^3$ .

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

**Soporte.** Gel de sílice F<sub>254</sub>.

**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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de linarina en metanol.

**Revelador.** Sulfato cérico amónico- 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  $R_f \approx 0.61$  la cual debe coincidir con la solución estándar.

**MATERIA EXTRAÑA.** MGA-FH 0030. 0.059 %  $\pm$  0.026 %.

**CENIZAS TOTALES.** MGA-FH 0060. 5.78 %  $\pm$  0.12%.

**CENIZAS INSOLUBLES EN ÁCIDO.** MGA-FH 0060. 0.097 %  $\pm$  0.07%.

**CENIZAS SOLUBLES EN AGUA.** MGA-FH 0060. 3.14 %  $\pm$  0.07%.

**MATERIAL EXTRAÍBLE.** MGA-FH 0070.

**Método I.** 12.21 %  $\pm$  0.60 % para etanol.

**Método II.** 38.69 %  $\pm$  0.79 % para agua.

**PERDIDA POR SECADO.** MGA-FH 0080. 7.98 %  $\pm$  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 %  $\pm$  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 104 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 5 $\mu$ m.

**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:

$$C_m = \left( \frac{C_r A_m}{A_r} \right) \times \frac{10000}{P_m}$$

Dónde:

**C<sub>m</sub>** = Concentración en mg de linarina en 1 g de muestra.

**C<sub>r</sub>** = Concentración de linarina en la solución de referencia (mg/mL).

**A<sub>m</sub>** = Área de la muestra.

**A<sub>r</sub>** = Área de la solución de referencia.

**P<sub>m</sub>** = Peso de la muestra en mg.

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