



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES.
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS.
ESCUELA DE BIOANÁLISIS.
CÁTEDRA COMPONENTES DE INVESTIGACIÓN
MÉRIDA - VENEZUELA



**ESTUDIOS DE LA ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE LOS EXTRACTOS
DE LA ESPECIE *Valeriana triplinervis* Turcz RECOLECTADA EN EL
ESTADO MÉRIDA**

(Trabajo de Grado para optar al Título de Licenciadas en Bioanálisis)

www.bdigital.ula.ve

Autoras:

Br. Cruz Mujica Génesis O. C.I V-20.407.401.

Br. España Cordoba Hilda R. C.I V-21.293.137.

Tutor:

Profa. Rondón, María Eugenia.

Mérida, Octubre de 2016.

DEDICATORIA

A la Santísima Trinidad (Padre, Hijo y Espíritu Santo), por permitirnos el regalo de la vida, darnos la fortaleza de seguir hacia adelante y llenarnos de entendimiento y paciencia a lo largo de nuestra carrera universitaria.

A nuestros familiares, amigos y profesores que nos motivaron y creyeron siempre en nosotras.

www,bdigital.ula.ve

AGRADECIMIENTOS

A Dios todopoderoso, por darnos el regalo de la vida y permitirnos cosechar el éxito después de tanto esfuerzo.

A nuestros padres, por el sacrificio, por sus consejos, su temple y el ímpetu cuando por más de una vez caímos en este largo camino, ustedes, tuvieron las palabras exactas para llenarnos de ánimo y seguir con nuestro objetivo.

A nuestros hermanos, por el apoyo incondicional, por estar allí, a veces a pesar de la distancia o de las ocupaciones personales, siempre fue reconfortante el saber que ustedes también creyeron en nosotras.

A nuestras amigas, de las que Dios te regala y en donde junto con ellas te sientes como en familia, Yenny, Angelismar y Jeisy; GRACIAS; porque cuando el camino pintaba tiempos de dificultad, ustedes cada una con su personalidad y ocurrencias hicieron que más de una lágrima se convirtiera en risas.

A los profesores, aquellos que muchas veces fueron nuestros padres y más de una vez nos dieron esos ánimos de seguir adelante y nunca desfallecer en medio de la adversidad, muchísimas gracias.

A esas personas que papá Dios pone en el camino de manera inesperada y se convierten en apoyo incondicional. GRACIAS.

A nuestra tutora María Eugenia Rondón, por toda la dedicación y abnegación con la que siempre nos atendió y ayudó en nuestra tesis, Dios la siga premiando en bendiciones.

A todas aquellas personas que siempre nos brindaron una palabra de aliento y que ahorita se nos saltan, LAS GRACIAS SON INFINITAS, Dios los bendiga eternamente.

Hilda y Genesis.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
ÍNDICE DE CONTENIDO	v
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
RESUMEN	xii
INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I. EL PROBLEMA	3
Planteamiento del problema	3
Justificación de la Investigación	6
Objetivos de la Investigación	8
<i>Objetivo general</i>	8
<i>Objetivos específicos</i>	8
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	10
Trabajo Previos	10
Usos etnobotánicos	10
Actividad farmacológica	11
Bases Teóricas	13
Aspectos botánicos y geográficos de la familia Valerianaceae (Caprifoliaceae)	13
Clasificación taxonómica	13
Características botánicas	14
Distribución geográfica	14
Género Valeriana L.	15

Características botánicas	15
Distribución geográfica en Venezuela	16
Composición química	17
Iridoides	19
Alcaloides	20
Características Botánicas y Distribución Geográfica de la especie Valeriana triplinervis (Turcz)	21
Extractos vegetales	24
Técnicas de extracción	24
Maceración	24
Lixiviación	24
Decocción	24
Extracción continua mediante Soxhlet	25
Cromatografía	24
Técnicas cromatográficas	25
Cromatografía en capa fina	25
Cromatografía gaseosa- espectrometría de masas	26
Cromatografía en columna (CC)	26
Cromatografía líquida de alta resolución de sus siglas en inglés (high performance liquid chromatography).	26
Infecciones bacterianas	27
Bacterias	27
Bacterias Gram positivas	27
Bacterias Gram negativas	28
Antibióticos /antibacteriano	29
Resistencia microbiana	29
Evaluación de la actividad antibacteriana	31

Dilución en Agar con discos o pozos (macrodilución/ microdilución)	31
Dilución en agar con discos	31
Microdilución	31
Hipótesis	33
CAPÍTULO III. MARCO METODOLÓGICO	34
Recolección e Identificación del Material Botánico	34
Preparación de los extractos para evaluación de la actividad biológica y ensayos cualitativos	34
Análisis cualitativo de los extractos de <i>V. triplinervis</i> Turcz	36
Cromatografía en Capa Fina (CCF)	37
Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de la <i>V. triplinervis</i> Turcz	38
Preparación de las placas de Petri.	39
Preparación de los discos	40
Preparación de los inóculos bacterianos	40
Inoculación	41
Prueba para la actividad antibacteriana	41
Incubación	41
Lectura de los ensayos	42
Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM)	42
CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
Análisis químico cualitativo de los extractos obtenidos de Valeriana <i>triplinervis</i> Turcz.	44
Determinación cualitativa de Valepotriatos por cromatografía en capa fina.	44
Determinación cualitativa de diversos componentes en los extractos obtenidos de <i>V. triplinervis</i> Turcz	46

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de la <i>V. triplinervis</i> Turcz.	49
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES	56
BIBLIOHEMEROGRAFÍA	58

www.bdigital.ula.ve

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución mundial de la familia <i>Valerianacea</i>	15
Figura 2: <i>Valeriana officinalis</i> L	16
Figura 3: Distribución del género <i>Valeriana</i> L., en los páramos de Venezuela	17
Figura 4: valerenal (1), ácido valerénico (2) valeranona (3), Valerenol (4), kessano (5) y elemol (6)	18
Figura 5: Estructura química de Valepotriatos aislados del género <i>Valeriana</i>	19
Figura 6: Estructura del Baldrinal	20
Figura 8. Alcaloides aislados de <i>V. officinalis</i>	21
Figura 9: <i>Valeriana triplinervis</i> (Turcz) A) Detalle de la hoja, B) Porte, C) Inflorescencia, D) Arbusto	23
Figura 10. Estructura de Bacteria Gram negativas y Gram positivas	28
Figura 11. Mecanismo de acción de los antibióticos	30
Figura 12. Solventes utilizados.	35
Figura 13. Preparación de los extractos.	35
Figura 14. Obtención de los extractos.	36
Figura 15. Agar Müller Hinton.	39
Figura 16. Preparación de los discos impregnados con los extractos	40
Figura 17. Inóculos bacterianos.	41
Figura 18. Fórmula para el cálculo de media	43
Figura 19. Fórmula para el cálculo de la desviación estándar	43
Figura 20. Cromatografía en capa fina de extracto metanólico de <i>V.</i>	44

tripplinervis (VT), tintura de *V. officinalis* L. (Tvo) y Extracto en diclorometano de las cápsulas de *V. officinalis* L. (Cvo).

Figura 21. Precipitado naranja en el fondo del tubo	47
Figura 22. Presencia de flavonoides	48
Figura 23. Lectura de los ensayos frente a las cepas ATCC	52
Figura 24. Actividad positiva de tres, de los cuatro extractos frente a <i>S. aureus</i> ATCC (25923)	53
Imagen 25. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en el extracto obtenido con n-hexano frente a <i>S. aureus</i> ATCC (25923).	53
Imagen 26. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en el extracto obtenido con diclorometano frente a <i>S. aureus</i> ATCC (25923).	54
Imagen 27. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en el extracto obtenido con metanol frente a <i>S. aureus</i> ATCC (25923).	54

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1: Clasificación taxonómica de la familia Valerianaceae Batsch	14
Tabla 2. Test cualitativos practicados sobre los extractos secos de <i>V. triplinervis</i> Turcz	37
Tabla 3. Cepas de referencia con los Antimicrobianos (Controles positivos)	39
Tabla 4. Resultados del tamizaje fitoquímico	47
Tabla 5. Ensayos realizados de la actividad antibacteriana de los extractos vegetales de la especie <i>V. triplinervis</i> Turcz	55

www.bdigital.ula.ve

INTRODUCCIÓN

Las plantas se han utilizado desde tiempos remotos como agentes terapéuticos. En el continente americano, los nativos, por su curiosidad innata, conocieron e hicieron uso de los productos naturales. Supieron de muchas plantas nativas de su ambiente natural productoras de sustancias que emplearon como digestivos, febrífugos, antiinflamatorios, sedantes, analgésicos, estimulantes, condimentos, etc., y hoy en día ésta práctica terapéutica continúa vigente (Albornoz, 1980).

Los asirios conocían poco más de 250 hierbas medicinales, en la Grecia antigua se usaban, entre otras, la canela, el ruibarbo, la genciana y la mostaza; de expediciones por África, Persia y la India, Alejandro Magno introdujo en Europa un sinnúmero de plantas con propiedades curativas (Hernández y Gally, 1981).

La estructura química singular y la actividad biológica diversa que caracterizan a los constituyentes de los productos naturales, abre nuevos campos de exploración en sus aspectos químico - farmacológico, farmacocinético y clínico. No todas las especies vegetales cuentan con este tipo de estudio, hay muchos aspectos que permanecen empíricos, lo cual es una limitante para seleccionar los constituyentes bioactivos y su aplicación terapéutica (Muñoz y col., 1999).

Hoy la medicina se vale de drogas sintéticas para aliviar todas las enfermedades, muchas de estas drogas son benéficas, pero muchas por mal uso o abuso, han perdido su eficacia, especialmente los antibióticos, y en incontables casos han provocado efectos secundarios nocivos (Hernández y Gally, 1981).

Sin embargo; es importante saber que en las últimas décadas, se ha intensificado la investigación científica para extraer y separar sustancias con actividad biológica o terapéutica, tal es el caso de la familia Valerianaceae, la

cual se ha utilizado desde la antigua Grecia y China para inducir el sueño, debido a sus propiedades ansiolíticas. Hoy en día, aun cuando no es un producto aprobado por la Agencia de Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA) para el tratamiento del insomnio, se utiliza en diferentes países con esta finalidad (Medina y col., 2008; Albornoz, 1980).

Además, algunas especies pertenecientes a la familia Valerianaceae, se les ha descrito actividad antibacteriana, anticancerosa, antiespasmódica debido a los componentes presentes en los aceites y extractos que se encuentran en diferentes partes de las plantas, tal es el caso de *Valeriana pavonii* Poepp la cual presenta un gran efecto ansiolítico (Olaya y col., 2010).

En esta investigación, se plantea el análisis del potencial antibacteriano de los extractos de *Valeriana triplinervis* (Turcz), una especie endémicas del Estado Mérida en Venezuela; la cual hasta el momento, no ha sido estudiada por lo que no existen reportes en la literatura científica. Con los resultados que se obtengan a partir de esta investigación se espera contribuir con el estudio de la capacidad antibacteriana de los extractos crudos de una de las especies del género *Valeriana* L, que crecen en los páramos andinos venezolanos y que se inició con el análisis de los extractos de *V. parviflora*, *V. rosaliana* y *V. phylloides*. El proceso metodológico que se desarrollará está destinado a la obtención de los extractos de *Valeriana triplinervis*, así como la evaluación de la actividad antibacteriana de los mismos, y la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) en aquellos extractos que presenten dicha actividad.

CAPÍTULO I

EL PROBLEMA

Planteamiento del Problema

En la actualidad, la búsqueda de nuevos medicamentos provenientes de productos naturales que resulten útiles para el control de enfermedades infecciosas (virus, bacterias, hongos o parásitos), son una de las prioridades en la industria farmacéutica.

Las enfermedades infecciosas constituyen la primera causa de muerte en el mundo, tanto en adultos como en niños. Más de 13 millones de personas mueren anualmente por enfermedades infecciosas emergentes y reemergentes, tales como la malaria, la tuberculosis, el síndrome de la inmunodeficiencia adquirida (SIDA), el síndrome respiratorio agudo grave (SARS) y el dengue. Solo tres de estas infecciones el sida, la tuberculosis y la malaria cobraron 5,7 millones de vidas durante el año 2001, la mayor parte de ellas en países en desarrollos (Manual de Antibióticos en Pediatría, 2007).

Las enfermedades infecciosas causadas por bacterias siguen siendo una causa de morbilidad y mortalidad en todo el mundo, sobre todo en los países tropicales y Venezuela no escapa de esta situación. En parte, el hecho se debe en primer lugar, a la resistencia que han mostrado las bacterias a los antibióticos, y en segundo lugar a la aparición de enfermedades emergentes que derivan en parte a la resistencia a fármacos, o a la aparición de nuevas infecciones en humanos (Mahady, 2005).

La incidencia de la resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias, tanto Gram positivas como Gram negativas, ha ido en aumento a pesar de los intentos de emplear los antibióticos de una manera más adecuada y racional (Sutcliffe, 2005). Esta resistencia a fármacos y la aparición de nuevos patógenos, exige la estricta necesidad de describir nuevas clases de antibióticos inhibidores de los mecanismos por los cuales las bacterias se han hecho resistentes, o bien con nuevos mecanismos de acción que puedan tener ventajas sobre los antibacterianos conocidos (Gibbons, 2005).

Desde hace años, el empleo de plantas medicinales y de productos derivados de las mismas está aumentando de manera importante. Esto se debe a una serie de factores, entre los cuales se puede destacar en muchos casos, el conocimiento preciso de su composición química, y el hecho de que en la actualidad dicha utilización se fundamenta en numerosos ensayos farmacológicos tanto *in vivo* como *in vitro*, así como en ensayos químicos. De este modo, los productos naturales han cobrado gran interés en los últimos años debido a la creencia popular que son eficaces y más seguros que los medicamentos de síntesis o por recientes tendencias en salud que buscan suplementar la alimentación. Entre las especies vegetales con mayor número de autorizaciones de comercialización son la alcachofa (*Cynara scolymus*), seguida de la caléndula (*Calendula officinalis*), valeriana (*Valeriana officinalis* L.), ajo (*Allium sativum* L.) y ginkgo (*Ginkgo biloba*), entre muchas otras. (Guevara, y col., 2010).

Además, ciertos restos arqueológicos y estudios históricos muestran que la utilización de las plantas medicinales ha sido una constante a lo largo de la historia, la practica empírica, probablemente basada en el desarrollo del instinto animal, que señala la elección de una planta determinada frente a una dolencia, basándose en la observación de los resultados, han ido constituyendo un elenco de información y que en la mayoría de los casos, estas observaciones han permitido a la ciencia dilucidar y justificar los

mecanismos a través de los cuales los remedios o medicamentos naturales son efectivos (Roldán, 1997).

Es por ello que los investigadores hoy en día descubren propiedades y principios activos a partir de las plantas medicinales, que constituyen importantes aportaciones innovadoras que no tienen una clara extrapolación terapéutica debida tal vez, a la falta de recursos económicos o de información. Mayormente, en el terreno de la oncología y la antibioterapia es donde surgen con mayor frecuencia los descubrimientos a partir de productos naturales; concretamente, en el caso de la oncología, existen nuevas estrategias para el desarrollo de medicamentos a partir de plantas que incluyen mecanismos no lesivos para las células sanas (Lorenzo y col., 2008).

Tomando en cuenta que un estímulo muy importante para la investigación en el área de los productos naturales, proviene de la etnofarmacología, lo cual arroja pistas muy valiosas sobre el uso de plantas medicinales, ya que aumenta la probabilidad de encontrar sustancias de interés farmacológico, donde se emprendió la presente investigación basada en las características químicas y farmacológicas que se les atribuye a algunas de las especies del género *Valeriana*.

Bajo este enfoque, se pretende explorar nuevas alternativas terapéuticas de origen natural a través de los extractos crudos obtenidos de las partes aéreas de la especie *Valeriana triplinervis* Turcz, que crecen en los páramos de Los Andes venezolanos, frente a organismos patógenos para determinar la efectividad de los mismos frente a los microorganismos seleccionados.

Justificación de la Investigación

Las plantas poseen una gran variedad de principios activos, que están asociadas a los procesos vitales básicos, y los metabolitos secundarios participan activamente en el ajuste del vegetal a las condiciones ambientales así como con la interrelación con parásitos y simbioses. Para el humano, los metabolitos secundarios, especialmente aquellas de origen vegetal, poseen diversas aplicaciones siendo utilizadas en salud, alimentación, perfumería e higiene personal. (Piedrasanta, 2007).

Valeriana officinalis L., (Valerianaceae), es una de las plantas más utilizadas para el tratamiento de la ansiedad y el insomnio. (Gallo, y col., 2012). Varios de los miembros del género *Valeriana* L., se utilizan en la medicina tradicional de algunos países. En Colombia, existen diversas especies reportadas, tales como *Valeriana arbórea* Killip & Cuatrec; *V. alophis* Graebn; *V. pyrolaefolia* Decne; *V. clematitidis* Kunth y *V. pavonii* Poepp, entre otras. De éstas, la especie *V. pavonii* se comercializa en la actualidad con fines terapéuticos. Esta planta se caracteriza morfológicamente por poseer tallos largos y rizomas, este último se utiliza con fines terapéuticos, principalmente en casos de insomnio y de ansiedad, pero no existe suficiente información científica que soporte su uso etnobotánico. (Celis, y col., 2007).

Recientemente, el extracto crudo y los aceites esenciales extraídos de las especies *Valeriana wallichii* y *V. dioscorides*, han demostrado actividad antibacteriana y/o antimicótica lo que incentiva a explorar la actividad antibacteriana que pudieran presentar las especies de *Valeriana* L., endémicas de los páramos andinos, tal es el caso de *V. triplirvis* Turcz, en la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el control de enfermedades infecciosas.

Es importante destacar que la composición química de esta especie, a excepción de *Valeriana officinalis* es poco conocida, particularmente *V.*

triplinervis Turcz, nunca antes ha sido investigada. Es por ello que esta investigación aportará nuevos datos cualitativos sobre de la composición química de los extractos crudos de esta especie, y sobre el potencial antibacteriano de los mismos.

www.bdigital.ula.ve

Objetivos de la Investigación

Objetivo General

Determinar la actividad antibacteriana de los extractos crudos de la especie *Valeriana triplinervis* Turcz recolectada en el estado Mérida.

Objetivos Específicos

1. Recolectar e identificar la especie *Valeriana triplinervis* Turcz. endémica del estado Mérida.
2. Preparar diferentes extractos de dicha especie empleando para ella disolventes en orden de polaridad creciente.
3. Determinar cualitativamente mediante el Tamizaje Fitoquímico la presencia de algunos metabolitos secundarios en la especies en estudio.
4. Analizar cualitativamente la composición química del extracto metanólico obtenido de la especie en estudio mediante Cromatografía en capa fina (CCF).
5. Comparar la presencia de metabolitos de tipo valepotriatos del extracto metanólico obtenido de la especie en estudio con el extracto de *Valeriana officinalis* que se expende bajo la forma farmacéutica de tintura y cápsula.
6. Determinar la actividad antibacteriana frente a las cepas *Enterococcus faecalis* ATCC (29212), *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Escherichia coli* ATCC (25922), *Klebsiella pneumoniae* ATCC (23357) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853).

7. Determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos crudos de la especie, *V. triplinervis* Turcz frente a los microorganismos que mostraran sensibilidad.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

Trabajos Previos

Usos etnobotánicos.

Valeriana L., es una planta ampliamente distribuida por toda Europa, en donde crece incluso de forma silvestre. Por ello, no es de extrañar que *Valeriana L.*, esté profundamente unida a la cultura Europea, sus propiedades terapéuticas sedantes son conocidas desde tiempos muy antiguos. De hecho, su nombre proviene del latín, ya que los romanos conocían esta planta como *valerium* (<sentirse bien>). Además; el famoso médico griego, Hipócrates, ya describió en el siglo V A.C. el uso del efecto tranquilizador y anticonvulsivo de *Valeriana L.* Dioscórides y Plinio recomendaron su aplicación en los estados de ansiedad o insomnio. En el renacimiento también se usó ampliamente. Así, Fabio Colonna en su *Phystobasanos*, asegura que la raíz de *Valeriana L.*, silvestre, pulverizada es excelente contra la epilepsia, no solo vio diversos epilépticos que curaron con el polvo de aquella raíz, sino que él mismo, habiendo padecido epilepsia, sanó con éste remedio (Haya, 2007).

Durante años, los científicos creían que solamente dos constituyentes de *Valeriana L.*, los valepotriatos y los ésteres de bornilo, producían el efecto sedante de la hierba. Pero un estudio italiano más reciente destaca que otras sustancias químicas de esta hierba, la valeranona y el éster kessillo, contribuyen también a su eficacia para inducir el sueño.

Los investigadores concluyeron que el efecto sedante de *Valeriana L.*, proviene de los efectos de sus muchos elementos constitutivos que trabajan en armonía unos con los otros (sinergismo) (Duke, 1998).

Actividad farmacológica.

Dentro de las actividades farmacológicas atribuidas a ésta familia, resalta la propiedad hipnótica que presentan algunas especies, lo cual las hacen útiles en estados de agitación nerviosa y en los casos donde existe dificultades para conciliar el sueño. Además; se ha empleado con fines terapéuticos siendo utilizada bajo la forma de infusión. El extracto, extracto fluido y la tintura se prepara a partir de los rizomas de la planta. La literatura describe el valor farmacológico de *Valeriana L.*, pero no está exenta de contradicciones. La actividad que tiene sobre el sistema nervioso central se le atribuye a la presencia de los valepotriatos, pero trabajos experimentales *in vivo* demuestran que estos resultados dependerán de la especie estudiada (Muñoz, y col., 1999).

Es una planta utilizada tradicionalmente como sedante, favorecen el sueño y son empleadas como tranquilizantes. Es posible que funcione para casos moderados de agitación (Ruiz, 2005). También se utiliza la raíz como antipirético, para combatir la fiebre, sobre todo cuando va acompañada de agitación o intranquilidad del enfermo; frecuentemente aparece también en el tratamiento de las palpitaciones del corazón por exceso de tensión nerviosa (Roldán, 1997).

Son muchas las preparaciones farmacéuticas de origen natural de las cuales el hombre se ha valido para el tratamiento o prevención de numerosas dolencias o enfermedades. En el caso de *Valeriana wallichii* DC., cuyos principios activos son valepotriatos y dihidrovaltrato, se ha utilizado con éxito en los sistemas tradicionales de la medicina adyurvédica contra la leishmania, enfermedades de los ojos, hígado, histeria, hipocondría, en estados de agitación nerviosa y shock emocional (Katoch, y col., 2012).

Uno de los estudios realizados con esta especie, consistió en utilizar el extracto de la planta liofilizado, el cual se disolvió en agua doblemente destilada para obtener la concentración deseada. El extracto acuoso de *Valeriana wallichii* DC., contiene hesperidina como uno de sus principales constituyentes, y se evaluó por su capacidad para proteger a la células frente a la radiación, especialmente al ácido desoxirribonucleico (ADN) y sobre las células de fibroblastos en humanos (Katoch, y col., 2012). Otros estudios han determinado que el extracto del rizoma de la *V. wallichii* DC, a diferentes concentraciones fueron evaluados por su actividad antihelmíntica *in vitro* (Potdar, y col., 2010).

Por otra parte; cabe destacar que algunos trastornos nerviosos como la ansiedad surgen en los individuos a través de diversas causas, por ejemplo: consecuencia de cambios hormonales, deficiencia en la dieta, estrés, envejecimiento y derivados de problemas genéticos, entre otras. Además, la ansiedad está estrechamente relacionada con otros problemas de salud mental, especialmente la depresión. Afortunadamente, se ha demostrado que existen algunos componentes de origen natural que pueden ayudar a controlar la ansiedad, tal es el caso de *V. officinalis* L. Los componentes que se encuentran en la raíz de *Valeriana L.*, han demostrado que aumentan la síntesis de GABA y disminuyen la recaptación de GABA sináptica (Alramadhan y col., 2012).

Otra especie de *Valeriana L.*, que ha sido estudiada es la *V. harwickii* Wall, original de Pakistán, Birmania y Ceilán, donde tradicionalmente se utiliza como antiespasmódico y antidiarreico, además de uso culinario como especia. El extracto crudo acuoso-metanólico de *V. harwickii*, mostró propiedades como espasmolítico y antidiarreico sobre el íleon de ratones a una concentración entre 0,01-1 mg/mL, similares al verapamilo, sugerente de bloqueo de los canales de calcio. Adicionalmente, el extracto acuoso-metanólico de *V. harwickii*, causó inhibición de la contracción inducida al yeyuno de conejo, mostrando así una acción antiespasmódica (Bashir, y col., 2011).

Dua y col., (2008), mencionan que el extracto de la raíz de *V. jatamansi* Jones, presentó actividad contra diferentes especies de mosquitos en su estado adulto y larvario, tal es el caso de *anopheles*, *aedes* y *culex*, respectivamente.

Bases Teóricas

Aspectos botánicos y geográficos de la familia Valerianaceae (Caprifoliaceae).

1. Clasificación taxonómica.

La versión más reciente del sistema de clasificación de angiospermas basado en criterios filogenéticos (APG III 2009) incluyó a los géneros de la familia Valerianaceae dentro de la familia Caprifoliaceae, pertenecientes al Orden Dipsacales (Kutschker, 2011) . Se observa en la **tabla 1**.

Tabla 1: Clasificación taxonómica de la familia Valerianaceae Batsch.

Fuente: Delucchi, 2013.

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Dipsacales
Familia:	Caprifoliaceae
Género :	<i>Valeriana</i>

2. Características botánicas.

La Familia Valerianaceae la componen plantas herbáceas, anuales, trepadoras, con hojas opuestas a menudo pinnadas y sin estípulas. Las inflorescencias por lo general son cimosas, unisexuales o hermafroditas, con flores sin ningún plano de simetría, fruto seco y una sola semilla. Son especies típicas que al secarse se caracterizan por un olor fuerte y persistente (Giraldo, 2010).

3. Distribución geográfica.

Incluye alrededor de 400 especies que se distribuyen en todo el mundo (**Figura 1**), a excepción de Australia y las Islas del Pacífico. El género *Valeriana* L., es el más diversificado y de mayor distribución dentro de esta familia, estando muy bien representado en la región Andina de América del Sur (Kutschker, 2011).

Las Valerianáceas están representadas en la flora argentina por géneros: *Valerianella* Mill, *Valeriana* L y *Stangea* Graebn; presentando el género *Valeriana* un total de 48 especies. En Chile, esta familia incluye los

monocasiales escorpioides. Flores pequeñas, blancas, cremosas o rosadas (**Figura 2**) (Xena, 1992).



Figura 2: *Valeriana officinalis* L.

Fuente: http://www.pirineodearagon.com/flora/paginas/VALERIANA_OFFICINALIS.HTML.

2. Distribución geográfica en Venezuela.

En Venezuela el género *Valeriana* está representado por 16 especies, las cuales se localizan a partir de los 700 msnm, algunas de estas especies superan los 4000 msnm (**Figura 3**). Dentro de las descritas para Venezuela, 14 especies forman parte de los Páramos Andinos venezolanos, de las cuales, 11 especies son arbustivas y dentro de éstas, 9 son endémicas y 3 especies son herbáceas. Las otras 2 especies descritas, son trepadoras, y tienen una distribución más amplia en el país, específicamente en boques montañosos. Dentro del análisis de caracteres de las especies descritas en el país, destaca la presencia de taxa de anteras tetra- o bioesporangiadas y de frutos con o sin papus (Xena, 1993).

heterosídicos, son ésteres lipófilos de trioles derivados del iridano (Bruneton, 2001).

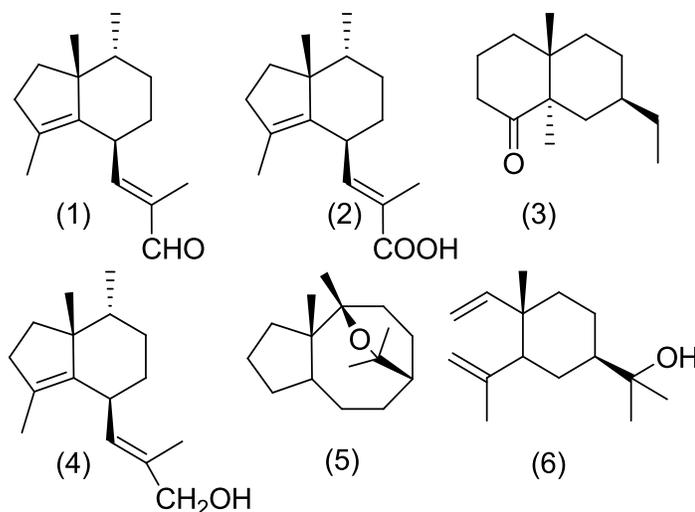


Figura 4: valerenal (1), ácido valerénico (2) valeranonona (3), Valerenol (4), kessano (5) y elemol (6) (Fuente: Bruneton, 2001).

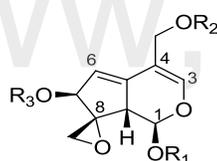
Por lo tanto, los sesquiterpenos mayoritarios presentes en la especie de *Valeriana officinalis* son de tres tipos de estructuras basados en los esqueletos del kessano, valeranonona y el ácido valerénico. Estos compuestos varían considerablemente dentro de la misma especie. En un estudio químico comparativo realizado a partir de extractos de las raíces de *Valeriana* colectada en una misma área local, se caracterizó principalmente por la presencia o ausencia del alcohol kessilico y por variación de las cantidades de valerenol, la valeranonona y elemol. Trabajos similares muestran que tales variaciones fueron independientes de las diferencias morfológicas de las plantas examinadas. Hansel, Schultz y col., (1982) investigaron el contenido de los ácidos valerénicos y encontraron que estos compuestos estaban presentes solamente en *Valeriana officinalis*.

1. Iridoides (valepotriatos).

Son monoterpenos que toman su nombre del iridodial, un constituyente de las secreciones defensivas de la hormiga *Iridomyrmex*, existen alcaloides iridoideos, por ejemplo, la gentianina y los alcaloides iridoideos de *V. officinalis* L., que además contiene epóxidos iridoideos (valepotriatos, valtratos) que son sedantes. Son además sustancias amargas que pueden repeler a los depredadores, pero que también atraen a algunos organismos especialistas (Anaya, 2003).

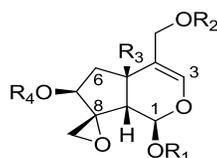
En el caso de las plantas del género *Valeriana* se han aislado iridoideos conocidos como valepotriatos dienos y valepotriatos monoenos; entre los que destacan el valtrato, isovaltrato, homovaltrato, entre otros como los componentes mayoritarios del género *Valeriana* (**Figura 5**) (Houghton, 1988).

Valepotriatos dienos



R1	R2	R3	
IV	Ac	IV	Valtrato
IV	IV	Ac	Isovaltrato
IV	Ac	Ac	7-desisovaleroil-7-acetilvaltrate
IV	IC	Ac	Homovaltrato I
IC	IC	Ac	Homovaltrato II
AcIV	IV	Ac	Acelvaltrato

Valepotriatos monoeno



R1	R2	R3	R4	
IV	Ac	H	Ac	Dihidrovaltrato
IV	IV-IV	OH	Ac	Isovaleroxidihidrovaltrato

Figura 5: Estructura química de Valepotriatos aislados del género *Valeriana*, fuente: (Anaya, 2003).

Los valepotriatos son inestables a la humedad, el calor y la acidez y cuando son degradados se genera compuestos como el baldrinal (**Figura 6**) que son por sí mismos reactivos. La tintura de *Valeriana* al conservarse dos semanas a 20 °C solo conserva 1/3 de los valepotriatos inicialmente presentes (Bruneton, 2001).

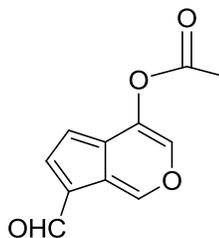


Figura 6: Estructura del Baldrinal. Fuente:

<http://www.chemfaces.com/natural/Baldrinal-CFN90525.html>.

2. Alcaloides.

Son bases orgánicas que se aíslan principalmente de las plantas superiores y se han encontrado en más de 100 familias de fanerógamas, en menor proporción en criptógamas (licopodios), microorganismos (ergot) y animales (peces, sapos). Su actividad fisiológica, principalmente es a nivel del sistema nervioso. Algunos se han manifestado como altamente tóxicos, y otros en dosis apropiadas, son drogas comúnmente usadas en medicina (ej., morfina). Estos compuestos son casi siempre incoloros (berberina es amarillo y sanguinarina es rojo), sólidos cristalinos, ópticamente activos, generalmente levorrotatorios (cinconina y laudanosina son dextrorrotatorios) y el nitrógeno, casi siempre, forma parte de uno o varios ciclos (Marcano y Hasegawa, 2002).

Giraldo (2010), menciona que se ha reportado también el aislamiento de actinidina e isovaleramida a partir de un extracto clorofórmico de las raíces de *V. officinalis*, reconociéndolos como principios activos de esta especie. Además; la actividad farmacológica de los alcaloides también ha sido

estudiada *in vitro*. Se ha demostrado que la actinidina, que representa alrededor del 0.015% del total de los alcaloides de *V. officinalis*, es un inhibidor altamente activo de la colinesterasa (**Figura 8**). Además, Celis y col., (2007) demostraron que estudios fitoquímicos de *V. pavonii* evidencian la presencia de alcaloides, esteroides y terpenos, entre sus principales metabolitos, destacando la fracción correspondiente a los alcaloides por su relativa y significativa presencia (0,44%), a diferencia de varias especies del mismo género, incluida *V. officinalis* (0,05% - 0,1%).

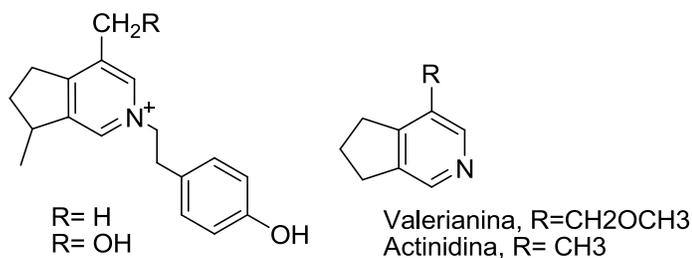


Figura 8. Alcaloides aislados de *V. officinalis*. (Tomado de: Giraldo 2010).

Características Botánicas y Distribución Geográfica de la especie *Valeriana triplinervis* (Turcz).

Se caracteriza por ser un arbusto de grandes dimensiones de 3-4 metros, ginodioico ramas densamente foliadas, pubescentes al nivel de la inflorescencia, con entrenudos cortos (5-12mm de largo); hojas membranosas así como sus hojas típicamente grandes y angostas, peciolo corto (3-5 mm de largo), inflorescencias terminales, en cimas corimboides (8-12 cm. largo); cúpula calicinal corta, enteriza, oblicua, pubescente al interior flores hermafrodita (1 cm de largo) o femeninas (0,7 cm largo), corola blanca, tubular, campanulada, gibosa, 5 lobulada, garganta vellosa, filamentos blancos, fruto (3-4 mm largo) sin pappus. Relacionada con *Valeriana quiroana* Xena pero, esta última es una planta más pequeña, con hojas de bordes crenados, y los entrenudos más corto, por lo cual las hojas se superponen

visiblemente sobre el tallo, lo cual no sucede en *V. triplinervis*, (**Figura 9**) (Xena, 1992).

Es endémica de los páramos merideños, ubicándose hacia la Sierra Nevada, 3350 msnm, también Los Granates, Palmira, Mucuchies, entre los 3000 y 3500 msnm (Xena, 1992).

www.bdigital.ula.ve

Extractos vegetales

Pardo, J. (2002), describe a los extractos vegetales como una mezcla compleja, con variedad de compuestos químicos, obtenidos por procesos físicos, químicos a partir de una fuente natural y utilizable en cualquier campo de la tecnología. Son además una mezcla compleja de compuestos con actividad farmacológica, compuesta por un principio activo (con la supuesta actividad) dentro de una matriz, en principio, sin actividad terapéutica.

Técnicas de extracción.

1. Maceración.

En esta técnica el material vegetal es fragmentado para luego ser remojado en el solvente y este pueda penetrar en la estructura vegetal y disuelva las sustancias contenidas. El material se agita esporádicamente por un período mínimo de dos días, al cabo del cual se decanta el líquido filtrado exprimiendo el residuo (Albornoz, 1980).

2. Lixiviación.

El material es pulverizado y colocado en un precolador, por el que se hace pasar continuamente un solvente que al atravesar sucesivamente las capas del material, empujado por su propio peso y la por la presión de la columna líquida, el solvente es saturado por los principios solubles (Albornoz, 1980).

3. Decocción.

En este procedimiento se hierve el material vegetal a 100°C en agua por espacios de 15 a 60 minutos (según sea la planta o el principio activo a extraer) utilizando un recipiente apropiado para impedir que se derrame (Albornoz, 1980).

4. Extracción continua mediante Soxhlet.

Utilizado como una de las técnicas más antiguas para la extracción de compuestos orgánicos a partir de muestras sólidas. El material a extraer, previamente molido y pesado se coloca en un cartucho de vidrio o celulosa, el cual se introduce dentro de la cámara de extracción, la cual está conectada por una parte a un balón de destilación y por otra a un refrigerante. El balón que contiene el disolvente se calienta a ebullición, el vapor asciende por el tubo lateral y se condensa en el refrigerante cayendo sobre el material, cuando alcanza un volumen conveniente este se sifona por el tubo y regresa al balón, este proceso se repite tantas veces hasta que se obtiene la extracción deseada (Lamarque y col., 2008).

Cromatografía

Definida como un método de análisis en el cual el flujo de un disolvente o gas favorece la separación de sustancias por migración diferencial a partir de una estrecha zona inicial en un medio poroso adsorbente (Tyler y col., 1979).

En donde la separación de los componentes de una mezcla, se basa en las diferencias específicas de sus propiedades físicas, se han descrito varias técnicas cromatográficas entre ellas las de, intercambio iónico, filtración en gel, sistema gas-líquido, sistema líquido-líquido, cromatografía en papel, en capa preparativa y la cromatografía en capa fina (Díaz, y col., 1997).

Técnicas cromatográficas.

1. Cromatografía en capa fina.

Resulta particularmente útil para el análisis de pequeñas cantidades de sustancias. Se caracteriza por la aplicación de un adsorbente seco y finalmente pulverizado en una capa delgada y uniforme, sobre una lámina de vidrio. La identificación positiva de un componente se efectúa comparando las manchas resultantes que tienen idéntico valor R_f e igual magnitud, que representan a la muestra y a la sustancia patrón (Tyler y col., 1979).

2. Cromatografía gaseosa- espectrometría de masas.

La fase móvil es un gas relativamente no reactivo como el helio, nitrógeno o el hidrógeno; en donde el resultado es casi siempre un cromatograma, más que una serie de muestras eluidas. El cromatograma muestra cuando se eluye cada soluto con solventes y las áreas de los picos señalan cuánto hay de cada componente (Atkins y Jones, 2006).

La cromatografía de gases- espectrometría de masas, produce un espectro de masas de cada componente al igual que su masa y ubicación en el cromatograma. Este medio efectivo de detección puede utilizarse cuando no se dispone de muestras estándares que ayudan a determinar las identidades de los solutos (Atkins y Jones, 2006).

3. Cromatografía en columna (CC).

Es una variedad de la cromatografía en la que la fase móvil es líquida y pasa a través de la fase estacionaria, la cual es sólida o líquida, la cual esta retenida en un recinto cilíndrico. La modalidad clásica de la CLC consiste en hacer pasar mediante gravedad la fase líquida sobre el sólido o activo retenido en una columna de vidrio (Valcárcel y Gómez, 1988).

4. Cromatografía líquida de alta resolución de sus siglas en inglés (high performance liquid chromatography).

En esta técnica se requieren presiones de varios centenares de atmosferas para conseguir caudales razonables con los modernos empaquetados de cromatografía de líquidos, que constan de partículas cuyo diámetro es igual o inferior a los $10\mu\text{m}$, es por ello y a consecuencia de estas grandes atmosferas, el equipo de cromatografía líquida de alta resolución tiende a hacer más elaborado a diferencia de los demás (Skoog y *col.*, 2001).

Infecciones bacterianas

Constituyen una causa importante de morbilidad y eventualmente de mortalidad, sobre todo en la población infantil y en ancianos. Aunque, afortunadamente la mayoría de las infecciones son procesos auto limitados, ya que son en su mayoría de etiología viral. Para que un tratamiento antibacteriano se considere óptimo debe ser tanto efectivo como seguro, por su parte, la efectividad depende no solo de la sensibilidad del patógeno al antibiótico, sino de algunas propiedades farmacológicas que permitan que se logren concentraciones adecuadas, tanto en el nivel alcanzado, como en el tiempo de permanencia en el sitio de la infección (Manual de Antibióticos en Pediatría, 2007).

Bacterias.

Las bacterias son células sin núcleo definido, con un solo cromosoma circular. Están provistas de membrana y pared celular y algunas de ellas poseen flagelo para movilizarse. Dependiendo de la especie, puede tener uno o un grupo de flagelos en los extremos o rodeando la célula. Las paredes celulares en la mayoría de las bacterias están cubiertas por material viscoso, el cual se le denomina cápsula, cuando es denso y grueso, o capa mucilaginosa cuando es delgado. Estos microorganismos tienen forma de barras, esferas, elipsoides, espirales, comas o filamentos (Rivera, 2007).

Dentro de la clasificación bacteriana, podemos conseguir:

1. Bacterias Gram positivas.

Posee una pared celular gruesa que consta de varias capas y está formada principalmente por peptidoglucano (150Å) que rodean la membrana citoplasmática (**figura 10**). El peptidoglucano es un exoesqueleto en forma de malla con una función semejante al de los insectos, es un elemento clave para la estructura, la replicación y la supervivencia de la célula en las condiciones normalmente hostiles en las que proliferan las bacterias (Murray y col., 2006).

Antibióticos / antibacteriano

Son sustancias producidas por microorganismos vivos (bacterias u hongos) que suprimen el crecimiento de otro microorganismo vivo, (en este caso bacterias), mientras que los antibacterianos aunque también suprimen el crecimiento bacteriano, son sustancias sintetizadas en el laboratorio, tal como ocurre en el caso de las sulfonamidas y de las quinolonas (Manual de Antibióticos en Pediatría, 2007).

Dentro de esta línea farmacológica, cabe mencionar que hay ciertos antibióticos que llegan a inhibir o eliminar el crecimiento de microorganismos sensibles a los mismos, denominados *antibióticos bactericidas o bacteriolíticos*, por otro lado existen antibióticos que no destruyen a los gérmenes, sino, que impiden su crecimiento y multiplicación, a ellos se les denomina *antibióticos bacteriostáticos*, mientras que sí se aumenta su concentración pueden actuar como bactericidas (De Ahumada, y col., 2002).

Resistencia microbiana.

La resistencia microbiana se adquiere por diferentes mecanismos. Uno es cuando una bacteria de una generación a otra adquiere información específica que le permite resistir. Otro mecanismo es cuando hay un abuso en el consumo de antibióticos, es decir cuando se expone una cepa bacteriana innecesariamente, con la posibilidad de que sobreviva alguna bacteria y estas generen resistencia al antibiótico. Y por último, cuando se usa un antibiótico en un caso que no se requiera, por ejemplo en las infecciones virales, ya que las bacterias presentes en el organismo pueden crear resistencia durante la administración de los mismos (**figura 11**) (Romero, 2007).

La clasificación de los antibióticos está dada principalmente por el mecanismo de acción sobre los microorganismos, como por ejemplo:

Evaluación de la actividad antibacteriana

Varios son los métodos empleados para la evaluación que tienen diversos antibióticos sobre algunas cepas bacterianas.

1. Dilución en Agar con discos o pozos (macrodilución/ microdilución).

Se diluye el antimicrobiano en el medio de cultivo donde va estar contenido el microorganismo a ensayar. Se inocula el microorganismo, se incuba y se determina la concentración del antimicrobiano que produce la inhibición del crecimiento del microorganismo definida como Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Este método puede realizarse en microescala, usando microplacas de pocillos (Murray y *col.*, 2009).

2. Dilución en agar con discos.

Con esta técnica se dispersa el microorganismo a ensayar previamente estandarizado sobre el agar, seguidamente se colocan los discos ya impregnados con la sustancia a evaluar (antibiótico) sobre el agar ya inoculado. Transcurrida la incubación del microorganismo, se observará el área de inhibición del crecimiento que rodea a los discos. El tamaño del área de inhibición corresponderá a la actividad ejercida por el antimicrobiano, entre más susceptible sea el microorganismo mayor será el área (Murray y *col.*, 2009).

3. Microdilución.

Para esta prueba el volumen de caldo utilizado va de los 0,05 – 0,1 mL, debido a que la mayoría de las bacterias para las pruebas de sensibilidad requieren la evaluación de diversos antibióticos a varias concentraciones diferentes, el menor volumen usado con la microdilución permite realizar la prueba de manera práctica en una sola placa de microtitulación. Una de las partes más importantes de esta prueba es la preparación y dilución de los antimicrobianos que se incorporarán en el medio líquido, es por ello que ya

se disponen de placas o paneles comerciales en donde ya se ha agregado previamente la concentración adecuada del antimicrobiano al caldo. En casi todos los casos los agentes antimicrobianos presentan diluciones al medio (Forbes y col., 2009).

www.bdigital.ula.ve

Hipótesis.

Algunas de las especies de la familia *Valerianaceae*, han presentado actividad antibacteriana, es por ello que se espera que los extractos crudos obtenidos de la especie recolectada en el Estado Mérida, *V. triplinervis* Turcz, presenten actividad frente a las diversas cepas bacterianas de referencia internacional.

www.bdigital.ula.ve

CAPÍTULO III

MARCO METODOLÓGICO

La metodología es el área del conocimiento que estudia los métodos generales de las disciplinas científicas, incluyendo los métodos, las técnicas, las tácticas, las estrategias y los procedimientos que utilizará el investigador para lograr los objetivos de su estudio (Hurtado, 2007). El plan de trabajo diseñado para llevar a cabo la presente investigación, consistió:

Recolección e Identificación del Material Botánico

El material botánico se recolectó en su hábitat natural: Parque Nacional Sierra Nevada, bosque aledaño a la Laguna La Fría, municipio Libertador, estado Mérida (Venezuela), a una altitud de 3572 msnm, identificado por el Prof. Luis Enrique Gámez de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales (Universidad de Los Andes, Mérida, Venezuela) conjuntamente con John Parra, en el año 2013. En donde una muestra de la Valeriana en estudio se depositó bajo el número de voucher: 945458, en el herbario de la facultad de Ciencias Forestales y ambientales.

Preparación de los extractos para evaluación de la actividad biológica y ensayos cualitativos

El material vegetal fresco (630 gr) de las partes aéreas de *V. triplinervis* Turcz, fueron desecados en estufa a 40 °C durante 48 horas. Posteriormente, se molieron, obteniéndose 350 gr del material seco.

Tabla 2. Test cualitativos practicados sobre los extractos secos de *V. triplinervis* Turcz.

Compuesto	Reactivo	Interpretación positiva
Alcaloides	Dragendorff	Precipitado color rojo, amarillo o anaranjado
Flavonoides	NaOH al 10%	Coloración amarilla a rojo (xantonas y flavonas), de café a púrpura rojizo (chalconas).
Esteroides	Salkoswki	La formación de un color marrón rojizo en la interfase indicará la presencia de un anillo esteroideo.
Triterpenos	Vainillina	La formación en la interfase de un color violeta mostrará la presencia de saponinas triterpenoides.
Saponinas	Agua destilada	La altura de la espuma, en caso que se presente, se considerará positiva a una altura de 8 a 10 mm estable por 30 minutos.

Cromatografía en Capa Fina (CCF).

Los extractos fueron sometidos a la técnica de cromatografía en capa fina o delgada (CCF/ CCD) utilizando placas de aluminio, cubiertas de silicagel (cromatofolios AL TLC silicagel 60 F₂₅₄ Merck®), dichas placas se desarrollaron con diferentes solventes (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol) y fueron observadas en la lámpara de luz ultravioleta ya que la presencia de valepotriatos se evidencia por la capacidad que tiene estos compuestos de absorber radiación ultravioleta empleando reveladores de uso común para la detección de alcaloides, valepotriato, entre otros. Se dejó

correr la fase móvil al menos 8 cm, teniendo en cuenta que en esta fase, pueden emplearse: el tolueno: acetato de etilo (75:25); *n*-hexano: metiletilcetona (80:20). Y para la detección de los componentes: ácido clorhídrico y ácido acético (8:2). Si se observan zonas azules o moradas indica la presencia de valtratos y acevaltratos, zonas cafés indican dihidrovaltratos. Irradiando con luz ultravioleta a 254 nm y empleando como revelador una solución de 2,4- dinitrofenilhidrazina en H₂SO₄, y calentando a 100 °C; se observan zonas verdes gris o azules; y si hay calor excesivo se observan zonas cafés-amarillas (Contreras, 2009).

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de la *V. triplinervis* Turcz

Para la evaluación de la actividad antibacteriana se empleó el método de difusión en agar con discos frente a bacterias de referencia internacional ATCC (American Type Culture Collection). Además; se emplearon antibióticos como controles positivos según cada microorganismo, de acuerdo a lo establecido por el CLSI 2015 (**Tabla 3**). Este procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a la metodología descrita por Velasco y *col.*, 2005.

7. Lectura de los ensayos realizados.

Se realizaron las lecturas de los halos de inhibición a las 24 y 48 horas, el diámetro de la zona de inhibición producto de la acción antibacteriana de los extractos ensayados, fue expresado en milímetros (mm). Las pruebas se realizaron por duplicado considerando como resultado positivo o sensible la presencia de halo de inhibición del crecimiento microbiano alrededor del disco impregnado con los extractos y en caso de ausencia del halo como negativo o resistente.

8. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM).

Sólo se determinó la CIM contra los microorganismos que mostraron susceptibilidad a los productos ensayados. Para determinar la CIM se prepararon diluciones de los extractos con el solvente a diferentes rangos de concentración, luego se impregnaron discos de papel de filtro con 20 μ L de cada dilución. La CIM es definida como la concentración más baja capaz de inhibir el crecimiento bacteriano visible (CLSI, 2015). Los ensayos se realizaron por triplicado, y posteriormente se realizó un cálculo, (empleando las respectivas fórmulas, **figura 18** y **19**), a los ensayos que presentaron actividad frente a cepas de referencia internacional, donde los cálculos fueron, media, la cual es definida por Harris (2006), como la suma de los valores medidos, divididos entre el n número de medidas; y la desviación estándar que se refiere a una medida del grado de proximidad de los datos en torno al valor de la media, cuanto menor es la desviación estándar, más estrechamente se agrupan los datos alrededor de la media.

Como se puede observar en la **Figura 20-A** el extracto de *Valeriana triplinervis* (VT) mostró un compuesto mayoritario que al ser revelado con 2,4 dinitrofenilhidrazina y calentado a 100°C se observó de coloración violeta la cual se puede atribuir a la presencia de compuestos del tipo valepotriatos (valtratos) tal como lo describe la metodología de Stahl, 1969 y Laufer, 1970. Al realizar el análisis comparativo de los extractos de ambas especies de *Valeriana* L., objeto de esta investigación con respecto a dos formas farmacéuticas que se consumen en el país, como lo son la tintura y las cápsulas de *V. officinalis* L.

Con respecto a la tintura de *V. officinalis* L. (TVo), llamó la atención observar la carencia de esta clase de compuestos los cuales son los responsables de la actividad terapéutica sedante y/o inductora del sueño atribuida a estas formulaciones farmacéuticas. Sin embargo; al consultar la bibliografía, existen evidencias experimentales que demuestran que la estabilidad de los valepotriatos, es alterada por la presencia de alcohol en dichos preparados farmacéuticos, por lo que la reputación del uso de las valerianas bajo la forma farmacéutica de tintura ha estado entre dicho en la comunidad científica (Houghton, 1988).

Adicionalmente, en las cápsulas de *V. officinalis* L., se observó el compuesto referido aunque en baja proporción. Esta última observación se basa en el hecho de que los compuestos del tipo valepotriatos sufren una degradación a través del tiempo por lo que es aconsejable que estos preparados farmacéuticos deben ser consumidos al poco tiempo de su preparación; según la bibliografía se ha observado disminución en la calidad de esta forma farmacéutica luego de transcurrido dos años de su elaboración (Bos, y col., 1996).

En la **Figura 20-B** se muestran los mismos extractos pero empleando una mezcla de disolventes de mayor polaridad para la fase móvil con la intención de observar los compuestos retenidos en la base de la primera cromatografía en capa fina. En este caso empleando la polaridad *n*-hexano: acetato de etilo en proporción 1:1, se pudo observar que en el extracto de *V. triplinervis*, existe la presencia dos compuestos más polares, los cuales dieron una coloración azul intensa y marrón, ésta última posiblemente debido a la presencia de compuestos de degradación, en este caso a los compuestos de tipo baldrinales (Bos, y col., 2002).

López y col., 2010, en su investigación titulada: **Fitoterapia: Valeriana**, señalan que la composición química de los extractos de la familia Valerianeacea, pueden variar, en su mayoría se agrupan en: iridoides (valepotriatos e isovalepotriatos) los cuales alcanzan su concentración máxima en invierno y se encuentran únicamente en la planta fresca o cuando esta ha sido disecada a temperaturas inferiores a 40° C ya que son muy inestables y se transforman con facilidad a baldrinales (aldehídos deshidratados), que también son activos. Aunque la planta en estudio no presenta investigaciones previas, los resultados arrojados mediante la técnica anteriormente descrita corrobora la presencia de este componente (valepotriatos) el cual se le atribuye en investigaciones realizadas, una actividad sedante.

2. Determinación cualitativa de diversos componentes en los extractos obtenidos de *V. triplinervis* Turcz.

Los extractos obtenidos se sometieron a diversos ensayos (tamizaje fitoquímico), cuyos resultados se presentan a continuación, **Tabla 4.**

anillo tricíclico obtenido a partir del extracto etanólico de *V. hardwickii*. Por otro lado, fuentes literarias mencionan a los esteroides como componentes y uno de los principios activos de *V. officinalis* (Ciarlotti, F. y Golberg, H., 2015).

Evaluación de la actividad antibacteriana de los extractos de la V. triplinervis Turcz.

A continuación en la tabla 6, se muestran los resultados de los ensayos realizados por triplicado a los extractos obtenidos con solventes en polaridad creciente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo y metanol) de *V. triplinervis* Turcz **Figura 23**. Todos los extractos ensayados, a excepción del extracto en acetato de etilo (**E3**) **Figura 24**, presentaron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC (25923) (**Figura 25, 26 y 27**). Donde los valores de la CIM oscilaron entre 150 mg/mL y 300 mg/mL. Los cálculos estadísticos (media y desviación estándar) obtenidos para los extractos que presentaron actividad frente a *S. aureus* se agrupan en la misma tabla.

Estos resultados preliminares sugieren que los extractos de *V. triplinervis* a las concentraciones evaluadas presentaron un limitado espectro de actividad antibacteriana. Sin embargo es importante resaltar que estos son los primeros reportes de la actividad antibacteriana de esta especie endémica de los Andes venezolanos. Al respecto, se han realizado estudios de actividad antimicrobiana en otras especies de este género sobre todo en los aceites esenciales; mientras que, a partir de extractos, son escasos los trabajos publicados hasta el momento.

Investigadores como Fletes y Rosas, 2015, en su investigación, mencionan que el uso de nanopartículas de plata (NPsAg) sintetizadas con extracto acuoso de *V. officinalis* L, presentaron actividad frente a cepas de *E. coli*, cuyo halo de inhibición en tres discos fue de: 9.75; 10 y 9.25 mm respectivamente, teniendo en cuenta estos resultados se puede deducir que

no se correlacionan con los obtenidos en la presente investigación; ya que los extractos de la *Valeriana* en estudio no presentaron actividad frente a las bacterias gram negativas (*E. coli*, *K. pneumoniae* y *P. aeruginosa*). López y col., 2010, señalan que algunos principios activos de la raíz (como la valerina, el isovaltrato) y extractos alcohólicos obtenidos de las flores mostraron actividad antimicrobiana *in vitro* frente a especies como *S. Typhi* y hongos como *A. fumigatus*, *C. albicans*.

Por otro lado, resultados obtenidos en la investigación de Morocho y Cuevas (2011), donde obteniendo el extracto etanólico (70% v/v en agua) de las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de *V. chaerophylloides* y utilizando cepas de referencia internacional: *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 25853), *K. pneumoniae* (ATCC 13883) y *C. albicans* (ATCC26790), empleando a su vez la técnica de difusión en agar con discos, mostraron resultados negativos de *V. chaerophylloides*, para los microorganismos utilizados.

Por su parte, Khuda y col., 2012, mencionan que extractos obtenidos a partir de *Valeriana wallichii* DC, cuyas fracciones clorofórmica y en *n*-hexano exhibieron una significativa actividad contra *S. aureus* y *B. subtilis*, respectivamente. Donde la fracción en cloroformo presentó una CIM de 0,27 mg/ml frente a *S. aureus*, y para *B. subtilis* la fracción en *n*-hexano su CIM fue de 0,31 mg/ml.

Otros investigadores determinaron, que a partir de la biomasa y raíces de *V. laxiflora*, se cuantificó la CIM de los compuestos aislados de dicha planta, en donde el -1-hidroxi-2,6-bis-epi-pinoresinol y el ácido ursólico presentaron actividad contra *M. tuberculosis*, con una CIM de 15,5 a 127 µg/mL (Gu y col., 2004).

Otro caso reportado es el de la *V. wallichii* DC cuyos extractos en *n*-hexano, cloroformo, metanol y agua fueron ensayados contra bacterias patógenas por

el método de difusión de agar con discos obteniéndose resultados satisfactorios ya que el extracto acuoso resultó activo contra *S. aureus* (halo de inhibición 23 ± 1.0 mm, CIM 250 $\mu\text{g/mL}$; CBM 500 $\mu\text{g/mL}$); seguido del extracto metanólico frente *B. subtilis* (halo de inhibición 20 ± 1.0 mm, CIM 31.5 $\mu\text{g/mL}$; CBM 500 $\mu\text{g/mL}$), *S. aureus* (halo de inhibición 19 ± 0.8 mm, CIM 125 $\mu\text{g/mL}$; CBM 125 $\mu\text{g/mL}$) y el extracto en *n*-hexano contra *B. subtilis* (halo de inhibición 18 ± 1.2 mm, CIM 125 $\mu\text{g/mL}$; CBM 125 $\mu\text{g/mL}$). (Sati, y col., 2011).

Teniendo en cuenta estas búsquedas y con base a ellos se analizaron los resultados presentados en la tabla 6, donde se puede establecer algunas similitudes, ya que los extractos de *V. triplinervis* Turcz a excepción del extracto en acetato de etilo (**E3**) resultaron activos contra *S. aureus* al igual que el reportado para *V. wallichii* DC. Y aunque la falta de investigaciones con respecto a los extractos y su actividad antibacteriana hacen que no se pueda determinar que compuesto en particular le atribuye la actividad antibacteriana de los extractos obtenidos de *V. triplinervis* Turcz, se puede deducir que los mismos presentan actividad frente a este microorganismo, en donde la CIM al realizarse por triplicado sobre los extractos que resultaron activos, la diferencia entre ellos fue de alrededor de una concentración de 30 mg/mL. A su vez los cálculos estadísticos aplicados a los ensayos activos frente a *S. aureus*, y basándose en la teoría descrita por Harris (2006), se puede interpretar que los resultados obtenidos a partir de los extractos que presentaron actividad (**E1**, **E2** y **E4**), tienen una media que resulta cercana a los tres valores que se obtuvieron para cada uno de ellos respectivamente, y donde además la desviación estándar arroja resultados muy bajos para los tres ensayos, lo que correlaciona lo que expone dicho autor:

“...mientras menor son los valores de la desviación estándar, más se agrupan estrechamente los resultados obtenidos alrededor de la media”

Tabla 5. Ensayos realizados de la actividad antibacteriana de los extractos vegetales de la especie *V. triplinervis* Turcz.

Microorganismos	Zona de Inhibición (mm)				Antibióticos de Referencia (mm)					Media de la CIM de los ensayos realizados por triplicado (mg/mL)				Desviación Estándar			
	E1	E2	E3	E4	OX	VA	NN	AZT	FEP	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (25923)	11	13	NA	9	26					166	200	NA	316	28,8	43,3	NA	28,8
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC (29212)	NA	NA	NA	NA		25				NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)	NA	NA	NA	NA			32			NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC (23357)	NA	NA	NA	NA				46		NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (27853)	NA	NA	NA	NA					36	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

*mm de los halos de inhibición (discos 6 mm de diámetro).

E1: Extracto en hexano; **E2:** Extracto en dicloro; **E3:** Extracto en acetato de etilo; **E4:** Extracto en metanol

OX: Oxacilina; **VA:** Vancomicina; **NN:** Tobramicina; **AZT:** Aztreonam; **FEP:** Cefepime.

NA: No activo

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima. Rango de concentración de 100 a 500 mg/mL.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES

1. El análisis mediante cromatografía en capa fina a partir del extracto metanólico de *V. triplinervis* Turcz, permitió determinar la presencia de valepotriatos, los cuales son uno de los componentes activos mayoritarios dentro de la familia *Valerianaceae*.
2. El tamizaje fitoquímico empleado sobre los extractos de la especie en estudio ayudó a determinar de forma cualitativa la presencia de alcaloides, flavonoides, triterpenos y esteroides.
3. El extracto obtenido a partir del acetato de etilo ante al ser sometido al tamizaje fitoquímico, presentó una positividad para la presencia de flavonoides en comparación de los demás extractos.
4. Dos de los cuatros extractos (acetato de etilo y diclorometano) presentaron positividad para la presencia de triterpenos, mientras que para esteroides los extractos **E1,E2,E3 y E4** presentaron una ligera positividad.
5. Los extractos (n-hexano, diclorometano y metanol) presentaron actividad frente a *S. aureus*, mostrando halos de inhibición para **E1**: 200, 150 y 150 mg/mL; **E2**: 250, 175 y 175 mg/mL y **E4**: 350,300 y 300 mg/mL, respectivamente.
6. La CIM para cada extracto para *S. aureus* fueron: 166,6 mg/mL para **E1** (n-hexano), 200 mg/ mL para **E2** (diclorometano) y 316 mg/mL para **E4** (metanol). Cabe acotar que al realizarse por triplicado el ensayo se deben

tomar en cuenta cada uno, realizando de esta forma un promedio de los mismos.

7. Los extractos obtenidos no mostraron actividad antibacteriana frente a las bacterias gram negativas incluidas en el estudio.

www.bdigital.ula.ve

BIBLIOHEMEROGRAFÍA

- Albornoz A. (1980). **Productos Naturales: Estudio de las Sustancias y Drogas Extraídas de las Plantas**. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
- Alramadhan, E., Hanna, M., Hanna, M.S., Goldstein, T., Ávila, S.M. y Semanas, B.S. (2012). Dietética y botánicos ansiolíticos. **Medical Science Monitor**, 18 (4) , 40-48.
- Anaya Lang, A.L. (2003). **Ecología Química**. México D.F: Plaza y Valdés, S.A. de C.V.
- Arévalo, D., Martínez, S.A., Rincón, J. y Guerrero, M.F. (2006). Fracción alcaloide obtenida de *Valeriana pavonii* Poepp con actividad anticonvulsionante. **Revista Colombiana de Ciencias Químicas**, 35 (2), 168-176.
- Atkins, P. y Jones, L. (2006). **Principios de química. Los caminos del descubrimiento**. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.
- Bashir, S., Memon, R. y Gillani, A.H. (2011). Actividades antiespasmódicos y antidiarreicos de *Valeriana hardwickii*. Rizoma supuestamente son medidas a través de bloqueo de los canales de calcio. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine**, 4 (77), 3049-3060.
- Bos R., Woerdenbag H. & Pras N. (2002). Determination of valepotriates. **Journal of Chromatography A**, 967, 131-146.
- Bos R., Woerdenbag H., Hendriks H., Zwaving J., De Smet P., Tittel G., Wikström J. & Scheffer J. (1996) Analytical Aspects of Phytotherapeutic Valerian Preparations. **Phytochemical Analysis**, 7 (3), 143-151.
- Bruneton, J. (2001). **Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales**. Zaragoza: Editorial Acribia, S.A.

- Celis, C., Rincón, J. y Guerrero, M. (2007). Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y de la fracción alcaloidal de *Valeriana pavonii*. **Revista colombiana de ciencia química y farmacológica**, 36 (1), 11-22.
- Ciarlotti, F. y Golberg, H. (2015). **Ayurveda y plantas medicinales**. Argentina, Buenos Aires: Ediciones LEA, S.A.
- CLSI. (2015). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Contreras, J. (2009). **Propuesta de dos formulaciones a partir de tinturas Valeriana prionophylla Stadl. como sedante y ansiolítico**. Maestría multidisciplinaria en producción y uso de plantas medicinales, Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- De Ahumada, J., Santana, M. y Serrano, J. (2002). **Farmacología práctica para: las diplomaturas en ciencias de la salud**. Ediciones Díaz de Santos, S. A., Madrid, España.
- Delucchi, G. (2013). *Centranthus ruber* (Valerianaceae) adventicia en la República Argentina. **Multequina**, 22 (2), 45-50.
- Días, J., Fernández, M. y Paredes, F. (1997). **Aspectos básicos de bioquímica clínica**. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid, España.
- Dua, V., Alam M., Pandey A., Rai S., Chopra A., Kaul V. & Dash A. (2008). Insecticidal activity of *Valeriana jatamansi* (Valerianaceae) against mosquitoes. **Journal of American Mosquito Control Association**, 24(2), 315-318.
- Duke, J.A. (1998). **The Green Pharmacy**. Estados Unidos: Library of Congress Cataloging- In- Publication Data.
- Fletes, N. y Rosas, G. (2015). Síntesis verde de nanopartículas de plata usando extracto acuoso de *Valeriana officinalis* y su evaluación como agentes antibacteriales. [Artículo PDF], XII encuentro participación de

la mujer en la ciencia. Universidad Michoacán de San Nicolás de Hidalgo. México.

Forbes, B., Sahm, D. y Weissfeld, A. (2009). **Bailey & Scott. Diagnóstico microbiológico**. Buenos Aires: Medica Panamericana.

Gallo, L., Ramírez, M., Piña, J., Palma, S., Allemandi, D. y Bucala, V. (2012). *Valeriana officinalis* extracto de planta seca por compresión directa: preparación y caracterización. **Pharm sci**, **80** (4), 1013-1026.

García, P., Fernández, M. y Paredes, F. (1997). **Microbiología clínica aplicada**. España, Ediciones Díaz de Santos S.A.

Gibbons, S. (2005). Plants as a Source of Bacterial Resistance Modulators and Anti-Infective Agents. **Phytochemistry Reviews**, **4** (1), 63-78.

Giraldo S. (2010). **Aislamiento e identificación de metabolitos activos sobre el sistema nervioso central obtenidos de *Valeriana pavonii***. [Tesis Doctoral]. Santafé de Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.

Gu, J.Q., Wang, Y., Franzblau, S.G., Montenegro, G., Yang, D. & Timmermann, B.N. (2004). Antitubercular constituents of *Valeriana laxiflora*. **Planta medica**, **70** (6), 509-14.

Guevara, H.A., Luengas, P.E. y Garavito, G. (2010). Revisión documental de los productos naturales legalmente autorizados para su mercado en Colombia. **Colombia Médica**, **41** (2), 129-140.

Hansel, R y Schulz, J. (1982). Valerensauden und valerenal als leitstoffe des officinellen Baldrians. **Deutsche Apotheker Zeitung**, **122**, 215-219.

Harris, D. (2006). **Análisis químico cuantitativo**. Barcelona: España. Editorial Reverté. S. A

Haya, F. (2007). **Uso Práctico de la Fitoterapia en Ginecología**. Madrid: Editorial Médica Panamericana.

- Hernandez, R. y Gally, M. (1981). **Plantas medicinales**. Editorial Pax, Mexico.
- Houghton, P. (1988). The biological activity of Valerian and related plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 22, 121-142.
- Hurtado, J. (2007). **El proyecto de investigación**. Caracas: Editorial Quiron-Skypal
- Katoch, O., Kaushik, S., Yogendra, M.S., Agrawala, P.K. y Misra, K. (2012). Propiedades radioprotectoras de un extracto acuso de *Valeriana wallichii*. **Journal Pharmacy Bioallied Sciences**, 4 (4), 327-332.
- Khuda, F., Iqbal, Z., Zakiullah, Khan, A. & Nasir, F. (2012). Antimicrobial and anti-inflammatory activities of leaf extract of *Valeriana wallichii* DC. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, 25 (4), 715-19.
- Kutschker, A. (2011). Revisión del género *Valeriana* (*Valerianaceae*) en Sudamérica Austral. **Guayana Botánica**, 68 (2), 244-296.
- Lamarque, A., Zygadlo, J., López, L., Torres, M. y Maestri, D. (2008). **Fundamentos teórico- prácticos de química orgánica**. Argentina: Editorial Encuentro.
- Laufer J., Seckel B & Zawving J. (1970). Composition of the active principles of different Valerian and Kentranthus species. **Pharmaceutisch Weekblad**, 105, 609-625.
- López, J., López, L. y Luna, M. (2010). **Fitoterapia: Valeriana**. [Trabajo PDF] Farmacología general.
- Lorenzo, P., Moreno, A., Lizasoain, I., Leza, J., Moro, M. y Portelés, A. (2008). **Farmacología Básica y Clínica**. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Mahady, G. (2005). Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. **Current pharmaceutical design**, 11 (19), 2405- 27.
- Manual de Antibióticos en Pediatría** (Sociedad Venezolana de Puericultura y Pediatría). (2007). Editorial Médica Panamericana C.A. Caracas.

- Marcano D. & Hasegawa M. (2002). **Fitoquímica orgánica**. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
- Medina Ortiz, O., Sánchez Mora, N., Fraguas Herraéz, D. y Arango López, C. (2008). Use of Valerian in the Long-Term Treatment of Insomnia. *Revista Colombiana de Psiquiatría*, 37(4), 614-626.
- Morocho, L. y Cueva, L. (2011). Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto etanólico de *Valeriana chaerophylloides* por el método de difusión en agar. **Repositorio Digital, Universidad Nacional de Loja**. URI: <http://dspace.unl.edu.ec/jspui/handle/123456789/4191>. Ecuador.
- Muñoz, O., Montes, M. y Wilkomirsky, T. (1999). **Plantas Medicinales de uso en Chile, química y farmacología**. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Murray P., Roshenthal K. & Pfaller M. (2009). **Microbiología Médica**. Editorial Elsevier, Barcelona, España.
- Murray, P., Rosenthal, K. y Pfaller, M. (2006). **Microbiología Médica**. Barcelona: MMVI Elsevier España, S.L.
- Olaya, M., Lozano, M., Botero, L., Rincón, J. y Guerrero, M. (2010). Evaluation of the acute and subchronic oral toxicity of ethanol extract from *Valeriana pavonii* species in Wistar rats. *Revista Colombiana Médica*, 41(3), 256-266.
- Pardo, J. (2002). **Patentabilidad de los extractos vegetales**, [diapositivas de PowerPoint]. Recuperado de la web de la Universidad de Barcelona: [http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentes extractosplantas.pdf](http://www.ub.edu/centrepatents/pdf/doc_dilluns_CP/pardo_patentes_extractosplantas.pdf).
- Piedrasanta, R. (2007). **Comparación química y de rendimiento del aceite esencial de hoja y raíz de *Valeriana prionophylla* standl. De dos diferentes localidades de Guatemala**. Maestría multidisciplinaria en

- producción y uso de plantas medicinales, Universidad San Carlos de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Guatemala.
- Pilerood, A. & Prakash, J. (2014). Evaluation of nutritional composition and antioxidant activity of Borage (*Echium amoenum*) and Valerian (*Valerian officinalis*). ***Journal of food science and technology***, 51 (5), 845-54.
- Potdar V., Lole V. y Patil S. (2011). In-vitro Anthelmintic Activity of Rhizomes of *Valeriana wallichii* DC (Valerianaceae) Against *Pheretima posthuma*. ***Indian Journal of Pharmaceutical Education and Research***, 45(1), 83-85.
- Rivera, G. (2007). *Conceptos Introductorios a la Fitopatología*. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Costa Rica.
- Roldán, A.A. (1997). ***100 Plantas Medicinales***. España: Editorial Edaf, S.A.
- Romero, R. (2007). ***Microbiología y parasitología humana. Bases etiológicas de las enfermedades infecciosas y parasitarias***. Editorial Médica Panamericana, D.F, México.
- Ruiz, J. (2005). ***Drogas Inteligentes***. Barcelona: Editorial Paidotribo.
- Sati S., Khulbe K. y Savita J. (2011). Antibacterial Evaluation of the Himalayan Medicinal Plant *Valeriana Wallichii* DC (Valerianaceae), ***Research Journal of Microbiology***, 3, 289-296.
- Skoog, D., West, D. y Holler, J. (2001). ***Fundamentos de química analítica***. Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.
- Sofowora, E. A. (1993). ***Phytochemical Assays in "Medicinal Plants and Traditional Medicine in África"***. Nigeria: Spectrum Books Limited.
- Stahl E. (1969). ***Thin-Layer chromatography: a laboratory handbook***. Springer. Berlin, Alemania.
- Sutcliffe, J. (2005). Improving on nature: antibiotics that target the ribosome. ***Current opinion in microbiology***, 8 (5), 534-42.
- Tyler, V., Brady, L. y Robbers, J. (1979). ***Farmacognosia***. Argentina: ***Editorial***: Librería "El Ateneo".

- Valcárcel, M. y Gómez, A. (1988). **Técnicas analíticas de separación**.
Barcelona, España: Editorial Reverté, S.A.
- Velasco, J., Contreras, E., Buitrago, D. y Velazco, E. (2005). Efecto Antibacteriano de *Virola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a Meticilina. **Ciencia**, 13 (4), 411-415.
- Villar del Fresno, Á. y Carretero Accame, M. (2001). Valeriana officinalis. Fitoquímica, farmacología y terapéutica. **Farmacia profesional**, 15 (9).
- Wang, P.C., Ran, X.H., Luo, H.R., Ma, Q.Y., Liu, Y.Q., Dai, H.F., Zhou, J, & Zhao, Y.X. (2013). Volvalerenol A, a new triterpenoid with a 12-membered ring from Valeriana hardwickii. **Organic letters, Journal of organic chemistry**, 15 (12), 2898-2901.
- Xena de E. N. (1993). Contribución al estudio del género *Valeriana L.* en Venezuela: Distribución geográfica, caracteres morfoanatómicos, cariológicos y palinológicos de interés taxonómico y evolutivo. **Acta Botánica Venezuelica**, 16 (2-4) 105-115.
- Xena, N. (1992). **Herbario Nacional de Venezuela, Flora de Venezuela**. Caracas: Fondo Editorial Acta Científica Venezolana.