



UNIVERSIDAD DE LOS ANDES  
FACULTAD DE FARMACIA Y BIOANÁLISIS  
ESCUELA DE BIOANÁLISIS  
DEPARTAMENTO DE FARMACOGNOSIA Y  
MEDICAMENTOS ORGÁNICOS



**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE LOS  
EXTRACTOS CRUDOS DE LAS ESPECIES VEGETALES *Valeriana  
rosaliana* Meyer y *Valeriana parviflora* (Trevi.) Hoeck FRENTE A  
MICROORGANISMOS INFECCIOSOS**

bdigital.uia.ve

Autor:

Fernández B., Sammy P.

C.I. V-17.862.741

Tutor:

Rondón R., María E.

C.I. V-10.109.668

Mayo, 2015

## DEDICATORIA

*A Dios Todo Poderoso por darme el conocimiento, entendimiento y estar a mi lado en cada momento.*

*A mis padres por haberme dado la oportunidad de seguir un sueño y brindarme su apoyo en todo momento.*

*A todos los seres queridos que me acompañaron en este caminar.*

**Sammy Fernández Barrientos**

bdigital.ula.ve

## AGRADECIMIENTOS

- A Dios Todo Poderoso quien puso en el camino las personas correctas para poder llevar a cabo este trabajo.
- A la profesora María Eugenia Rondón Rivas, por brindarme su apoyo, compartir sus conocimientos, por su paciencia, dedicación, orientación y entusiasmo, por motivarme a alcanzar cada objetivo propuesto y ser una excelente Tutora. Muchísimas gracias.
- A la profesora Judith Velasco Carrillo, por su dedicación, orientación y su colaboración en la realización de los ensayos microbiológicos. Gracias por sus enseñanzas y por ser un ejemplo como profesional.
- Al profesor Luis Enrique Gámez, por su valiosísima colaboración clave en la realización de este trabajo, quien con sus conocimientos, dedicación y esfuerzo, ayudo en la difícil búsqueda, recolección e identificación de las especies vegetales estudiadas. Gracias por su gran aporte.
- Al profesor Luis Rojas por su colaboración para la identificación de los compuestos químicos.
- A la Universidad de Los Andes por acogerme en su seno y formarme como profesional.
- Al personal técnico que colaboró durante la realización de los extractos y ensayos.
- Al Consejo de Desarrollo Científico Humanístico y Tecnológico de la Universidad de Los Andes (CDCHT), por el financiamiento otorgado en la realización de este trabajo.

- Al personal que labora en los herbarios de la Facultad de Ciencias Forestales y Ambientales “Carlos Liscano” (MER) y el Herbario de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis “Dr. Luis Ruiz Terán” de la Universidad de Los Andes, por la colaboración prestada en la búsqueda de información de las especies vegetales estudiadas, haciendo mención especial a la Ing. Adela Ortega.
- A todas aquellas personas que me tendieron la mano en algún momento durante la realización de este trabajo.

bdigital.ula.ve

## RESUMEN

En la presente investigación, se presentan los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de las especies *Valeriana parviflora* (Trevir.) Hoeck (rizomas y partes aéreas) y *Valeriana rosaliana* Meyer (partes aéreas), pertenecientes a la familia Valerianaceae (Caprifoliaceae), plantas endémicas de los Andes venezolanos, así como también la composición química del aceite esencial de las partes aéreas de *V. parviflora*. Estas especies no presentan estudios previos de actividad antimicrobiana, sin embargo a otras especies del mismo género como *V. wallichii* DC y *V. officinalis* L., se les atribuye una notable actividad antimicrobiana, de allí la importancia en la realización de esta investigación. Para el estudio de la composición del aceite esencial se utilizó 950 g de material fresco, la extracción duró 4 horas, obteniéndose 0,3 mL (0,03%), utilizando la técnica de hidrodestilación por arrastre de vapor, los análisis químicos se hicieron por CG y CG-EM. Se identificaron 55 compuestos, representando un 84.9% del total del aceite. Los componentes mayoritarios fueron o-xilol (16,2%), ácido 3-metilisovalérico (10,6%) y geranial (9,5%). Para la actividad antimicrobiana, se prepararon extractos fraccionados con solventes de polaridad creciente: *n*-hexano (H), diclorometano (DM), acetato de etilo (AE), metanol (M), acetona (A), hidroalcohólico (HA) y agua (Ac), el ensayo se hizo por el método de difusión en agar con discos, frente a *S. aureus* (ATCC 25923), *E. fecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922), *K. pneumoniae* (ATCC 23357), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *C. albicans* (DCCB-385) y *C. krusei* (ATCC 6258). Los extractos fraccionados DM (rizomas), H y HA (partes aéreas) y el crudo M de *V. parviflora*; así como los extractos H, DM, AE, HA, A, Ac de la *V. rosaliana*, mostraron inhibición del crecimiento bacteriano solo frente a *S. aureus* ATCC (25923). Los valores de CIM más bajos fueron los obtenidos en el extracto en DM de los rizomas de la *V. parviflora* y los extractos en H y M (crudo), de la *V. rosaliana* (170 mg/mL, 150 mg/mL y 50 mg/mL, respectivamente). Este es el primer reporte sobre composición química y actividad antimicrobiana de ambas especies.

## INDICE GENERAL

	pp
Dedicatoria.	
Agradecimientos.	
Resumen.	
Índice General.....	iv
Índice de Figuras.....	viii
Índice de Tablas.....	x
1. Introducción.....	1
2. Marco Teórico.....	3
2.1 Familia Valerianaceae Batsch (Caprifoliaceae).	
2.1.1 Clasificación Taxonómica.....	4
2.1.2 Aspectos Botánicos.....	4
2.1.3 Aspectos Geográficos.....	5
2.2 Género <i>Valeriana</i> L.	
2.2.1 Aspectos Botánicos.....	5
2.2.2 Aspectos Geográficos.....	6
2.2.3 Aspectos Químicos.....	7
2.2.3.1 Iridoides (Valepotriatos).....	7
2.2.3.2 Alcaloides.....	9
2.2.3.3 Aceites esenciales.....	9
2.2.3.4 Otros Compuestos.....	11
2.2.4 Usos Etnobotánicos.....	12
2.2.5 Aspectos Farmacológicos.....	12
2.3 Especies <i>Valeriana parviflora</i> (Trevir.) Hoeck.	
2.3.1 Aspectos Botánicos.....	15
2.3.2 Aspectos Geográficos.....	15
2.4 Especie <i>Valeriana rosaliana</i> Meyer.	
2.4.1 Aspectos Botánicos.....	16

2.4.2 Aspectos Geográficos.....	16
2.5 Extractos Vegetales.	
2.5.1 Definición.....	17
2.5.2 Técnicas de Extracción	
2.5.2.1 Maceración.....	18
2.5.2.2 Lixiviación.....	18
2.5.2.3 Digestión.....	18
2.5.2.4 Infusión.....	19
2.5.2.5 Decocción.....	19
2.5.2.6. Extracción continua.....	19
2.6 Métodos de Obtención del Aceites Esenciales	
2.6.1 Hidrodestilación.....	19
2.6.2 Arrastre por Vapor.....	20
2.6.3 Extracción con disolventes.....	20
2.7 Cromatografía.	
2.7.1 Definición.....	20
2.7.2 Técnicas Cromatográficas	
2.7.3 Cromatografía en Capa Fina.....	21
2.7.4 Cromatografía de Gases.....	21
2.8 Enfermedades Infecciosas.....	22
2.9 Bacterias.....	22
2.10 Hongos.....	23
2.11 Antibióticos.....	24
2.12 Resistencia Antimicrobiana.....	26
2.13 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana	
2.13.1 Dilución en Agar o Caldo.....	26
2.13.2 Difusión por Disco.....	27
3. Planteamiento del Problema.....	28
4. Hipótesis.....	30
5. Objetivos.....	32

5.1 Objetivo General.....	33
5.2 Objetivos Específicos.....	33
6. Metodología.....	35
6.1 Recolección e Identificación del Material Botánico.....	36
6.2 Preparación de los Extractos Secos.....	37
6.3 Análisis Cualitativo de los Extractos Secos (Determinación de Valepotriatos y Alcaloides).....	40
6.3.1 Cromatografía en Capa Fina.....	40
6.3.2 Análisis de Presencia de Alcaloides.....	40
6.4 Obtención del Aceite Esencial.....	41
6.5 Identificación de los Componentes Químicos de los Extractos y Aceite Esencial.....	42
6.6 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana.....	43
6.6.1 Preparación de Las Placas de Petri.....	44
6.6.2 Preparación de los Discos.....	45
6.6.3 Preparación de los inóculos.....	45
6.6.4 Inoculación.....	46
6.6.5 Ensayo de la Actividad Antimicrobiana.....	46
6.6.6 Lectura de los Ensayos.....	47
6.6.7 Determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima.....	47
7. Resultados y Discusiones.	
7.1 Detección Cualitativa de Valepotriatos por Cromatografía en Capa Fina.....	49
7.2 Determinación de alcaloides.....	51
7.3 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas del Aceite Esencial de la <i>Valeriana parviflora</i> (Trevir) Hoeck.....	52
7.4 Cromatografía del Extracto en Diclorometano de la <i>Valeriana parviflora</i> (Trevir) Hoeck.....	54
7.5 Cromatografía del Extracto Metanólico de la <i>Valeriana parviflora</i> (Trevir) Hoeck.....	55



7.6 Evaluación de la Actividad Antimicrobiana de los Extractos de la <i>Valeriana parviflora</i> (Trevir) Hoeck y la <i>Valeriana rosaliana</i> Meyer.....	57
8. Conclusiones.....	66
9. Referencias Bibliográficas.....	69

bdigital.ula.ve

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>pp.</b>
1 Distribución geográfica de la familia Valerianaceae Batsch.....	5
2 Distribución de las especies de <i>Valeriana</i> en los Páramos venezolanos.....	6
3 Esqueleto del iridano.....	7
4 Clasificación de valepotriatos según su estructura.....	8
5 Estructura del Baldrinal.....	8
6 Alcaloides monoterpénicos aislados de <i>Valerianas</i> .....	9
7 Monoterpenos presentes en el aceite esencial de las <i>Valerianas</i> .....	10
8 Sesquiterpenos presentes en el género <i>Valeriana</i> L.....	11
9 Lignano aislado de <i>Valeriana</i> L.....	11
10 <i>Valeriana parviflora</i> (Trevir.) Hoeck.....	16
11 <i>Valeriana rosaliana</i> Meyer.....	17
12 Estructura celular bacteriana.....	22
13 Estructura de la pared celular de las bacterias.....	23
14 Puntos básicos de actividad antibiótica.....	25
15 Recolección de la <i>V. rosaliana</i> Meyer.....	36
16 Recolección de la <i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck. ....	37
17 Proceso de desecación del material vegetal.....	38
18 Proceso de preparación de los extractos.....	39
19 Extractos vegetales preparados a partir de la <i>V. rosaliana</i> Meyer y <i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck. ....	39
20 Preparación del aceite esencial de la <i>V. parviflora</i> .....	40
21 Preparación de medios de cultivo.....	44
22 Preparación de discos. ....	45
23 Colocación de discos. ....	46
24 Material para preparar las diluciones.....	47

<b>25</b>	Cromatografía en capa fina.....	49
<b>26</b>	Compuestos mayoritarios del aceite esencial de la <i>V. parviflora</i> .....	54
<b>27</b>	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck contra <i>S. aureus</i> ATCC (25923).....	61
<b>28</b>	Actividad antimicrobiana de los extractos de <i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck y <i>V. rosaliana</i> Meyer frente a <i>S. aureus</i> ATCC (25923).....	62
<b>29</b>	Actividad antimicrobiana del extracto en hexano de <i>V. rosaliana</i> frente a <i>S. aureus</i> ATCC (25923) .....	62

bdigital.ula.ve

## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla</b>	<b>pp.</b>
<b>1</b> Clasificación taxonómica de la familia Valerianaceae.....	4
<b>2</b> Clasificación de los antibióticos según su estructura química.....	24
<b>3</b> Microorganismos a utilizarse en los ensayos antimicrobianos y sus respectivos controles.....	43
<b>4</b> Test de alcaloides en extractos de la <i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck y la <i>V. rosaliana</i> Meyer.....	52
<b>5</b> Composición química del Aceite Esencial de la <i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck.....	53
<b>6</b> Composición química del extracto en Diclorometano de la <i>V. parviflora</i> Trevir Hoeck. ....	56
<b>7</b> Composición química del extracto metanólico de la <i>V. parviflora</i> Trevir Hoeck. ....	57
<b>8</b> Actividad Antimicrobiana de los Extractos Vegetales de la especie <i>Valeriana parviflora</i> (Trevir) Hoeck.....	63
<b>9</b> Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales (partes aéreas) de la especie <i>V. rosaliana</i> Meyer.....	64
<b>10</b> Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de las especies <i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck y <i>V. rosaliana</i> Meyer.....	65

## 1. INTRODUCCIÓN

El reino vegetal siempre le ha aportado al hombre grandes beneficios que han contribuido con su supervivencia, una prueba de ello es el oxígeno que le permite respirar, los frutos y semillas que lo alimentan, madera con la que pueden construir viviendas y hasta remedios naturales para las afecciones que sufre. Desde la época prehistórica el hombre recurría a las plantas cuando manifestaba alguna dolencia, ese era su modo de curación mucho antes que existiera la medicina moderna (Albornoz, 1987).

Por otra parte, en épocas antiguas los egipcios, los asiáticos y los griegos reportaban el uso de plantas como el azafrán, la canela, el tomillo, comino, incienso, eucalipto, menta, el cannabis, entre muchas otras, para ser utilizadas como terapia en el tratamiento de diferentes enfermedades, siendo los griegos los primeros en documentar un libro que trata sobre el uso de plantas medicinales. A partir de ese momento muchos herboristas dedicaron al cultivo y búsqueda de plantas medicinales para usos terapéuticos (Albornoz, 1980).

En la actualidad, no solo los herboristas se dedican a la búsqueda y cultivo de estas plantas de interés para el hombre ya que desde hace unas décadas se han venido formando grupos de investigación científica cuya área de estudio son los Productos Naturales, los cuales tienen como finalidad estudiar la composición química de las plantas que presentan actividad biológica y de esta manera buscar alternativas terapéuticas a diversas enfermedades que aun no tienen un tratamiento adecuado (Albornoz, 1987; Marcano & Hasegawa, 2002).

Dentro de estas se encuentra la enfermedad del Alzheimer, el cáncer, el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA), infecciones causadas por

microorganismos resistentes a antibióticos, siendo esta última, una de las más estudiadas por los grupos de investigación de Productos Naturales; ya que los microorganismos se han adaptado a la exposición de antimicrobianos de referencia internacional, es por ello que la búsqueda de nuevas entidades químicas que puedan combatir estos microorganismos es de vital importancia (Cabezas, 2005).

En Venezuela, se encuentran grupos de investigación dedicados al área de Productos Naturales quienes se encargan de estudiar la rica diversidad vegetal que hay en el país, siendo los páramos andinos una referencia para la búsqueda de especies que solo se encuentran en esta parte del mundo, un ejemplo de ello, son las especies del género *Valeriana* L. que se encuentran habitando los páramos de Los Andes, un total de nueve especies son endémicas de la región, esto representa una alternativa para la búsqueda de nuevos compuestos capaces de generar una inhibición en el crecimiento microbiano (Bueno y Suarez, 2010; Xena, 1992).

Si bien es cierto que este género no es usado tradicionalmente como un antimicrobiano, sino como un antidepresivo y sedante, hay estudios que indican que *Valeriana* L., no solo presentan esta actividad biológica sino que también presentan actividad anticancerígena, antiparasitaria, antifúngica, antimicrobiana, antileishmánica e incluso insecticida (Wang et al. 2010). En el presente trabajo se decidió abordar el estudio de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos de las especies *Valeriana rosaliana* Meyer endémica del estado Táchira y *Valeriana parviflora* (Trevir.) Hoeck, endémica del estado Mérida, así como la composición química de los extractos y aceite esencial de esta última.

# MARCO TEÓRICO

## 2. MARCO TEORICO

### 2.1. Familia Valerianaceae Batsch (Caprifoliaceae)

#### 2.1.1 Clasificación taxonómica:

Es mostrada en la **Tabla 1**

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica de la familia Valerianaceae

<b>Reino:</b>	Plantae
<b>División:</b>	Magnoliophyta
<b>Clase:</b>	Magnoliopsida
<b>Subclase:</b>	Asteridae
<b>Orden:</b>	Dipsacales
<b>Familia:</b>	Valerianaceae

(Fernández, 2011).

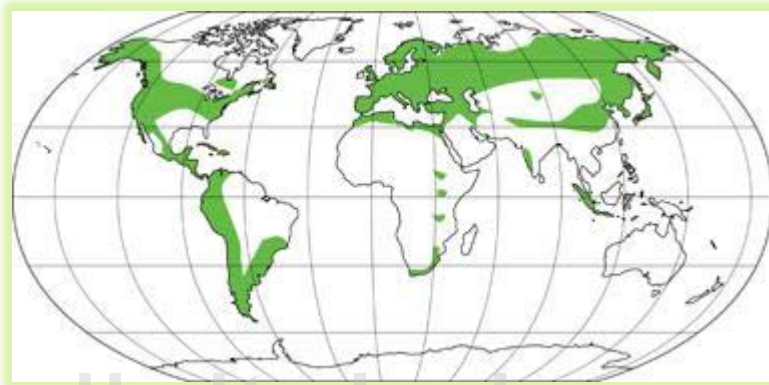
#### 2.1.2 Aspectos botánicos:

Son hierbas anuales y perennes rara vez son arbustos, generalmente presentan rizomas, y se caracterizan por poseer un olor fuerte cuando está seca, el cual es distintivo de este grupo debido a la presencia de valepotriatos en las raíces. Sus hojas son opuestas, compuestas o simples con borde liso, dentado, serrado o crenado; las inflorescencias son terminales, axilares o cimoides, con flores pequeñas, blancas, cremosas o rosas, hermafroditas o unisexuales, cáliz con tubo adnato al ovario, corola gamopétala, estambres de 1 a 4, ovario ínfero, trilocular, un lóculo fértil y dos estériles desarrollados, fruto un aquenio cipselado, seco, indehiscente, semilla péndula con endospermo ausente o muy escaso (Xena, 1992).



### 2.1.3 Aspectos geográficos:

La familia Valerianaceae incluye 12 géneros y alrededor de 400 especies que se distribuyen en todo el mundo, a excepción de Australia y las islas del Pacífico (**Figura 1**). El género *Valeriana* L., es la más diversificada y de mayor distribución dentro de esta familia (Kutschker, 2011).



**Figura 1.** Distribución geográfica de la familia Valerianaceae Batsch

Fuente: *Valerianaceae Batsch*. (s.f.). Recuperado el 05 de Junio de 2014, de [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/valerianaceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/valerianaceae.html)

## 2.2 Género *Valeriana* L.:

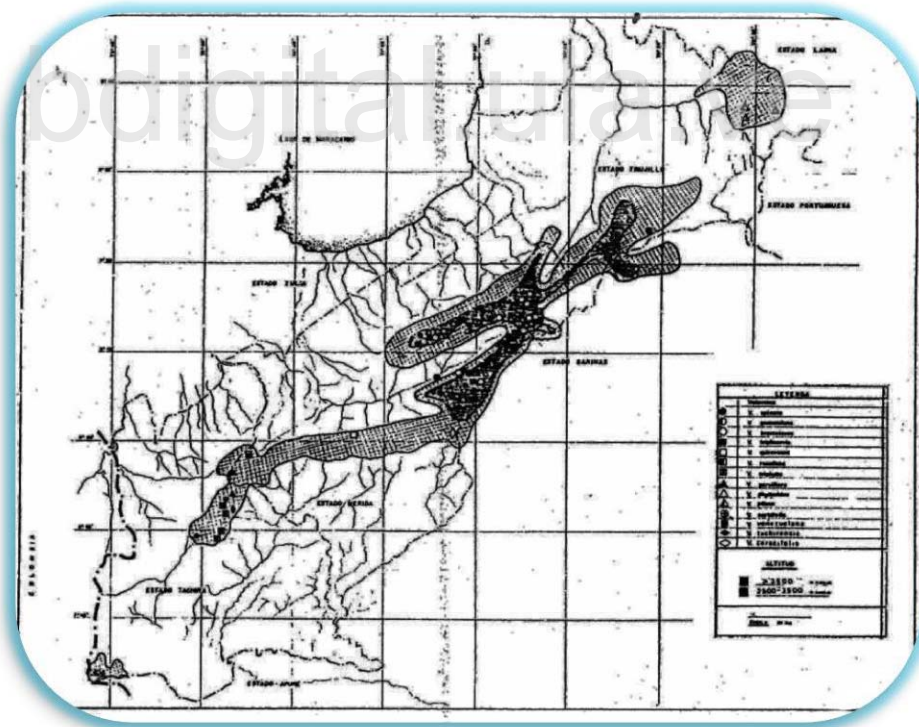
### 2.2.1 Aspectos Botánicos:

Son hierbas perennes, sufrútices o arbustos, raramente hierbas anuales o plantas trepadoras, con rizoma o raíces leñosas de olor fuerte, con hojas opuestas o en roseta basal. Inflorescencias capitoides, flores hermafroditas o unisexuales, cáliz de limbo involuto en la flor, sino reducido a una corta corona. Corola blanca, cremosa o rosada. Estambres tres, ovario ínfero, tricarpelar, solamente el adaxial fértil, el fruto un aquenio cipselado, semilla sin albumen llenando totalmente el lóculo fértil (Xena, 1992).

### 2.2.2 Aspectos geográficos:

Género representado por unas 200 especies, ausente solo en Australasia, es el único representante de la familia Valerianaceae en Venezuela, presenta 16 especies siempre en montañas a partir de los 700 msnm, entre ellas 14 crecen en los Páramos Andinos venezolanos (**Figura 2**), 11 son arbustivas (9 endémicas) y 3 son herbáceas.

Las especies que se encuentran en Venezuela pertenecen a dos subgéneros: Subgénero *Phyllactis* y Subgénero *Valeriana* L., sección Portería, encontrándose en este último la *Valeriana rosaliana* Meyer y *Valeriana parviflora* (Trevir.) Hoeck (Xena, 1993).



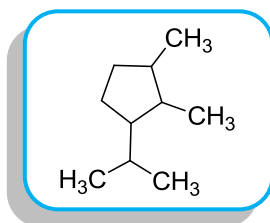
**Figura 2.** Distribución de las especies de *Valeriana* en los Páramos venezolanos (Tomado de Xena, 1993).

### 2.2.3 Aspectos químicos:

El género *Valeriana* L. se caracteriza químicamente por poseer como componentes mayoritarios metabolitos no volátiles conocidos como valepotriatos, los cuales son ésteres de iridoides (monoterpenos), alcaloides, lignanos y flavonoides; además de metabolitos volátiles presentes en los aceites esenciales característicos de este género (Dewick, 1998). A continuación se detallan algunos de los componentes mencionados anteriormente:

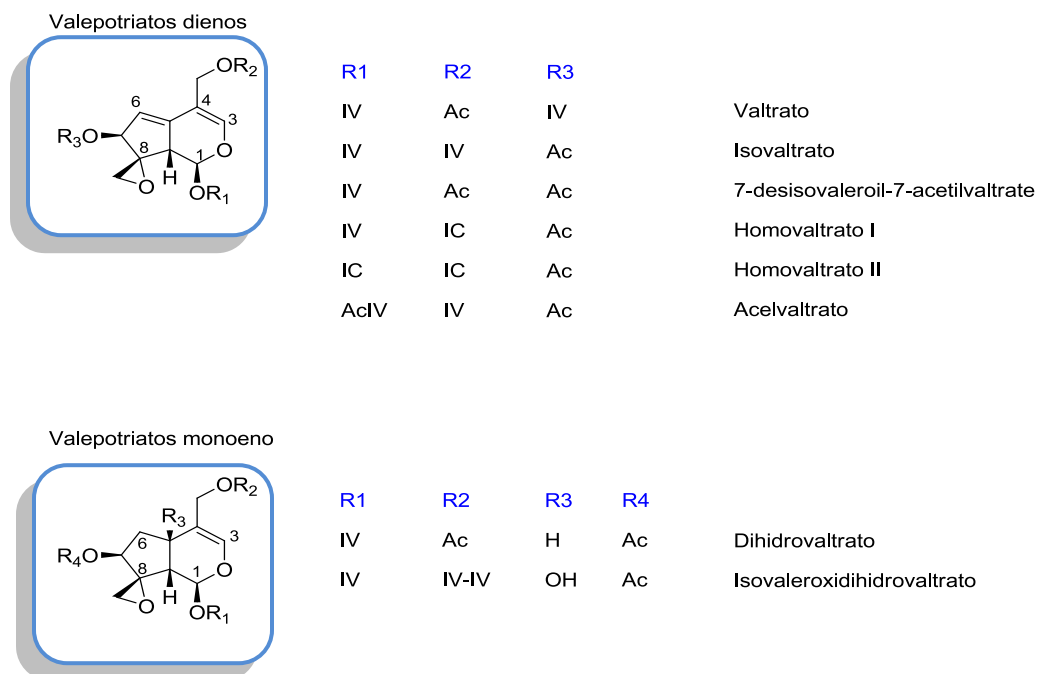
#### 2.2.3.1 Iridoides (valepotriatos):

Son monoterpenos cíclicos que se caracterizan por presentar el esqueleto de iridano (1,2-dimetil-3-isopropilciclopentano) (**Figura 3**). El término iridoides es tomado del nombre de unas hormigas del género *Iridomirmex* de las cuales se lograron aislar compuestos con el esqueleto iridano. Este grupo solo tiene representación en las Angiospermas (Dicotiledóneas) con excepción de algunas estructuras presentes en insectos (Sánchez, 2006; Bruneton, 2001).



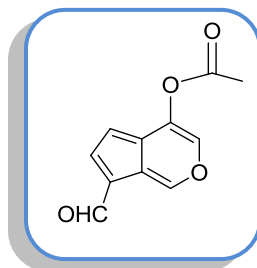
**Figura 3.** Esqueleto del iridano (Tomado de Bruneton, 2001)

En el caso de las plantas del género *Valeriana* L., se han aislado iridoides conocidos como valepotriatos dienos y valepotriatos monoenos; entre los que destacan el valtrato, isovaltrato, homovaltrato, como los componentes mayoritarios del género *Valeriana* L. (**Figura 4**) (Houghton, 1988).



**Figura 4:** Clasificación de valepotriatos según su estructura (Tomado de Van Meer y Labadie, 1981) IV: isovaleril, IC: Isocaproil, Ac: acetil, AcIV: Acetoxiisovaleril, H: hidrógeno, OH: hidroxilo

Los valepotriatos son inestables hidrolizándose con gran facilidad debido a la humedad, el calor y la acidez, dando lugar a baldrinales que son aldehídos insaturados de color amarillo (**Figura 5**) que son por sí mismos reactivos. La tintura de *Valeriana* L. al conservarse dos semanas a 20 °C solo conserva 1/3 de los valepotriatos inicialmente presentes ya que el alcohol presente en dicha forma farmacéutica degrada a esta clase de compuestos. (Bruneton, 2001; Bravo, 2006).

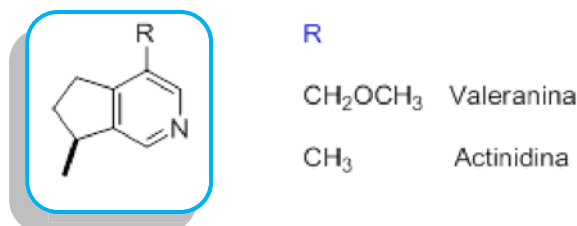


**Figura 5.** Estructura del Baldrinal (Tomado de Bos et al., 2002)

### 2.2.3.2 Alcaloides:

Son sustancias agrupadas que no presentan homogeneidad desde el punto de vista químico, se definen como compuestos nitrogenados generalmente heterocíclicos con actividad fisiológica específica, se encuentran fundamentalmente en plantas y derivan biosintéticamente de aminoácidos. Algunos de los alcaloides más conocidos y consumidos por el ser humano son la cafeína (*Coffea arabiga*), la teofilina (*Camelia sinensis*) y la teobromina (*Theobroma cacao*) los cuales producen efectos diuréticos y estimulantes en el cuerpo (Albornoz, 1980; Pérez, 2013).

En 1967 Torsell y Wahlberg (citado en Houghton, 1999) lograron aislar de la *V. officinalis* L., dos alcaloides terpenoides estructuralmente similares a los iridoides tales como valeranina y a la actinidina (**Figura 6**). Estos alcaloides mostraron ser inhibidores altamente activo de la colinesterasa en pruebas *in vitro*, aunque no mostraron acción significativa en conejos (Houghton, 1999).



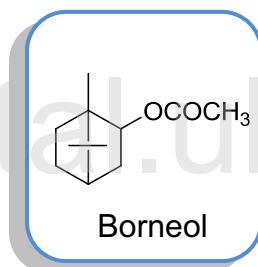
**Figura 6.** Alcaloides monoterpénicos aislados de *Valerianas* (Tomado de Bos et al., 2002).

### 2.2.3.3 Aceites Esenciales:

Son productos de composición generalmente muy compleja, son de sumo interés académico e industrial por contener los principios volátiles que se encuentran en los vegetales y que son responsables de las fragancias de las

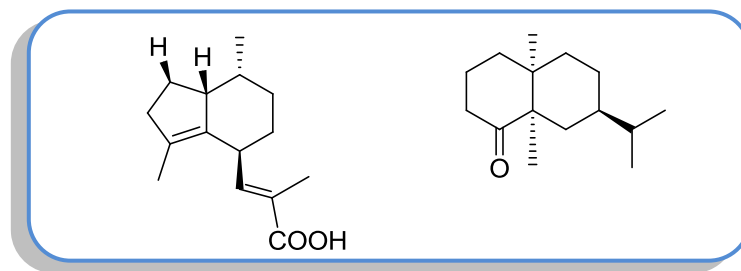
flores y otros órganos de las plantas. Están constituidos por terpenos, hidrocarburos alifáticos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres, fenoles y lactonas. Son particularmente abundantes en las familias Lamiaceae, Rutaceae, Mirtaceae, Cruciferae y Geraniaceae. Algunos ejemplos de estos compuestos son: geranial, mentol, eucaliptol, alcanfor entre otros. (Albornoz, 1980; Bruneton, 2001).

La composición química de los aceites esenciales en el género *Valeriana* L., es muy variable ya que depende del clima y de factores ecológicos. En la *V. officinalis* L., se ha encontrado monoterpenos principalmente borneol (**Figura 7**) y su acetilo; sin embargo; los sesquiterpenos son más relevante debido a la actividad biológica que presentan (Houghton, 1999).



**Figura 7.** Compuestos presentes en el aceite esencial de las Valerianas (Bos et al., 2002).

Entre los sesquiterpenos hallados en *V. officinalis* L., se encuentra el ácido valerénico exclusivo de especies de este género, y se encuentra mayoritariamente en el aceite esencial de *V. fauriei* Briq. y *V. officinalis* L., además de la valeranona que es el compuesto principal en *Valeriana wallichii* DC (Houghton, 1999) (**Figura 8**).



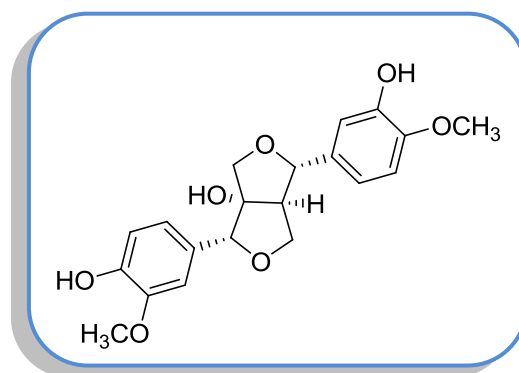
Ac. Valerénico

Valeranona

**Figura 8.** Sesquiterpenos presentes en el género *Valeriana* L.  
(Tomado de Giraldo, 2010).

#### 2.2.3.4. Otros compuestos:

También se han aislado pequeñas cantidades de un lignano conocido como 1-hidroxipinoresinol (**Figura 9**) el cual presenta un ligero efecto sobre los receptores benzodiazepínicos. Algunos aminoácidos libres tales como GABA, tirosina, arginina y glutamina también se han separado de los extractos de estas especies. (Houghton, 1999).



**Figura 9.** Lignano aislado de *Valeriana* L. (Tomado de Houghton, 1999).

#### 2.2.4 Usos Etnobotánicos:

Su uso se remonta a la antigüedad siendo descrita por Dioscórides, Hipócrates y Galeno. Dioscórides hacía referencia a ella como la Gran Valeriana en su Libro I sobre remedios y plantas naturales y reportaba su utilidad en el tratamiento de la epilepsia. El italiano Gayo Plinio la recomendó para los espasmos de la faringe y Galeno, en el siglo II d.C, recomendaba su uso para tratar el insomnio. Tampoco la tradición china e hindú escapó a sus encantos y la incluyeron como un remedio más de su medicina tradicional. A lo largo del siglo XVI, se extendió su uso como sedante. Durante la Segunda Guerra Mundial, *V. officinalis* L. fue frecuentemente utilizada para aliviar la tensión nerviosa originada por los bombardeos y explosiones frecuentes en esas circunstancias (López et al., 2010).

Otro usos descritos por Fonnegra y Jiménez (2007) para este género son: tratamiento de encías irritadas, cefalea, náuseas, trastornos de las vías urinarias e infecciones vaginales, diurético, antídoto para venenos, resfrío, expectorante, antiespasmódico, vermífugo, carminativo, antiflatulento, analgésico, hipnótico, fortalecer el corazón, calambres musculares, neuralgia, tratamiento de heridas y llagas en la piel.

#### 2.2.5 Aspectos farmacológicos:

La mayoría de los estudios realizados sobre las especies del género *Valeriana* L., se han volcado al estudio de los compuestos que ejercen actividad a nivel del sistema nervioso central, *V. officinalis* L. es recomendada para tratar trastornos del sueño como el insomnio, que en algunos casos están relacionados con el incremento del stress oxidativo causado por cambios en la homeostasis de los neurotransmisores (Olanow, 1993; D'Almeida et al. 1998; Cierelli, 2006).



Varios estudios sugieren que posiblemente *V. officinalis* L. interactúen con distintos sistemas de neurotransmisores (Mueller et al. 2002; Ortiz et al. 2006). En 2009, un grupo de investigadores demostró que la tintura de *V. officinalis* L., previene la demanda oxidativa en el cerebro inducida por diferentes agentes pro-oxidantes, sugiriendo de esta manera, que el uso del extracto de esta especie de *Valeriana* L., puede resultar beneficioso en la reducción de los casos de insomnio asociados al stress oxidativo (Sudati et al. 2009).

Debido a estas virtudes, el uso de *V. officinalis* L., puede constituir una excelente alternativa para pacientes que reciben terapia contra el cáncer quienes suelen padecer de trastornos del sueño y estados de fatiga extrema y no desean que se les administren tratamientos contra el insomnio que pueden causar dependencia debido al uso prolongado de los mismos. La administración de *V. officinalis* L., en este tipo de pacientes mejora sustancialmente dichos estados de fatiga y los problemas de insomnio, sin que presente ningún tipo de efecto tóxico o no deseado en estos pacientes (Barton et al. 2011).

Otra especie de *Valeriana* L., capaz de inducir efectos a nivel del Sistema Nervioso Central es *V. pavonii* Poepp., una especie que crece y se comercializa en Colombia como sedante, la cual demostró tener efectos farmacológicos como anticonvulsivante, sedante y antidepresivo en experimentos realizados *in vitro* (Celis et al., 2007).

Otras especies de *Valeriana* L., con efecto antidepresivo demostrado sobre animales de experimentación incluye a *V. glechomifolia* Meyer (Müller et al. 2012), el extracto metanólico de las raíces de *V. fauriei* Briq. (Liu et al. 2012), *V. wallichii* DC (Sha et al., 2011) y *V. officinalis* L (Hattesoehl et al. 2008).

En 2007, un grupo de investigadores, demostraron que los extractos etanólicos y acuosos de *V. officinalis* L. poseían propiedades anticoronariaespásticas, antihipertensivos y antibroncoespásticas significativas. Estos fueron similares a las exhibidas por la nifedipina y se deben a las características estructurales de los principios activos que contienen (Circosta et al., 2007).

A pesar de que en la mayoría de los casos reportados, los estudios sobre actividad biológica de las especies del género *Valeriana* L. se han centrado en el efecto que estas poseen a nivel del Sistema Nervioso Central (SNC), especialmente como inductores del sueño; adicionalmente, se han realizado otros estudio que permiten reconocerles otros efectos farmacológicos y el aceite esencial de *V. officinalis* L. ha mostrado un efecto antibacteriano y antifúngico contra un amplio espectro de microorganismos. Dicho aceite esencial también posee un marcado efecto antioxidante (Wang et al. 2010).

También se ha demostrado una excelente actividad citotóxica a partir de los extractos de *V. officinalis* L., *V. wallichii* DC., y *V. edulis* Nutt. Ex Torr & Gray, frente a las líneas celulares de cáncer de pulmón y de colon (Bos et al. 1998).

Adicionalmente, la *Valeriana wallichii* DC., la cual crece en el Himalaya y de la que se emplean las raíces y rizomas (Wallis, 2005). Se ha reportado su uso para aliviar el dolor abdominal, contra el insomnio, epilepsia, neurosis, ciática, antiespasmódico, antihelmíntico (Potdar et al. 2011) y leishmanisida (Ghosh et al. 2011). El aceite esencial de esta especie también posee actividad antibacteriana y antifúngica (Sati et al. 2011).

La actividad antifúngica del aceite esencial de la especie *V. dioscoridis* de Grecia fue demostrada por Pavlovic M., Kovacevic N., Tzakou O. y Couladis

M. (2007) y de *V. prionophylla* Standl. (VP) por Gaitan (2005) de esta última también se reporta actividad antibacteriana (Canmacu, 2007), así como también de la especie *V. hardwickii* Wall, a la cual además se le reportó una potente actividad antioxidante (Yousuf et al. 2013, 2014).

Por otra parte, se ha demostrado que el extracto alcohólico de la especie *V. jatamansii* Jones resultó ser activo contra diferentes tipos de mosquitos de los géneros *Anopheles*, *Aedes* y *Culex*, tanto en estado adulto como en larvas (Dua et al. 2008) y el extracto metanólico de las raíces posee un notable efecto antioxidante (Thusoo et al., 2014).

### **2.3. Especie *Valeriana parviflora* (Trevir.) Hoeck:**

#### **2.3.1 Aspectos botánicos:**

Arbusto que mide 1 a 3 metros de alto, es profusamente ramificado y de ramas erectas, con hojas sésiles y diminutas, orbiculares-ovadas, recubriéndose entre ellas y cubriendo totalmente el tallo, posee un borde entero, inflorescencias terminales en cimas capituliformes escondidas entre las brácteas, es de flores hermafroditas o femeninas; cáliz verde intenso, corola blanca, estambres con filamentos blancos y presenta fruto de uno 2 a 3 mm de largo sin pappus (**Figura 10**).

**2.3.2 Aspectos geográficos:** Es una especie endémica del páramo de Piedras Blancas y sus alrededores, en los Andes merideños se encuentra a una altura que oscila entre los 3000 y 4300 msnm (Xena, 1992).



A

B

**Figura 10.** *Valeriana parviflora* (Trevir.) Hoeck. a) Porte; b) Detalles de la inflorescencia. Tomada por el Prof. Luis E. Gámez

#### 2.4 Especie *Valeriana rosaliana* Meyer:

##### 2.4.1 Aspectos botánicos:

Es un arbusto que mide de 1,5 a 2,5 metros de alto, muy ramificado, y con ramas profusamente foliadas y pilosas en su parte superior y defoliada hacia su parte inferior, con hojas ascendentes espatuladas, los bordes crenato-serrados, ápice obtuso e inflorescencia en la cima capitoide terminal, con flores pequeñas, hermafroditas o femeninas, limbo del cáliz corto y con frutos sin papus (**Figura 11**) (Meyer, 1979; Xena, 1992).

##### 2.4.2 Aspectos geográficos:

Es una especie endémica de los páramos El Rosal y Batallón en Los Andes tachirenses entre 3000 y 3300 msnm (Xena, 1992).



**Figura 11.** *Valeriana rosaliana* Meyer. a) Porte; b) Detalles de la inflorescencia; c) Detalles de la hoja. Tomada por Prof. Luis E. Gámez.

## 2.5 Extracto vegetal:

### 2.5.1 Definición:

Es un concentrado que se obtiene al tratar material vegetal con solventes apropiados, tales como agua, alcohol, hexano, diclorometano, entre otros. Están constituidos por una mezcla de compuestos activos e inertes, la

consistencia de los mismos puede ser blanda, firme, secos o fluidos y se pueden obtener de la totalidad o partes de la planta fresca o seca, a través de técnicas de extractivas como: maceración, lixiviación, digestión, infusión, decocción, extracción continua (Albornoz, 1980).

### 2.5.2 Técnicas de extracción:

#### 2.5.2.1 *Maceración:*

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

#### 2.5.2.2 *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).

#### 2.5.2.3 *Digestión:*

Es una técnica donde se aplica calor moderado al material pulverizado, lo cual aumenta el poder disolvente. Para que el solvente pueda usarse continuamente por reciclaje, se adapta un condensador al balón donde se efectúa la digestión (Albornoz, 1980).

#### 2.5.2.4 *Infusión:*

Es una técnica que utiliza las hojas, flores y sumidades floridas (partes tiernas de las plantas) y se extraen con agua caliente, pero sin someterlas a ebullición; el agua se vierte sobre ellas en un recipiente el cual se mantendrá cerrado durante unos treinta minutos (Albornoz, 1980).

#### 2.5.2.5 *Decocción:*

El material crudo, se somete a ebullición con agua en un recipiente apropiado para impedir que se derrame (Albornoz, 1980).

#### 2.5.2.6 *Extracción continúa:*

En esta técnica el material vegetal se trata con un disolvente que disuelve uno o algunos de sus componentes. Son utilizados aparatos especialmente diseñados, tales como el Soxhlet y los extractores liquido-liquido (Albornoz, 1980).

### **2.6 Método de obtención de Aceites Esenciales:**

#### 2.6.1 Hidrodestilación:

Se usa material seco, que es introducido en una cámara de destilación, no es sometido a ebullición sino que es calentado suavemente hasta que la materia volátil se condense en otra cámara en el cual se separaran la capa oleosa de la acuosa (Albornoz, 1980).

### 2.6.2 Arrastre por vapor:

Es usado material fresco, el cual se corta inmediatamente antes de la destilación para evitar oxidación o pérdida por volatilización, se coloca en una cámara de destilación, pero en lugar de macerar, se hace que el vapor de agua penetre y arrastre gotitas del destilado hacia el condensador (Albornoz, 1980).

### 2.6.3 Extracción con disolventes:

Para ella se utilizan solventes no polares (éter sulfúrico, éter de petróleo o benceno). En ella la destilación se mantiene uniforme a 50 °C (Albornoz, 1980).

## 2.7. **Cromatografía:**

### 2.7.1 Definición:

Es una técnica de separación que está fundamentada en el efecto de retención ejercido por una fase estacionaria, que puede ser un sólido o un líquido anclado a un soporte sólido, y el efecto de desplazamiento ejercido por una fase móvil, que puede ser líquida o gaseosa, sobre los componentes de una mezcla con la finalidad de separarlos. El proceso básico de la técnica consiste en depositar la mezcla en la fase estacionaria para que la fase móvil arrastre sus componentes a distintas velocidades a lo largo de la fase (Martinez & Csáky, 2001).

La cromatografía puede ser clasificada de acuerdo a la naturaleza física de las fases en: sólido-líquido, líquido-líquido, sólido-líquido y sólido-gas, pero también se clasifica de acuerdo a la interacción entre los componentes de la



mezcla y la fases estacionaria y móvil en: cromatografía de absorción, de partición y de intercambio iónico (Martinez & Csáky, 2001).

### 2.7.2 Técnicas Cromatográficas:

#### 2.7.2.1 *Cromatografía en capa fina:*

Es una cromatografía de adsorción sólido-líquido, en donde la fase estacionaria está constituida por un sólido polar finamente granulado, depositado comúnmente sobre una placa de vidrio formando una capa fina, que permite adsorber las moléculas polares de la mezcla mediante las interacciones dipolo-dipolo o la formación de enlaces de hidrogeno, a medida que esta va siendo desplazada por la fase móvil (Martinez & Csáky, 2001).

#### 2.7.2.2 *Cromatografía de gases:*

Es una cromatografía que utiliza un gas inerte como fase móvil y un sólido o líquido (soportado en un sólido inerte) polar, la técnica consiste básicamente en el tiempo que es retenido el gas portador (fase móvil) hasta lograr eludir los compuestos de la mezcla (previamente vaporizada) que fueron adsorbidos por la fase estacionaria, los vapores eluidos por la fase móvil pasan por un detector y este envía una señal que será transformada y se verá reflejada en forma de un gráfico proporcionado por un cromatograma. Esta técnica es muy útil para obtener datos cualitativos y cuantitativos de los componentes de una mezcla (Albornoz, 1980; Martinez & Csáky, 2001).

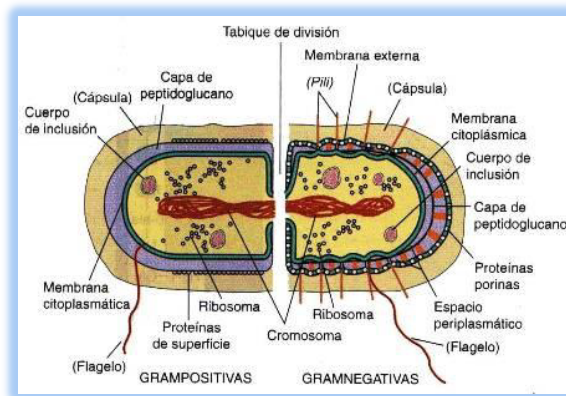
El cromatógrafo de gases puede ser utilizado junto a un espectrómetro de masas (GC-MS) con la finalidad de permitir la separación e identificación de mezclas complejas (Martinez & Csáky, 2001).

## 2.8 Enfermedades Infecciosas:

Desde el momento de nacimiento y durante toda su vida las personas son propensas a sufrir una ruptura del equilibrio fisiológico del cuerpo, alterando su estado de salud y produciendo enfermedades, si esta pérdida de equilibrio homeostático es causada por un microorganismo, como bacterias, virus u hongos, las enfermedades serían de tipo infeccioso pudiendo ser contagiosas o no. (Volk, 1996; Divo, 1990).

## 2.9 Bacterias:

Son microorganismos unicelulares capaces de multiplicarse por sí mismos a expensas del medio que los rodea, poseen una estructura relativamente simple carente de núcleo verdadero, pero con presencia de mitocondrias, plásmidos, ribosomas, aparato de Golgi, retículo endoplasmático y una pared celular muy compleja que rodea la membrana celular (**Figura 12**) (Murray et al., 2009).



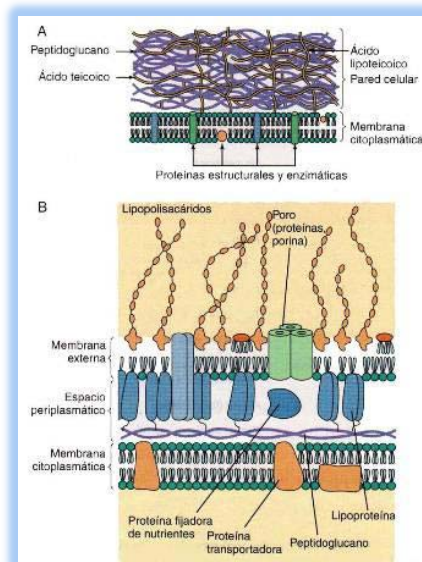
**Figura 12.** Estructura celular bacteriana (Tomado de Murray et al., 2009)

De acuerdo a la composición de la pared celular, las bacterias pueden ser divididas en dos grandes grupos: *Gram* positivas cuya pared está constituida

por una gruesa capa de péptidoglucano y ácidos teicoicos y *Gram* negativas que poseen una pared más compleja que las *Gram* positivas (**Figura 13**), de los componentes de la pared *Gram* negativa destacan los lipopolisacáridos (exotoxina), el espacio periplásmico donde se encuentran algunas proteínas y la baja proporción de péptidoglucano en comparación con la cantidad que hay en *Gram* positivas (Wolk, 1996).

## 2.10 Hongos:

Son organismos macro y microscópicos de distribución universal, y a diferencia de las bacterias poseen una estructura celular más compleja propia de organismos eucariotas con un núcleo bien definido, mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico, una membrana celular con ergosterol como componente esteroideo principal y una pared celular compuesta principalmente por quitina y glucano. Los hongos pueden clasificarse de acuerdo a su aspecto morfológico en levaduras y formas miceliales (Divo, 1990; Murray y col., 2009).



**Figura 13.** Estructura de la pared celular de las bacterias: A) *Gram* positivas y B) *Gram* negativas (Tomado de Murray et al., 2009).

## 2.11 Antibióticos:

Son sustancias producidas por microorganismos que ejerce una acción antagónica contra los demás (antibiosis) inhibiendo procesos vitales, según Waksman (citado en Divo, 1990) los seres vivos superiores vegetales o animales también son capaces de elaborar sustancias análogas a los antibióticos producidos por microorganismos. Actualmente, estos compuestos químicos se utilizan para combatir procesos infecciosos de origen microbiano (Divo, 1990).

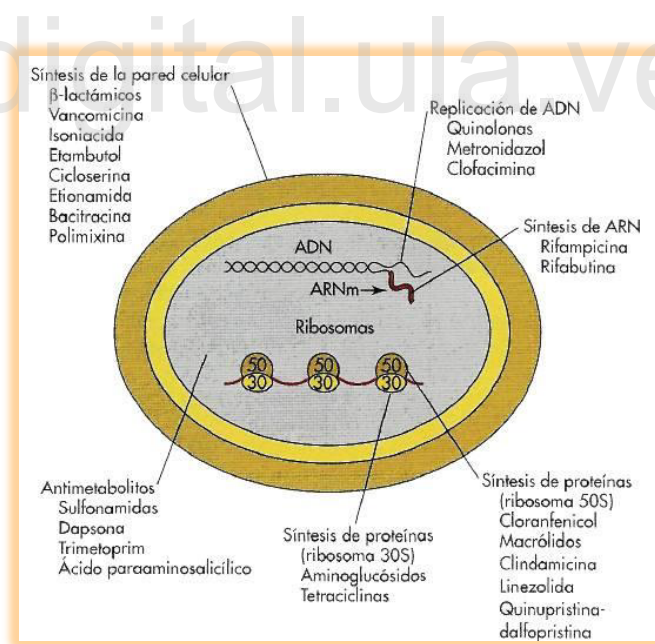
Los antibióticos pueden ser clasificados según: su espectro de actividad (amplio o reducido); su estructura química (**Tabla 2**); su mecanismo de acción (**Figura 14**) y su efecto antimicrobiano, este último está basado en la capacidad de inhibir el crecimiento bacteriano (bacteriostáticos), en destruir bacterias (bactericida) y en actuar sobre hongos (antifúngico) de este último destacan los imidazoles que son capaces de inhibir la síntesis de ergosterol componente importante de la membrana celular de los hongos (Divo, 1990; Volk, 1996).

**Tabla N° 2** Clasificación de los antibióticos según su estructura química

Antibióticos	Representantes	Modo de acción
Betaláctamicos	Penicilinas, cefalosporina, cefamicinas, carbapenemos y monobactámicos.	Inhibición de la síntesis de la pared celular
Glucopéptidos	Vancomicina.	
Lipopéptidos	Daptomicina.	
Polipéptidos	Bacitracina, polimixina.	
Aminoglucósidos	Amikacina, gentamicina, estreptomina, trombamicina.	Inhibe la síntesis de proteínas
Tetraciclinas	Tetraciclina, doxiciclina, minociclina.	
Oxazolidinonas	Linezolid	

Cloranfenicol	Cloranfenicol	
Macrólidos	Eritromicina, azitromicina, claritromicina.	
Cetólidos	Telitromicina	
Clindamicina	Clindamicina	
Estreptograminas	Quinupristina-dalfopristina	
Rifampicina	Rifampicina y rifabutina.	
Quinolonas	Ciprofloxacino, levofloxacino.	
Metronidazol	Metronidazol	
Sulfonamidas	Sulfametoxazol	Antimetabolitos

(Govantes et al. 1999; modificado)



**Figura 14.** Puntos básicos de actividad antibiótica

(Tomado de Murray et al., 2009).

## 2.12 Resistencia antimicrobiana:

Viene dada por una mutación genética que hace que el microorganismo pierda sensibilidad a la acción ejercida por un antibiótico, la bacteria a través de diversos mecanismos pueden inhibir la acción del antibiótico. Un primer tipo de resistencia se da cuando la bacteria es capaz de producir sustancias que destruyen el antibiótico como es el caso de las penicilinasas ( $\beta$ -lactamasa) que actúan contra los  $\beta$ -lactámicos impidiendo así la acción de estos contra la bacteria. Otro tipo de resistencia se da a través de mutación cromosómica en la cual la bacteria cambia los receptores a los que se une el antibiótico en la bacteria impidiendo así su acción; y por último, está la resistencia por plásmidos donde una bacteria resistente a antibióticos le transmite esa información a una bacteria sensible convirtiéndola ahora en resistente (Volk, 1996).

## 2.13 Evaluación de la actividad antimicrobiana:

Varios métodos de laboratorio pueden ser usados para determinar *in vitro* la susceptibilidad de bacterias y hongos ante agentes microbianos.

### 2.13.1 Dilución en Agar o en caldo:

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 et al., 2009).

### 2.13.2 Difusión por disco:

En esta se dispersa el microorganismo a ensayar, previamente estandarizado en el agar y a continuación se colocan discos impregnados con el antimicrobiano sobre la superficie del agar. Transcurrida la incubación del microorganismo se observara 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 et al., 2009).

bdigital.ula.ve

# PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA



### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades infecciosas siempre han sido un problema de salud pública, debido a que constituyen la primera causa de muerte en el mundo, tanto en adultos como en niños. Más de 13 millones de personas en el mundo mueren anualmente debido a este tipo de enfermedades y en América, la cifra alcanza 1 millón de decesos anuales, siendo la mayor incidencia en países en vía de desarrollo (Cabezas, 2005).

Por otra parte, los antimicrobianos (antibacterianos, antifúngicos, antivirales y antiparasitarios) han sido los fármacos claves para hacer frente a estas enfermedades infecciosas, pero en los últimos años se ha visto reducida su eficacia frente a organismos patógenos resistente, esto se debe en gran medida al uso indiscriminado de esta clase de fármacos en el tratamiento de patologías que no lo requieren. Adicionalmente, a esta situación, la aparición de nuevos patógenos multirresistentes ha encendido la alarma a nivel mundial, por lo que la industria farmacéutica ha trabajado en los últimos años en generar nuevos antimicrobianos, pero muy poco se basan en nuevas entidades químicas (Periago, 2011; Cabrera & Otero, 2008; Finch & Hunter, 2006).

Es por ello que se pretende explorar nuevas alternativas terapéuticas de origen natural a través de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos crudos y aceites esenciales obtenidos de las especies *Valeriana rosaliana* Meyer y *Valeriana parviflora* (Trevir.) Hoeck, que crecen en los páramos de Los Andes venezolanos, frente a organismos patógenos para determinar cuál de los extractos presenta mayor actividad antimicrobiana frente a los microorganismos seleccionados.

# HIPÓTESIS

#### 4. HIPÓTESIS

Diversas especies de la familia Valerianaceae (Caprifoliaceae) reportan actividad antimicrobiana a partir de sus extractos, por lo tanto se espera que los extractos de las especies *Valeriana rosaliana* Meyer y *Valeriana parviflora* (Trevir.) Hoeck presenten actividad antimicrobiana contra diversos microorganismos infecciosos.

bdigital.ula.ve

# OBJETIVOS

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general:

Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos de las especies *Valeriana rosaliana* Meyer y *Valeriana parviflora* (Trevir) Hoeck contra microorganismos infecciosos.

### 5.2 Objetivos específicos:

- Recolectar e identificar la especie *Valeriana parviflora* (Trevir) Hoeck y *Valeriana rosaliana* Meyer que crecen en los páramos andinos.
- Extraer el aceite esencial de las partes aéreas de la *V. parviflora* (Trevir) Hoeck.
- Analizar la composición química del aceite esencial de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck.
- Preparar los extractos del material vegetal en disolventes de polaridad creciente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, hidroalcohólico y agua).
- Determinar cualitativamente la presencia de valepotriatos y alcaloides de las especies en estudio.
- Realizar un análisis comparativo de la presencia de valepotriatos de las especies en estudio y las preparaciones comerciales en tintura y capsulas de la *V. officinalis*.

- Evaluar la actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de las especie en estudio..

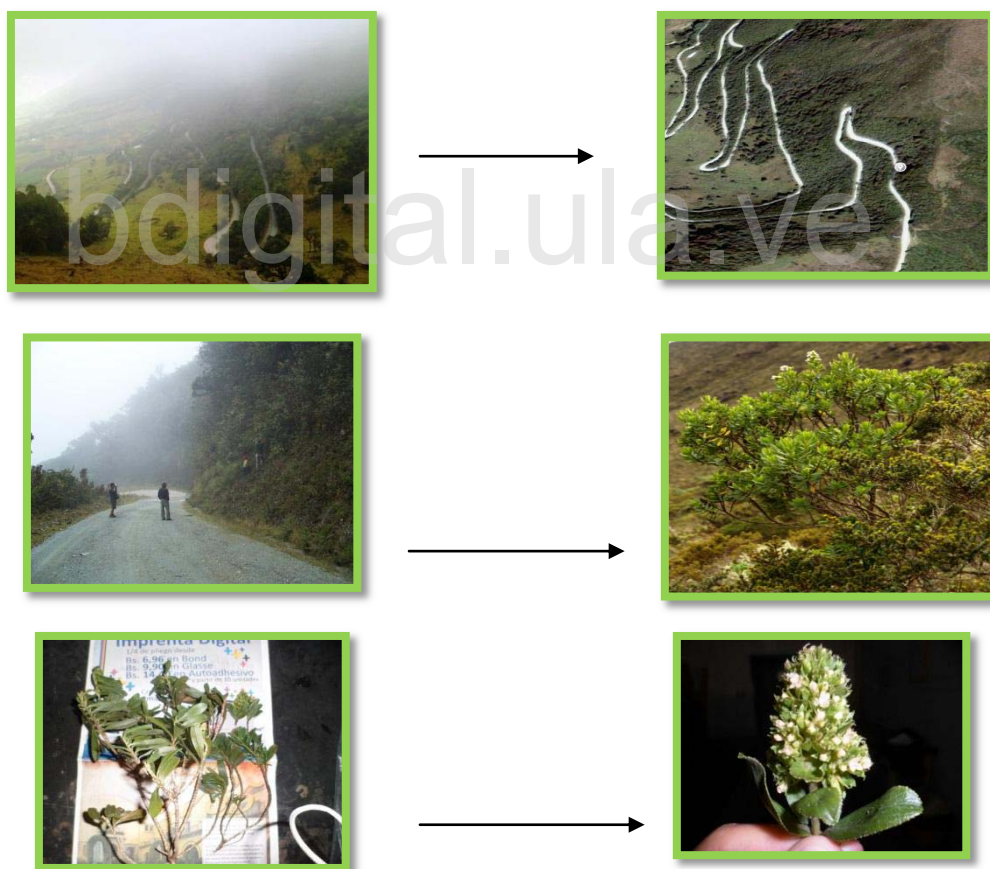
bdigital.ula.ve

# METODOLOGÍA

## 6. METODOLOGÍA:

### 6.1 Recolección e Identificación del Material Botánico:

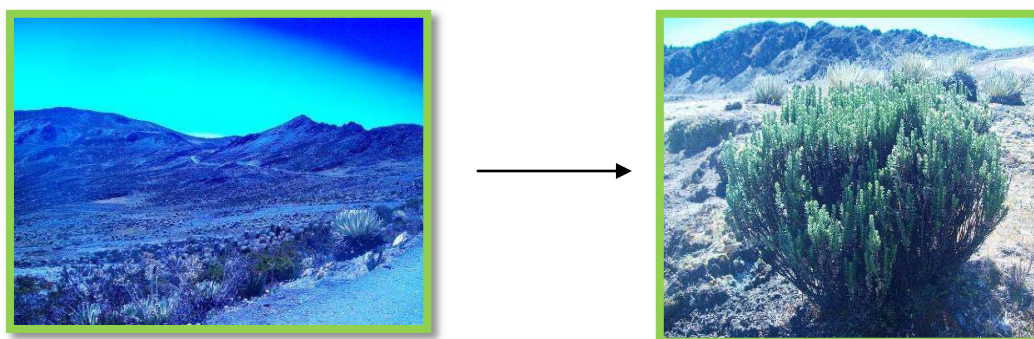
La recolección de las partes aéreas de *V. rosaliana* Meyer, fue llevada a cabo el día 31 de Mayo de 2012 en horas de la tarde en el Páramo El Rosal, Municipio Jáuregui del Estado Táchira, específicamente a 200 m partiendo desde el alto del sector Los Cruces en dirección a la Grita a orillas de carretera, a una altura de 2940 msnm y con las siguientes coordenadas 8°01'17.8" N y 71°58'09.3"O (Figura 15).



**Figura 15.** Recolección de la *V. rosaliana* Meyer.



La recolección de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck fue realizada en el mes de Febrero del año 2013, en el Páramo Piedras Blancas a 13 Km de la localidad de Piñango, Estado Mérida, Venezuela a unos 4000 msnm., de ella se recolectó las partes aéreas y rizomas (**Figura 16**).



**Figura 16.** Recolección de la *V. parviflora* (Trevir) Hoeck.

La identificación de ambas especies la realizó el Ingeniero Forestal Luis Enrique Gámez. Un espécimen de cada especie fue depositado en el Herbario MERF de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis bajo el número de Voucher SPFB 01 para *V. rosaliana* Meyer y SPFB 02 para *V. parviflora* (Trevir) Hoeck.

## 6.2 Preparación de los Extractos Secos:

El material vegetal recolectado fue pesado en estado fresco 640 g de *V. rosaliana* Meyer; 1100 g de partes aéreas y 420 g de rizomas de *Valeriana parviflora* (Trevir) Hoeck fueron desecados en estufa a 40 °C durante 48 horas (**Figura 17**), posteriormente se molieron. En el caso de los rizomas, previo al secado fue realizado un lavado, para eliminar restos de material no deseado como tierra. Se utilizó la técnica de extracción por maceración con solventes de polaridad creciente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, mezcla hidroalcohólica 50%, agua y acetona).



**Figura 17.** Proceso de desecación del material vegetal.

El procedimiento se llevó a cabo colocando 200 g de material vegetal seco y molido en un matraz Erlenmeyer al que se le añadió *n*-hexano y se mantuvo a temperatura ambiente y con agitación constante, transcurridas 48 horas se filtró y la fracción se concentró a presión reducida mediante un rotavapor hasta sequedad. El material vegetal remanente fue utilizado para las posteriores extracciones siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente y con un orden de polaridad creciente.

Este procedimiento fue idéntico para las tres muestras (partes aéreas de *V. rosaliana*; partes aéreas y rizomas de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck) salvo en el caso de las partes aéreas de la *V. parviflora* (Trevir) Hoeck que no se obtuvo el extracto en acetato de etilo. En total, se obtuvieron 18 extractos para el análisis de actividad microbiológica (**Figura 18**).

Adicionalmente a estos 18 extractos, fueron preparados 3 extractos crudos (uno para *V. rosaliana* Meyer y 2 para *V. parviflora* (Trevir) Hoeck) por la técnica de maceración ya descrita, utilizando como único solvente metanol y a los que llamamos extractos crudos (**Figura 19**)



Figura 18. Proceso de preparación de los extractos

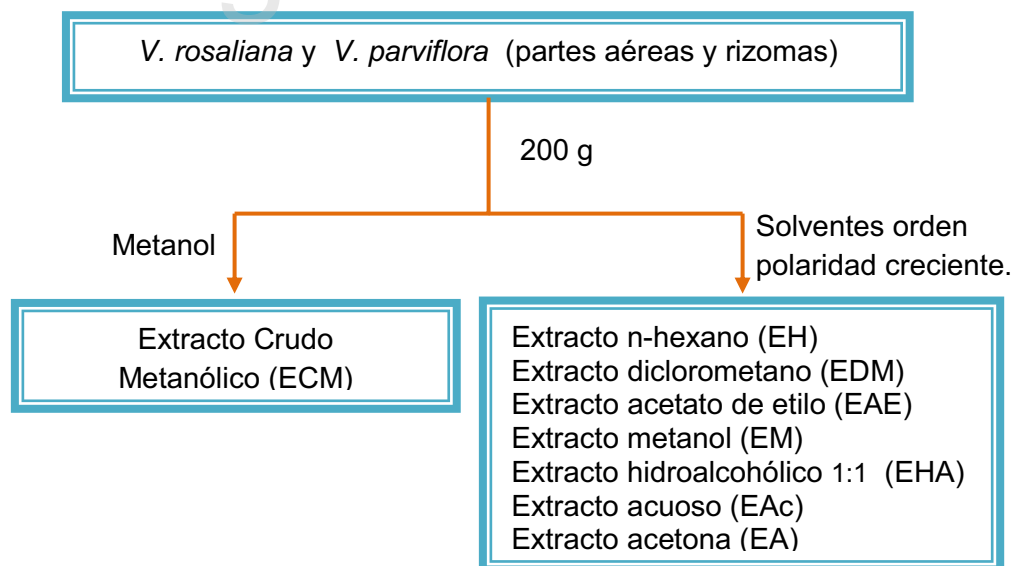


Figura 19. Extractos vegetales preparados a partir de la *V. rosaliana* Meyer y *V. parviflora* (Trevir) Hoeck

Una vez obtenidos todos los extractos estos fueron llevados a refrigeración a 4C° para conservarlos protegidos de la luz hasta el momento de ser utilizados para las pruebas antimicrobianas.

### **6.3 Análisis Cualitativo de los Extractos Secos** (Determinación de valepotriatos y alcaloides)

El análisis cualitativo se llevó a cabo mediante dos procesos que se describen a continuación:

#### **6.3.1 Cromatografía en Capa Fina (CCF):**

Para su realización fueron utilizadas placas de aluminio cubiertas de gel de sílice con indicador fluorescente de un espesor de 0,25 mm (TLC sílica gel 60 HF<sub>254</sub> Merck). Las placas se desarrollaron con diferentes solventes 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. Así, a 254 nm el valtrato y el acevaltrato se pueden distinguir por su coloración violeta y cuando la placa es rociada con la solución reveladora empleando 2,4-dinitrofenilhidrazina y calentando por 5 minutos a 105 °C se tornan inmediatamente a color azul o violeta en el caso de valtrato, acevaltrato e isovaleroxihidroxidihydrovaltrato (IVHD), mientras que el dihydrovaltrato se torna naranja (Stahl, 1969; Laufer et al., 1970).

#### **6.3.2 Análisis de presencia de alcaloides:**

En el procedimiento se extrajo 5 g de material vegetal seco con 120 mL de metanol a reflujo durante dos horas, posteriormente se realizó un filtrado de la mezcla y se llevó a sequedad en rotavapor al vacío. Este filtrado se alcalinizó con una solución de amoníaco. Esta solución fue pasada a través

de un embudo de decantación para extraerla con 15 mL de cloroformo, adicionándole posteriormente 1 mL de solución saturada de sulfato de sodio.

El extracto obtenido se llevó nuevamente a sequedad y al residuo se le adicionó 2 mL de HCl 1 % y 2 mL de cloroformo agitándose ligeramente. Esta mezcla se dejó en reposo hasta observar dos capas separadas. El sobrenadante se repartió en 3 tubos de ensayos de forma equitativa, para cada tubo se usó un reactivo (Dragendorff, Meyer y Wagner) de los cuales se añadía 2 gotas a cada ensayo.

#### 6.4 Obtención del Aceite Esencial:

El material vegetal fresco de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck (partes aéreas) fue pesado (950 g) y cortado en pequeños trozos, para ser colocado en un balón de ebullición junto con el agua, una vez completado el paso anterior se procedió a hacer el montaje del equipo necesario para llevar a cabo la técnica de extracción hidrodestilación por arrastre de vapor, empleando la Trampa de Clevenger. El tiempo de la extracción fue de 4 horas, transcurrido ese tiempo se obtuvo 0,3 mL del aceite (0.03%), que se recolectó en un vial y se sometió a tratamiento con sulfato de sodio anhidro, el mismo fue conservado herméticamente cerrado y refrigerado a 4 °C hasta su utilización.



**Figura. 20** Preparación del aceite esencial de *V. parviflora*

### **6.5. Identificación de componentes químicos de los extractos y aceite esencial:**

Los análisis tanto de la composición química de los aceites esenciales, así como de los extractos crudos, se realizó en un cromatógrafo de gases Perkin-Elmer AutoSystem equipado con detector de ionización de llama, entrada manual de datos y una columna capilar de sílica 5% fenilmetilpolisiloxano (AT-5, Alltech Associates Inc., Deerfield, IL), 60 m x 0,25 mm, 0,25 mm de ancho. La temperatura inicial del horno fue de 60°C. El horno se calentó a 4°C / min hasta 260 °C manteniendo esta temperatura durante 20 min. Las temperaturas del inyector y detector fueron de 200 °C y 250 °C, respectivamente. El gas portador fue helio a 1,0 mL/min. La muestra se inyectó en una relación de dilución de 1:10.

Los índices de Kóvats se calcularon en relación con una serie de *n*-alcanos C8-C24 y se compararon con los valores reportados en la literatura. El método de normalización de las áreas de los picos se utilizó para calcular el porcentaje de cada compuesto en el aceite esencial.

En cuanto a los análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS), se realizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett-Packard 6890 acoplado a un detector de masas HP5973. El cromatógrafo está equipado con una columna capilar de sílice fundida HP-5MS (30 m x 0,25 mm de diámetro interno y 0,25 µm de espesor de la película). Se inyectó 1,0 µL de la muestra utilizando un inyector automático Hewlett-Packard (ALS) con un reparto de 100:1, Usando Helio (He) como gas. El rango de temperatura usado fue de 60-260 °C. La identificación de los compuestos del aceite esencial se hizo de acuerdo a sus índices de retención y por comparación de los espectros de masas con los existentes en la biblioteca Wiley 6<sup>ta</sup> edición y librería Nist.

## 6.6 Evaluación Actividad Antimicrobiana:

La actividad antibacteriana se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Velasco et al. (2005) y la antifúngica a Lozina et al. (2007) en levaduras. Esta evaluación se realizó en el Laboratorio de Síndromes Gastrointestinales y Urinario “Lic. Luisa Vizcaya” (S.G.U.), de la Facultad de Farmacia y Bioanálisis de la Universidad de Los Andes bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo.

En la **Tabla N° 3** se muestran los microorganismos utilizados para evaluar la actividad antimicrobiana, al igual que lo respectivos antimicrobianos utilizados como control positivo del ensayo

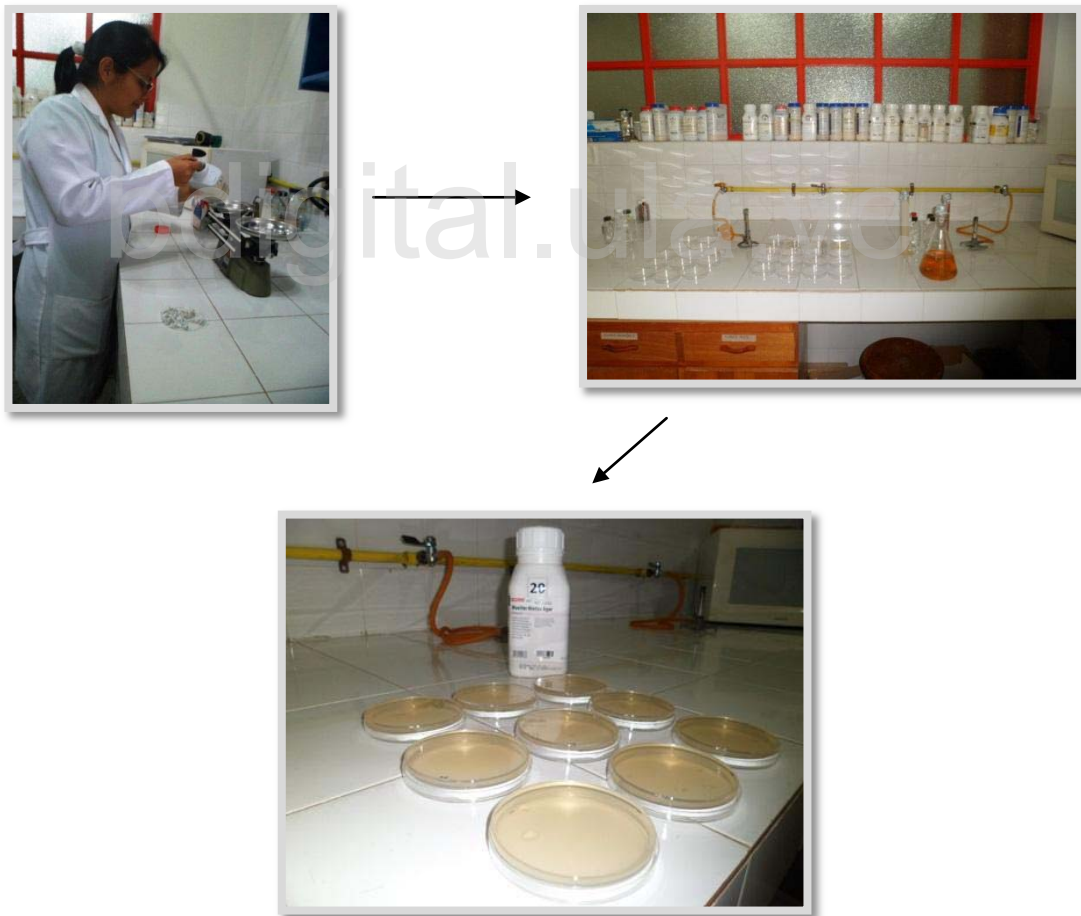
**Tabla N° 3.** Microorganismos a utilizarse en los ensayos antimicrobianos y sus respectivos controles

	Microorganismo	Controles Positivos
<b>Bacterias</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)</li> <li>- <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 29212)</li> <li>- <i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)</li> <li>- <i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 23357)</li> <li>- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Oxacilina® BBL (10 µg)</li> <li>- Vancomicina® BBL (30 µg)</li> <li>- Tobramicina® BBL (30 µg)</li> <li>- Aztreonam® BBL (10 µg)</li> <li>- Ceftazidime® BBL (30 µg)</li> </ul>
<b>Levaduras</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Candida albicans</i> DCB-385</li> <li>- <i>Candida krusei</i> ATCC 6258</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fluconazol®, Liofilchem S.R.L. (100 µg)</li> <li>-Vorcum®, Pfizer (400 ® µg/mL)*</li> </ul>

\*200 mg de Voriconazol

### 6.6.1 Preparación de las placas de Petri:

En el caso de las bacterias se utilizó aproximadamente 20 mL de agar Müeller-Hinton (MH) en la placas de Petri y para las levaduras 20 mL de agar Müeller-Hinton, suplementado con 2% p/v de glucosa y azul de metileno (0,05 µg/mL); la preparación del agar, se realizó siguiendo las instrucciones de la casa comercial, bajo la supervisión de la Dra. Judith Velasco Carrillo; una vez preparado el medio se dejó solidificar a temperatura ambiente y posteriormente se realizó el control de esterilidad y se conservaron a 4°C hasta su uso (**Figura 21**).



**Figura 21.** Preparación de medios de cultivo.



### 6.6.2 Preparación de los discos:

Los discos de papel de filtro de 6 mm de diámetro, se impregnaron con 20  $\mu\text{L}$  de los extractos, los cuales fueron preparados a una concentración máxima de 500 mg/mL, utilizando como solvente el mismo usado en la extracción, estos discos organizados en placas de Petri de vidrio, se dejaron a temperatura ambiente dentro de 18 a 24 h y se esterilizaron bajo luz ultravioleta (LUV) durante 2 horas previas al ensayo (**Figura 22**).



**Figura 22.** Preparación de discos.

### 6.6.3 Preparación de los inóculos:

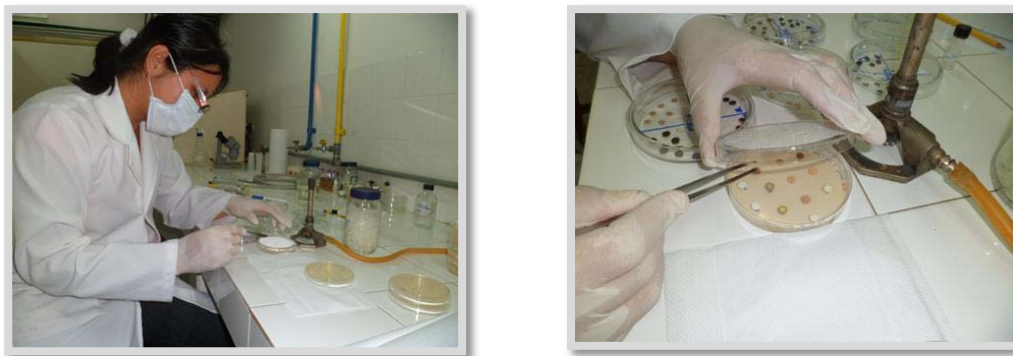
Los inóculos se prepararon en solución salina estéril (0,85% NaCl), a partir de un cultivo fresco de cada cepa bacteriana repicada en caldo Müeller-Hinton, y las levaduras en agar Sabouraud, hasta que se logró una turbidez correspondiente al patrón de McFarland N° 0,5 ( $1 \times 10^{6-8}$  UFC/mL, UFC: Unidad Formadora de Colonias) para las cepas bacterianas y en el caso de las levaduras al patrón de McFarland N° 1-3 ( $1 \times 10^{6-8}$  UFC/mL).

#### 6.6.4 Inoculación:

En el caso de cepas bacterianas, una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se sembró en la superficie del agar correspondiente con un hisopo estéril. Para levaduras una vez preparado el inóculo de cada microorganismo, se suspendió 1 mL del mismo en 20 mL de agar Müller-Hinton modificado, mezclando en forma envolvente con la finalidad de depositarlos en placas de Petri (Lozina, *et al.*, 2005).

#### 6.6.5 Ensayo de la actividad antimicrobiana:

Una vez inoculadas las placas se procedió a colocar los discos de papel de filtro previamente impregnados con los extractos, sobre la superficie del agar (**Figura 23**), además se colocaron discos de papel de filtro impregnados con los distintos controles negativos (solventes: hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, mezcla hidroalcohólica, agua y acetona), según sea el caso. También se colocaron los discos de los controles positivos para cada antimicrobiano (**Tabla N° 3**). Las placas fueron refrigeradas a 4 °C por 24 h, posterior a eso se llevaron a la estufa a una temperatura de 37 °C por un tiempo de 18-24 horas para las placas con cepas bacterianas y de 24-48 para las placas con levaduras.



**Figura 23.** Colocación de discos.

#### 6.6.6 Lectura de los ensayos:

Transcurrido el tiempo de incubación se procedió a la lectura de las placas, la inhibición del crecimiento microbiano se expresó en 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.

#### 6.6.7 Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM):

Solo se determinó la CIM de los extractos que mostraron actividad antimicrobiana. Para determinar la CIM se prepararon diluciones seriadas de los extractos con un rango de concentración de 10-500 mg/mL y se impregnaron discos con 20  $\mu$ L de cada dilución (CLSI, 2015) (**Figura 24**).



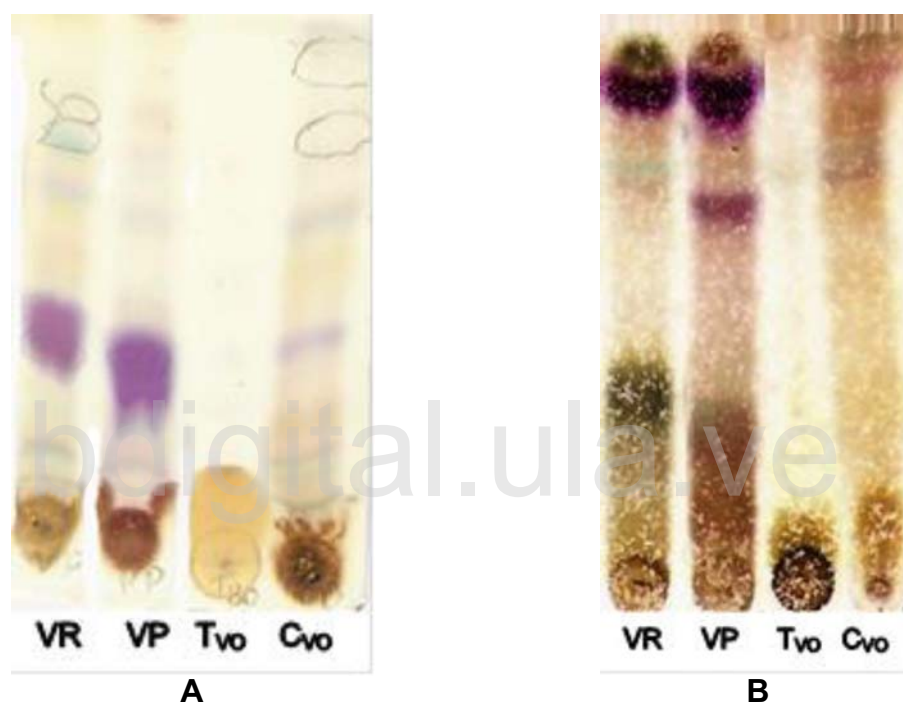
**Figura 24.** Material para preparar las diluciones

# RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 7.1 Detección cualitativa de Valepotriatos por CCF:

Los resultados obtenidos del análisis de los extractos de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer, se muestran a continuación:



**Figura 25.** Cromatografía en capa fina de extracto diclorometano de *V. rosaliana* Meyer (VR) y de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck (VP), tintura de *V. officinalis* L. (Tvo) y Extracto en diclorometano de las cápsulas de *V. officinalis* L. (Cvo). **Figura 25-A** Polaridad de la fase móvil *n*-hexano: acetato de etilo 93:7. **Figura 25-B:** Polaridad de la fase móvil *n*-hexano: acetato de etilo 1:1.

Como se pudo observar en la **Figura 25-A** los extractos VR y VP mostraron una gran similitud a la polaridad empleada; ya que se observó en ambos, un compuesto mayoritario que al ser revelado con 2,4 dinitrofenilhidrazina dieron dos manchas de coloración violeta las cuales se pueden atribuir a la presencia de compuestos del tipo valepotriatos (valtratos) tal como lo describe la metodología de Stahl, 1969 y Laufer, 1970. En este punto, se intentó hacer un 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 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 dicho 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, et al., 1996).

En la **Figura 25-B** se mostraron 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 cierta diferencia entre los extractos de *V. rosaliana* Meyer y *V. parviflora* (Trevir) Hoeck, ya que en el primer caso se observan al menos dos compuestos de coloración verde y en el segundo caso de coloración marrón los cuales pudieran deberse a la presencia de tales compuestos de degradación, en este caso a los compuestos de tipo baldrinales (Bos, et al., 2002).

Haciendo una revisión bibliográfica sobre trabajos previos realizados sobre el análisis cualitativos de algunas especies de *Valeriana* L., se encontró que Blacklund y Moritz (1998) en su trabajo titulado “*Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae*” analizaron un total de 29 especies de *Valeriana* L. dentro de las que se encuentra la *V. parviflora* (Trevir) Hoeck, cuyos extractos fueron analizados mediante cromatografía en capa fina para determinar la presencia de valepotriatos arrojando resultados positivos lo cual está de acuerdo con lo observado en el extracto preparado en la presente investigación.

En cuanto a *V. rosaliana* no se encontró trabajos que hicieran referencia al estudio de valepotriatos en esta especie.

## **7.2 Determinación de alcaloides:**

Los resultados obtenidos del análisis cualitativo de los extractos de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer se presentan en la **Tabla N° 4**.

**Tabla N° 4** Test Alcaloidal en extractos de las partes aéreas de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer.

Especie	Dragendorff	Wagner	Mayer
<i>V. parviflora</i> (Trevir) Hoeck	+	+	+
<i>V. rosaliana</i> Meyer	+	+	+

Positivo (+++); Moderadamente positivo (++); Ligeramente positivo (+)

En ambas especies se evidenció la presencia de alcaloides aunque en baja proporción por lo que fue catalogado como ligeramente positivo, aunque existen pocos reportes en la literatura científica sobre el aislamiento e identificación de alcaloides del género *Valeriana* L. según Francke (citado por Houghthon, 1988). Otros reportes indican la presencia de este tipo de compuestos en *V. officinalis* L. (Janot, et al., 1979) y *V. pavnii* Poepp (Arévalo, et al., 2006).

### 7.3 Cromatografía de Gases-Espectrometría de Masas del aceite esencial de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck:

El aceite esencial obtenido por hidrodestilación, fue analizado por cromatografía de gases y cromatografía de gases-espectrometría de masa y los resultados se encuentran resumidos en la **Tabla N° 5**. Se identificaron 55 compuestos, representando un 84,9 % del total del aceite. Los constituyentes mayoritarios fueron o-xilol (16,2 %), ácido 3-metilisovalerico (10,6 %) y geranial (9,5 %) (**Figura 26**). Los monoterpenos oxigenados fueron los más abundantes (19,8 %), seguido de los norisoprenoides (19,1 %). El ácido 3-metilvalerico y sus derivados (16,1 %), representado principalmente por el ácido 3-metilisovalerico (10,6 %), ácido 3-metilvalerico (2,9 %) y ácido isovalerico (1,6 %).



**Tabla 5:** Composición química del Aceite Esencial de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck

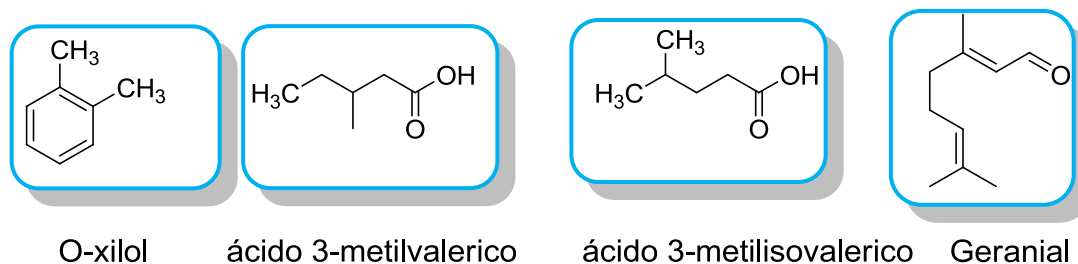
Compuestos <sup>a</sup>	% de área	IK <sup>b</sup>	Compuestos <sup>a</sup>	% de área	IK <sup>b</sup>
Ácido valérico	0,6	827	α-gurjuneno	0,4	1402
(E)-2-hexenal	3,3	838	trans-cariofilleno	0,3	1409
Ácido isovalérico	1,6	840	α-humuleno	0,1	1448
Ácido 3-metil isovalérico	10,6	846	Aromadendreno	0,5	1455
2-hexenol, (E)	0,8	851	α-amorfeno	0,5	1472
1-hexanol	0,9	854	germacreno-D	2,8	1477
o-Xilol	16,2	890	α-muuroleno	0,2	1496
N-heptanal	0,2	894	γ-cadineno	0,2	1510
Ácido 3-metil valérico	2,9	957	7-epi-α-selineno	0,3	1513
6-metil-5-hepten-2-ona	0,2	980	δ-cadinene	1,4	1519
trans-2,4-heptadienal	0,5	990	(+)-espatulenol	0,4	1568
2,4-heptadienal	0,6	1003	t-cadinol	1,2	1631
1,8-Cineol	0,1	1028	t-muurolol	1,3	1644
Linalool	2,3	1096	α-cadinol	1,3	1646
Nonanal	1,5	1099	Pentadecanal	0,5	1709
p-vinilanisol	0,8	1149	Drimenol	4,9	1760
α-terpineol	0,8	1185	Neopitadieno	0,7	1829
p-mentanall	1,3	1209	6,10,14-trimetil 2-pentadecanona	0,3	1834
Bornileno	0,6	1221	1-Heptadeceno	0,3	1875
Citronellol	0,3	1224	Cicloecosano	0,1	1971
z-citral	4,8	1236	Ácido, etil ester hexadecanoico	0,2	1973
trans-2-hexenil valerato	0,2	1242	Heneicosano	0,3	2105
Geraniol	0,5	1253	<b>Total identificado</b>		
(E)-2-decenal	1,9	1261	Monoterpenos hidrocarbonados	0,6	
Geranial	9,5	1272	Monoterpenos oxigenados	19,8	
Timol	1	1294	Sesquiterpenos hidrocarbonados	6,6	
teasperano A	0,2	1301	Sesquiterpenos Oxigenados	4,2	
Isoeugenol	0,7	1355	Norisoprenoides	19,1	
undecanal-2	0,6	1359	Ácido 3-Metilvalérico y derivados	16,1	
Eugenol	0,3	1364	Otros componentes	18,5	
α-copaeno	0,4	1371	<b>Total identificado</b>	<b>84,9</b>	
benzil valerianato	0,2	1386			

<sup>a</sup> Compuestos enumerados siguiendo una secuencia de elución a partir de una columna de DB-5

<sup>b</sup> IK obtenidos de la literatura (Adams, 2007 y Davies, 1990).

Estos resultados están de acuerdo con los reportados previamente para otras especies de valeriana, en los cuales los monoterpenos oxigenados han sido los constituyentes predominantes (Coassini, 1989). Sin embargo también se pudieron observar algunas diferencias importantes con respecto a otros aceites esenciales de especies de valerianas recolectadas en China (Wang et al., 2010) y Turquía (Barbakci et al., 2012) en los cuales los mayores componentes fueron alcohol patchoulinico (13,4 % y 36,8 %), acetatos de kesilo (0,9 % - 15,4 %), valeranona (5,8 % - 18,2 %) y ácido valérico (5,8 % - 28,0 %).

En el presente análisis no se observaron los compuestos ácido valerénico, ni valeranona, los cuales son los responsables de los efectos sedantes o hipnóticos atribuidos a los aceites esenciales de las especies de *Valeriana* (Houghton, 1988). Estas diferencias entre el aceite esencial de *Valeriana parviflora* (Trevir) Hoeck y los reportados en la literatura para otras especies de valeriana son debido a las condiciones medio ambientales (Juliani et al., 2002).



**Figura 26.** Compuestos mayoritarios del aceite esencial de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck

#### 7.4 Cromatografía del extracto en diclorometano de *V. parviflora* Trevir Hoeck.

Los resultados del análisis por CG-EM del extracto en diclorometano de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck se muestran en la **Tabla N° 6**. Reportó 28

compuestos que representan un 70,36 % del total de la mezcla. Los compuestos mayoritarios fueron 4-hidroxi-4-metil pentanona (14,21 %), 1-heptadeceno (9,58 %), ácido Isovalérico (9,35 %) y ácido 3-metilvalerico (7,39 %). La fracción correspondiente al ácido 3-metilvalerico y sus derivados (33,19 %) representa la mayor proporción con respecto a los demás componentes de la mezcla.

Del análisis por CG-EM del extracto en diclorometano de las partes aéreas de la *V. parviflora* Trevir Hoeck se evidencio además, la presencia del baldrinal (0,73 %) lo cual indica la presencia de valtratos en dicho extracto pero que no fueron detectados mediante esta técnica. La fracción correspondiente al ácido 3-metilisovalerico y sus derivados (33,19 %) representada mayormente por el ácido Isovalérico (9,35 %) y ácido 3-metilvalerico (7,39 %) pueden ser empleados como marcadores quimiotaxonómicos en el análisis de extractos de especies de este género mediante esta técnica.

#### **7.5 Cromatografía del extracto metanólico de *V. parviflora* Trevir Hoeck:**

El análisis de CG-EM del extracto metanólico de *V. parviflora* Trevir Hoeck permitió identificar 15 compuestos representando el 80,94 % de la muestra (**Tabla N° 7**), siendo los compuestos mayoritarios 4-hidroxi-4-metil-2-pentanona (33,93 %), el ácido (3S)-3-metil-3-hidroxipentanoico con (10,25 %), la fracción correspondiente al ácido 3-metil valérico y sus derivados representa la mayor proporción observada con un 46,62 %. En este extracto no se observó la presencia de derivados del tipo valepotriatos ni sus productos de descomposición tipo baldrinal.

**Tabla 6:** Composición química del extracto en Diclorometano de *V. parviflora* Trevir Hoeck.

<b>Compuesto</b>	<b>% de área</b>
n-tetradecano	0,43
n-hexadecano	0,29
4-decenal	0,27
Ácido Isovalérico	9,35
n-heptadecano	0,15
Ácido 3-metilvalerico	7,39
Ácido hexanoico	0,61
Ácido nonanoico	0,21
Docosano	0,29
4-hidroxi-4-metil pentanona	14,21
5-octadeceno	0,49
1-tricosano	0,16
Ciclotetradecano	0,74
Ciclohexadecano	2,93
1-octadeceno	0,84
1-heptadeceno	9,58
Ácido gamma lactona 4-hidroxi octanoico	1,03
cetil isovalerato	2,24
Heptacosano	0,99
Tetracosano	5,69
5-eicoseno ( E )	0,71
Ácido hexadecanoico	1,51
N-eicosano	1,92
Ciclotetracosano	2,81
Ácido octadecanoico	0,18
Baldrinal	0,73
1-octadecanol	4,05
1-nonadeceno	0,56
<b>Total identificado</b>	<b>70,36</b>

**Tabla 7:** Composición química del extracto metanólico de *V. parviflora* Trevir Hoeck.

Compuesto	% Área
Ácido 3-Hidroxi-3-metilvalerico	2,44
4-hidroxi-4-metil-2-Pentanona	33,93
Dodecano	2,03
Ácido (3S)-3-metil-3-hidroxipentanoico	10,25
1-Hidroxilinalool	1,51
trans-4-Metoxi-3-buten-2-ona	4,72
Tetradecano	1,75
1,3-dimetil-2-(1-metiletil)- Ciclopenteno	2,07
AR-Curcumene	2,30
Neopentilideneciclohexano	11,72
Piridinium, 1[[[4cloropenil)sulfonil]amino]-, hidróxido	1,59
Ácido 1,2-Benzenedicarboxílico	3,27
3,7,11,15-tetrametil, 2-Hexadecen-1-ol,	1,48
Ácido 1, 2-Benzenodicarboxílico, bis (2-etilhexil) éster.	1,75
Ácido 1,2-Benzenodicarboxílico, bis (2-etilhexil) éster.	1,72
<b>Total identificado</b>	<b>80,94</b>

### 7.6 Evaluación de la Actividad antimicrobiana de los extractos de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer:

En la **Tabla N° 8**, son presentados los resultados de la actividad antimicrobiana de los extractos con solventes de polaridad creciente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, mezcla hidroalcohólica y agua) de la especie vegetal *V. parviflora* (Trevier) Hoeck, los cuales muestran que solo los extractos en diclorometano de los rizomas y los extractos en *n*-hexano e hidroalcohólico de las partes aéreas presentaron actividad contra la bacteria Gram positiva *S. aureus* ATCC 25923 (**Figura 27 y 28**), los valores

de la concentración inhibitoria mínima (CIM) para los extractos fueron 170 mg/mL, 500 mg/mL y 500 mg/mL respectivamente. La actividad antimicrobiana del aceite esencial de la *V. parviflora* (Trevier) Hoeck no fue analizada debido a que el rendimiento del aceite fue bajo (0.03 %).

Los resultados correspondientes a la actividad antimicrobiana de los extractos con solventes de polaridad creciente (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, mezcla hidroalcohólica, agua y acetona) de la especie vegetal *V. rosaliana* Meyer, se muestran en la **Tabla Nº 9**, los cuales muestran que todos los extractos con excepción del metanólico presentaron actividad antimicrobiana contra *S. aureus* ATCC 25923 (**Figura 27 y 28**). Los valores de CIM obtenidas para los extractos oscilaron entre 150 mg/mL y 500 mg/mL.

La actividad antibacteriana de los extractos madres metanólicos de las especies vegetales *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer son presentados en la **Tabla Nº 10**. En ellos se muestra que los extractos de los rizomas de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y de las partes aéreas de *V. rosaliana* presentaron actividad antibacteriana frente a *S. aureus* ATCC 25923. Los valores de CIM fueron 400 mg/mL y 50 mg/mL, respectivamente.

Los resultados obtenidos de la evaluación de la actividad antimicrobiana de los diferentes extractos de las especies vegetales *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer, indican que solo presentan inhibición del crecimiento bacteriano frente a *S. aureus* ATCC 25923. Es importante resaltar que estos son los primeros reportes de la actividad antibacteriana de ambas especies endémicas de los Andes venezolanos. Sin embargo, sí 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 muy pocos los trabajos publicados hasta el momento.

En el caso de los aceites esenciales, se han reportado que los mismos han presentado un amplio espectro antimicrobiano tanto en bacterias *Gram* positivas como *Gram* negativas. Concretamente, en el aceite esencial de *Valeriana officinalis* L. se obtuvieron concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) entre 62,5 µg/mL y 400 µg/mL (Wang, et al., 2010) y de la *V. wallichii* entre 125 µg/mL y 250 µg/mL) (Sati, et al., 2011).

Con respecto a los extractos, se determinó que en el caso del extracto etanólico de la *Valeriana pilosa* ensayado contra *S. aureus*, *E. coli*, *B. subtilis*, *C. albicans* y *Alternaria* sp, no mostró actividad contra ninguno de los microorganismos ensayados (Lizcano, et al., 2008), de manera que estos hallazgos no se correlacionan con los resultados obtenidos en los ensayos de actividad antimicrobiana de las *Valerianas* en estudio.

Otro caso reportado es el de *V. wallichii* DC cuyos extractos en *n*-hexano, cloroformo, metanol y agua fueron ensayados contra bacterias patógenas por el método de difusión en disco obteniéndose resultados satisfactorios ya que el extracto acuoso resultó bastante activo contra *S. aureus* (halo de inhibición 23±1,0 mm, CIM 250 µg/mL; CBM 500 µg/mL); seguido del extracto metanólico contra *B. subtilis* (halo de inhibición 20±1,0 mm, CIM 31,5 µg/mL; CBM 500 µg/mL), *S. aureus* (halo de inhibición 19±0,8 mm, CIM 125 µg/mL; CBM 125 µg/mL) y el extracto en *n*-hexano contra *B. subtilis* (halo de inhibición 18±1,2 mm, CIM 125 µg/mL; CBM 125 µg/mL). (Sati, et al., 2011).

De los extractos de *V. hardwickii* Wall ensayados contra *E. coli*, *S. aureus*, *S. pyogenes*, *B. subtilis*, *K. pneumoniae* y *Lactococcus*, los que resultaron más activos fueron los extractos clorofórmico y el etanólico con valores de CIM entre 600-800 µg/mL. Adicionalmente, también se han reportado estudios de la actividad antifúngica de compuestos del tipo valepotriatos aislados de la

especie *Valeriana capense* L., los cuales mostraron actividad frente los hongos fitopatógenos *Cladosporium cucumerinum*, *Erysiphe graminis* y *Venturia inequalis*.

Entre los valepotriatos ensayados se encuentran el valtrato, isovaltrato, didrovaltrato, clorovaltrato, homovaltrato, dihomovaltrato, diavaltrato y el isovaleroxidihidrovaltrato, siendo el valtrato el más activo contra los tres microorganismos con un porcentaje de actividad entre 70-99 %. Asimismo, se realizaron pruebas contra *Candida albicans* y *A. fumigatus* siendo también en este caso el valtrato el que mostró mayor actividad con una CIM de 10 µg/mL para ambos microorganismos (Fuzzati, et al., 1996).

En base a estos antecedentes y analizando los resultados presentados en las tablas **8**, **9** y **10** podemos establecer algunas similitudes ya que el extracto acuso de *V. rosaliana* Meyer resulto activo contra *S. aureus* al igual que el reportado para *V. wallichii* DC. Por otro lado, el extracto en diclorometano de *V. rosaliana* Meyer y de los rizomas de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck fueron activos contra *S. aureus* lo cual también fue observado en *V. hardwickii* Wall (Yousuf et al., 2013).

Debido a los escasos antecedentes reportados para la actividad antimicrobiana de extractos de especies del género *Valeriana* L, así como de la composición química de los mismos, no es posible establecer un patrón en el comportamiento antibacterianos de los mismos, ni atribuir dicha actividad a compuestos químicos en particular. Sin embargo; podemos inferir en base a los resultados observados que *V. rosaliana* Meyer presento mejor actividad antibacteriana que *V. parviflora* (Trevir) Hoeck.

Con respecto a los extractos madres, el obtenido de *V. rosaliana* Meyer mostró una CIM de 50 mg/mL mucho menor a los observados en los

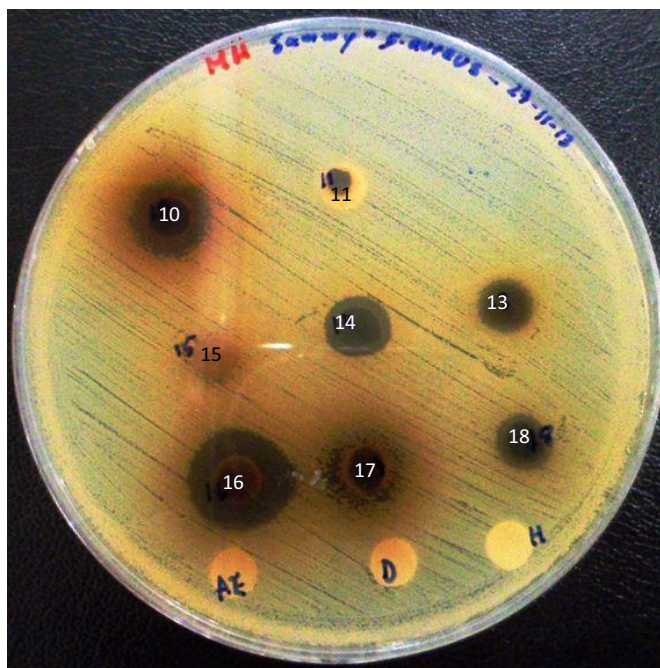


extractos obtenidos por partición los cuales oscilaron entre 150-500 mg/mL esto evidencia el efecto sinérgico de los constituyentes químicos en los extractos obtenidos de plantas (Williansom, 2001)

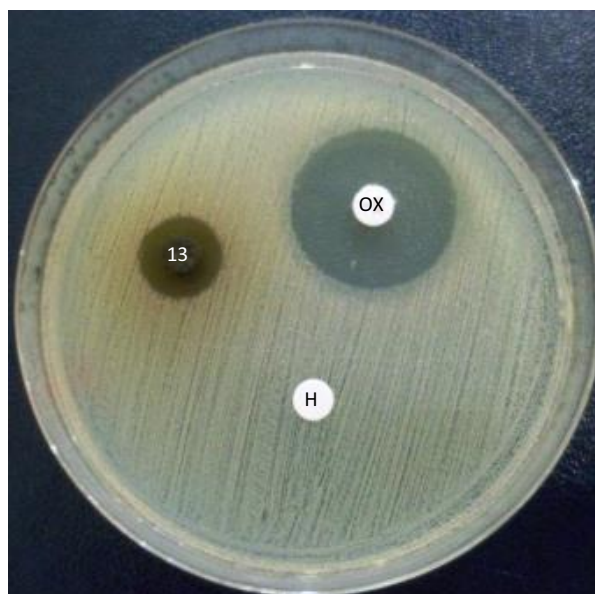
En cuanto a la actividad antifúngica se reporta un resultado similar en los estudios realizados por Cuevas, 2008, quien probó el extracto etanólico de *V. chaerophylloides* Sm, en la levadura *Candida albicans*; y el mismo demostró no tener actividad antimicrobiana.



**FIGURA 27.** Actividad antimicrobiana de los extractos de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck contra *S. aureus* ATCC (25923). Extractos de los rizomas en: *n*-hexano (1), acetato de etilo (2), diclorometano (3), metanol (4), hidroalcohólico (5) y agua (6). Extractos de las partes aéreas en: *n*-hexano (7), diclorometano (8), metanol (9). Etanol (E) y Metanol (M).



**FIGURA 28.** Actividad antimicrobiana de los extractos de *V. parviflora* (Trevir) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer frente a *S. aureus* ATCC (25923) Extractos de las partes aéreas de *V. parviflora* en: hidroalcohólico (10) y agua (11). Extractos de las partes aéreas de *V. rosaliana* en diclorometano (13), acetato de etilo (14), metanol (15), hidroalcohólico (16) y agua (17) y acetona (18). Acetato de etilo (AE), Diclorometano (D) y Hexano (H).



**FIGURA 29.** Actividad antimicrobiana del extracto en hexano de *V. rosaliana* frente a *S. aureus* ATCC (25923). Extracto en *n*-hexano (12), Oxacilina (OX) y Hexano (H).

**TABLA N° 8.** Actividad Antimicrobiana de los Extractos Vegetales de la especie *Valeriana parviflora* (Trevir) Hoeck

Microorganismos	Zona de Inhibición (mm)*																			CIM (mg/mL)					
	Extractos vegetales									Solventes (Controles negativos)										Antibióticos (Controles positivos)					
	Rizomas					Partes aéreas				E11	H	AE	DM	M	Ac	Ox	VA	T	AZT	CAZ	FL	V	E3	E7	E10
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	NA	NA	10*	NA	NA	8*	NA	NA	11*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	22	NP	NP	NP	NP	NP	170	500	500	
<i>E. faecalis</i> ATCC (29212)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	23	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	20	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	33	NP	NP	NP	NP	NP	NP
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP	31	NP	NP	NP	NP	NP
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP	NP	36	NP	NP	NP	NP
<i>Candida krusei</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP

\*mm de los halos de inhibición (discos 6 mm de diámetro), promedio de dos ensayo.

**E1:** Extracto en hexano (260 mg/mL); **E2:** Extracto en acetato de etilo (250 mg/mL); **E3:** Extracto en diclorometano (170 mg/mL); **E4:** Extracto en metanol (150 mg/mL); **E5:** Extracto hidroalcohólico (190 mg/mL); **E6:** Extracto acuoso (200 mg/mL); **E7:** Extracto en hexano (500 mg/mL); **E8:** Extracto en diclorometano (500 mg/mL); **E9:** Extracto en metanol (500 mg/mL); **E10:** Extracto hidroalcohólico (500 mg/mL); **E11:** Extracto acuoso (500 mg/mL).

**H:** Hexano; **AE:** Acetato de etilo; **DM:** Diclorometano; **M:** Metanol; **Ac:** Acuoso

**OX:** Oxacilina® (10 µg); **VA:** Vancomicina® (30 µg); **AZT:** Aztreonam® (10 µg); **CAZ:** Ceftazidime® (30 µg); **FL:** Fluconazol® (100 µg) y **VOR:** Voriconazol® (400 µg/mL).

**NA:** no activo; **NP:** no probado. **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima. Rango de concentración de 100 a 500 mg/mL

**TABLA N° 9.** Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales (partes aéreas) de la especie *V. rosaliana* Meyer

Microorganismos	Zona de inhibición (mm)*																		CIM (mg/mL)								
	Extractos vegetales									Solventes (Controles negativos)									Antibióticos (Controles positivos)								
	E12	E13	E14	E15	E16	E17	E18	H	AE	DM	M	Ac	A	Ox	VA	T	AZT	CAZ	FL	V	E12	E13	E14	E16	E17	E18	
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	15*	8*	8*	NA	12*	8*	8*	NA	NA	NA	NA	NA	NA	22	NP	NP	NP	NP	NP	NP	150	460	500	300	500	500	
<i>E. faecalis</i> ATCC (29212)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	23	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	20	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
<i>K. pneumoniae</i> ATCC (23357)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	33	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP	31	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
<i>Candida albicans</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP	NP	36	NP	NP	NP	NP	NP	NP	NP	
<i>Candida krusei</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NP	NP	NP	NP	NP	NP	22	NP	NP	NP	NP	NP	NP	

\*mm de los halos de inhibición (discos 6 mm de diámetro), promedio de dos ensayo.

**E12:** Extracto en hexano (500 mg/mL); **E13:** Extracto en acetato de etilo (500 mg/mL); **E14:** Extracto en diclorometano (500 mg/mL); **E15:** Extracto en metanol (500 mg/mL);

**E16:** Extracto hidroalcohólico (500 mg/mL); **E17:** Extracto acuoso (500 mg/mL); **E18:** Extracto en acetona (500 mg/mL).

**H:** Hexano; **AE:** Acetato de etilo; **DM:** Diclorometano; **M:** Metanol; **Ac:** Acoso; **A:** acetona.

**Ox:** Oxacilina® (10 µg); **VA:** Vancomicina® (30 µg); **T:** Tobramicina® (30 µg); **AZT:** Aztreonam® (10 µg); **CAZ:** Ceftriaxone® (30 µg); **FL:** Fluconazol® (100 µg) y **VOR:** Voriconazol® (400 µg /ml).

**NA:** no activo; **NP:** no probado. **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima

Rango de concentración de 100 a 500 mg/mL

**TABLA N° 10.** Actividad antimicrobiana de los extractos vegetales de las especies *V. parviflora* (Trevir) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer

Microorganismo	Zona de inhibición (mm)*					CIM (mg/mL)	
	Extractos vegetales			Solvente (Control negativo)	Antibiótico (Control positivo)	EA	EC
	EA	EB	EC	Metanol	Oxacilina® (10 µg)		
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (25923)	8*	NA	12*	NA	22	400	50

\*mm de los halos de inhibición (discos 6 mm de diámetro), promedio de dos ensayo.

**EA:** Extracto en metanol de la raíz de *V. parviflora* (500 mg/mL); **EB:** Extracto en metanol de las partes aéreas de *V. parviflora* (500 mg/mL); **EC:** Extracto en metanol de las parte aéreas de *V. rosaliana* (500 mg/mL). **NA:** no activo. **CIM:** Concentración Inhibitoria Mínima. Rango de concentración de 10 a 500 mg/mL

bdigital.ula.ve

# CONCLUSIONES

## 8. CONCLUSIONES

- Los resultados de la Cromatografía en Capa Fina permitieron detectar la presencia de Valepotriatos en los extractos en diclorometano de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer.
- El test de alcaloides confirma la presencia de esta clase de compuestos en *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer
- Como compuestos mayoritarios en el aceite esencial extraído de las partes aéreas de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck, se obtuvo el o-xilol (16,2 %), seguido del ácido 3-metilisovalérico (10,6 %) y geranial (9,5 %).
- En todos los extractos analizados de *Valeriana parviflora* (aceite esencial, extractos diclorometano y extracto metanólico), la porción correspondiente al ácido 3-metilvalérico y sus derivados se obtuvo en mayor proporción.
- El extracto en diclorometano de los rizomas de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck, presentó actividad antibacteriana “in vitro” frente a *S. aureus* ATCC (25923), con una concentración 170 mg/mL de CIM.
- Los extractos en hexano e hidroalcohólico de las partes aéreas de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck, mostraron actividad antibacteriana “in vitro” frente a *S. aureus* ATCC (25923), con los valores de CIM de de 500 mg/mL para ambos.
- Los extractos fraccionados de *n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, hidroalcohólico (1:1), acetona y acuoso de *V. rosaliana* Meyer, mostraron

actividad antibacteriana *in vitro* frente a *S. aureus* ATCC (25923), con los valores de CIM que van desde los 150 mg/mL hasta los 500 mg/mL.

- Los extractos madres metanólicos de los rizomas de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y las partes aéreas de *V. rosaliana* Meyer, mostraron actividad antibacteriana “*in vitro*” frente a *S. aureus* ATCC (25923), con los valores de CIM de 400 mg/mL y 50 mg/mL.
- Los extractos fraccionados (*n*-hexano, diclorometano, acetato de etilo, metanol, hidroalcohólico proporción 1:1, acuoso) de *V. parviflora* (Trevier) Hoeck y *V. rosaliana* Meyer, no mostraron inhibición del crecimiento, frente bacterias *Gram* negativa ni levaduras.
- Este es el primer reporte sobre el estudio de la actividad antimicrobiana de las especies *V. parviflora* y *V. rosaliana*; así como de la composición química del aceite esencial y extractos de *V. parviflora* por lo que la realización de la presente investigación abre una nueva línea de investigación sobre el potencial biológico que pudieran tener las distintas especies del género *Valeriana* L. reportadas para Los Andes venezolanos.



REFERENCIAS  
bdigital.ula.ve  
BIBLIOGRÁFICAS

## 9. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Adams R. (2007). **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. Allured Publ. Corp., Carol Stream, Illinois, Estados Unidos.
2. Albornoz A. (1980). **Productos Naturales: Estudio de las Sustancias y Drogas Extraídas de las Plantas**. Universidad Central de Venezuela. Caracas-Venezuela.
3. Albornoz A. (1987). **Medicina Tradicional Herbaria**. Instituto Farmacoterápico Latino. Caracas-Venezuela.
4. Arévalo D., Martíne C., Rincón J. & Guerrero M. (2006). Fracción alcaloidal obtenida de *Valeriana pavonii* Poepp con actividad anticonvulsivante. **Revista Colombiana de Ciencias Químico - Farmacéuticas**, 35(2), 168-176.
5. Bardakci H, Demirci B, Yasilada E, Kirmizibekmez H & Can Baser K. (2012) Chemical composition of the essential oil of the subterranean parts of *Valeriana alliariifolia*. **Records of Natural Product**, 6(1), 89-92.
6. Barton, L., Atherton P., Bauer B., Moore D. Jr, Mattar B., Lavasseur B., Rowland K. Jr, Zon R., Lelindqwister N., Nagargoje G., Morgenthaler T., Sloan J. & Loprinzi C. (2011) The Use of *Valeriana officinalis* (Valerian) in Improving Sleep in Patients Who Are Undergoing Treatment for Cancer: A Phase III Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Study (NCCTG Trial, N01C5). **The Journal of Supportive Oncology**, 9(1), 24-31.

7. Blacklund A. & Moritz T. (1998) Phylogenetic implications of an expanded valepotriate distribution in the Valerianaceae. ***Biochemical Systematics and Ecology***, 26 (3), 309-335.
8. 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.
9. Bos R., Hendriks H., Scheffer JJ. & Woerdenbag HJ. (1998). Cytotoxic potential of valerian constituents and valerian tinctures. ***Phytomedicine***, 5(3), 219-225.
10. Bos R., Woerdenbag H. & Pras N. (2002). Determination of valepotriates. ***Journal of Chromatography A***, 967, 131-146.
11. Bravo, L. (2006). ***Farmacognosia***. Editorial Elsevier, Madrid, España.
12. Bruneton J., (2001). ***Farmacognosia Fitoquímica Plantas Medicinales***. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
13. Bueno D. & Suarez F. (2010). ***Estudio comparativo de la composición química y determinación de la actividad antibacteriana del aceite esencial de la especie Chromolaena laevigata (Lam.) R. King & H. Rob contra bacterias multirresistentes de origen nosocomial***. [Tesis de Pregrado]. Mérida, Venezuela. Universidad de Los Andes, Facultad de Farmacia y Bioanálisis.
14. Cabezas C. (2005). Dengue en el Perú: aportes para su diagnóstico y control. ***Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública***, 23(3), 212-228.

15. Cabrera C. & Otero C. (2008). Los mecanismos de resistencia a antibióticos: ¿Podremos lograr un equilibrio entre el uso-abuso de los antibióticos y así lograr la disminución de la resistencia bacteriana a estos medicamentos? **Revista Colombiana Salud Libre**, 3(1), 83-104.
16. Celis C., Rincón J. & Guerrero M. (2007). Actividad farmacológica sobre el sistema nervioso central del extracto etanólico y de la fracción alcaloidal de *Valeriana pavonii*. **Revista Colombiana de Ciencias Químico Farmacéuticas**, 36(1), 11-22.
17. CLSI. (2015). **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document M100-S25. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
18. Circosta C., De Pasquale R., Samperi S., Pino A. & Occhiuto F. (2007). Biological and analytical characterization of two extracts from *Valeriana officinalis*. **Journal of Ethnopharmacology**. 112 (2), 361-367.
19. Cirelli C. (2006). Cellular consequences of sleep deprivation in the brain. **Sleep Medicine Reviews**, 10(5), 307-321.
20. Coassini L. & Moneghini, M. (1989). Geographical variation in the monoterpenes of *Valeriana officinalis* leaf. **Biochemical Systematics and Ecology**, 17(8), 563–567.
21. D’Almeida V., Lobo L., Hipólido DC., de Oliveira AC., Nobrega JN. & Tufik S. (1998). Sleep deprivation induces brain region-specific decreases in glutathione levels. **Neuroreport**, 9(12), 2853-2856.

22. Davies N. (1990). Gas Chromatographic Retention Indices of Monoterpenes and Sesquiterpenes on Methyl Silica and Carbowax 20M. Phases. ***Journal of Chromatography A***, 503 (1), 1-24.
23. Dewick, P.M. (1998). ***Medicinal Natural Products. A Biosynthetic Approach***. John Wiley & Sons. University of Nottingham, UK.
24. Divo, A. (1990). ***Microbiología Médica***. Editorial Interamericana, México D.F., México.
25. 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.
26. Fernández, J. (2011). Obtención del extracto de *Valeriana officinalis*. [presentación de Slideshare.com]. Recuperado el 22 de Abril de 2015. URL: <http://es.slideshare.net/betagarri/obtenci>
27. Finch R. & Hunter PA (2006). Antibiotic resistance--action to promote new technologies: report of an EU Intergovernmental Conference held in Birmingham, UK, 12-13 December 2005. ***Journal of Antimicrobial Chemotherapy***, 58 (1), i3-i22.
28. Fonnegras, R. & Jiménez, S. (2007). ***Plantas medicinales aprobadas en Colombia***. Editorial Universidad de Antioquia. Medellín, Colombia.
29. Fuzzati N., Wolfenfer J., Hostettman K., Msonthi J., Mavi S. & Molleyres L. (1997). Isolation of Antifungal Valepotriates from *Valerian capense* & the

- Search for Valepotriates in Crude Valerianaceae Extracts. *Phytochemical Analysis*, 7 (2), 76-85.
30. Gaitán I. (2005). **Actividad de doce plantas nativas Guatemaltecas Contra *Sporothrix schenckii***. [Tesis de Pregrado]. Guatemala, Guatemala. Universidad de Guatemala, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia.
31. Ghosh S., Debnath S., Hazra S., Hartung A., Thomale K., Schultheis M., Kapkova P., Schurigt U., Moll H., Holzgrabe U. & Hazra B. (2011). *Valeriana wallichii* root extracts and fractions with activity against *Leishmania spp.* *Parasitology Research*, 108(4), 861-871.
32. Giraldo S. (2010). **Aislamiento e identificación de metabolitos activos sobre el sistema nervioso central obtenidos de *Valeriana pavonii***. [Tesis de Doctoral]. Santafé de Bogotá, Colombia. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias.
33. Govantes C., Govantes J. & Velázquez P. (1999). Manual Normon. Laboratorios Normon S.A., Madrid, España.
34. Hattesoehl M., Feistel B., Sievers H., Lehnfeld R., Hegger M. & Winterhoff H. (2008). Extracts of *Valeriana officinalis* L. s.l. show anxiolytic and antidepressant effects but neither sedative nor myorelaxant properties. *Phytomedicine*, 15(1-2), 2-15.
35. Houghton, P. (1988). The biological activity of Valerian and related plants. *Journal of Ethnopharmacology*. 22 (2), 121-142.

36. Houghton, P. (1999). The scientific basis for the reputed activity of Valerian. ***Journal Pharmaceutical and Pharmacology***. 51 (5), 505-12.
37. Janot M., Guilhem J., Contz O., Venera G & Cionga E. (1979) [Contribution to the study of valerian alkaloids (*Valeriana officinalis* L.): actinidine and naphthyridylmethylketone, a new alkaloid (author's transl)]. ***Annales Pharmaceutiques Françaises***, 37 (9-10), 413-20.
38. Juliani H., Biurrun F., Koroch A., Oliva M., Demo M., Trippi V. & Zygadlo J. (2002) **Chemical constituents and antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana xenica***. *Planta Medica*, 68 (8), 762-4.
39. Kutschker, A. (2011). Revisión del género *Valeriana* (Valerianaceae) en Sudamérica austral. ***Gayana Botánica***, 68 (2), 244-296.
40. Laufer J., Seckel B & Zawving J. (1970). Composition of the active principles of different Valerian and Kentranthus species. ***Pharmaceutisch Weekblad***, 105 (22), 609-625
41. Liu W., Gao P., Wang G., Canción S., Li L., Li X., Yao X. & Zhang Z. (2012). In vivo antidepressant activity of sesquiterpenes from the roots of *Valeriana fauriei* Briq. ***Fitoterapia***, 83 (3), 599-603.
42. Lizcano A. & Vergara J. (2008). ***Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos y/o aceites esenciales de las especies vegetales Valeriana pilosa, Hesperomeles ferruginea, Myrcianthes rhopaloides y Passiflora manicata frente a organismos patógenos y fitopatogénicos***. [Tesis de Pregrado]. Bogotá, Colombia. Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias.

43. Lozina, L. A., Boehringer, S. B., & Acosta, O. (2005). **Extrapolación en una Forma Posológica de valores obtenidos in Vitro sobre actividad antifúngica del propóleo**. Universidad Nacional del Nordeste. Comunicaciones científicas y tecnológicas 2005. Resumen: V-018.
44. López J., López L. & Luna M. (2010). Fitoterapia: Valeriana. [presentación de lopezrodriguez.com]. Recuperado el 22 de Abril de 2015. URL: <http://www.lopezrodriguezj.com/wpcontent/uploads/2011/02/TrabajoValerianaOffiicinalis.pdf>
45. Marcano D. & Hasegawa M. (2002). **Fitoquímica orgánica**. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela.
46. Martínez, M. & Csáky, A. (2001). **Técnicas experimentales en síntesis orgánica**. Editorial Síntesis. Madrid, España.
47. Meyer F. (1979). A new species of *Valeriana* (Valerianaceae) from Venezuela. **Brittonia**, 31 (1), 101-103.
48. Müller C., Schumacher B., Brattström A., Abourashed E. & Koetter U. (2002). Interactions of valerian extracts and a fixed valerian-hop extract combination with adenosine receptors. **Life Sciences**, 71(16), 1939–1949.
49. Müller L., Salles L., Stein A., Betti A., Sakamoto S., Cassel E., Vargas R., von Poser G. & Rates S. (2012). Antidepressant-like effect of *Valeriana glechomifolia* Meyer (Valerianaceae) in mice. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**. 36(1), 101-109.



50. Murray P., Roshenthal K. & Pfaller M. (2009). **Microbiología Médica**. Editorial Elsevier, Barcelona, España.
51. Olanow C. (1993). A radical hypothesis for neurodegeneration. **Trends in Neuroscience**, 16(11), 439-444.
52. Ortiz J., Nieves-Natal J. & Chavez P. (2006). Commercial valerian interactions with [3H]Flunitrazepam and [3H]MK-801 binding to rat synaptic membranes. **Phytotherapy Research**, 20(9), 794-798.
53. Pavlovic M., Kovacevic N., Tzakou O. & Couladis M. (2007). Composition of the Essential Oils from the Aerial Parts of Five Wild Growing *Valeriana* species. **Journal of Essential Oil Research**, 16 (5), 500-503.
54. Perez, N. (2013). Tema N° 7. Alcaloides. [presentación de saber.ucv.ve]. Recuperado el 22 de Abril de 2015. URL: <http://saber.ucv.ve/jspui/bitstream/123456789/7967/1/7.%20ALCALOIDES%202013-2014.pdf>
55. Periago M. (2011). La resistencia a antimicrobianos: Un factor de riesgo para las enfermedades infecciosas. **Revista Panamericana de Salud Pública**. 30 (6), 507-08.
56. Potdar V., Lole V. & 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.
57. Thusoo S., Gupta S., Sudan R., Kour J., Bhagat S., Hussain R. & Bhagat M. (2014). Antioxidant Activity of Essential Oil and Extracts of *Valeriana*

*jatamansi* Roots, **BioMed Research International**, vol. 2014, Article ID 614187, 4 pages, 2014. doi:10.1155/2014/614187

58. Stahl E. (1969). **Thin-Layer chromatography: a laboratory handbook**. Springer. Berlin, Alemania
59. Sánchez, E. (2006). **Síntesis estereoselectivas de terpenoides bioactivos vía procesos radicalarios**. [Tesis Doctoral]. Granada, España. Universidad de Granada, Facultad de Ciencias.
60. Sati S., Khulbe K. & Savita J. (2011). Antibacterial Evaluation of the Himalayan Medicinal Plant *Valeriana Wallichii* DC (Valerianaceae), **Research Journal of Microbiology**, 3, 289-296.
61. Sha S., Tirkey N., Kuhad A. & Chopra K. (2011). Effect of quercetin on lipopolysaccharide induced-sickness behavior and oxidative stress in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, 43(2), 192-197.
62. Sudati J Fachinetto R., Pereira R., Boligon A., Athayde ML., Soares F., de Vargas N. & Rocha J. et al. (2009). In vitro antioxidant activity of *Valeriana officinalis* against different neurotoxic agents. **Neurochemical Research**. 34 (8), 1372-1379.
63. *Valerianaceae Batsch*. (s.f.). Recuperado el 05 de Junio de 2014. URL: [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/valerianaceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/valerianaceae.html).
64. Van Meer J. & Labadie R. (1981). Straight-phase and reversed-phase high-performance liquid chromatographic separation of valepotriate isomers and homologues. **Journal of Chromatography**, 205, 206-212.

65. Velasco J., Contreras E., Butriago D., & Velazco E. (2005). Efecto antibacteriano de *Virola sebifera* sobre *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina. **Ciencia**, 13(4), 411-15.
66. Volk, W. (1996). **Microbiología Básica**. Editorial Harla, México D.F., México.
67. Wallis T.E. (2005) **Textbook of Pharmacognosy**. CBS Publishers and distributors. New Delhi-India.
68. Wang J., Zhao J., Liu H., Zhou L., Liu Z., Wang J., Han J., Yu Z. & Yang F. (2010). Chemical analysis and Biological Activity of the Essential Oils of two Valerianaceous species from China: *Nardostachys chinensis* y *Valeriana officinalis*. **Molecules**, 15, 6411-6422.
69. Williamson E. (2001). Synergy and other interactions in phytomedicines. **Phytomedicine**, 8 (5), 401-409.
70. Xena de E. N. (1992). Valerianacea. Flora de Venezuela. **Acta Científica Venezolana**. 5 (1), 221-266.
71. 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.
72. Yousuf S., Bachheti R. & Joshi A. (2013). Screening Of Extracts Of *Valeriana hardwickii* For Their Antibacterial Activity. **International Journal of PharmTech Research**, 5 (2), 679-683.

73. Yousuf S., Bachheti R., Joshi A. & Mathur A. (2014). Antioxidant Activity of Different Extracts of Valeriana hardwickii. ***International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research***, 24 (2), 297-301.

bdigital.ula.ve