

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN DE ÁCIDO VALERÉNICO O SUS DERIVADOS EN
EXTRACTO DE HOJAS Y RAÍZ DE VALERIANA (*Valeriana
prionophylla* Standl.)

JUAN CARLOS GARRIDO TANCHEZ

MAESTRIA MULTIDISCIPLINARIA EN USO Y PRODUCCIÓN DE
PLANTAS MEDICINALES

Guatemala, octubre de 2,007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA
ESCUELA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

ANÁLISIS POR CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA
RESOLUCIÓN DE ÁCIDO VALERÉNICO O SUS DERIVADOS EN
EXTRACTO DE HOJAS Y RAÍZ DE VALERIANA (*Valeriana
prionophylla* Standl.)

Informe de tesis
Presentado por

JUAN CARLOS GARRIDO TANCHEZ

Para optar al título de

MAESTRIA EN ARTES, MULTIDISCIPLINARIA EN USO Y
PRODUCCIÓN DE PLANTAS MEDICINALES

Guatemala, octubre de 2,007

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACIA

JUNTA DIRECTIVA

Óscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D.	DECANO
Pablo Ernesto Oliva Soto	SECRETARIO
Licda. Lillian Raquel Irving Antillón, M.A.	VOCAL I
Licda. Liliana Vides de Urizar	VOCAL II
Licda. Beatriz Eugenia Batres de Jiménez	VOCAL III
Br. Mariesmeralda Arriaga Monterroso	VOCAL IV
Br. José Juan Vega Pérez	VOCAL V

CONSEJO ACADEMICO
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

Óscar Manuel Cóbar Pinto, Ph.D. , DECANO

Licda. Anne liere de Godoy, M.Sc.

Dr. Jorge Luis De león Arana

Dr. Jorge Edwin López Gutiérrez

Félix Ricardo Veliz Fuentes, M.Sc.

INDICE

1. Resumen	6
2. Introducción	7
3. Definición del problema	8
4. Justificación	8
5. Marco teórico	9
Botánica	9
5.2 Química de la Familia <i>Valerianaceae</i>	9
5.2.1 Aceite volátil	10
5.2.2 Iridoides	11
5.2.3 Alcaloides	16
5.2.4 Flavonoides	16
5.3 Cromatografía líquida de alta resolución	18
6. Objetivos	20
6.1 Objetivo general	20
6.2 Objetivos específicos	20
7. Hipótesis	20
7.1 Hipótesis alterna	20
7.2 Hipótesis nula	20
8. Materiales y métodos	21
8.1 Universo de trabajo	21
8.2 Muestra	21
8.3 Materiales	21
8.4 Equipos	21
8.5 Reactivos	22
8.6 Métodos	22
8.6.1 Recolección de material vegetal	22
8.6.2 Lavado, desinfección y secado de hojas	22
8.6.3 Lavado, desinfección y secado de raíces	22
8.6.4 Determinación de humedad de la droga vegetal	23
8.6.5 Extracción por percolación de raíces y hojas de <i>V. prionophylla</i>	23
8.6.6 Cromatografía líquida de alta resolución	23
9. Resultados	25
10. Discusión de resultados	30
11. Conclusiones	32
12. Recomendaciones	32
13. Referencias bibliográficas	33
Anexos	35

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Componentes químicos del aceite esencial de <i>V. officinalis</i>	10
TABLA 2. Sesquiterpenos presentes en la raíz de <i>V. officinalis</i>	11
TABLA 3. Estructura química de los valepotriatos tipo dieno	12
TABLA 4. Estructura química de los valepotriatos tipo monoeno	13
TABLA 5. Estructura química de los valepotriatos tipo hidrino	14
TABLA 6. Otros valepotriatos presentes en la raíz de <i>V. officinalis</i>	14
TABLA 7. Productos de degradación de los valepotriatos	14
TABLA 8. Estimación del contenido de valepotriatos por especie	15
TABLA 9. Características cromatográficas de los valepotriatos	18
TABLA 10. Contenido en g / 100 g de droga vegetal seca, de sesquiterpenos en muestras de hojas y raíz de <i>V. prionophylla</i> de dos localidades	30

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. Cromatograma por HPLC de <i>V. officinalis</i>	19
FIGURA 2. Cromatograma de los estándares de A. valerénico, hidroxivalerénico y acetoxivalerénico	25
FIGURA 3. Cromatograma de hoja de <i>V. prionophylla</i> del Depto. de San Marcos	26
FIGURA 4. Cromatograma de raíz de <i>V. prionophylla</i> del Depto. de San Marcos	27
FIGURA 5. Cromatograma de hojas de <i>V. prionophylla</i> del Depto de Totonicapán	28
FIGURA 6. Cromatograma de raíz de <i>V. prionophylla</i> del Depto. de Totonicapán	29

1. RESUMEN

Valeriana officinalis es una especie europea, utilizada por su efecto sedante, hipnótico y anti-convulsivante. Las principales farmacopeas del mundo establecen que éstas actividades farmacológicas se atribuyen principalmente a los valepotriatos y al ácido valerénico y sus derivados. Guatemala cuenta con la *Valeriana prionophylla*, especie nativa de mesoamérica, que ha demostrado actividades farmacológicas similares a las observadas en *V. officinalis*. Por ello, se evaluó la presencia de ácido valerénico o sus derivados, en un extracto obtenido por el método de percolación utilizando como único disolvente metanol grado reactivo, en hojas y raíz de *V. prionophylla* cultivada en el departamento de San Marcos y otro de procedencia silvestre del Depto. de Totonicapán, utilizando cromatografía líquida de alta resolución. Los resultados obtenidos indican que las hojas de *V. prionophylla*, del Depto. de San Marcos y Totonicapán, presentan ácido hidroxivalerénico a una concentración de 0.015 y 0.043 g / 100 g en base seca, respectivamente. Las raíces de *V. prionophylla* provenientes de San Marcos y Totonicapán, poseen ácido hidroxivalerénico y valerénico a una concentración de 0.019 y 0.052, y 0.023 y 0.015 g / 100 g en base seca, respectivamente. Ninguna de las muestras presentó Ácido acetoxivalerénico. Por tanto, se concluye que las condiciones cromatográficas de trabajo establecidas en el presente trabajo de investigación, son adecuadas para la evaluación del ácido valerénico, hidroxivalerénico y acetoxivalerénico en muestras de hojas y raíces de *V. prionophylla*, utilizando cromatografía líquida de alta resolución.

2. INTRODUCCIÓN

Valeriana officinalis ha sido utilizada en la medicina tradicional de Europa y América, principalmente como sedante, hipnótico y anti-convulsivante. Estas actividades farmacológicas se han atribuidos a diversos compuestos presentes en ésta, sin embargo los valepotriatos (valtrato / iso-valtrato y dihidrovaltrato) y el ácido valerénico y sus derivados, se consideraron los principales constituyentes con actividad sedante. Los valepotriatos son productos naturales que desde el punto de vista químico pertenecen a los iridoides, y fueron aislados por primera vez en 1,960 de las partes subterráneas de *V. wallichii*; el ácido valerénico fué aislado en 1,957 y es un derivado sesquiterpénico estable y con actividad sedante.

Las preparaciones farmacéuticas derivadas de valeriana, han sido en los últimos años utilizadas como sustitutos naturales de los medicamentos de síntesis inductores del sueño, principalmente por su relativa seguridad, efectividad y por no inducir adicción.

En Guatemala se cuenta con *Valeriana prionophylla*, especie nativa de mesoamérica, que en estudios clínicos y de laboratorio ha demostrado actividades farmacológicas similares a las observadas en *V. officinalis*. Por ello, se hace necesario ampliar el conocimiento químico de ésta, a través de identificar y cuantificar el ácido valerénico ó sus derivados, presentes en un extracto metanólico de hojas y raíz de *V. prionophylla*, de especímenes cultivados en el departamento de San Marcos y otro de procedencia silvestre en el Departamento de Totonicapán.

Se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución, pues es una de las técnicas cromatográficas de elección descrita en las farmacopeas, para la evaluación de estos compuestos químicos.

3. DEFINICION DEL PROBLEMA

Entre los principales medicamentos de origen vegetal con actividad inductora del sueño y ansiolítica, está el derivado de la raíz de *Valeriana officinalis*, sin embargo esta especie no es cultivada en Guatemala, por lo que la producción de éstos fitofármacos se realiza a partir de material vegetal importado.

Estudios de laboratorio y clínicos han demostrado que los extractos de raíz de *Valeriana prionophylla* (especie nativa de mesoamérica) presentan actividades farmacológicas similares a las de *Valeriana officinalis*, donde el ácido valerénico y sus derivados juegan un papel importante ; sin embargo, la información acerca de éstos compuestos químicos es escasa e incipiente.

Por tanto, es fundamental determinar la presencia de éstos compuestos, que son marcadores fitoquímicos de especie, teniendo en cuenta que son altamente inestables, termolábiles, de rápida descomposición, y que además se encuentran en poca cantidad. Por esto, se utilizó la cromatografía líquida de alta resolución, técnica empleada para la identificación y cuantificación de éstos compuestos en extractos metanólicos de la raíz de Valeriana.

4. JUSTIFICACION

La determinación del perfil cromatográfico del ácido valerénico y sus derivados en extractos de raíz y hojas de *V. prionophylla*, proveerá la información básica para establecer la posible relación entre éstos compuestos y los efectos farmacológicos observados.

Desde el punto de vista fitofarmacéutico, se podrán elaborar extractos de *V. prionophylla* estandarizados en ácido valerénico ó sus derivados, a partir de los cuales se podrá formular y desarrollar un fitofármaco de origen vegetal, los cuales en los últimos años han experimentado una fuerte demanda en el mercado nacional.

5. MARCO TEORICO

5.1 Botánica

5.1.1 Taxonomía y descripción

La Valeriana es un miembro de la familia *Valerianaceae* Batsch., del género *Valeriana* L., el cual engloba 200 especies alrededor del mundo.

Valeriana prionophylla Standl. crece preferentemente en regiones húmedas, con arboledas de pino abiertas, o lugares alpinos, o bien en crestas de acantilados rocosos, secos, algunas veces en piedra caliza, a alturas de entre 2,100-4,200 m. Se ha reportado en México (Chiapas), Costa Rica y en los siguientes departamentos de Guatemala: Chimaltenango, Guatemala, Huehuetenango, Quetzaltenango, Sacatepéquez, San Marcos, Sololá, Totonicapán.(1)

Botánicamente se describe como una planta erecta, perenne, con raíces largas, en forma de tenedor, tallo de 10-80 cm de altura, ligeramente piloso o casi glabro, con nudos pilosos (Anexo 1); hojas predominantemente basales, usualmente numerosas y de apariencia cespitosa, lámina foliar no dividida, oblongo-linear a espatulada, de 3-30 cm de largo, 0.5-3.0 cm de ancho, base obtusa, atenuada a subpeciolar, con márgenes aserrados, serrado-dentados, ondulado-dentados, crenados, o raramente enteros, usualmente ciliados, glabros a pilosos, hojas caulinares en 2-3 pares, de 2-20 cm de largo, sésiles y fijadas, con peciolo corto; inflorescencia larga, pedunculada, flores numerosas dispuestas en un agregado dicasio, denso o difuso; brácteas lineares; limbo del cáliz con 9-11 segmentos; corola rotada, 1.5-3.0 mm de largo, de color blanco, rosado o violeta pálido, glabra; estambres exertos, las anteras presentan 4 lóbulos, la teca surcada; estilo exerto; aquenios de 2-3 mm de largo, lisos o transversalmente rugosos, glabros o pilosos, los márgenes adaxiales son usualmente conspicuos. (1)

5.2 Química de la familia *Valerianaceae*

La familia *Valerianaceae* posee cuatro grupos principales de consti-

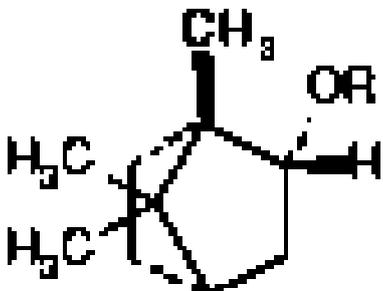
tuyentes químicos, sesquiterpenos de los aceites volátiles, iridoides, alcaloides y flavonoides.(2)

5.2.1 Aceite volátil

El contenido de los aceites volátiles varía grandemente tanto dentro de la misma especie como entre distintas especies. *V. officinalis* europea contiene menos del 1 % volumen/peso (v/p), en tanto que *V. officinalis* var. *latifolia* de origen Japonés posee rendimientos de 0.5 a 6.0 % v/p.(2)

Los aceites son mezclas de derivados de monotepenos y sesquiterpenos. El aceite de *V. officinalis* europea contiene 12 monotepenos y 17 sesquiterpenos; encontrándose en mayor cantidad el bornil-acetato y el isovalerato. Sin embargo, el sesquiterpeno ácido valerénico es el único constituyente con actividad sedante.(2)

Tabla 1. Componentes químicos del aceite esencial de *V. officinalis*

	R
BORNIL ACETATO	Ac
BORNIL ISOVALERATO	iVal
	

Los principales sesquiterpenos presentes en éste grupo de plantas, se basan en el esqueleto químico del kesano, valeranano y valerénano. Las cantidades y composición química de los aceites volátiles son tan variables, que se deben determinar en cada muestra, para poder así establecer la correlación entre la actividad biológica y los constituyentes.(2)

Cabe hacer notar que la presencia simultánea de los tres sesquiterpenos ciclopentánicos, ácido valerénico, ácido acetoxivalerénico y

valerenal, únicamente se observa en *Valeriana officinalis*, lo que permite la diferenciación entre ésta y otras especies del género.(3)

5.2.1.1 Farmacología

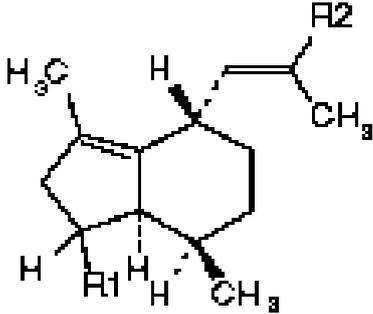
El ácido valerénico exhibe un efecto modulador alostérico positivo (no así el ácido acetoxivalerénico ni el hidroxivalerénico) a concentraciones > de 1 μM , evidenciado por la expresión del receptor GABA_A (I_{GABA}). El efecto es dosis-dependiente y la estimulación máxima de los receptores $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ ocurre a 100 μM . (4)

Por otro lado se establece que el sitio de unión del ácido valerénico con el receptor GABA es distinto al utilizado por las benzodiazepinas.

El efecto estimulador del ácido valerénico sobre el receptor GABA, depende de la composición de la sub-unidad β del receptor. La acción del ácido valerénico se ejerce preferentemente en los receptores que contienen las sub-unidades $\beta_2\beta_3$.

La actividad sedante, hipnótica y ansiolítica de *Valeriana* podría deberse a la interacción del ácido valerénico con los canales GABA_A . (4)

Tabla 2. Sesquiterpenos presentes en la raíz de *V. officinalis*

	R1	R2
ACIDO VALERENICO	H	COOH
ACIDO HIDROXIVALERENICO	OH	COOH
ACIDO ACETOXIVALERENICO	OAc	COOH
VALERENAL	H	CHO

5.2.2 Iridoides

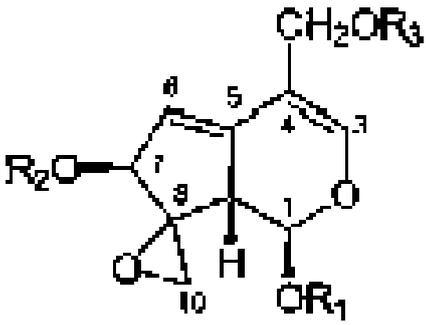
Los iridoides (valepotriatos) son monoterpenoides ciclopentan-c-pi-

ranos, que poseen un esqueleto básico de 10 carbonos, y se encuentran en un gran número de familias de plantas, a menudo en su forma glicosídica (5).

Los valepotriatos (nombre derivado de triésteres epóxicos de Valeriana) son productos naturales, que desde el punto de vista químico pertenecen a los iridoides; son principios activos importantes en la Familia *Valerianaceae* y constituyen el 0.5-1.6 % (5).

Usualmente las raíces contienen la mayor cantidad de valepotriatos, encontrándose 14.5 % p/p en las raíces frescas de *V. thalicroides*, 7 % p/p en *V. mexicana* DC y 1.2 % p/p en *V. officinalis*. En el caso de *V. kilimandascharica* Engl., sus hojas contienen un 5 % p/p de valepotriatos.(2)

Tabla 3. Estructura química de los valepotriatos tipo dieno

	R1	R2	R3	VALEPOTRIATOS TIPO DIENO
	1	Iv	Iv	Ac
2	Iv	Ac	Iv	Isovaltrato
3	AIv	Iv	Ac	Acevaltrato
4	Iv	Ac	Ac	Diavaltrato
5	Iv	Aiv	Ac	Homoacevaltrato
6	Miv	Iv	Ac	1-Homovaltrato
7	Iv	Ac	Miv	7-Homovaltrato
8	Iv	Ac	Aiv	11-Acevaltrato
9	Iv	Hiv	Ac	Hidrovaltrato
10	Cr	Iv	Ac	1-Seneciovaltrato
11	Iv	H	Iv	Deacetilisovaltrato

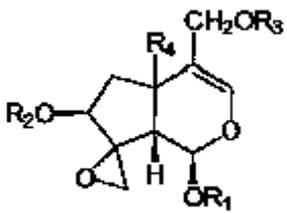
El valtrato e isovaltrato representan más del 90 % del total de los valepotriatos; además se encuentran pequeñas cantidades de dihidrovaltrato, iso-valeroxi-hidroxidihidrovaltrato, 1-acevaltrato y otros.

5.2.2.1 Clasificación y estructura

Basados en su estructura química los valepotriatos se pueden dividir en cuatro tipos: dieno, monoeno, valtratohidrino y el desoxi-monoeno. (5)

Los valepotriatos difieren en cuanto a los sustituyentes ácidos esterificados al grupo OH y número de dobles enlaces en el núcleo iridoide, presencia de grupos epóxido, azúcares y ésteres.(2)

Tabla 4. Estructura química de los valepotriatos tipo monoeno

	R1	R2	R3	R4	VALEPOTRIATOS TIPO MONOENO
	12	Iv	Ac	Iv	
13	Iv	Iv	Ac	H	Isodidrovaltrato
14	Iv	Ac	Iiv	OH	IVDH valtrato
15	Miv	Ac	Iv	H	Homodidrovaltrato
16	Ac	Iv	Aiv	H	AHD valtrato

Los valepotriatos son compuestos inestables: son termolábiles y se descomponen rápidamente bajo condiciones acuosas ácidas o alcalinas, así como en soluciones alcohólicas. En metanol anhidro y almacenados a 20 °C, los valepotriatos diénicos son relativamente estables; disueltos en metanol o etanol, con una pequeña cantidad de agua y almacenados a temperatura ambiente, la descomposición es del 90 % en pocas semanas.(5)

Los principales productos de la descomposición de los valepotriatos son compuestos de color amarillo llamados baldrinales, los cuales reaccionan químicamente y pueden formar polímeros. La pérdida de los grupos sustituyentes en C1 y C7 en el valtrato y acevaltrato, y la formación de un grupo aldehído en C10 resulta en la formación del baldrinal; el homobaldrinal se origina de la pérdida de un grupo acetil e isovaleril en C1 y C7 del isovaltrato.(5)

Tabla 5. Estructura química de los valepotriatos tipo hidrino

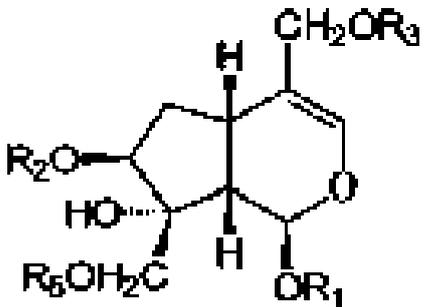
	R1	R2	R3	R5	VALEPOTRIATOS HIDRINOS
	17 ^a	Iv	Iv	Iv	
17b	Iv	Iv	Ac	Ac	Valtrato hidrino B2
17c	Biv	Iv	Iv	Ac	Valtrato hidrino B3
17d	Iv	Iv	Ac	Iv	Valtrato hidrino B4
17e	Iv	Iv	Miv	Ac	Valtrato hidrino B5a
17f	Iv	Miv	Iv	Ac	Valtrato hidrino B5b
17g	Iv	Miv	Ac	Ac	Valtrato hidrino B6a
17h	Miv	Iv	Ac	Ac	Valtrato hidrino B6b
17i	Cr	Iv	Iv	Ac	Valtrato hidrino B7
17j	Aiv	Iv	Iv	Ac	Valtrato hidrino B8

Tabla 6. Otros valepotriatos presentes en la raíz de *V. officinalis*

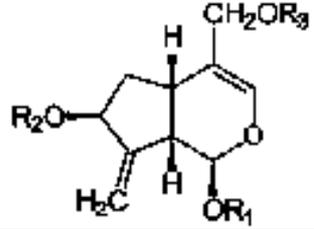
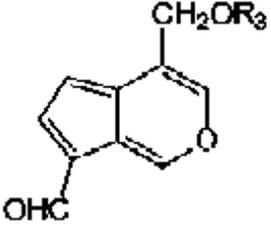
	R1	R2	R3	
	18	Iv	Ac	Iv
19	Miv	Ac	Iv	8,11-Desoxihomodidrovaltrato

Tabla 7. Productos de degradación de los valepotriatos

	R3	
	23	Ac
24	Iv	Homobaldrinal
25	H	Deacilbaldrinal

5.2.2.2 Farmacología

V. officinalis L., *V. wallichii* DC y *V. edulis* Nutt. ex Torr son las especies más utilizadas en la producción de medicamentos herbarios (5), ya que los valepotriatos presentes en ellas, han presentado actividad espasmolítica, sedante y anti-convulsiva; así mismo se sugiere, que interaccionan con sustancias con esqueleto químico similar presentes en el aceite esencial y de ésta forma actúan sobre el sistema nervioso.(6)

Tabla 8. Estimación del contenido de valepotriatos por especie

VALEPOTRIATOS (PS %)	RAÍCES Y RIZOMA	HOJAS	TALLOS	FLORES	BIOTECNOLOGÍA
<i>V. officinalis</i>	0.3-1.7				+
<i>V. wallichii</i>	1.8-3.5				0.83
<i>V. edulis</i>	8.0-12.0				+
<i>V. kilimandschari</i>	5.2	5.9	3.2	3.8	
<i>V. alliarilfolia</i>	+	+	+		+
<i>V. dioicia</i>	0.2	+	+		
<i>V. tripteris</i>	0.3	+	+		

+ valepotriatos presentes, cantidad exacta desconocida

5.2.2.3 Toxicidad de los valepotriatos

Entre los principales efectos adversos reportados por la ingesta de medicamentos que contienen *V. officinalis* se encuentran, midriasis, congestión torácica, cefalea, dolor abdominal, temblores y nefrotoxicidad. En estudios hematológicos se ha reportado que la Valeriana incrementa la tendencia a hemorragias y causa desórdenes en la coagulación sanguínea.(7)

Los valepotriatos son considerados componentes con actividad tranquilizante, sin embargo poseen una fuerte actividad alquilante contra el agente nucleofílico 4-(p-nitrobenzil) piridina.(7)

En ratones macho Albino Swiss, la valeriana incrementó significativamente la frecuencia de micro-nucleación en eritrocitos policromá-

ticos y redujo la relación eritrocitos policromáticos / normocromáticos; ésto demuestra el efecto genotóxico y mitodepresivo de la valeriana sobre los precursores eritrocíticos en la médula ósea.(7)

El estudio bioquímico de células hepáticas en los mismos sujetos experimentales, indica que la valeriana incrementa el malon-dialdehído y disminuye el sulfidrilo no-protéico, reduciendo así la efectividad de los sistema enzimáticos fisiológicos anti-oxidantes.(7)

Estos cambios bioquímicos se observan en células hepáticas y testiculares a dosis de 1,000 y 2,000 mg de extracto de valeriana por Kg de peso corporal, sin presentarse una curva lineal dosis/respuesta. (7)

En cuanto a la citogenética de las células germinales, la valeriana incrementa la frecuencia de anormalidades cromosómicas, como los aneuploides, univalentes sexuales y poliploides. La evaluación morfológica del espermatozoide evidencia un incremento en el porcentaje total de anormalidades, además de observarse un aumento en las anormalidades morfológicas en la cabeza del espermatozoide (forma triangular y amorfa). (7)

Es difícil establecer la entidad química responsable de los efectos genotóxicos, sin embargo se podría relacionar con la presencia de terpenoides (valepotriatos) y flavonoides (6-metilapigenina y 2S(-)-hesperidina), los cuales favorecerían la peroxidación lipídica.(7)

5.2.3 Alcaloides

En 1967 se aislaron por primera vez dos alcaloides de *V. officinalis*, 16 a y 16 b, en cantidades de 0.015 % y 0.001 % p/p, respectivamente. La estructura del anillo se asemeja a la de los iridoides, sin embargo las cantidades presentes son tan pequeñas que hacen poco probable que contribuyan con la actividad biológica observada en la Valeriana. (2)

5.2.4 Flavonoides

Al emprender la búsqueda de las sustancias activas de la Valeriana, se encuentra que los epoxiridoides (valepotriatos) y sus productos de degradación, los baldrinales, y los terpenos no-volátiles, como el

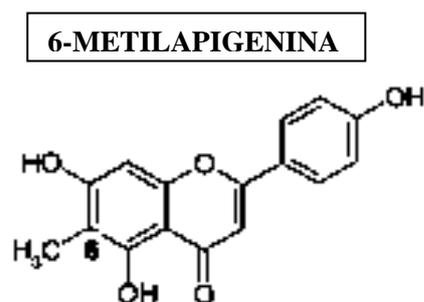
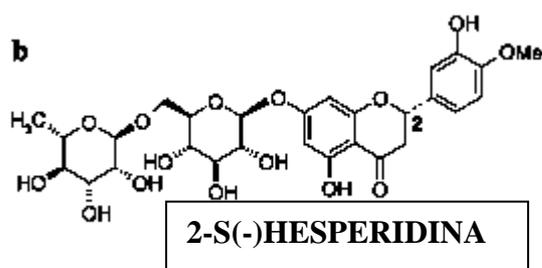
ácido valerénico y sus derivados, no son necesariamente los responsables de la acción farmacológica observada, esto debido a que:

- la acción depresiva central de los valepotriatos, valeranona y del aceite esencial, no demuestra una reducción en el recambio de glucosa cerebral en ratas
- la potencia sedante de éstos compuestos es baja (>30 mg/kg, en ratones);
- los valepotriatos en medio acuoso rápidamente se degradan, produciendo baldrinales, que son químicamente reactivos y pueden formar polímeros, desapareciendo de los extractos; y
- las raíces y rizomas de las diferentes especies de Valeriana, poseen grandes diferencias en cuanto a su constitución química. (8)

Es por ello que el estudio de los flavonoides en la Valeriana a cobrado importancia, ya que se ha demostrado su actividad sedante e inductora del sueño. La linarina inicialmente se encontró en *V. wallichii* en 1,968; estudios recientes la han identificado en *V. officinalis*, indicando que ésta y su aglicona, acacetina, poseen actividad sedante e inductora del sueño. Sin embargo, su mecanismo de acción aún no está establecido, ya que no son ligandos para el sitio de unión a las benzodiazepinas en el cerebro de ratones.(8)

La 6-metilapigenina es el primer compuesto aislado de la valeriana que posee una afinidad media-alta al sitio de unión a benzodiazepina (BDZ-bs) ($k_i = 0.5 \mu\text{M}$), posee un efecto ansiolítico en ratones y no presenta actividad inductora del sueño. Su concentración en las raíces de *V. officinalis* y *V. wallichii* es de aproximadamente 60 $\mu\text{g/g}$ de droga cruda (9).

La 2S(-)hesperidina, flavonoide conocido desde 1,936, es el isómero con actividad sobre el sistema nervioso central, pero no es un ligando del BDZ-bs, receptor 5-hidroxi-triptamina tipo 1-A, receptor 5-hidroxitriptami-



na tipo 2, receptores glutamatergicos AMPA y receptores adenosina 1. De aquí que, aún no se conozca el mecanismo de su actividad sedante y promotora del sueño.(9)

En ratas macho Wistar la administración de 6-metilapigenina y 2-S(-) hesperidina, en una relación en peso 2:1, incrementa dramáticamente el efecto hipnótico; esto demuestra la relevancia de éstos compuestos en la actividad tranquilizante e inductora del sueño de las valerianas.(9)

5.3 Cromatografía líquida de alta resolución

Esta técnica es utilizada al aislar y posteriormente analizar, de forma rápida y eficiente, los diversos compuestos presentes en un extracto de productos naturales. Se puede hacer uso de las siguientes cuatro formas: fase normal, fase reversa, cromatografía de permeación en gel y cromatografía de intercambio iónico. El tipo de cromatografía dependerá de los materiales y métodos utilizados en el aislamiento o extracción del producto natural y la especie química a evaluar.

La cromatografía líquida de alto desempeño de fase reversa consiste en una fase estacionaria, que es más apolar que la fase móvil y está formada por partículas cuyo tamaño y distribución son críticos, al momento de separar distintos compuestos en una mezcla.

Tabla 9. Características cromatográficas de los valepotriatos

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (min)	FACTOR DE CAPACIDAD (K')	UV MÁXIMA (nm)
Baldrinal	4.43	2.20	230, 246, 291, 424
Homobaldrinal	9.76	6.05	230, 246, 291, 424
Acevaltrato	18.32	12.23	256, 259
Didrovaltrato	19.47	13.06	203
IVDH	20.43	13.75	203
Isovaltrato	21.38	14.44	256, 259
Valtrato	22.11	14.96	256, 259

La fase móvil puede hacer uso de agua y/o disolventes orgánicos miscibles, como el acetonitrilo, metanol, tetrahydrofurano o una mezcla de ellos.

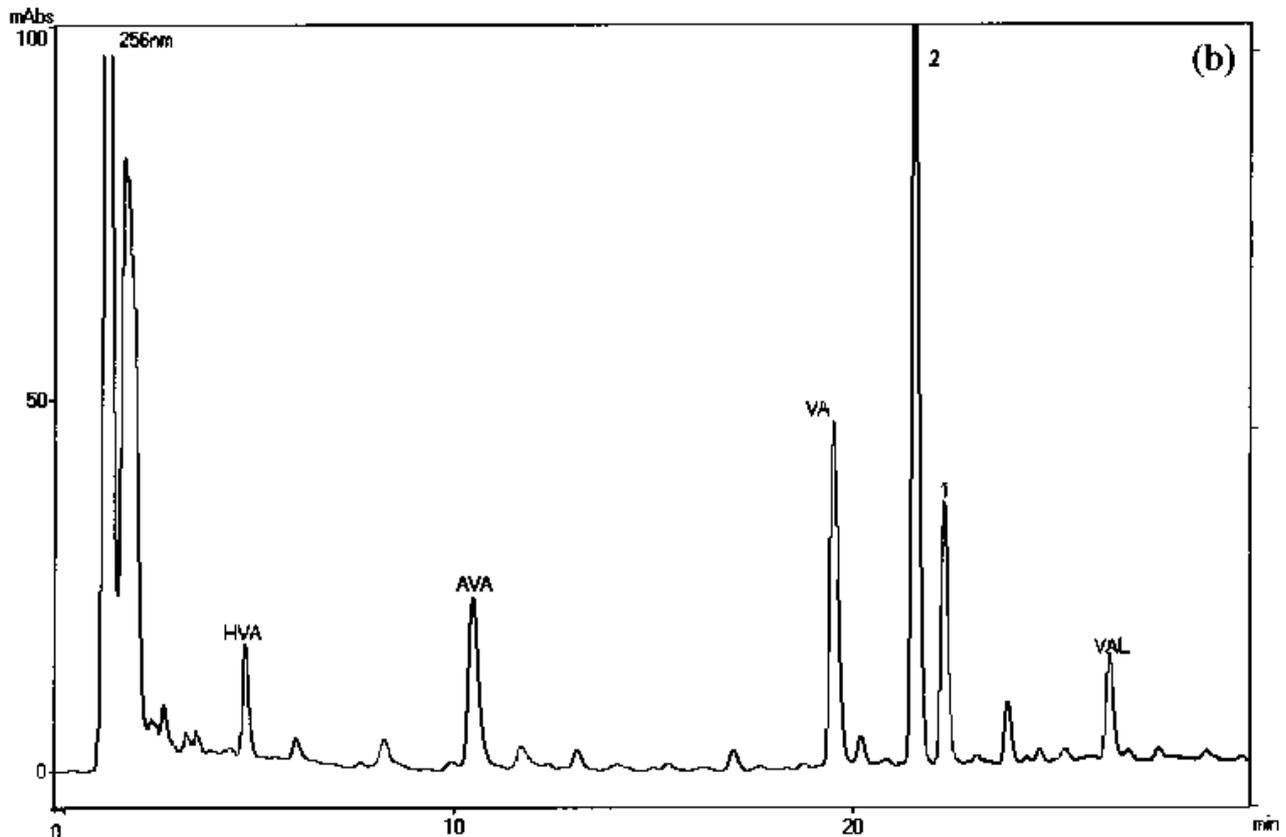


Figura No. 1 Cromatograma por HPLC de *V. officinalis*, donde se encuentran presentes . Acevaltrato (3), isovaltrato (2), valtrato (1), ácido hidroxivalerénico (HVA), ácido acetoxivalerénico (AVA), ácido valerénico (VA) y valerenal (VAL).

Todo esto en conjunto proporciona una gran área de superficie, en la cual interaccionan los compuestos acarreados por la fase móvil con la fase estacionaria, produciendo una cromatografía con gran poder de resolución. (10)

6. OBJETIVOS

6.1 General

Determinar la presencia de ácido valerénico o sus derivados, en extractos de hojas y raíz de *V. prionophylla* de dos localidades, mediante la cromatografía líquida de alta resolución.

6.2 Específicos

6.2.1 Estandarizar la metodología de cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de ácido valerénico, ácido hidroxivalerénico y ácido acetoxivalerénico.

6.2.2 Evaluar el ácido valerénico y sus derivados, presentes en los extractos de hojas y raíces.

6.2.3 Cuantificar el ácido valerénico y los derivados identificados y establecer las diferencias entre la Valeriana cultivada y silvestre.

7. HIPOTESIS

7.1 Alterna

El perfil fitoquímico de ácido valerénico y sus derivados, presente en *V. prionophylla* evaluado por cromatografía líquida de alta resolución, difiere entre la Valeriana cultivada y silvestre.

La cantidad de ácido valerénico o sus derivados presentes en *V. prionophylla*, evaluados por cromatografía líquida de alta resolución, difiere entre la Valeriana cultivada y silvestre.

7.2 Nula

El perfil fitoquímico de ácido valerénico y sus derivados, presente en *V. prionophylla*, evaluado por cromatografía líquida de alta resolución, es similar en la Valeriana cultivada y silvestre.

La cantidad de ácido valerénico o sus derivados presentes en *V. prionophylla*, evaluados por cromatografía líquida de alta resolución, es similar entre la Valeriana cultivada y la de procedencia silvestre.

8. MATERIALES Y METODOS

8.1 Universo

Especie de *Valeriana prionophylla* en Guatemala.

8.2 Muestra

Especímen de *Valeriana prionophylla* cultivada en la aldea Vista Hermosa, Municipio de Tacaná, Departamento de San Marcos y especímenes silvestres recolectados en el Cerro Raxquim, a 3,221 msnm, coordenadas 14° 44'54'' y 91° 23'31'', Aldea Parraxquim, Totonicapán.

8.3 Materiales

Percolador plástico

Columna ZORBAX Eclipse XDB-C 18, 4.6 x 250 mm, 5 μ m,

Agilent technology. No. Parte 990967-902

Gasa de uso médico

Balón aforado de 50 ml

Balones volumétricos de 10 ml

Erlen-meyer de 50 ml

Probeta de 50 ml

Pipeta automática de volumen variable 5.0-100.0 ml

Filtros de 0.45 μ m

Jeringas descartables de 3 ml

Jeringa para inyección tipo HPLC de 100 μ l

Frascos plásticos color ámbar de 50 ml

Cuchillo

Piocha

Bolsas de polipropileno negras de 25 libras

8.4 Equipo

Equipo de cromatografía líquida de alta resolución marca Hewlett

Packard Serie 1050, con Integrador HP 3396 Serie II y Detector ultravioleta
Balanza analítica marca Ohaus
Balanza de humedad marca Ohaus
Horno de secado
Secador de material vegetal con bandejas plásticas de secado

8.5 Reactivos

Metanol absoluto grado reactivo
Metanol absoluto grado HPLC
Agua destilada
Agua grado HPLC
Estándar de Acido acetoxivalerénico grado HPLC
Estándar de Acido hidroxivalerénico grado HPLC
Estándar de Acido valerénico grado HPLC

8.6 Métodos

8.6.1 Recolección de material vegetal

- Seleccionar los especímenes con mejores características de desarrollo floral
- Introducir el pico de una piocha 10-20 cms en el suelo, por debajo de la planta seleccionada, y con un movimiento de palanca extraerla completamente.
- Inmediatamente introducir la raíz de la planta en una bolsa plástica gruesa y atar a nivel del tallo, formando un empaque hermético.

8.6.2 Lavado, desinfección y secado de hojas

- Seleccionar y cortar las hojas de mejor aspecto y constitución.
- Lavar 3 veces con agua destilada.
- Lavar una vez más con agua conteniendo hipoclorito de sodio (10 gotas de hipoclorito por 1 litro de agua).
- Colocar en bandejas plásticas de secado una hoja contigua a la otra sin apilarlas.

8.6.3 Lavado, desinfección y secado de raíces

- Seleccionar y cortar las raíces de mejor aspecto

- Lavar vigorosamente las raíces con agua destilada y un cepillo fino, eliminando tierra, impurezas y materia extraña
- Lavar una vez más con agua conteniendo hipoclorito de sodio (10 gotas de hipoclorito por 1 litro de agua)
- Con un cuchillo bien afilado, cortar longitudinalmente las raíces en hojuelas lo más delgadas posibles
- Colocar las hojuelas en bandejas plásticas de secado una contigua a otra sin apilarlas.

8.6.4 Determinación de humedad

- Utilizando una balanza de humedad, colocar 1 g de droga vegetal y determinar la humedad
- Si la humedad es mayor al 10 %, secar en horno eléctrico por 30 min a 40 °C
- Determinar nuevamente la humedad relativa

8.6.5 Extracción por percolación de raíces y hojas de *V. prionophylla*

- En un percolador limpio y seco, colocar en la parte inferior un trozo de algodón; seguidamente colocar papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador
- Pesar 2 g de polvo fino de hojas ó raíces de *V. prionophylla*
- Humedecer el material vegetal con 5 ml de alcohol metílico absoluto grado reactivo
- Transferir todo el material vegetal al percolador y agregar metanol absoluto hasta ajustar 30 ml
- Dejar reposar por 24 horas.
- Abrir la llave de la parte inferior y dejar gotear el líquido a una velocidad adecuada
- Recoger el extracto en un beaker, añadir suficiente disolvente extra, según se requiera, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio (30 ml)
- El material sólido que ha quedado, se presiona fuertemente y el líquido obtenido se añade al percolado obtenido anteriormente(11)

8.6.6 Cromatografía líquida de alta resolución

Para el análisis cuantitativo se utiliza una modificación del método de Hänsel y Schulz (12); ésta consiste en utilizar el proceso de extracción por percolación con metanol absoluto durante 24 hrs, lo que

provee una buena separación del ácido valerénico, ácido acetoxivalerénico, ácido hidroxivalerénico y el aldehído valeranal.

La determinación exacta de éstos componentes debe realizarse mediante la utilización de estándares (ácido valerénico, ácido acetoxivalerénico y ácido hidroxivalerénico) y el cálculo de los coeficientes de extinción propio de cada compuesto.(13)

8.6.6.1 Preparación de los estándares.

Pesar 5 mg de cada uno de los estándares y colocar en un matraz volumétrico de 100 ml. Diluir con una solución de metanol:agua (80:20). Los estándares serán almacenados en viales color ámbar y bajo condiciones de refrigeración.(13)

8.6.6.2 Condiciones cromatográficas

Columna	C-18, 5µm, 4.6 x 250 mm
Fase móvil	Metanol: Agua (80:20) con ácido fosforico 0.5 % v/v
Tasa de flujo	1.0 ml/min
Detección UV	255 nm
Volumen de inyección	20 µl
Tiempo de corrida	15 min
Orden de elusión	A. hidroxivalerenico, A. acetoxivalerénico, A. valerénico y valeranal.

8.6.6.3 Cálculos

Calcular el porcentaje de ácido valerénico o ácidos valerénicos totales utilizando la siguiente fórmula:

$$100 V (C/W)(r_u / r_s)$$

Donde:

V= volumen en ml utilizado en la preparación de la muestra

C= concentración en mg/ml de la solución estándar

W= peso en mg de la valeriana utilizada para preparar la muestra

r_u= pico de la muestra

r_s=pico de la solución estándar (13)

9. RESULTADOS

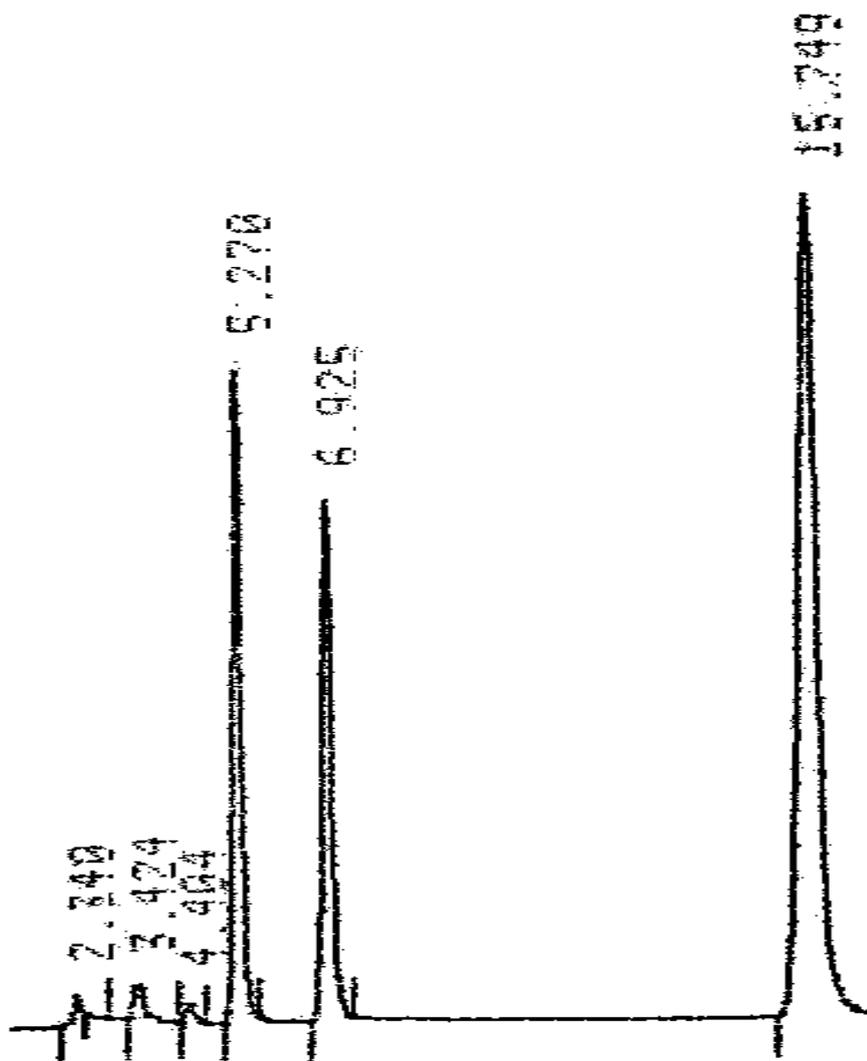


Figura 2. Cromatograma de los estándares de A. valerénico, hidroxivalerénico y acetoxivalerénico

Inicialmente se procedió a estandarizar la metodología de cromatografía líquida de alta resolución, obteniéndose el perfil cromatográfico de los estándares de ácido hidroxivalerénico, ácido acetoxivalerénico y ácido valerénico, los cuales presentan tiempos de retención de 5.270, 6.925 y 15.749 min , respectivamente.

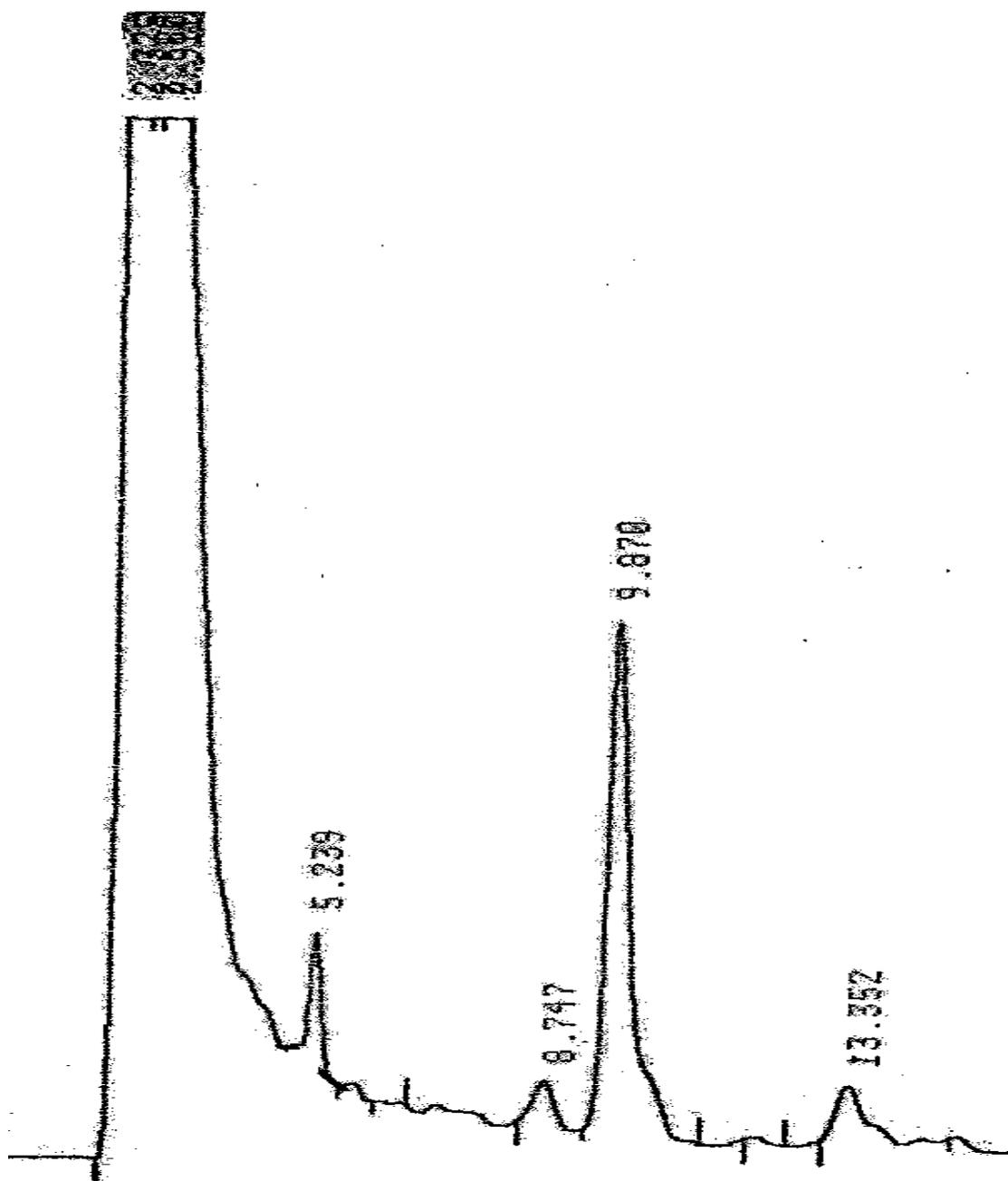


Figura 3. Cromatograma de hoja de *V. prionophylla* del Depto. de San Marcos

El cromatograma correspondiente al extracto de hojas de *V. prionophylla*, proveniente del Departamento de San Marcos, Fig. 3 presenta un pico definido a un tiempo de retención de 5.239 min, el cual corresponde al ácido hidroxivalerénico. El área bajo la curva de éste es de 224,342, equivalente a 0.015 g / 100 g en base seca. Se observa la ausencia de picos correspondientes a los tiempos de retención del ácido valerénico ó acetoxivalerénico.

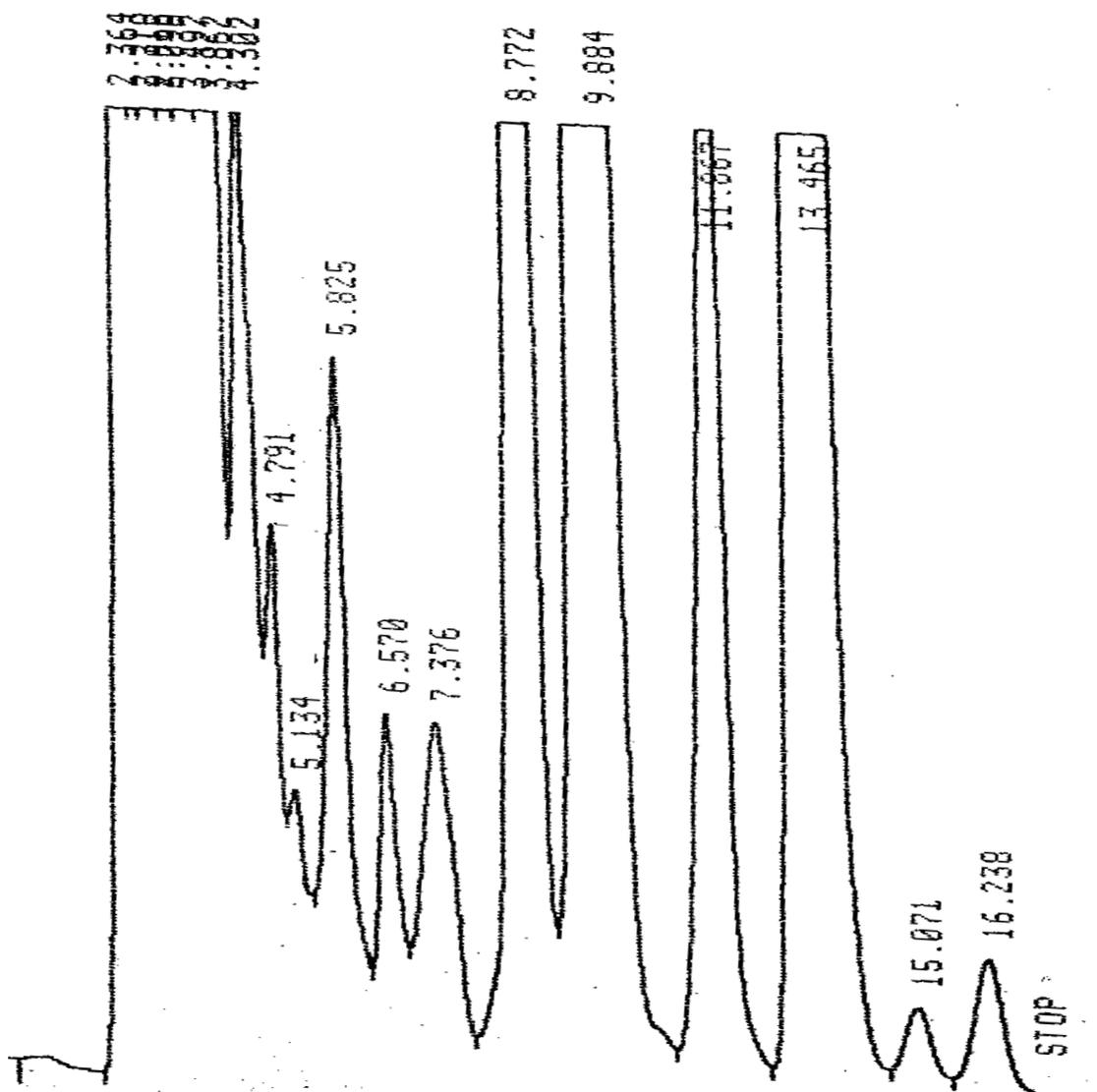


Figura 4. Cromatograma de raíz de *V. prionophylla* del Depto. de San Marcos

El extracto metanólico de raíz de *V. prionophylla* proveniente del Depto. de San Marcos, Fig. 4, presenta picos cromatográficos con tiempos de retención de 5.134 y 15.071 min, correspondientes al ácido hidroxivalerénico y valerénico respectivamente. Las áreas bajo la curva de éstos son de 298,764 y 986,323, y equivalen a un contenido de 0.019 y 0.052 g / 100 g en base seca, respectivamente.

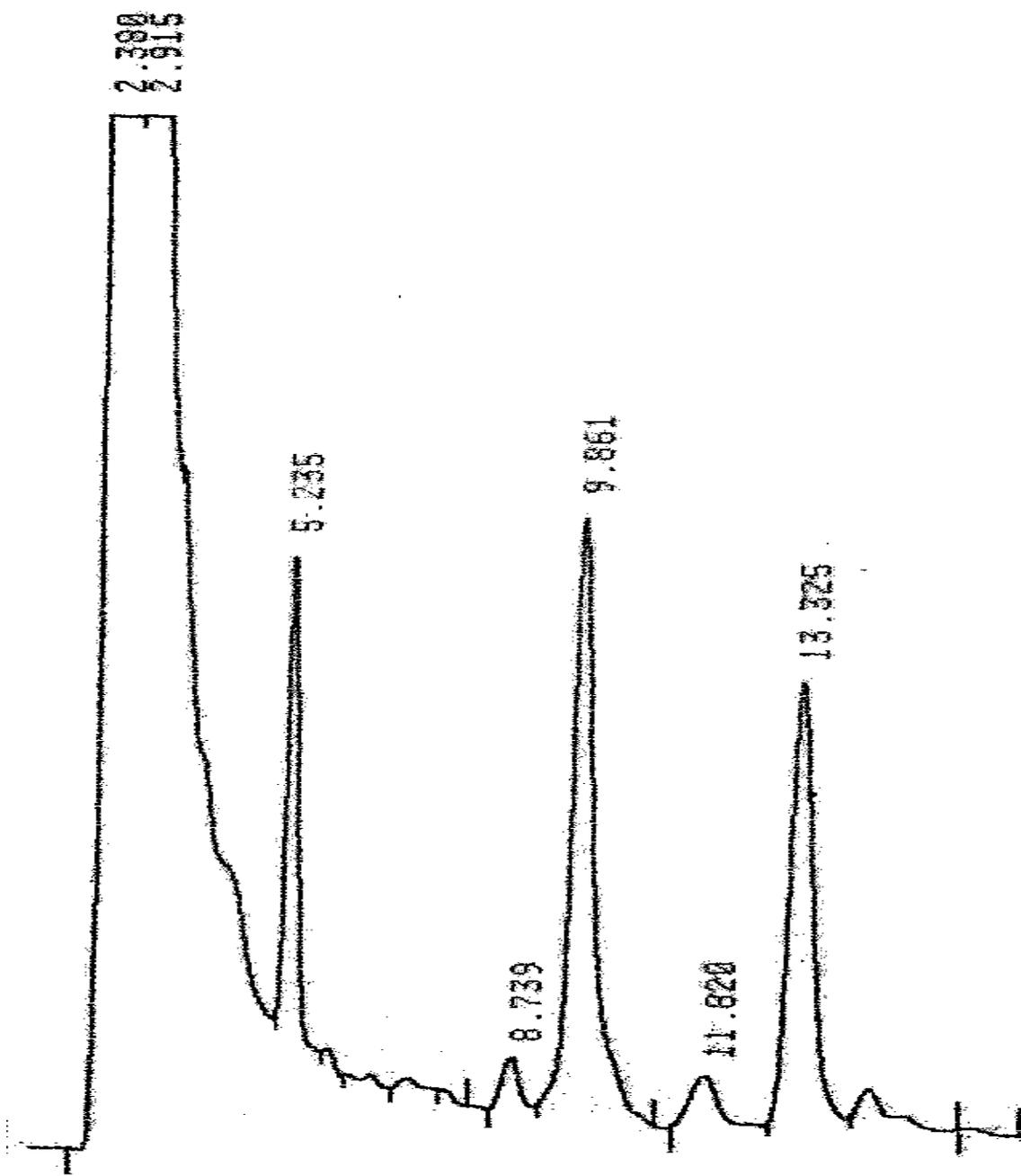


Figura 5. Cromatograma de hojas de *V. prionoophylla* del Depto de Totonicapán

Los picos observados en el cromatograma del extracto de hojas de *V. prionoophylla* provenientes de Totonicapán, Figura 5, evidencian la presencia de ácido hidroxivalerénico, con un tiempo de retención de 5.235 min, y un área bajo la curva de 701,288; está equivale a 0.043 g / 100 g en base seca.

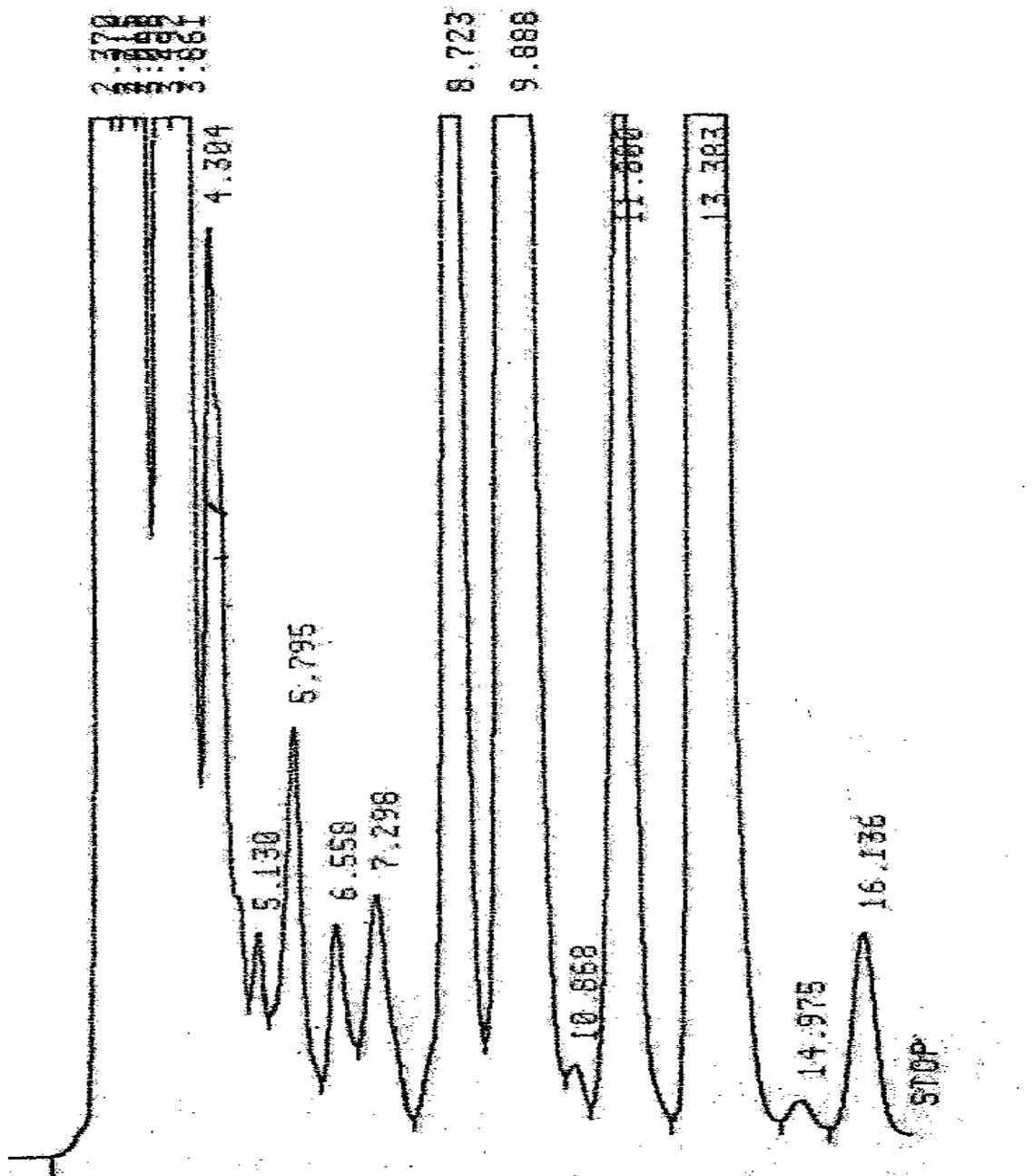


Figura 6. Cromatograma de raíz de *V. prionoophylla* del Depto. de Totonicapán

La raíz de *V. prionoophylla* proveniente del Depto. de Totonicapán, Fig. 6, presenta dos picos, uno a un tiempo de retención de 5.130 y otro a 14.975 min, los que corresponden al ácido hidroxivalerénico y al ácido valerénico. El área bajo la curva es de 378,863 y 308,819, y equivalen a 0.023 g / 100 g y 0.015 g / 100 g en base seca, respectivamente.

De los valores de humedad, peso de muestra, volumen final del percolado (Anexo 4), y área bajo la curva de los picos cromatográficos, se calcula estequiometricamente el contenido de ácido valerénico y sus derivados en gramos por 100 gramos de base seca.

TABLA 10. Contenido en g / 100 g de droga vegetal seca, de sesquiterpenos en muestras de hojas y raíz de *V. prionophylla* de dos localidades

	ÁCIDO VALERÉNICO	ÁCIDO ACETOXI-VALERÉNICO	ÁCIDO HIDROXI-VALERÉNICO
HOJAS <i>V. prionophylla</i> SAN MARCOS	-----	-----	0.015 g / 100 g
RAÍZ <i>V. prionophylla</i> SAN MARCOS	0.052 g / 100 g	-----	0.019 g / 100 g
HOJAS <i>V. prionophylla</i> TOTONICAPAN	-----	-----	0.043 g / 100 g
RAÍZ <i>V. prionophylla</i> TOTONICAPAN	0.015 g / 100 g	-----	0.023 g / 100 g

10. DISCUSION DE RESULTADOS

El proceso de estandarización de la cromatografía líquida de alta resolución para la determinación de ácido valerénico, hidroxivalerénico y acetoxivalerénico, indica que las condiciones cromatográficas establecidas en el presente trabajo de investigación, son adecuadas para la evaluación de éstos sesquiterpenos en muestras de hojas y raíces de *V. prionophylla*.

La metodología de extracción por percolación con metanol absoluto (100 %) grado reactivo como único disolvente, no fue del todo satisfactoria, El análisis cromatográfico de los extractos metanólicos de *V. prionophylla*, evidencian una gran diversidad de constituyentes químicos presentes, principalmente en la raíz, lo que produce traslape y poca definición en los picos cromatográficos.

Por ello, se debe redefinir el proceso de extracción, haciendo énfasis en la utilización de partición con disolventes de diferente polaridad, con lo cual se podrá optimizar el proceso y por ende, la calidad de los picos cromatográficos característicos del ácido valerénico y sus derivados.

Debido a que el ácido valerénico se transforma químicamente en ácido valerénico, ácido acetoxivalerénico, ácido hidroxivalerénico y valerenal, el cálculo del valor de ácido valerénico total (suma de todas las especie químicas) es más representativo de los productos farmacológicamente efectivos en el caso de *Valeriana officinalis* que la determinación única de ácido valerénico. Sin embargo, es de suma relevancia el establecer la presencia de ácido valerénico, ya que podría validar la utilización de las hojas de *Valeriana prionophylla* como droga vegetal, y así aprovechar la actividad sedante atribuida a éste tipo de compuestos.

Las hojas de *V. prionophylla* provenientes del departamento de San Marcos y Totonicapán, no presentan picos cromatográficos de ácido valerénico ó ácido acetoxivalerénico. Esto se podría deber a que la exposición de las hojas al ambiente húmedo en el que habitan éstas plantas, podría favorecer una estructura química y energética más estable, como lo es la forma hidroxilada (ácido hidroxivalerénico).

El pico cromatográfico del ácido hidroxivalerénico se observa claramente en ambas muestras de hoja, conteniendo *V. prionophylla* de origen silvestre (Totonicapán) aproximadamente 3 veces el valor de la de San Marcos. Esto podría deberse a las características genéticas y fenológicas de la planta, la calidad y tipo de suelo, y las condiciones climáticas.

Las raíces de *V. prionophylla* de ambas localidades, presentaron picos cromatográficos indicativos de ácido valerénico e hidroxivalerénico. La raíz de *V. prionophylla* procedente del departamento de San Marcos presenta niveles más altos de ácido valerénico en comparación con la de Totonicapán; la cantidad de ácido hidroxivalerénico presente en la raíz, es similar para ambas localidades. De aquí podemos inferir, que la actividad sedante atribuida a la raíz, sería más pronunciada en la *Valeriana prionophylla* cultivada, ya que en conjunto contiene mayor cantidad de sesquiterpenos que la de origen silvestre.

11. CONCLUSIONES

- 11.1 El procedimiento de extracción por percolación con metanol absoluto grado reactivo, extrae compuestos químicos no deseados, por lo que se debe ensayar con mezclas de disolventes con alta afinidad para el ácido valerénico y sus derivados. En cuanto a las condiciones cromatográficas establecidas, son adecuadas para la evaluación de éstos compuestos en hojas y raíces de *V. prionophylla*, utilizando cromatografía líquida de alta resolución.
- 11.2 La estandarización de la metodología de evaluación de ácido valerénico, acetoxivalerénico e hidroxivalerénico, indica que los picos cromatográficos de dichos compuestos presentan tiempos de retención de 15.7, 6.9 y 5.2 min, respectivamente.
- 11.3 Las hojas de *V. prionophylla* provenientes de las dos localidades evaluadas, presentan únicamente picos cromatográficos correspondientes al ácido hidroxivalerénico, siendo la oriunda del departamento de Totonicapán la que presenta la mayor cantidad de dicho compuesto (0.043 g / 100 g en base seca).
- 11.4 Las raíces de *V. prionophylla* de ambas localidades, presentan picos cromatográficos de ácido valerénico e hidroxivalerénico. El ácido valerénico en las raíces de *V. prionophylla* cultivada es de 0.052 g / 100 g en base seca, tres veces más que la cantidad encontrada en la Valeriana de origen silvestre.
- 11.5 No se evidenció la presencia de ácido acetoxivalerénico en las hojas y raíces de *Valeriana prionophylla*, en las dos localidades estudiadas.

12. RECOMENDACIONES

- 12.1 Ensayar procesos de extracción por partición con disolventes de diferentes polaridades, para asegurar el aislamiento eficaz del ácido valerénico, hidroxivalerénico y acetoxivalerénico.
- 12.2 Evaluar *V. prionophylla* de otros Departamentos de Guatemala, con el fin de establecer los especímenes con mejores propiedades fitoquímicas.

13. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Flora of Guatemala. Field. Bot. U.S.A. 1976;24(11):302-303
2. Houghton PJ. The biological activity of valerian and related plants. Journal of Ethnopharmacology. 1988;22:121-142.
3. Carlini EA. Plants and the central nervous system. Pharmacology, Biochemistry and Behavior. 2003;75:501-512.
4. Khom S. et al. Valerenic acid potentiates and inhibits GABA_a receptors: Molecular mechanism and subunit specificity. Neuropharmacology. 2007;20:1-10.
5. Bos R., Woerdenbag H. and Pras N. Determination of valepotriates. Journal of Chromatography. 2002; 967:131-146.
6. Hobbs C. VALERIAN.U.S.A.: Herbal/Gram, Doc. Tec. No. 21, 1989.
7. Al-Majed A. et al. Studies on the cytological and biochemical effects of valerian in somatic and germ cells of Swiss albino mice. Food and Chemical Toxicology. 2006;44:1830-1837.
8. Fernández S. Sedative and sleep-enhancing properties of linarin, a flavonoid-isolated from *Valeriana officinalis*. Pharmacology, Biochemistry and behavior. 2004;77:399-404.
9. Marder M. et al. 6-Methylapigenin and hesperidin: new valeriana flavonoids with activity on the CNS. Pharmacology, Biochemistry and behavior. 2003;75:537-545.
10. Satyajit D. et al., eds. Natural products isolation, Methods in biotechnology. 2.ed. NJ, U.S.A.: Humana Press, 2006. 515p. (p. 213-231).
11. Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia, Lipronat: Manual de operaciones. Guatemala: Universidad de San Carlos, 2005.
12. Hansel R., Schulz J. Valerensäuren und valerenal als leitstoffe des offizinellen baldrians: bestimmung mittels HPLC technik Dtsch Apoth Ztg. 1982;122:215-219

13. Upton R., ed. American Herbal pharmacopoeia and therapeutic Compendium; Valerian root, *Valeriana officinalis*. Analytical, Quality control and Therapeutic monograph. CA, U.S.A.: American Herbal Pharmacopoeia, 1999. 28p.

ANEXOS

Anexo 1. Fotografías de las diferentes partes de la planta de *Valeriana prionophylla* en estado silvestre.



A. Inflorescencia



B. Plántulas

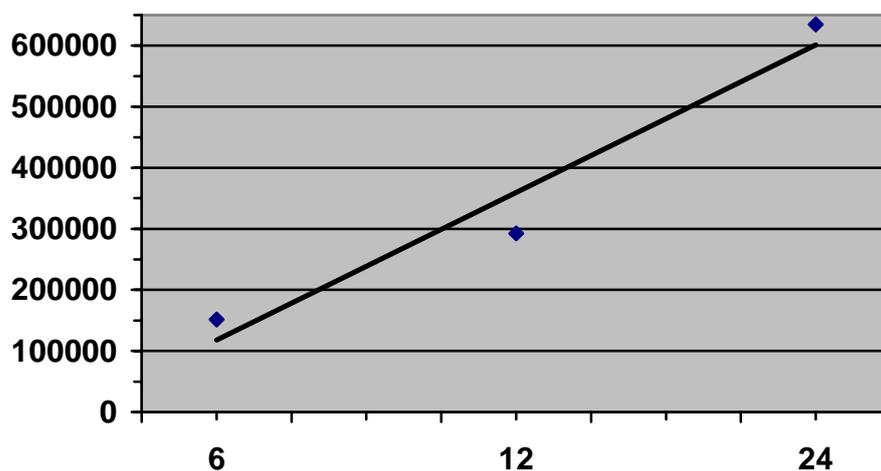


C. Raíz y hojas



D. Tallo floral

Anexo 2. Curva de calibración del standard de Acido hidroxivalerénico, para hojas de *V. prionophylla*, a una atenuación de 4, graficada como área total del pico vrs. concentración del estandard.

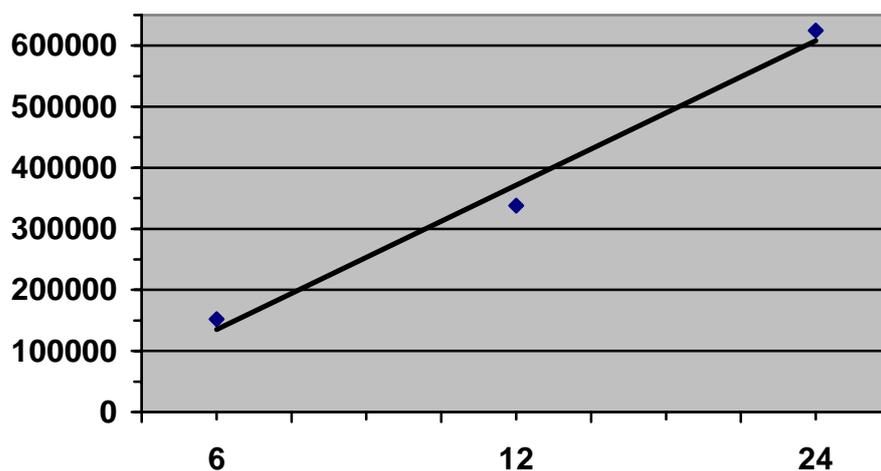


ATENUACIÓN 4	
CONCENTRACIÓN (ug/mL)	ÁREA
6	151,384
12	292,637
24	634,619

INTERCEPTO	-19,607
PENDIENTE	27,082.4048
COEFICIENTE	0.9989763

MUESTRAS	ÁREA	CONCENTRACIÓN (ug/mL)
HOJA V. <i>PRIONOPHYLLA</i> TOTONICAPAN	224,342	9.0076
HOJA V. <i>PRIONOPHYLLA</i> SAN MARCOS	701,288	26.6185

Anexo 3. Curva de calibración del standard de Acido hidroxivalerénico, para raíz de *V. prionophylla*, a una atenuación de 6, graficada como área total del pico vrs. concentración del standard.



ATENUACIÓN 6	
CONCENTRACIÓN (ug/mL)	ÁREA
6	151,965
12	337,900
24	624,781

INTERCEPTO	8,524.5
PENDIENTE	25,930.2976
COEFICIENTE	0.99772407

MUESTRAS	ÁREA	CONCENTRACIÓN (ug/mL)
RAÍZ V. <i>PRIONOPHYLLA</i> TOTONICAPAN	378,863	14.2820
RAÍZ V. <i>PRIONOPHYLLA</i> SAN MARCOS	298,764	11.1930

Anexo 4. Características físicas de las muestras utilizadas y volumen final del extracto obtenido por percolación.

MUESTRA	HUMEDAD DROGA VEGETAL (%)	PESO MUESTRA (g)	PERCOLADO (mL)
HOJA V. <i>PRIONOPHYLLA</i> TOTONICAPAN	5.40	2.0012	30.8
RAÍZ V. <i>PRIONOPHYLLA</i> TOTONICAPAN	7.34	2.0222	30.6
HOJA V. <i>PRIONOPHYLLA</i> SAN MARCOS	7.58	2.0103	30.3
RAÍZ V. <i>PRIONOPHYLLA</i> SAN MARCOS	10.45	1.9967	31.0